

# Odabrani nusproizvodi biljnoga podrijetla kao kozmeceutici

---

**Dobroslavić, Erika**

**Professional thesis / Završni specijalistički**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:472088>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Erika Dobroslavić

ODABRANI NUSPROIZVODI BILJNOGA PODRIJETLA KAO KOZMECEUTICI

Specijalistički rad

Zagreb, Rujan 2022.g.

Poslijediplomski specijalistički studij: Dermatofarmacija i kozmetologija

Mentor rada: prof. dr. sc. Marijana Zovko Končić

Specijalistički rad obranjen je dana 29. rujna 2022.g. na Zavodu za farmakognoziju pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr.sc. Dubravka Vitali Čepo
2. Prof.dr.sc. Marijana Zovko Končić
3. Prof. emmerita Zdenka Kalođera

Rad ima 74 lista.

Ovaj specijalistički rad izrađen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Marijane Zovko Končić.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Marijani Zovko Končić na ukazanom povjerenju i pomoći u obliku stručnih i korisnih savjeta tijekom izrade ovoga rada.

Zahvaljujem svima koji su na bilo koji način uljepšali moj period studiranja na specijalističkom studiju, a najviše svojim roditeljima i Nikši na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju.

## SAŽETAK:

**Cilj istraživanja:** Nusproizvodi vinarstva, proizvodnje maslinova ulja i prerade agruma zbog svojega sastava i mogućnosti ekstrakcije posjeduju potencijal za primjenu u kozmetičkoj industriji. Cilj ovog istraživanja je provesti detaljnu pretragu literature o zabilježenim djelovanjima njihovih ekstrakata na kožu samostalno, ili u sklopu kozmetičkih formulacija.

**Materijali i metode:** Za potrebe pisanja specijalističkog rada pretražene su elektroničke baze ScienceDirect i PubMed. Pregledane su sve publikacije koje su se pojavile kao rezultat pretrage s dostupnim cjelovitim tekstovima, ili u iznimnim slučajevima sažecima. Odabir je ograničen na izvorne radove objavljene na engleskom jeziku s istraženim djelovanjem ekstrakata nusproizvoda na kožu i mehanizme povezane s tim učinkom.

**Rezultati:** Radom su obuhvaćene 52 publikacije, od čega 22 za nusproizvode vinarstva, 18 za nusproizvode proizvodnje maslinova ulja te 12 za nusproizvode prerade agruma. Navedena istraživanja sistematično su obrađena na temelju zabilježenih učinaka. Nusproizvodi vinarstva i proizvodnje maslinova ulja pokazali su anti-aging, antimikrobno i protuupalno djelovanje te djelovanje na zacjeljivanje rana, melanogenezu i povećanje učinkovitosti pripravaka UV zaštite. Komina grožđa, uključujući peteljke, najbolje je istražen dio nusproizvoda vinarstva. Ekstrakti lista masline najbolje su istražen dio nusproizvoda proizvodnje maslinova ulja. Nusproizvodi prerade agruma pokazali su anti-aging, antimikrobno i protuupalno djelovanje te djelovanje na zacjeljivanje rana, melanogenezu i aktivaciju TRPA-1. Ekstrakti lišća različitih vrsta agruma najbolje su istražen dio nusproizvoda prerade agruma.

**Zaključak:** Sve tri vrste nusproizvoda pokazuju potencijal za primjenu u kozmetici kao sastavnice proizvoda različitih namjena. Izražena je potreba za optimiranjem ekstrakcijskih postupaka s fokusom na pojedine skupine bioaktivnih molekula uzimajući u obzir i

sinergijske učinke, kao i za istraživanjem optimalnih oblika dostave koji bi rezultirali maksimalnim iskorištenjem povoljnih djelovanja. Također, nužan je veći broj kliničkih studija s primjenom formuliranih pripravaka s većim brojem ispitanika budući da su brojna djelovanja potvrđena primjenom samostalnih ekstrakata, te *in-vitro*.

## SUMMARY:

**Objective of the research:** By-products of winemaking, olive oil production and citrus processing, due to their composition and well researched extraction possibilities, have the potential for use in the cosmetic industry. The aim of this research is to conduct a detailed literature review on the effects of these by-products' extracts on their own or as a part of cosmetic formulations.

**Materials and methods:** For the purposes of writing this research, the electronic databases ScienceDirect and PubMed were searched. All publications that appeared as a result of the search with available full texts, or in exceptional cases abstracts, were reviewed. The selection was limited to original papers published in English with the investigated effect of by-product extracts on skin and skin-related mechanisms.

**Results:** The paper includes 52 publications, 22 of which are for by-products of winemaking, 18 for by-products of olive oil production and 12 for by-products of citrus processing. These studies have been systematically processed based on the recorded effects. By-products of winemaking and olive oil production have shown anti-aging, antimicrobial and anti-inflammatory effects, as well as effects on wound healing, melanogenesis and increasing the effectiveness of UV protection preparations. Grape pomace, including stalks, is the best researched part of winemaking by-products. Olive leaf extracts are the best researched part of the by-products of olive oil production. Citrus by-products have shown anti-aging, antimicrobial and anti-inflammatory effects, as well as effects on wound healing, melanogenesis and TRPA-1 activation. Leaf extracts of different types of citrus fruits are the best researched part of citrus processing by-products.

**Conclusion:** All three types of by-products show the potential for use in cosmetics as ingredients of products with different purposes. There is a need to optimize the extraction procedures focusing on certain groups of bioactive molecules taking into account possible

synergistic effects, as well as to explore optimal forms of delivery that would result in maximum utilization of the by-products' beneficial properties. Also, clinical studies with the application of formulated cosmetic preparations on larger number of subjects are necessary, since a number of effects have been confirmed mostly on extracts alone and *in-vitro*.



## Sadržaj

1. Uvod i pregled područja istraživanja.....	1
1.1. Pregled nusproizvoda vinarstva.....	1
1.1.1. Komina grožđa.....	2
1.1.2. Lišće vinove loze.....	4
1.1.3. Vinski talog.....	4
1.2. Pregled nusproizvoda proizvodnje maslinova ulja.....	5
1.2.1. Komina maslina.....	6
1.2.2. Otpadna voda iz mlina.....	7
1.2.3. Koštice masline.....	7
1.2.4. Lišće masline.....	8
1.3. Pregled nusproizvoda prerade agruma.....	8
1.3.1. Čvrsti dijelovi.....	10
1.3.2. Otpadne vode od procesiranja.....	12
1.3.3. Lišće agruma.....	12
2. Cilj istraživanja.....	13
3. Materijali i metode- Sustavni pregled saznanja o temi.....	14
3.1. Anti-aging djelovanje.....	14
3.1.1. Nusproizvodi vinarstva.....	15
3.1.2. Nusproizvodi proizvodnje maslinova ulja.....	18
3.1.3. Nusproizvodi prerade agruma.....	20
3.2. Antimikrobno djelovanje.....	21

3.2.1. Nusproizvodi vinarstva.....	22
3.2.2. Nusproizvodi proizvodnje maslinova ulja.....	22
3.2.3. Nusproizvodi prerade agruma.....	24
3.3. Zacceljivanje rana.....	25
3.3.1. Nusproizvodi vinarstva.....	25
3.3.2. Nusproizvodi proizvodnje maslinova ulja.....	27
3.3.3. Nusproizvodi prerade agruma.....	28
3.4. Protuupalno djelovanje.....	29
3.4.1. Nusproizvodi vinarstva.....	29
3.4.2. Nusproizvodi proizvodnje maslinova ulja.....	31
3.4.3. Nusproizvodi prerade agruma.....	32
3.5. Utjecaj na melanogenezu.....	32
3.5.1. Nusproizvodi vinarstva.....	34
3.5.2. Nusproizvodi proizvodnje maslinova ulja.....	35
3.5.3. Nusproizvodi prerade agruma.....	36
3.6. Zaštita od UV zračenja.....	37
3.6.1. Nusproizvodi vinarstva.....	39
3.6.2. Nusproizvodi proizvodnje maslinova ulja.....	40
3.7. Aktivacija TRPA-1 kanala.....	41
4. Rasprava.....	43
5. Zaključci.....	52
6. Popis literature.....	53



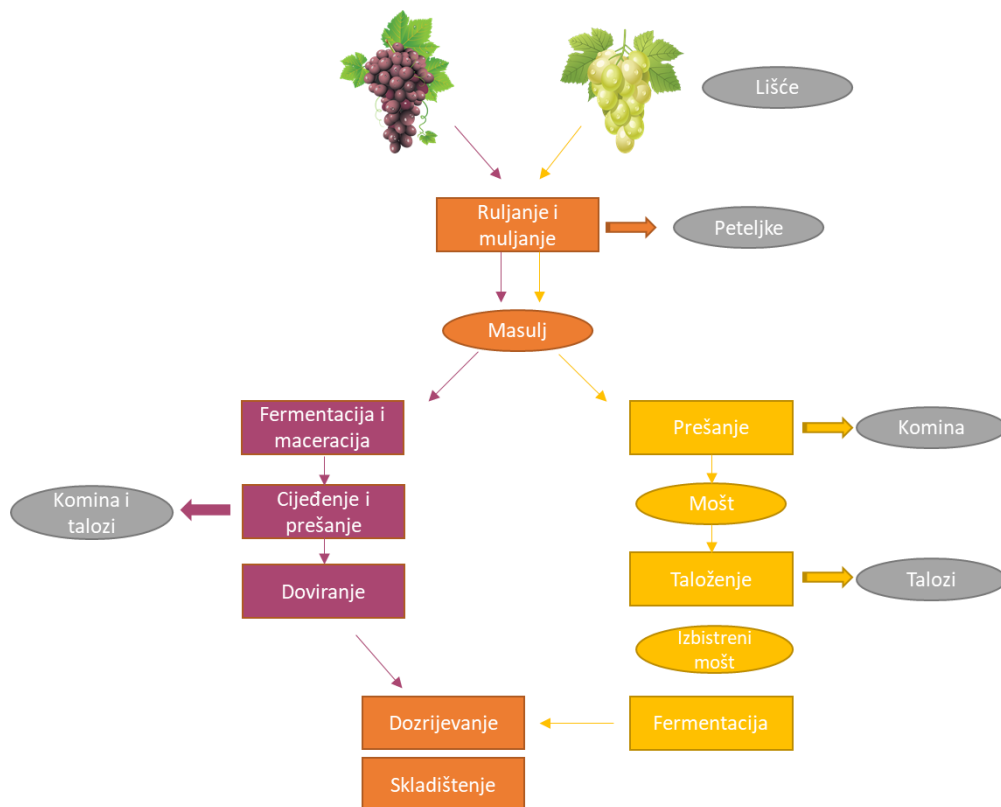
## 1. Uvod i pregled područja istraživanja

U posljednje vrijeme, interes potrošača o sastojcima u kozmetičkim proizvodima i briga o njihovom utjecaju na zdravlje sve je veća. Posljedično, raste i potražnja za proizvodima koji nose oznake "prirodno" i "bio" zbog percepcije o njihovoj većoj kvaliteti (1). Istovremeno je prisutna potreba za održivim rješenjima unutar kozmetičke industrije kako bi se smanjili negativni utjecaji na okoliš i omogućilo ekonomičnije korištenje sredstava (2). Jedan od mogućih pristupa jest korištenje nusproizvoda (organski otpad) prehrambene industrije u svrhu dobivanja kozmeceutika (kozmetički proizvodi s aktivnim sastojcima koji polučuju učinke slične lijekovima i čija je svrha poboljšati izgled i funkciju kože djelovanjem na različite problematike) (3), budući da u njima zaostaje značajna količina bioaktivnih molekula (4). Implementacijom takvog modela kružne ekonomije značajno bi se reducirala količina bio-otpada i posljedični troškovi zbrinjavanja u prehrambenoj industriji (5). Kozmetička industrija bi profitirala uslijed smanjene potrebe za uzgojem biljaka u svrhu dobivanja sastojaka svojih proizvoda, čime bi se također smanjili negativni učinci na okoliš izazvani eksploatacijom poljoprivrednih zemljišta (6). Budući da je u Republici Hrvatskoj, kao i na ostatku Mediterana, prisutna tradicija vinarstva, proizvodnje maslinova ulja i uzgoja agruma, a posljedično nastaju i veće količine nusproizvoda tih industrija, važno je procijeniti njihov potencijal za primjenu u kozmetičkoj industriji kako bi se mogla razvijati nova, održiva rješenja.

### 1.1. Pregled nusproizvoda vinarstva

Na godišnjoj razini, u svijetu se uzgoji 210 milijuna tona grožđa (*Vitis vinifera* L., Vitaceae), od čega 15% za vinarstvo (7). Procijenjena godišnja količina nusproizvoda proizvodnje vina samo u Europi iznosi  $14,5 \times 10^6$  tona (8). Navedeni nusproizvodi uključuju otpadne vode, emisiju stakleničkih plinova, anorganski otpad (dijatomejska zemlja, bentonit) te u najvećoj mjeri organski otpad, odnosno kominu grožđa (sjemenke, pulpa, pokožica) s

peteljka i lišćem koji obiluju različitim bioaktivnim molekulama, osobito polifenolnim spojevima (9). Interes za primjenom komine grožđa u izolaciji funkcionalnih sastojaka za farmaceutsku, prehrambenu i kozmetičku industriju proizlazi djelomično iz poteškoća kod primjene u agronomiji u obliku hrane za stoku (intolerancija životinja na određene sastojke poput neprobavljivih trijeslovina) i gnojiva (fitotoksičnost i antimikrobno djelovanje polifenola umanjuje željeni učinak) (10). Proces proizvodnje vina (vinifikacija) složen je te uključuje nekoliko faza u kojima nastaju nusproizvodi. Osnovna shema procesa proizvodnje vina (11) prikazana je na slici 1.



Slika 1. Faze proizvodnje vina i nastanak nusproizvoda

### 1.1.1. Komina grožđa

Komina grožđa je otpad iz vinarije koji zaostaje nakon prešanja. Komina grožđa uključuje kožicu, ostatak pulpe, sjemenke te ovisno o definiciji i peteljke. Količina nastale groždane komine ovisi o sorti i procesu prešanja, kao i o koracima fermentacije. Prema

studijama, ta se količina kreće između 20-30% originalne mase grožđa (12). Peteljke se mogu, ali ne moraju uklanjati, ovisno o sorti i željenom sastavu vina, budući da one sadržavaju visoke koncentracije trijeslovina (13). Kod proizvodnje crnog vina, mošt i komina su oboje uključeni u proces fermentacije. Prisustvo kožice omogućuje prijelaz antocijana u vino koji su zaslužni za boju vina. Kod proizvodnje bijelog vina, komina nije uključena u proces fermentacije, već se fermentira samo mošt nakon procesa prešanja (12). Zbog toga, komina iz proizvodnje bijelog vina sadrži veću količinu pulpe i nefermentiranih šećera (14). Budući da proces proizvodnje vina prije nastanka komine ne uključuje značajne kemijske promjene bioaktivnih sastojaka (tijekom fermentacije događaju se promjene na ugljikohidratima), većina tih spojeva ostaje sačuvana. Prema Dwyer i suradnicima (2014) (12), 70% fenolnih spojeva ostaje u komini nakon procesiranja što predstavlja potencijal za ekstrakciju sastojaka za razvoj visokovrijednih proizvoda uzimajući u obzir široko istraženi raspon njihovih bioloških aktivnosti (15). Fenolni spojevi nađeni u grožđu mogu se podijeliti u nekoliko glavnih skupina: fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne), jednostavni flavonoidi (katehini (flavan-3-oli), flavonoli i antocijani (crno grožđe)), složeni flavonoidi (trjeslovine i proantocijani) te neflavonoidi poput stilbena (resveratrol i viniferin) (16,17). Različite tehnike ekstrakcije koje za cilj imaju postizanje maksimalnih prinosa i kvalitete ekstrahiranih fenolnih spojeva iz komine grožđa detaljno su opisane u radu Moro i suradnika (2021)(18).

Kožica grožđa sačinjava oko 65% ukupnog materijala groždane komine i njen sastav značajno varira ovisno o sorti vina. Generalno, oko 30% kožice sačinjavaju neutralni polisaharidi, 20% pektin, 15% fenolni spojevi te <5% strukturni proteini. Sjemenke čine 38-52% ostatka suhe tvari komine, a sadrže otprilike 40% vlakana, 10-20% lipida, 10% proteina, kompleksnih fenola, kao i šećera i minerala. Netopljive frakcije, pretežno celuloza i pektin čine 80% nešećerne suhe tvari. Sjemenke su uglavnom cijenjene zbog nutritivne vrijednosti

ulja bogatog nezasićenim masnim kiselinama (oleinska i linolna) s niskim udjelom zasićenih masnih kiselina te bogatog ostatka polifenola nakon ekstrakcije ulja (19). Najbolji način za izolaciju ulja iz sjemenki je hladno prešanje zbog zadržavanja visoke antioksidacijske aktivnosti, no zbog relativno malog sadržaja ulja u sjemenkama najčešće se primjenjuju otapala pri povišenim temperaturama što uzrokuje gubitke termolabilnih spojeva i sveukupno lošijom kvalitetom ulja. Nove metode za dobivanje ulja koje se istražuju uključuju primjenu pulsirajućeg električnog polja i ekstrakciju pri povišenom tlaku (16). Sjemenke također sadrže vitamin E u rasponu od 10-530 mg kg<sup>-1</sup> ulja koji je čest sastojak u kozmetičkim proizvodima zbog izrazitog antioksidacijskog djelovanja (16). Udio peteljki varira između 1,4 i 7% ukupnog materijala groždane komine. Udio vlage u peteljkama najčešće je u rasponu 55-80%, ovisno o varijetetu grožđa, dok u alkoholu netopivi dijelovi sačinjavaju u prosjeku 71% suhe tvari uz izostanak razlike između bijelog i crnog grožđa (20). Udio fenolnih spojeva u peteljci procjenjuje se na 5,8% suhe tvari, a glavni predstavnici su proantocijani, flavan-3-oli, stilbeni i fenolne kiseline (21,22).

#### 1.1.2. Lišće vinove loze

Lišće vinove loze manje je istražen dio organskog otpada vinarstva, a dostupna istraživanja pokazuju prisutnost širokog raspona bioaktivnih molekula uključujući organske kiseline, lipide, enzime, vitamine, karotenoide, terpene, šećere i fenolne spojeve (23,24). Od fenolnih spojeva, najzastupljeniji (80%) su flavonoli (u najvećoj mjeri glikozidi kvercetina) spojevi s antioksidacijskim i protuupalnim učinkom (16,25).

#### 1.1.3. Vinski talog

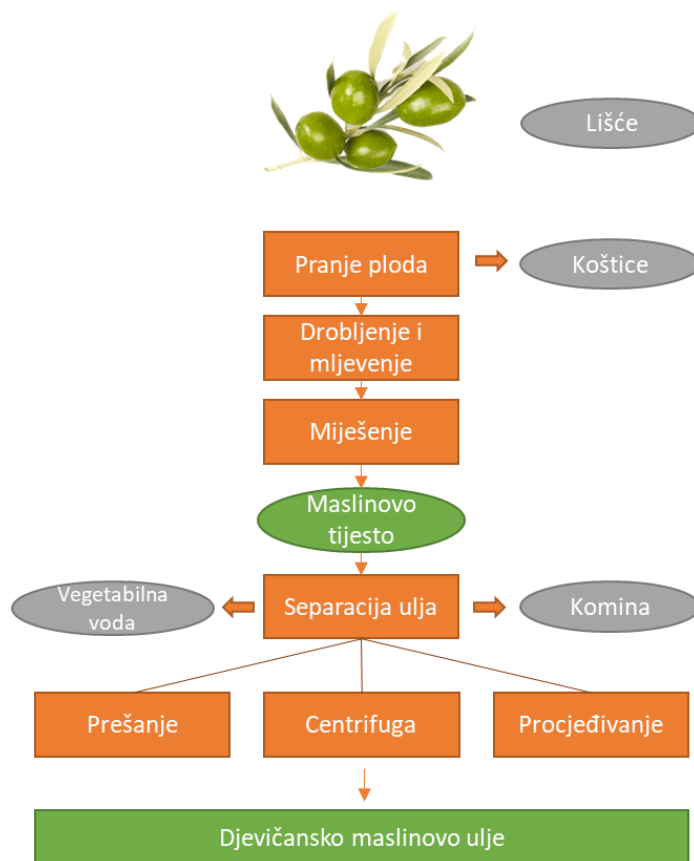
Vinski talog je relativno slabo istražen dio nusproizvoda vinarstva, a podrazumijeva ostatke na dnu spremnika nakon fermentacije i tijekom skladištenja vina, kao i ostatke nakon filtracije i centrifugiranja. Glavni sastojci taloga su mikroorganizmi (kvasac), vinska kiselina,

fenolni spojevi i anorganske tvari (26). Talog je od iznimne važnosti u vinifikacijskom procesu jer interakcija s polifenolnim spojevima utječe na boju i organoleptička svojstva vina (27). Također, enzimi iz taloga omogućuju hidrolizu i transformaciju polifenola u visokovrijedne fenolne spojeve kao što je galna kiselina koji tijekom maceracije prelaze u vino, iako značajne količine zaostaju i u talogu. Procijenjena koncentracija fenolnih spojeva u vinskom talogu iznosi 50 mg GAE g<sup>-1</sup> suhe tvari (28), a najzastupljenije su trijeslovine, građene uglavnom od jedinica katehina čiji udio, ovisno o sorti, varira između 50-62% (29). Potvrđena je antioksidacijska aktivnost ekstrakata polifenolnih spojeva iz vinskog taloga (30), a velika prednost je lakša mogućnost ekstrakcije u usporedbi sa sjemenkama i kožicom koje zahtijevaju procese sušenja i više koraka predekstrakcijske obrade (29).

## 1.2. Pregled nusproizvoda proizvodnje maslinova ulja

2018. godine, u Europskoj Uniji uzgojeno je 12,9 milijuna tona ploda masline (*Olea europaea* L., Oleaceae) za potrebe proizvodnje maslinova ulja (31), od koje u uljarama godišnje nastane 9,6 milijuna tona komine masline (32). Osim komine, nusproizvodi proizvodnje maslinova ulja uključuju lišće, koštice i vodu iz ploda za koje se pokazalo kako sadrže široku lepezu bioaktivnih molekula s različitim djelovanjima (33). Faze procesa proizvodnje maslinova ulja (34) prikazane su na slici 2.





Slika 2. Faze proizvodnje maslinova ulja i nastanak nusproizvoda

### 1.2.1. Komina maslina

Komina maslina glavni je nusproizvod procesa proizvodnje maslinova ulja, a sastoji se od kožice masline, pulpe i koštica. Od 100 kg maslina dobije se 35-40 kg komine. Glavne komponente komine su različiti polisaharidi (pektinski polisaharidi, celuloza i polimeri hemiceluloze bogati ksilanima i glukoronoksilanima, ksiloglukani) koji potencijalno mogu imati ulogu u poboljšanju fizikalnih i reoloških svojstava (hidracija, viskoznost, oksidacijska stabilnost) u kozmetičkim formulacijama (35). Također, komina sadrži 2-3% zaostalog maslinova ulja te različite peptide, proteine, masne kiseline, pigmente i polifenolne spojeve među kojima se ističu hidroksitirozol i oleuropein (36). Oleuropein je spoj koji se sastoji od elenolne kiseline, glukoze i hidroksitirozola, a pripada skupini sekoiridoida (spojeva sličnih kumarinu). Intenzivne znanstvene studije provedene ne oleuropeinu potvrdile su brojne

učinke poput antioksidacijskog, protuupalnog i antimikrobnog (37). Skvalen je ugljikovodik koji se također nalazi u komini masline. Većina skvalena se dobiva iz maslinova ulja, a ima primjenu u kozmetičkoj industriji ponajviše zbog antioksidacijskih i emolijentnih svojstava (37).

### 1.2.2. Otpadna voda iz mlina

Otpadna voda iz mlina je blago kisela tekućina čiji sastav kvantitativno i kvalitativno varira ovisno o sorti masline, klimatskim uvjetima, načinu skladištenja i ekstrakcijskom procesu u proizvodnji ulja. Osim vode (83-92%), sadrži i šećere, lipide, pektine te polialkohole i fenolne spojeve (u najvećem udjelu oleuropein i hidroksitirozol) koji mogu imati fitotoksične učinke (33), te stoga predstavljaju rizik u zagađenju okoliša. Otpadna voda iz mlina također sadrži značajne količine dušika, fosfora, kalija i magnezija (38). Mineralne tvari sačinjavaju približno 18% prirodnih hidratizirajućih faktora koji se nalaze u korneocitima i generiraju osmotsku silu koja privlači vodu i održava rožnati sloj kože hidriranim, što otpadnoj vodi iz mlina daje potencijal za primjenu u kozmetičkim formulacijama namijenjenima hidrataciji kože. Izolacija bioaktivnih spojeva iz otpadne vode zahtjevan je proces, a do sada su istraživani procesi poput membranske separacije i esterifikacije hidroksitirozola (33). Obećavajućom se pokazala metoda sušenja raspršivanjem u kojoj se primjenom različitih nosača (npr. arapska guma, maltodekstrin) raspršivanjem otpadne vode na visokim temperaturama u za to predviđenim uređajima proizvode prahovi gdje bioaktivne molekule bivaju uklopljene u zaštitni sloj nosača (39). Budući da takav proces zahtijeva značajna inicijalna ulaganja, upitna je ekonomičnost njegovog provođenja u industrijskim razmjerima.

### 1.2.3. Koštice masline

Koštice masline sastoje se od drvenog endokarpa i sjemenke te se u proizvodnji ulja najčešće uklanjaju zdrobljene nakon separacije ulja. Drveni dio sadrži celulozu (28,1-40,4%), hemicelulozu (18,5-32,2%), lignin (25,3-27,2%) i značajne količine proteina koji sadrže sve esencijalne aminokiseline, dok je ulje sjemenki bogato polinezasićenim masnim kiselinama (najviše linolne), uz mali udio fenolnih spojeva koji su prisutni u plodu masline (hidroksitirozol, oleuropein) (37). Unatoč vrijednom sastavu, koštice se najviše koriste kao izvor energije i biosorbent, za dobivanje fenol-formaldehidne smole te kao dodatak prehrani u stočarstvu (33).

#### 1.2.4. Lišće masline

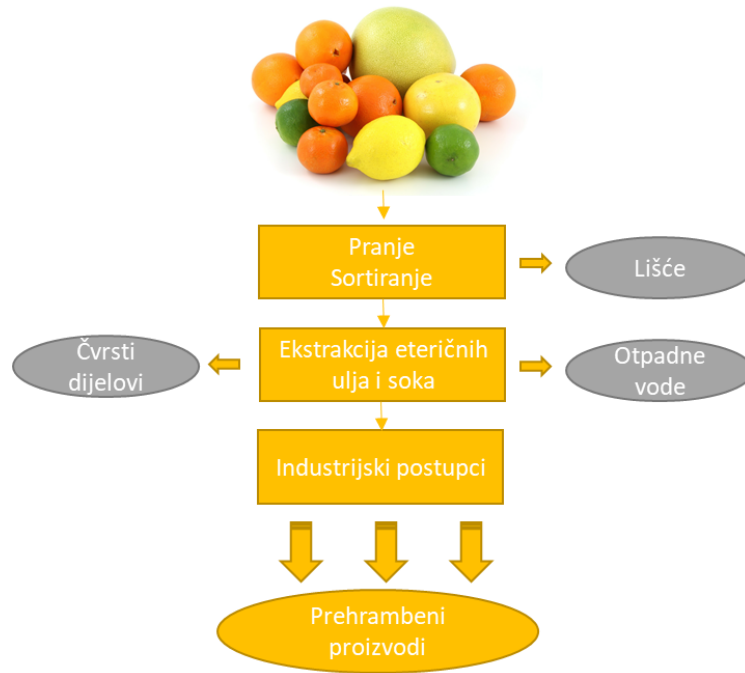
Lišće masline može sačinjavati čak 10% mase sirovog materijala koji stigne u uljaru (40). Tradicionalno se koristilo u narodnoj medicini za tretiranje različitih problema s gastrointestinalnim, dišnim i urogenitalnim traktom, ali i za liječenje kožnih bolesti (41). Ovi pozitivni učinci se u velikoj mjeri mogu pripisati visokom udjelu različitih fenolnih spojeva (flavonoli, flavan-3-oli, sekoiridoidi, flavoni, fenolne kiseline) (42) i polinezasićenih masnih kiselina gdje, za razliku od ulja, ne dominira oleinska nego linolenska masna kiselina u udjelu 34-41%. Osim navedenih, lišće također sadrži i mineralne tvari, u prvom redu željezo i bakar, proteine (5-13%) i ugljikohidrate (28%), od čega 7% vlakana (33). Ekstrakti lišća masline dobiveni različitim tehnikama pokazali su širok spektar bioloških djelovanja uključujući antioksidacijsko, antibakterijsko, antifungalno i protuupalno (41).

### 1.3. Pregled nusproizvoda prerade agruma

2016. godine, u svijetu je uzgojeno 124 milijuna tona agruma, od čega je 23,54 milijuna tona procesirano u prehrambenoj industriji što je rezultiralo s oko 13 milijuna tona nusproizvoda (43). Nusproizvodi prerade agruma uključuju lišće, čvrste dijelove (kora i pulpa, sjemenke, membrane), otpadne vode od pranja i konzerviranja te otpadne vode od

destilacije (melasa, limunska kiselina, ostatci eteričnih ulja, pektin) (44) koji se djelomično zbrinjavaju kompostiranjem, termolizom, spaljivanjem i sl. U najvećoj mjeri, kao što je slučaj i s nusproduktima vinarstva i proizvodnje maslinova ulja, završavaju ispuštanjem i odlaganjem u okoliš. Takav način zbrinjavanja nusproizvoda, osim narušavanja ravnoteže u okolišu, rezultira ekonomskim gubicima zbog čega se postojeći sustav smatra neodrživim te je od iznimnoga značaja pronaći im industrijsku namjenu u obliku proizvoda dodane vrijednosti (45).

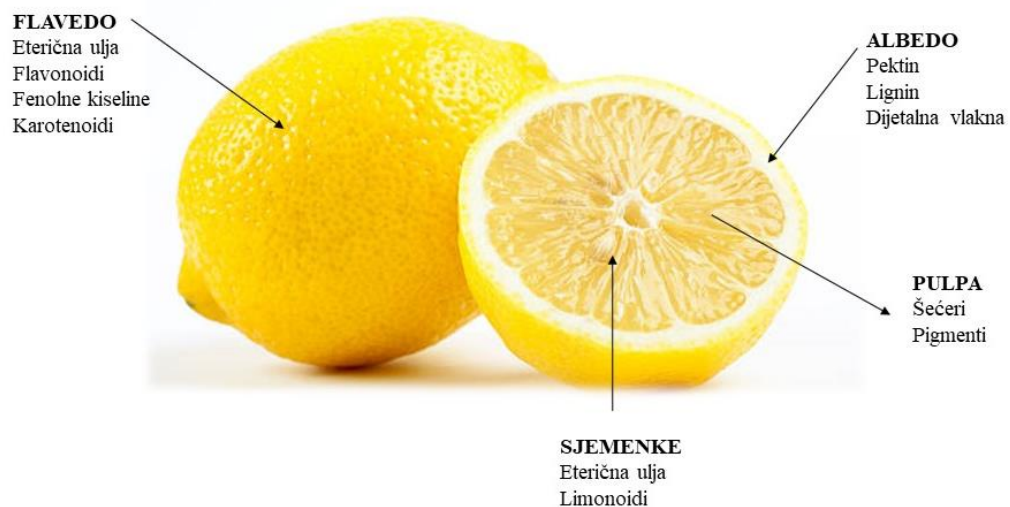
Najzastupljeniji predstavnici agruma, odnosno voća roda *Citrus* (Rutaceae) su slatka naranča (*C. sinensis* (L.) Osbeck) koja se uzgaja u više od 100 zemalja u svijetu, mandarina (*C. reticulata* Blanco), limun (*C. limon* (L.) Osbeck), limeta (*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle) i grejpfrut (*C. paradisi* Macfad). U manjoj mjeri zastupljeni su ljuta naranča (*C. × aurantium*), četrun (*C. medica* L.) i pomelo (*C. maxima* (Burm.) Merr.) (44). Glavni proizvod prerade citrusnog voća je koncentrirani voćni sok, dok ostali proizvodi uključuju marmelade, džemove, pekmeze, arome iz eteričnih ulja te vlakna i pektine ekstrahirane iz ostataka u proizvodnji (46). Osnovna shema nastanka citrusnih nusproizvoda (46) prikazana je na slici 3.



Slika 3. Proces dobivanja proizvoda od agruma i nastanak nusproizvoda

### 1.3.1. Čvrsti dijelovi

Čvrsti dijelovi nusproizvoda od prerade agruma uključuju koru (40-55%), membrane (30-35%) i sjemenke (<10%). Na slici 4 prikazana je anatomija ploda agruma uz naglašene prisutne spojeve u pojedinim dijelovima, prema podacima iz (43).



Slika 4. Anatomija ploda agruma i prisutne komponente

Čvrsti dijelovi nusproizvoda prerade agruma obiluju eteričnim uljima (većinski u kori, dio u sjemenkama) koji se sastoje od monoterpena i seskviterpena (ugljikovodici s dvije ili tri izoprenske jedinice) i njihovih derivata, a najzastupljeniji je D-limonen (do 95% u naranči) (46). Eterična ulja iz kore već dugo nalaze primjenu u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji poglavito zbog arome, a u posljednje vrijeme razmatraju se i njihovi povoljni učinci na zdravlje, poglavito zbog antioksidacijskog i antimikrobnog djelovanja (43). Iako se eterična ulja citrusa najčešće dobivaju tiještenjem, za dobivanje se mogu primjenjivati i druge tehnike, a najčešće su hidrodestilacija, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i mikrovalovima te ekstrakcija superkritičnim fluidima. Prilikom ekstrakcije, dio komponenti iz eteričnog ulja zaostaje u vodi zbog svoje polarne prirode čime nastaju hidrolati koji također posjeduju antimikrobna i antioksidacijska svojstva, te nalaze primjenu u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (47). Nakon ekstrakcije eteričnog ulja, u kori zaostaju pektin (polisaharid D-galakturonskih jedinica povezanih  $\alpha$ -1,4 glikozidnim vezama esterificiran djelomično metanolom ili octenom kiselinom) i dijetalna vlakna (neškrobni polisaharidi s najmanje deset ugljikohidratnih jedinica- npr. celuloza, lignin, hemiceluloza). Pektin iz agruma može postojati u kompleksnoj ili netopljivoj formi zbog čega se široko primjenjuje u prehrambenoj industriji kao sredstvo za želiranje, zgušnjivač i emulgator, a u farmaceutskom smislu je zanimljiv zbog svojih protuupalnih svojstava (43). Čvrsti dijelovi nusproizvoda također sadrže karotenoide, fenolne spojeve i limonoide. 115 je detektiranih karotenoida u nusproizvodima agruma, a mogu se podijeliti u dvije skupine – oksigenirane ksantofile (lutein, violaksantin) i ugljikovodične karotene (likopen,  $\beta$ -karoten). Karotenoidi su prekursori vitamina A koji je, među ostalim pozitivnim učincima, uključen u rast epitelnih tkiva (48). Zbog složenosti stanične stijenke nusproizvoda agruma, izolacija karotenoida predstavlja izazovan proces koji uključuje različite predtretmane poput primjene enzima i

liofilizacije, a slijede ih ekstrakcijski postupci s primjenom ultrazvuka, mikrovalova, ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku te ekstrakcije impulsnim električnim poljem (49). U nusproizvodima agruma sadržano je znatno više fenolnih spojeva nego u jestivim dijelovima (50), a oni uključuju većinom fenolne kiseline i flavonoide od kojih su najzastupljeniji flavanoni (narirutin, hesperidin, naringin, neohesperidin). Udio fenolnih spojeva uvelike varira ovisno o vrsti, uvjetima rasta i načinu prerade agruma, kao i primijenjenoj tehnici ekstrakcije (43). Za izolaciju fenolnih spojeva primjenjuju se brojne tehnike ekstrakcija, a fokus istraživanja stavljen je na optimiranje s ciljem postizanja maksimalnih prinosa uz zadržavanje biološke aktivnosti (51). Limonoidi su kompleksni triterpenoidni spojevi koji se nalaze uglavnom u sjemenkama, a mogu se pojavljivati u formi aglikona (limonin i nomilin) koji su ranijim fazama rasta agruma odgovorni za gorak okus citrusa ili glikozida koji nastaju u kasnijoj fazi razvoja. Za ove spojeve se pokazalo kako imaju antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje, a najučinkovitija ekstrakcija postiže se primjenom superkritičnih fluida (43).

### 1.3.2. Otpadne vode od procesiranja

Industrijski procesi prerade agruma zahtijevaju velike količine vode koja nakon njih postaje otpad. Količina otpadne vode ovisi o potrebnoj količini za određeni proizvodni proces i količini procesiranog voća te upravljanju vodom u postrojenju, a prema literaturi varira od 1 do 17 m<sup>3</sup> (52). Otpadna voda bogata je fitokemikalijama iz čvrstih nusproizvoda s potencijalom za upotrebu u kozmetičkoj industriji (pektin, flavonoidi, oligosaharidi, terpeni, eterična ulja), no mogućnost ekstrakcije je ograničena njihovom razrijeđenošću i kompleksnosti ekstrakcijskog procesa što posljedično povećava troškove i ne uklapa se u model cirkularne ekonomije.

### 1.3.3. Lišće agruma

Lišće agruma tradicionalno je korišteno u narodnoj medicini za tretiranje različitih zdravstvenih problema, a danas su potvrđena antimikrobna, antioksidacijska i protuupalna djelovanja njihovih različitih ekstrakata koja se mogu pripisati sadržaju brojnih bioaktivnih molekula poput askorbinske kiseline i značajne količine fenolnih spojeva (53) koji se, kao i fenolni spojevi iz lišća vinove loze i masline, mogu ekstrahirati brojnim konvencionalnim i naprednim tehnikama ekstrakcije. Lišće agruma je osobito zanimljivo zbog sadržaja eteričnog ulja za koje se pokazalo da imaju jače antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje od eteričnog ulja kore citrusa (54). Ovisno o vrsti agruma, sastav eteričnih ulja varira u broju komponenti (npr. *C. × aurantium* 41 detektiran spoj, *C. limon* (L.) Osbeck i *C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle po 59 detektiranih spojeva) i njihovoj količini, no svima je zajedničko da je limonen često najzastupljeniji hlapivi spoj (55).



## **2. Cilj istraživanja**

Budući da nusproizvodi vinarstva, proizvodnje maslinova ulja i prerade agruma zbog svojega sastava i mogućnosti ekstrakcije posjeduju potencijal za primjenu u izolaciji sastojaka za kozmetičku industriju, cilj ovog istraživanja je provesti detaljnu pretragu literature o zabilježenim djelovanjima njihovih ekstrakata na kožu samostalno, ili u sklopu kozmetičkih formulacija.

### 3. Materijali i metode – Sustavni pregled saznanja o temi

Za potrebe pisanja specijalističkog rada pretražene su elektroničke baze ScienceDirect i PubMed. U pretraživanju su korištene ključne riječi koje se odnose na nusproizvode (engl. *grape pomace, grape waste, olive pomace, olive waste, citrus pomace, citrus waste, by-products*) i kozmetiku (engl. *cosmetics, cosmeceuticals, active ingredients*). Prilikom pretraživanja uključeni su filteri koji su se odnosili na tip članka (Article type: Research articles) i jezik publikacije (Language: English). Pregledane su sve publikacije koje su se pojavile kao rezultat pretrage s dostupnim cjelovitim tekstovima, ili u iznimnim slučajevima sažetcima. Odabir je ograničen na izvorne radove objavljene na engleskom jeziku s istraženim djelovanjem ekstrakata nusproizvoda na kožu i mehanizme povezane uz kožu. Za proširenje saznanja, pregledane su i relevantne literaturne reference navedene u selektiranim publikacijama. Pretraga elektroničkih baza literature rezultirala je velikim brojem publikacija koje su potom pregledane i selektirane na temelju postojanja rezultata o djelovanju ekstrakata nusproizvoda vinarstva, proizvodnje maslinova ulja i prerade agruma na kožu i uz nju povezane mehanizme. Uz to, pregledane su i literaturne reference u selektiranim publikacijama te su dobivene ukupno 52 publikacije, od čega 22 za nusproizvode vinarstva, 18 za nusproizvode proizvodnje maslinova ulja te 12 za nusproizvode prerade agruma. Navedena istraživanja sistematično su obrađena u sljedećim poglavljima na temelju zabilježenih učinaka.

#### 3.1. Anti-aging djelovanje

Stanje i izgled kože ovise o različitim čimbenicima koji uključuju genetiku, prehranu, konzumaciju alkohola i pušenje te vanjske čimbenike poput UV zračenja, zagađenja zraka i hvatanja slobodnih radikala. Promjene na starijoj koži posljedica su gubitka elastičnosti uslijed stanjivanja dermalnog izvanstaničnog matriksa i gubitka kolagena, elastina i

hijaluronske kiseline (56). Obnavljanje stanica također se usporava tijekom starenja, poglavito zbog akumulacije slobodnih radikala nastalih iz lančanih oksidacijskih reakcija nekoliko staničnih makromolekula, uz smanjenu respiraciju (57). Uslijed takvog oksidacijskog stresa dolazi do povećane oksidacije proteina i povećane lipidne peroksidacije. Povećana oksidacija proteina dovodi do poremećaja funkcija stanica, membrana i signalnih puteva te starenja i preuranjene apoptoze (58). Povećana lipidna peroksidacija dovodi do gubitka funkcije staničnih membrana i pretjerane aktivacije aktivatora proteina 1 (AP-1), transkripcijskog čimbenika koji inhibira transformirajući čimbenik rasta beta (TGF- $\beta$ ) odgovoran za održavanje homeostaze u koži (59). Također, aktiviraju se i metaloproteinaze (MMP) koje degradiraju sastavnice dermisa uključene u održavanje stanja i izgleda kože (kolagen, elastin i hijaluronska kiselina) (60). MMP-1 (intersticijska kolagenaza) uglavnom razgrađuje kolagen tipa I, II i III, dok MMP-3 razgrađuje izvanstanični matriks. Proteoglikani, laminin, fibronektin, želatina i kolagen tipa III i IV su također supstrat navedenim enzimima što rezultira smanjenom tonusu kože i povećanim nastankom bora (61). Posljedice oksidacijskog stresa uvećane su postupnim smanjenjem aktivnosti antioksidacijskih obrambenih mehanizama, poglavito aktivnosti glutaciona (GSH) i glutation peroksidaze (60). Također, primijećena je i smanjena količina proteina toplinskog šoka (HSP) koji su uključeni u popravak proteina oštećenih oksidacijom. Još jedan proces koji se javlja tijekom starenja je glikacija, neenzimski proces koji rezultira ireverzibilnom tzv. AGE formacijom (eng. *advanced glycation end products*) sa značajnim utjecajem na kolagenska i elastinska vlakna koja postaju otporna na proteolizu, posljedično rezultirajući slabijim obnavljanjem stanica (62). U nastavku je prikazan pregled učinaka nusproizvoda vinarstva, proizvodnje maslinova ulja i prerade agruma na spomenute mehanizme.

### 3.1.1. Nusproizvodi vinarstva

U istraživanju koje su proveli Wittenauer i suradnici (63), metanolni ekstrakt polifenolnih spojeva iz komine grožđa sorte Riesling pokazao je visoku učinkovitost u inhibiciji kolagenaze (93%) i elastaze (85%), gdje su se niskomolekulske frakcije s visokim udjelom galne kiseline pokazale učinkovitijima od visokomolekulskih frakcija. Također, primijećen je sinergijski učinak ekstrakta u odnosu na pojedinačne polifenolne spojeve. U drugom istraživanju, ispitivanjem permeacije etanolnog polifenolnog ekstrakta iste sorte grožđa u Franz-difuzijskim ćelijama, autori su utvrdili kako niskomolekulski polifenolni spojevi prodiru dublje u kožu kroz rožnati sloj od visokomolekulskih što upućuje da će takve frakcije pokazati veće djelovanje pri topikalnoj primjeni (64). Složeni procijanidini također su imali visoku sposobnost permeacije što su autori pripisali činjenici da je kao otapalo korištena vodena otopina etanola koji inače poboljšava apsorpciju aktivnih sastojaka u koži. U prilog tome govore i rezultati istraživanja Punzo i suradnika (65) gdje su za ekstrakciju antocijana iz komine grožđa crnih sorti vina iz sjeverne Italije primijenjena prirodna eutektička otapala (betain i različiti donori vodika) te se pokazalo kako je otapalo imalo značajnu ulogu u permeaciji antocijana kroz membranu u Franz difuzijskim ćelijama, a kombinacija betaina i limunske kiseline pokazala se najboljom. U istraživanju Dresch i suradnika (7), hidrogelovi 2,5% Natrosola (neionski polimeri topivi u vodi) pripremljeni s ekstraktima listova različitih sorti vinove loze pokazali su nisku permeaciju polifenolnih spojeva (u najvećem udjelu kvercetin i njegovi glikozidi) u Franz-difuzijskim ćelijama na temelju čega su autori zaključili kako se navedeni spojevi zadržavaju na površini kože te kao takvi mogu polučiti *in-vitro* potvrđeno antioksidacijsko djelovanje i umanjiti štetne učinke UV zračenja. Međutim, Wittenauer i suradnici (64) također su primijetili slabu detekciju kvercetin glikozida prilikom ispitivanja na svinjskoj koži, a navedeno su povezali s visokom reaktivnosti navedenih spojeva s proteinima u koži što može otežati njihovu izolaciju i kvantifikaciju te posljedično navesti na pogrešne zaključke.

Važnost primijenjenog otapala spomenuta u kontekstu permeacije ekstrakata bolje je promatrati iz aspekta dobivenog polifenolnog sastava u ekstraktima budući da će se oni koristiti u formuliranju kozmetičkih proizvoda, a kao što je spomenuto, sadržaj polifenolnih spojeva igra veliku ulogu u inhibiciju enzima uključenih u starenje kože. Primjenom različitih otapala Maidin i suradnici (66) ekstrahirali su polifenolne spojeve iz komine grožđa sorte Barbera iz sjeverne Italije te su utvrdili kako su alkoholni ekstrakti sadržavali više ukupnih polifenola, antocijana i flavonola, dok je vodeni ekstrakt sadržavao veći udio fenolnih kiselina i flavan-3-ola. Pri tome je sirovi vodeni ekstrakt dvostruko učinkovitije inhibirao kolagenazu i elastazu što autori povezuju s višim udjelom flavan-3-ola koji hidrofobnim interakcijama dovode do konformacijskih promjena u enzimima posljedično umanjujući njihovu aktivnost. Etanolne frakcije dobivene primjenom koloidnih čestica su pak bile učinkovitije od vodenih frakcija što se objašnjava prisutnošću kvercetina u etanolnoj frakciji koji potencijalno ulazi u interakciju s aktivnim mjestom enzima.

Još je nekoliko istraživanja potvrdilo anti-aging djelovanje ekstrakata različitih komponenti nusproizvoda vinarstva. Primjerice, Matos i suradnici (67) ispitali su inhibicijsko djelovanje 50% etanolnog ekstrakta komine grožđa crne sorte Tempranillo, taloga zaostalog nakon fermentacije te taloga porto vina (vino u čijoj se proizvodnji fermentacija prekida radi fortifikacije vina 77% destilatom čime se postiže veća slatkoća i viši udio etanola) na MMP-1 kolagenazu i elastazu. Talog zaostao nakon fermentacije pokazao je najveće inhibicijsko djelovanje na oba enzima, što je bilo u skladu s visokim sadržajem ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktu, dok su ekstrakt komine i taloga porto vina pokazali približno jednako djelovanje. Kod inhibicije elastaze nije bilo korelacije između pojedinih skupina polifenolnih spojeva, dok je kod MMP-1 zabilježena korelacija između sadržaja individualnih spojeva (kaftarinske kiseline, antocijana maldivina i peonidin-3-O-glukozida te flavonola miricetina i kvercetina) i razine inhibicije. U istraživanju Leal i suradnika (68) metanolni (70%) ekstrakti

polifenolnih spojeva iz peteljki šest različitih sorti vinove loze s 11 detektiranih fenolnih kiselina pokazali su inhibicijski učinak u rasponu 67,98–98,02% na elastazu, a najboljom se pokazala sorta Syrah. Malinowska i suradnici (69) ispitali su djelovanje etanolnog (60%) ekstrakta polifenolnih spojeva (stilbeni vitiferin i resveratrol te katehini) iz trske grožđa pet različitih sorti na aktivaciju proteina sirtuina (SIRT-1) koji održava dugovječnost stanica, transkripcijskih faktora i proteina koji sudjeluju u reparaciji DNA. Ekstrakt polifenolnih spojeva trske sorte Riesling se pokazao najučinkovitijim s učinkom aktivacije SIRT-1 od 171%, dok ekstrakt trske sorte Sauvignon, koji je također imao i najniži udio polifenolnih spojeva, nije imao nikakav učinak na aktivaciju SIRT-1. Deniz i suradnici (70) zabilježili su *in-vitro* učinkovitost etanolnog (80%) ekstrakta sjemenki grožđa na inhibiciju elastaze od 30% i kolagenaze od 75%. Učinkovitost u inhibiciji kolagenaze potvrđuje i istraživanje Odah i suradnika (71) koji su ispitali učinkovitost acetonskog (90%) ekstrakta sjemenki grožđa prethodno odmašćenog heksanom u inhibiciji kolagenaze MMP-2 *in-vivo* na koži miševa tretiranih UV-zračenjem primjenom količine 50 mg kg<sup>-1</sup> dvaput tjedno tijekom 15 tjedana. Pokazalo se kako je ekstrakt učinkovitiji od korištenog standarda kurkume rezultirajući smanjenim zadebljanjem kože, što su autori povezali s visokim udjelom polifenolnih spojeva u ekstraktu.

### 3.1.2. Nusproizvodi proizvodnje maslinova ulja

U istraživanju Kishikawa i suradnika (72), pripremljeni su vodeni i etanolni ekstrakti lišća, komine (pulpa i koštice) masline i otpadne vode iz mlina te se pokazalo kako je sadržaj polifenolnih spojeva bio viši u etanolnim ekstraktima, a najviša koncentracija ukupnih polifenola zabilježena je etanolnom ekstraktu lišća. Ispitivanje promocije proizvodnje kolagena pokazalo je kako je etanolni ekstrakt pulpe masline bio najučinkovitiji s postotkom promocije 427%, što je blizu vrijednosti koja se postiže primjenom referentne askorbinske kiseline (487%). Askorbinska kiselina smatra se referentnom zbog svoje uloge kofaktora

enzima prolin 4-dioksigenaze koji je nužan za proizvodnju kolagena te redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  iona koji je također kofaktor navedenom enzimu, a čijom redukcijom se enzim aktivira. U istraživanju je utvrđeno kako nije samo sadržaj oleuropeina zaslužan za postizanje navedenih učinaka, već je riječ o sinergijskom učinku više kemijskih spojeva budući da je postotak promocije kolagena primjenom izoliranog oleuropeina bio 4 puta manji u odnosu na etanolni ekstrakt pulpe. Osim promocije kolagena, povećana je i održivost fibroblasta koji proizvode kolagen, a čija proliferacija se starenjem smanjuje. U istraživanju de la Luz Cadiz-Gurrea i suradnika (73) etanolni (20%) ekstrakti lišća i komine masline obogaćeni su standardom oleuropeina u postotku od 20 i 30% uz dodatak 10% triterpena. Ispitana je učinkovitost inhibicije elastaze i hijaluronidaze te se pokazalo kako je ekstrakt s 20% oleuropeina bio 2 puta uspješniji u inhibiciji hijaluronidaze, dok je za 1% uspješniji u inhibiciji elastaze bio ekstrakt s 30% oleuropeina (20% inhibicije pri  $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Pri navedenoj koncentraciji ekstrakta zamijećen je nizak negativan učinak na održivost stanica, dok je pri koncentraciji od  $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$  došlo do značajnih toksičnih učinaka na stanice (61% smanjenja održivosti stanica) što ukazuje da postoji granica pri kojoj negativni učinci oleuropeina prevladavaju nad pozitivnima. Nunes i suradnici (74) pripravili su tri različita ekstrakta lišća masline (bez primjene organskih otapala pri visokim i sobnim temperaturama; detalji nisu navedeni zbog tajnosti) gdje se pokazalo kako su ekstrakti s najmanjim sadržajem polifenolnih spojeva bili najmanje toksični prema stanicama kože. Primjenom ekstrakata u koncentraciji  $2,3 \mu\text{g ml}^{-1}$  postignuta je inhibicija hijaluronidaze 20–30%, elastaze u rasponu 94–100% te kolagenaze 0–19%. Inhibicija kolagenaze niža od 50% zabilježena je i u istraživanju Deniz i suradnika (70) gdje je primjenjen 80% etanolni ekstrakt lista masline pri koncentraciji  $666 \mu\text{g ml}^{-1}$ . U istom istraživanju, inhibicija elastaze je također bila niža od 50% unatoč primijenjenoj koncentraciji višestruko višom od koncentracije u istraživanju Nunes i suradnika (74) što može biti rezultat različitog polifenolnog sastava uzoraka te različitih metoda ekstrakcije. U istraživanju koje su

proveli Marijan i suradnici (75), za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz lista masline korišteni su različiti omjeri polipropilenglikola, vode i mliječne kiseline gdje se omjer (A) 10:89:1 pokazao optimalnim za postizanje maksimalnog prinosa fenolnih spojeva, a omjer (B) 28,6:63,6:7,8 za maksimalne prinose oleuropeina. Pokazalo se kako je omjer otapala (B) rezultirao ekstraktom s učinkovitosti inhibicije elastaze boljom od standarda ursolične kiseline, a samostalna otapala nisu imala inhibitorno djelovanje. Kod ispitivanja inhibicije kolagenaze, pokazalo se kako su otapala samostalno imala bolji učinak od ekstrakata te je on bio veći od standarda galne kiseline što ukazuje da navedena otapala, unatoč prednosti da nije potrebna njihova eliminacija prilikom formulacije kozmetičkih proizvoda, nisu prikladan odabir za djelovanje na više enzima uključenih u starenje kože. Wanitphakdeechea i suradnici (76) ispitali su učinkovitost komercijalne kreme s ekstraktom lista masline (SUPERHEAL™ O-Live Cream, PhytoCeuticals, Inc., SAD) na 36 sudionika u dobi 20–65 g. sa znakovima fotostarenja kože primjenom 0,6 g kreme dvaput dnevno na cijelo lice tijekom dva mjeseca. Mjereni su transepidermalni gubitak vlage (TEWL), pH, tekstura, hidratacija i bore na koži kao i subjektivni doživljaj sudionika. Rezultati su objektivno pokazali 64% poboljšanje u teksturi (smanjenje TEWL, poboljšana hidratacija i vidljivost bora), dok je 47,2% sudionika subjektivno izrazilo nezadovoljstvo rezultatima. Di Mauro i suradnici (77) fokus istraživanja stavili su na šećernu i mineralnu frakciju otpadne vode iz mlina te su formulirali U/V emulziju s 1% liofilizirane navedene frakcije čije je djelovanje na gubitak vlage karakterističan za starenje kože ispitano na 30 žena u dobi od 28±5 godina tijekom 7 dana primjene 20 mg jednom dnevno. Hidratacija kože mjerena je MoistureMeter uređajem prije i 7 dana nakon aplikacije te se pokazalo kako je primjena emulzije rezultirala poboljšanom hidratacijom kože.

### 3.1.3. Nusproizvodi prerade agruma



U istraživanju koje su proveli Deniz i suradnici (70) ispitano je djelovanje 80% etanolnog ekstrakta kore i listova 17 različitih sorti citrusa, a samo je ekstrakt flaveda gorke naranče (*C. × aurantium*) pokazao inhibitorno djelovanje više od 50% na kolagenazu i elastazu s postotcima inhibicije koji su redom iznosili 70 i 20%. Navedeni ekstrakt također je imao i najveći udio polifenolnih spojeva. U drugom istraživanju, ispitano je djelovanje metanolnog ekstrakta kore gorke naranče uklopljenog u fosfolipidne komplekse u kombinaciji s ekstraktom sladića. Omjer naranče i sladića 1:2 se pokazao optimalnim u smislu sadržaja polifenolnih spojeva, a omjer 1:1 ekstrakta i fosfolipida rezultirao je najvećom učinkovitosti uklapanja (78). Formulirane su kreme s 1% fosfolipidnog kompleksa omjera 1:1 te je ispitana permeacija u Franz-difuzijskim ćelijama. Pokazalo se kako je retencija polifenola u koži dulja kada su ekstrakti uklopljeni u fosfolipide, u usporedbi s kremom sa samim sirovim ekstraktima što se objašnjava produljenim otpuštanjem iz fosfolipidnog kompleksa. Inhibicija elastaze pri koncentraciji 3000 µg ml<sup>-1</sup> iznosila je 28% što pokazuje kako postoji potencijal za primjenu u anti-aging kozmetici, osobito zato što nije ispitan sirovi ekstrakt nego formulirana krema spremna za primjenu na koži. Daljnji korak bio bi ispitivanje podnošljivosti za kožu *in-vivo* budući da ekstrakti citrusa mogu prouzročiti iritaciju kože (79), te dakako daljnje istraživanje potencijala različitih komponenti nusproizvoda prerade agruma te formulacije pripravaka s ekstraktima brojnih sorti različitog sastava.

### 3.2. Antimikrobno djelovanje

Bakterijske infekcije čest su uzrok brojnih kožnih problema. Primjerice, *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitivne bakterije) uključene su u razvoj kožnih infekcija uključujući impetigo i piodermu (80). *Staphylococcus epidermidis*, bakterija komensalne flore, oportunistički je patogen koji može uzrokovati infekcije kože i nazalne mukoze. Akne su jedno od najčešćih kožnih oboljenja karakterizirane povećanom

proizvodnjom sebuma, hiperkeratinizacijom pilosebacealnih jedinica i upalom. *Cutibacterium acnes* (prijašnji naziv *Propionibacterium acnes*) anaerobna je Gram-pozitivna bakterija koja je dio prirodne flore u koži, a njeni biofilmovi su česti kod akni. Iako ne postoje kvantitativne razlike u populaciji *C. acnes* između oboljelih pacijenata i kontrolnih skupina, pokazalo se kako su prisutni različiti filotipovi bakterije *C.acnes* koji mogu biti uzrok jedinstvenim imunskim odgovorima kod akni. Pokazalo se kako je *C.acnes* otporna 50.8% do 93.6% na sve uobičajene antibiotike koji se primjenjuju u liječenju akni zbog čega je od velikog značaja pronaći alternativne načine liječenja toga kožnoga oboljenja koje zahvaća 85% adolescentske i 11% odrasle populacije (81). U posljednje vrijeme, sve se više istražuje primjena srebrnih nanočestica s antimikrobnim djelovanjem koje se mogu sintetizirati tzv. "zelenim" metodama bez upotrebe opasnih kemikalija. Za sintezu takvih nanočestica se najčešće primjenjuju prirodni produkti poput kvasaca, bakterija, gljivica te biljnih ekstrakata (82), u što se mogu ubrojiti i ekstrakti nusproizvoda vinarstva, proizvodnje maslinova ulja i prerade agruma.

### 3.2.1. Nusproizvodi vinarstva

U istraživanju koje su proveli Leal i suradnici (68), 70% metanolni ekstrakt peteljki različitih sorti grožđa koji je sadržavao 11 identificiranih fenolnih kiselina pokazao je antimikrobno djelovanje *in-vitro* protiv Gram-pozitivnih bakterija uključenih u patologiju ulkusa na stopalu. George i suradnici (83) proizveli su celulozni hidrogel s ekstraktom komine crnog grožđa dobivenog korištenjem etil-acetata i metanola kao otapala u omjeru 1:1 te su zabilježili inhibicijsko djelovanje protiv Gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus* koja je uključena u patologiju atopijskog dermatitisa i folikulitisa. Kod većine biljnih ekstrakata izraženije je djelovanje protiv Gram-pozitivnih bakterija iz razloga što Gram-negativne bakterije u svojoj strukturi sadrže sloj lipopolisaharida koji otežava prodor bioaktivnih molekula u njihovu stanicu (84).

### 3.2.2. Nusproizvodi proizvodnje maslinova ulja

Antimikrobna aktivnost ekstrakata nusproizvoda proizvodnje maslinova ulja bolje je istražena od antimikrobne aktivnosti nusproizvoda vinarstva te nekoliko istraživanja ukazuje na njihov potencijal u primjeni protiv različitih patogena. U istraživanju Kishikawa i suradnika (72), ispitano je antimikrobno djelovanje vodenih i etanolnih ekstrakata lišća, komine (pulpa i koštice) masline i otpadne vode iz mlina te se pokazalo kako nijedan ekstrakt nije djelovao na Gram negativnu bakteriju *Escherichia coli*, dok je etanolni ekstrakt lišća, ujedno i ekstrakt s najvećom koncentracijom polifenola, imao inhibicijsko djelovanje protiv bakterije *Staphylococcus aureus*. Utvrđeno je kako oleuropein samostalno nije pokazao antimikrobno djelovanje čime je zaključeno da je riječ o sinergijskom učinku različitih grupa polifenolnih spojeva. Slično su zaključili Obied i suradnici (85) prilikom istraživanja ekstrakta otpadne vode iz mlina gdje se pokazalo kako su samostalni polifenolni spojevi (hidroksitirozol, kavena i ferulična kiselina) manje učinkovito inhibirali rast bakterija *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativna). od cjelovitog ekstrakata. Leouifoudi i suradnici (84) su ispitivanjem ekstrakata komine masline i otpadne vode iz mlina utvrdili kako su oba ekstrakta pokazala antimikrobno djelovanje protiv bakterije *Staphylococcus aureus*, dok je protiv bakterija *Escherichia coli* i *Streptococcus faecali* (Gram-pozitivna) djelovanje bilo ograničeno. U istraživanju koje su proveli Nunes i suradnici (74), ekstrakti lista masline pokazali su inhibicijsko djelovanje protiv Gram-pozitivnih bakterija *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*, Gram-negativnih *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* te kvasca *Candida albicans* gdje je djelovanje bilo jače protiv Gram pozitivnih bakterija, vjerojatno zbog prethodno spomenutih razlika u građi bakterija. Schlupp i suradnici (86) utvrdili su inhibicijsko djelovanje ekstrakta otpadne vode iz mlina također na Gram pozitivne (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Cutibacterium acnes*) i Gram negativne bakterije (*Escherichia coli*, *Pseudomonas*

*aeruginosa*) s najvećom učinkovitosti protiv *Staphylococcus epidermis* i *Cutibacterium acnes* koje su patološki čimbenik u upalnom stanju kod akni. Qidwai i suradnici (87) također su zabilježili antimikrobno djelovanje protiv navedenih dviju bakterija prilikom ispitivanja metanolnog, etanolnog, acetonskog i vodenog ekstrakta lista masline gdje se metanolni ekstrakt pokazao najučinkovitijim, što je bilo u skladu s najvećim udjelom polifenolnih spojeva i antioksidacijskom aktivnosti. Ekstrakt se također pokazao učinkovitiji protiv anaerobne *Cutibacterium acnes*, nego protiv aerobne *Staphylococcus epidermis*.

### 3.2.3. Nusproizvodi prerade agruma

Nekoliko je istraživanja potvrdilo antimikrobno djelovanje ekstrakata nusproizvoda prerade agruma. Primjerice, u istraživanju Atolani i suradnika (88) saponificirani ekstrakt ulja sjemenki slatke naranče (*C. sinensis* (L.) Osbeck) obogaćen medom i ekstraktom lista klinčića pokazao je antibakterijsko djelovanje protiv *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*, antifungalno protiv *Penicilium notatum* i *Candida albicans* te umjereno antiparazitno protiv *Toxoplasma gondii*, bez citotoksičnosti prema humanim keratinocitima. Budući da u ovom istraživanju nije primijenjen ekstrakt ulja sjemenki slatke naranče samostalno, ne može se zaključiti da je on odgovoran za navedena djelovanja te je vjerojatno riječ o sinergijskom djelovanju. U istraživanju Guo i suradnika (89), etanolni ekstrakt kore slatke naranče podijeljen je u tri frakcije (etil-acetatna, petroleteraska i vodena) te se pokazalo kako je etil-eterska frakcija jedina pokazala antimikrobno djelovanje protiv sva 4 testa mikroorganizma (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*) što je bilo u skladu s visokim sadržajem ukupnih polifenolnih spojeva i flavonoida, poglavito nobiletina čija je korelacija s antimikrobnom aktivnosti potvrđena. Tsai i suradnici (90) ispitali su antimikrobno djelovanje eteričnog ulja lišća pomela (*C. maxima* (Burm.) Merr.) i utvrdili značajnu aktivnost protiv bakterija *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* te kvasca *Candida albicans*, što su pripisali sadržaju citronelala i citronelola, glavnih

detektiranih komponenti u udjelu 50,71–59,82%). Dutta i suradnici (82) proveli su zelenu sintezu nanočestica s vodenim ekstraktom kore slatke limete (*C. limetta* Risso). Nanočestice su pokazale djelovanje protiv bakterija *Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* s izrazitim djelovanjem protiv stvaranja biofilмова i uspješnom permeacijom kroz stanične membrane bakterija.

### 3.3. Zacjeljivanje rana

Zacjeljivanje oštećene kože dinamičan je i složen proces koji uključuje mrežu interakcija između posrednika, krvnih stanica i izvanstaničnog matriksa rezultirajući regeneracijom površinskog tkiva kože. Kada dođe do ozljede, otpuštaju se proupalni citokini i čimbenici rasta (trombocitni čimbenik rasta – PDGF, transformirajući čimbenik rasta beta – TGF- $\beta$ , vaskularni endotelni čimbenik rasta – VEGF, čimbenik rasta fibroblasta - FGF i epidermalni čimbenik rasta – EGF). FGF, VEGF i EGF aktiviraju neutrofile i monocite u svrhu zaštite od infekcije. U ovoj fazi, stanice proizvode reaktivne kisikove vrste (ROS), signalizirajući upalu i štiteći tako od napada mikroorganizama. Pretjerana proizvodnja ROS može smanjiti brzinu zacjeljivanja rane, a stanice koje okružuju ranu uključene su u degenerativni proces koji ugrožava zatvaranje rane rezultirajući kroničnim ranama, kao što su dijabetičke lezije i dekubitusi (91). Monociti se naknadno diferenciraju u makrofage i akumuliraju na mjestu rane otpuštajući čimbenike rasta koji promoviraju angiogenezu i proliferaciju fibroblasta i keratinocita (faza proliferacije). Nakon toga, dolazi do reepitelizacije i proizvodnje kolagena i elastina nakon čega se višak matriksa uklanja apoptozom ili aktivnošću metaloproteinaza (MMP), označavajući završnu fazu remodeliranja (92). Deregulacija procesa zacjeljivanja pojavljuje se kao posljedica starenja, stresa i određenih patologija poput dijabetesa i pretilosti čime može doći do razvoja kroničnih rana.

Iz tog razloga, važno je istražiti različite mogućnosti sprečavanja razvoja kroničnih rana, a potencijal nusproizvoda vinarstva, proizvodnje maslinova ulja i prerade agruma prikazan je dalje u tekstu.

### 3.3.1. Nusproizvodi vinarstva

U nekoliko istraživanja ispitan je utjecaj ekstrakata nusproizvoda vinarstva na zacjeljivanje i obnovu kože. U istraživanju koje su proveli Craciun i suradnici (93) ispitan je učinak vodenog ekstrakta komine grožđa (nedefinirana sorta) na keratinocite i fibroblaste (HS27 stanična linija). Zabilježen je stimulacijski učinak na sintezu i diferencijaciju keratinocita te ubrzanje staničnog ciklusa fibroblasta (stimulirane S i G2/M faze mitoze) utjecajem na ekspresiju involucrina, transglutaminaza 1 i citokeratina 5/14 koji su ključni u rastu epidermalnih slojeva kože. Također, zabilježena je stimulacija sinteze kolagena od 27% nakon 72 h izloženosti. Ekstrakt komine bijelog grožđa sorte Graševina dobiven primjenom prirodnog eutektičkog otapala (betain:glukoza s 30% vode) odabranog primjenom COSMOtherm softwera za optimiranje ekstrakcije polifenolnih spojeva pokazao je sposobnost stimulacije proliferacije keratinocita do 40% (94). Navedeni ekstrakt bio je 15% učinkovitiji od 70% etanolnog ekstrakta koji je korišten za usporedbu što je bilo u korelaciji sa sadržajem polifenolnih spojeva u ekstraktima što ukazuje kako su prirodna eutektička otapala bolji odabir za dobivanje ekstrakata s djelovanjem na zacjeljivanje rana, a moguće i na ostale mehanizme u koži uzme li se u obzir sadržaj polifenolnih spojeva za kojeg se u mnogim istraživanjima pokazalo kako je u korelaciji s drugim djelovanjima na kožu. Da vodene otopine etanola nisu najbolji odabir za postizanje maksimalnih učinaka na zacjeljivanje rana pokazalo se i u istraživanju koje su proveli Manca i suradnici (95) gdje je 50% etanolni ekstrakt komine crnog grožđa sorte Cannonau samostalno uzrokovao smanjenje vijabilnosti keratinocita, a ekstrakt inkorporiran u unilamelarne (~927 nm) polidisperzne

(PI~0,56) liposome (učinkovitost inkorporacije 98%) i povećao je proliferaciju za 155% nakon 24 h izloženosti.

U istraživanju koje su proveli Carullo i suradnici (96), ekstrakt sjemenki grožđa sorte Mantonico dobiven Soxhlet ekstrakcijom uz primjenu heksana pokazao je učinkovitost od 50% u zacjeljivanju rana na HaCaT staničnoj liniji keratinocita u usporedbi s kontrolom što su autori pripisali udjelu masnih kiselina koje polučuju pozitivno djelovanje u različitim fazama zacjeljivanja kože. Također, autori su utvrdili sinergijski učinak masnih kiselina prisutnih u sjemenkama grožđa s prisutnim flavonoidima (kvercetin) na povećanje proliferacije keratinocita u usporedbi s primjenom flavonoida samostalno što pokazuje da ekstrakcija isključivo lipidne frakcije ne iskorištava sav potencijal sjemenki grožđa. Hemmati i suradnici (97) ispitali su u kliničkoj studiji učinkovitost kreme s udjelom ekstrakta sjemenki crnog grožđa od 2% (odabran na temelju preliminarnog istraživanja gdje je na zečevima ispitan utjecaj kreme s 2–10% ekstrakta na zacjeljivanje rana te se nakon histološkog praćenja, mjerenjem udjela hidrokspirolina i vlačne čvrstoće pokazao optimalnim) na zacjeljivanje rana. Studija je provedena tijekom tri tjedna primjenom dvaput dnevno na 40 ispitanika u dobi 14–50 godina s različitim lezijama na koži. Pokazalo se kako je kod ispitanika tretiranih navedenom kremom došlo do 6 dana ranijeg zacjeljivanja kože u usporedbi s kontrolnom skupinom koja je dobila placebo, što pokazuje značajan potencijal primjene ekstrakta sjemenki grožđa u proizvodima namijenjenima navedenoj svrsi.

### 3.3.2. Nusproizvodi proizvodnje maslinova ulja

Učinak ekstrakata nusproizvoda proizvodnje maslinova ulja na zacjeljivanje rana ispitano je u dva istraživanja. U prvom (98), 80% metanolni ekstrakt hidroksitirozol oleata iz komine masline pokazao je učinak na mikroRNA molekule uključene u regulaciju staničnog redoks statusa i regeneracije keratinocita (hsa-miR-21, hsa-miR-29-a) te povećao njihovu

aktivnost ukazujući na povoljan učinak ekstrakta komine na zacjeljivanje kože. Nikakav učinak na hsa-miR-34-a, koja inhibira proliferaciju i stimulira apoptozu keratinocita te je uključena u patologiju psorijaze, nije zabilježen. U drugom istraživanju, heksanski i vodeni ekstrakt lista masline upareni do suha uklopljeni su u mast u udjelu od 1% s mješavinom glikol-stearat:propilneglikol:tekući parafin (3:6:1) te uspoređeni s lijekom Madecassol® u u činkovitosti u zacjeljivanju rana u štakora (99). Na 12. dan primjene lijek Madecassol® doveo je do 100% zacjeljenja rane, dok je formulacija s vodenim ekstraktom rezultirala s 87% zacjeljenjem rane, poboljšanom epitelizacijom, razvojem fibroblasta i uspostavom kolagenskih vlakana. Formulacija s heksanskim ekstraktom nije imala učinka.

### 3.3.3. Nusproizvodi prerade agruma

Djelovanje ekstrakata nusproizvoda agruma na zacjeljivanje rana ispitano je u tri istraživanja. U prvom (100), ispitano je djelovanje liofiliziranog vodenog ekstrakta kore japanskog agruma *Citrus tamurana* na proliferaciju i migraciju fibroblasta *in-vitro* te se pokazalo kako je pri koncentracijama većim od 1 mg ml<sup>-1</sup> ekstrakt inhibirao proliferaciju fibroblasta, a pri nižim koncentracijama je zabilježen linearan porast proliferacije. Također, zabilježena je migracija stanica prema mjestu ozljede te povećana brzina faza G2/S mitoze što upućuje kako navedeni ekstrakt u optimalnom omjeru može ubrzati zacjeljivanje rana, a potrebno je istražiti njegovo djelovanje kada bi bio uklopljen u kozmetičku formulaciju. U drugom istraživanju (101), djelovanje na zacjeljivanje rana eteričnog ulja kore mandarine (*C. reticulata* Blanco) ispitano je *in-vivo* na koži miševa te se pokazalo kako je promjer rana značajno smanjen u skupini gdje je topikalno primijenjeno eterično ulje. Također, prema Draize testu, nije zabilježena iritacija uslijed primjene eteričnog ulja. Abbasi i suradnici (102) proizveli su srebrne nanočestice s vodenim ekstraktom lista limuna (*C. limon* (L.) Osbeck) koje su uklopili u mast za zacjeljivanje rana s bazom Eucerin®. Djelovanje je ispitano *in-vivo* na 60 miševa s ranama promjera 2x2 cm tijekom 10 dana. Primjena formulacije s



nanočesticama rezultirala je smanjenjem veličine rane te povećanim brojem fibroblasta i koncentracijom heksozamina, hidroksiprolina i heksuronske kiseline. Pokazalo se kako je formulacija s nanočesticama bila značajno uspješnija od samostalnog ekstrakta uklopljenog u mast, kao i od kontrolnih skupina gdje su primjenjeni tetraciklin, sama baza Eucerin® ili gdje nije primjenjen nikakav pripravak. Ovo pokazuje kako srebrne nanočestice značajno poboljšavaju djelovanje ekstrakata i učinkovitost formulacija te otvaraju novo područje istraživanja.

#### 3.4. Protuupalno djelovanje

Upala je obrambeni odgovor imunskog sustava na biotičke (patogeni) i abiotičke (toksični spojevi i okolišni utjecaji) napade. Uobičajeno, upala eliminira uzrok štete i inicira popravak oštećenog tkiva, no kronična upala može imati negativne učinke poput povećanog oksidacijskog stresa, fibroze, nekroze i različite reakcije kože poput ekcema (103). Početak upale uključuje aktivaciju dvaju signalnih puteva: 1) put nuklearnog čimbenika  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) fosforilacijom inhibitora I $\kappa$ B $\alpha$  i njegovom posljedičnom degradacijom i 2) put protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK) putem fosforilacije kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (ERK), c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) i p38. Aktivacija ovih puteva inducira aktivaciju proupalnih citokina (interleukin (IL) i faktora tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) te proupalnih enzima i proteina uključujući inducibilnu sintazu dušikova oksida (iNOS), 5-lipoksigenazu (5-LOX) i ciklooksigenazu 2 (COX-2)(104). Signalni put NF- $\kappa$ B također sudjeluje u protuupalnim reakcijama što ukazuje na njegovu uključenost ne samo u aktivaciji, nego i regulaciji upalnog procesa.

Istraživanja protuupalnih aktivnosti najčešće se provode na keratinocitima koji imaju aktivnu ulogu u koordinaciji imunskog odgovora u koži ekspresijom citokina, kemokina i pomoćnih molekula. Poremećaj regulacije i abnormalna ekspresija upalnih posrednika ili njihovih receptora u keratinocitima imaju značajnu ulogu u patogenezi kroničnih upalnih stanja kože poput psorijaze, atopijskog dermatitisa i kontaktnog alergijskog dermatitisa (105).

#### 3.4.1. Nusproizvodi vinarstva

Različiti dijelovi nusproizvoda u nekoliko istraživanja pokazali su protuupalno djelovanje. Primjerice, u istraživanju Punzo i suradnika (65) ekstrakt antocijana iz komine grožđa crnih sorti vina iz sjeverne Italije dobiven primjenom prirodnih eutektičkih otapala rezultirao je smanjenim lučenjem proupalnog citokina IL-8 u prisustvu citotoksičnog menadoina prilikom tretmana stanica humanih keratinocita. Ferri i suradnici (106) ispitali su na humanim embrijskim stanicama bubrega protuupalno djelovanje vodenih i etanolnih (95%) ekstrakata komine bijelog grožđa prethodno tretirane enzimima za poboljšanu ekstrakciju. Etanolni ekstrakt nije pokazao protuupalno djelovanje, dok je vodeni inhibirao TNF- $\alpha$  induciranu upalu za 62%. Djelovanje je bilo u korelaciji sa sadržajem polifenolnih spojeva. 70% metanolni ekstrakti peteljki različitih sorti vina pokazali su protuupalno djelovanje inhibicijom dušikova oksida za do 35% (sorta Arinto) u istraživanju Leal i suradnika (68) ispitivanjem na Raw 264.7 staničnoj liniji. U istraživanju Quieroz i suradnika (107), ekstrakt peteljki portugalske crne sorte grožđa Sousão dobiven primjenom mješavine metanola, mravlje kiseline i vode u omjeru 50:2:48 pokazao je na Raw 264.7 staničnoj liniji inhibiciju dušikova oksida za 37,2%, dok su pojedinačni spojevi izolirani iz ekstrakta bili uspješniji u inhibiciji te su maldivin-3-O-glukozid, kvercetin-3-O-glukozid i maldivin-3-O-(6-kafeoil)-glukozid redom pokazali učinkovitost inhibicije od 52,4, 48,9 i 47,2%. Najuspješnijom se pokazala kombinacija maldivin-3-O-glukozida s vitaminom E gdje je postignuta inhibicija dušikova oksida od 71%, što je više od samostalnog vitamina kao i

izoliranih fenolnih spojeva. Kombinacija istog glikozida s mješavinom vitamina E i C bila je manje uspješna od samostalnih izoliranih fenolnih spojeva. Ovo pokazuje kako se adekvatnim formuliranjem može postići sinergijski učinak ekstrakta peteljki grožđa s drugim aktivnim sastojcima.

Pri ispitivanju na Raw 264.7 staničnoj liniji, i ekstrakt sjemenki grožđa sorte Pecorello dobiven Soxhlet ekstrakcijom uz primjenu heksana pokazao je protuupalno djelovanje inhibicijom dušikova oksida uz izostanak toksičnih učinaka na stanice (96). Ovo ukazuje na djelovanje ekstrakta lipidne frakcije sjemenki na upalne mehanizme, što su autori povezali sa sadržajem karotenoida u ekstraktu koji aktivacijom Nrf2 transkripcijskog čimbenika mogu potaknuti protuupalni stanični odgovor. Harbeoui i suradnici (108) proizveli su 80% etanolni ekstrakt fenolnih spojeva iz sjemenki grožđa sorti crnog grožđa Merlot, Syrah i Carignan te ispitali na staničnoj liniji RAW 264.7 nekoliko mehanizama uključenih u protuupalno djelovanje. Pokazalo se kako je ekstrakt sjemenki sorte Syrah bio najuspješniji u inhibiciji TNF- $\alpha$  (83,36%), proupalnog citokina IL-6 (71,70%), dušikova oksida (37,02%) što je bilo u skladu s najvišim udjelom fenolnih spojeva, poglavito flavan-3-ola.

#### 3.4.2. Nusproizvodi proizvodnje maslinova ulja

Protuupalno djelovanje nusproizvoda proizvodnje maslinova ulja ispitano je samo u rezultatima jednog istraživanja (75) gdje su primjenom polipropilenglikola, vode i mliječne kiseline u različitim udjelima proizvedeni polifenolni ekstrakti lista masline spremni za primjenu u kozmetičkim formulacijama. Maseni omjer polipropilenglikola, vode i mliječne kiseline od 10:89:1 bio je optimalan za postizanje maksimalnog prinosa fenolnih spojeva, dok je omjer od 28,6:63,6:7,8 bio optimalan za maksimalne prinose oleuropeina. Ispitivanjem učinkovitosti inhibicije 5-lipoksigenaze pokazalo se kako su ekstrakti bili lošiji u inhibiciji od standarda nordihidrogvajaretna kiseline te nije bilo razlike između učinkovitosti ekstrakata

ovisno o primijenjenom otapalu. Otapala samostalno su također pokazala učinkovitost u inhibiciji 5-lipoksigenaze, što znači da nije samo ekstrakt lista masline zaslužan za navedeno djelovanje. Uz rezultate spomenutog istraživanja, činjenice da je oleuropein izoliran iz maslinova ulja pokazao učinkovitost u inhibiciji 5-lipoksigenaze i dušikova oksida (109), a komercijalni ekstrakt u nusproduktima proizvodnje maslinova ulja također zastupljenog verbakozida pokazuje potencijal za liječenje atopijskog dermatitisa zbog inhibicijskog učinka na proupalne citokine uključene u njegovu patologiju (110), ukazuju na to da potencijal postoji.

### 3.4.3. Nusproizvodi prerade agruma

Protuupalno djelovanje ekstrakata nusproizvoda prerade agruma ispitano je samo u jednom istraživanju (90) gdje su eterična ulja lista pomela (*C. maxima* (Burm.) Merr.) dobivena hidrodestilacijom i mikrovalnom ekstrakcijom bez primjene otapala pokazala inhibicijsko djelovanje na 5-lipoksigenazu (5-LOX) u postotcima 33,94% i 38,59%, a pokazalo se kako je za navedeno djelovanje najodgovorniji udio citronelola.

### 3.5. Utjecaj na melanogenezu

Boja ljudske kože dolazi iz epiderme gdje su smješteni melanociti – stanice koje proizvode pigment melanin. U epidermi, keratinociti i melanociti čine simbiotsku jedinicu gdje jedan melanocit opskrbljuje do 40 keratinocita melaninom raširenom mrežom svojih produženih nastavaka - dendrita. Uzorak distribucije sintetiziranog melanina određuje boju kože. Melanin također ima važnu ulogu u apsorpciji slobodnih radikala nastalih u citoplazmi i zaštiti od različitih izvora ionizirajućeg zračenja, uključujući UV svjetlo. Melanin nastaje u procesu melanogeneze koji se događa u melanosomima. Prvi korak u melanogenezi je oksidacija tirozina djelovanjem enzima tirozinaze čime nastaje dopakinon koji se konvertira u dopakrom, a daljnjom oksidacijom dolazi do formacije eumelanina ili feomelanina (111). Osim tirozinaze, još su dva enzima uključena u melanogenezu (TRP1 i TRP2), no jedino je tirozinaza neophodna za odvijanje procesa zbog ključne uloge u prvom koraku.

Iako melanin poglavito ima fotoprotektivnu ulogu u koži, pretjerana proizvodnja melanina ili abnormalna distribucija mogu uzrokovati hiperpigmentacije u koži. Izloženost različitim lijekovima i kemikalijama, starenje, kao i određena zdravstvena stanja poput melasme, ali i neurodegenerativnih bolesti mogu dovesti do hiperpigmentacija. Zbog toga, sve je veća potražnja za pronalaskom novih i moćnih inhibitora melanogeneze. Najčešći cilj je direktna inhibicija katalitičke aktivnosti tirozinaze, zbog presudne uloge ovoga enzima u

procesu melanogeneze. Budući da se tirozinaza proizvodi samo u melanocitima, inhibitori tirozinaze imaju specifično djelovanje na melanogenezu bez nuspojava. S druge strane, inhibitori ekspresije gena za tirozinazu rijetko se ispituju zbog njihovog nespecifičnog i globalnog djelovanja putem unutarstaničnih signalnih puteva (112).

Osim hiperpigmentacija, poremećaji uzrokovani nedostatkom u proizvodnji i/ili izvozu melanina kao što su vitiligo, postupalne hipopigmentacije i progresivna makularna hipomelanoza značajno utječu na kvalitetu života pojedinca. Poremećaj progresivne makularne hipomelanoze karakteriziran je poremećajem sazrijevanja melanosoma (113). Idiopatska guttata hipomelanoza (IGH) poremećaj je karakteriziran bijelim makulama, a kožne lezije oboljelih imaju smanjen sadržaj melanina ili potpuni nedostatak melanina u keratinocitima s poremećenim razgranjavanjem dendrita u melanocitima što ukazuje na disfunkciju normalnog izvoza melanina iz melanocita do keratinocita (114). Vitiligo je još jedan poremećaj gdje su prisutne karakteristične bijele makule, a može biti uzrokovan različitim okidačima poput stresa, opekline, mehaničkih i kemijskih trauma koje u konačnici dovode do autoimunog odgovora koji cilja melanocite rezultirajući progresivnom depigmentacijom kože (115). 0,5–2% svjetske populacije pogođeno je vitiligom, dok se u Indiji postotak penje čak do 8,8% (116). Trenutni oblici terapije za vitiligo uključuju primjenu topikalnih kortikosteroida, kirurške tretmane, topikalne imunomodulatore i fototerapiju UVB zračenjem uskog pojasa koja se koristi samostalno ili u kombinaciji s modalitetima. Unatoč prednostima, ove metode imaju ograničenja koja uključuju ponovnu pojavu bijelih lezija nakon prestanka terapije uz različite druge nuspojave koje sprječavaju dosljednost pacijenata terapiji. Biljni ekstrakti ljekovitog djelovanja koji sadrže spojeve s potencijalnim stimulativnim učinkom na melanogenezu od velikog su interesa u području ispravljanja hipopigmentacija bijelih kožnih lezija u vitiligu (116). Također, u kozmetičkoj industriji postoji potražnja za sredstvima koja će postizati "prirodniji" učinak samotamnjenja

ili repigmentaciju sijede kose. Osim toga, poboljšana melanogeneza moguće bi mogla poboljšati fotozaštitu svijetle kože i smanjiti rizik od raka kože zbog čega je nužno istražiti potencijal različitih biljnih izvora bioaktivnih molekula za tretiranje poremećaja hipopigmentacije.

### 3.5.1. Nusproizvodi vinarstva

U nekoliko istraživanja potvrđeno je djelovanje ekstrakata nusproizvoda vinarstva na melanogenezu. U istraživanju koje su proveli Ferri i suradnici (106), ispitano je djelovanje vodenih i etanolnih (95%) ekstrakata komine bijelog grožđa prethodno tretirane enzimima za poboljšanu ekstrakciju na enzim tirozinazu. Etanolni ekstrakti pokazali su jače inhibicijsko djelovanje (63–79%) od vodenih (43–70%) što je bilo u skladu s većim sadržajem fenolnih spojeva u etanolnom ekstraktu. Matos i suradnici (67) ispitali su inhibicijsko djelovanje 50% etanolnog ekstrakta komine grožđa crne sorte Tempranillo, taloga zaostalog nakon fermentacije te taloga porto vina na tirozinazu. Talog zaostao nakon fermentacije pokazao je najveće inhibicijsko djelovanje, što je bilo u skladu s visokim sadržajem ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktu. Ekstrakt taloga porto vina bio je 3–5 puta manje učinkovit od taloga zaostalog nakon fermentacije, a ekstrakt komine grožđa 20 puta manje učinkovit. U ovom slučaju, nije zabilježena korelacija između sadržaja ukupnih fenolnih spojeva ili individualnih spojeva i inhibicijskog djelovanja ekstrakata te se vjerojatno radi o učinku drugih prisutnih komponenti. Deniz i suradnici (70) zabilježili su *in-vitro* učinkovitost etanolnog (80%) ekstrakta sjemenki grožđa na inhibiciju tirozinaze od približno 70%. Odah i suradnici (71) zabilježili su također inhibicijsko djelovanje acetonskog (90%) ekstrakta sjemenki grožđa prethodno odmašćenog heksanom na tirozinazu, no višestruko slabije od standarda kojične kiseline. U istraživanju koje su proveli Malinowska i suradnici (69), ispitano je djelovanje 60% etanolnih ekstrakata polifenolnih spojeva (stilbeni vitiferin i resveratrol te katehini) iz trske grožđa pet različitih sorti grožđa na aktivnost tirozinaze. Ekstrakt polifenolnih spojeva

trske sorte Riesling se pokazao najučinkovitijim s postotkom inhibicije 62,5% (približno samom resveratrolu i vitiferinu), dok je ekstrakt trske sorte Sauvignon bio najlošiji s dvostruko manjim postotkom inhibicije što je pratio i najniži udio polifenolnih spojeva. 70% metanolni ekstrakti polifenolnih spojeva iz peteljki šest različitih sorti vinove loze pokazali su inhibicijski učinak u rasponu 41,47–53,83% na tirozinazu, a najdjelotvornijim se pokazao ekstrakt peteljki sorte Syrah (68).

### 3.5.2. Nusproizvodi proizvodnje maslinova ulja

U istraživanju Kishikawa i suradnika (72), pripremljeni su vodeni i etanolni ekstrakti lišća, komine (pulpa i koštice) masline i otpadne vode iz mlina te je ispitano njihovo djelovanje na sadržaj melanina u B16 stanicama melanoma. Pokazalo se kako je sadržaj polifenolnih spojeva bio viši u etanolnim ekstraktima, a najveća koncentracija ukupnih polifenola zabilježena je etanolnom ekstraktu lišća koji je ujedno imao i najveći učinak (69,2%) na smanjenje udjela melanina uspješniji od arbutina (44,4%) koji se koristi za posvjetljivanje kože te samostalnog oleuropeina (41,6%) što ukazuje na sinergijski učinak u ekstraktima. Tome u prilog govori i činjenica da je navedeni etanolni ekstrakt lišća u usporedbi s drugim ekstraktima imao značajno manju koncentraciju oleuropeina. Nunes i suradnici (74) istražili su tri različita ekstrakta lišća masline (bez primjene organskih otapala pri visokim i sobnim temperaturama; detalji nisu navedeni zbog tajnosti) gdje je postignuta inhibicija tirozinaze u rasponu od 10–16% , a ekstrakt s najvećim ukupnim sadržajem fenola i hidroksitirozola pokazao je najjače djelovanje. Ha i suradnici (117) ispitali su djelovanje 5 frakcija 80% etanolnog ekstrakta lista masline na sadržaj melanina u B16F1 stanicama, gdje je butanolna frakcija imala višestruko veći udio oleuropeina od ostalih frakcija, a etilacetatna frakcija primijenjena u postotku 0,01% koji nije imao negativne učinke na održivost keratinocita, pokazala je najučinkovitije smanjenje melanogeneze (2,3X). Mehanizam nije razjašnjen te su potrebna daljnja istraživanja. Wanitphakdeechea i suradnici (76) ispitali su



djelovanje komercijalne kreme s ekstraktom lista masline (SUPERHEAL™ O-Live Cream, PhytoCeuticals, Inc., SAD) na hiperpigmentacije istraživanjem na 36 sudionika u dobi 20–65 g. sa znakovima fotostarenja kože primjenom 0,6 g kreme dvaput dnevno na cijelo lice tijekom dva mjeseca. 53% ispitanika prijavilo je subjektivan doživljaj smanjenja hiperpigmentacija, dok je objektivno indeks melanina ostao isti.

Osim inhibicijskih učinaka na melanogenezu, ekstrakti lišća masline pokazali su i učinke kod hipopigmentacijskih poremećaja. U istraživanju koje su proveli Goenka i Simon (116), 80% etanolni ekstrakti lista masline standardizirani na oleuropein (16–24%) te >30% ukupnih fenolnih spojeva pokazali su utjecaj na sintezu i izlučivanje melanina u mišjim B16F10 i ljudskim MNT-1 stanicama melanoma. Povećane su razine izvanstaničnog melanina, bez utjecaja na unutarstanični što znači da je melanogena aktivnost bazirana na povećanju sekrecije.

### 3.5.3. Nusproizvodi prerade agruma

Dokazi o učincima nusproizvoda prerade agruma na melanogenezu pojavili su se u nekoliko istraživanja. Primjerice, u istraživanju koje su proveli Guo i suradnici (89), etanolni ekstrakt kore slatke naranče (*C. sinensis* (L.) Osbeck) podijeljen je u tri frakcije (etil-acetatna, petroleterka i vodena) te se etil-eterska frakcija, iako lošija od standarda kojične kiseline, pokazala najučinkovitijom u inhibiciji tirozinaze što je bilo u skladu s visokim sadržajem ukupnih polifenolnih spojeva i flavonoida, poglavito nobiletina. U istraživanju koje su proveli Aumeeruddy-Elafi i suradnici (118), eterična ulja lista i kore pomela (*C. maxima* (Burm.) Merr.), kore kvrgave limete (*C. hystix*) i lista mandarine (*C. reticulata* Blanco) pokazala su inhibicijsko djelovanje na tirozinazu iznad 50%, gdje se eterično ulje kore kvrgave limete pokazalo učinkovitijim od standarda kojične kiseline. Eterična ulja lišća generalno su se pokazala lošijima od eteričnih ulja kore, a eterično ulje lista pomela je bilo

više od dvostruko uspješnije od eteričnog ulja lista mandarine. U istraživanju koje su proveli Borse i suradnici (119), proizveden je sapun s 95% etanolnim ekstraktom kore slatke naranče (*C. sinensis* (L.) Osbeck) te je tijekom mjesec dana na koži nogu 20 ispitanika bilježen učinak sapuna na količinu melanina. Ispitanici koji su koristili sapun s ekstraktom imali su 17,33% manje melanina na koži u odnosu na ispitanike koji su koristili sapun bez ekstrakta. Rezultati navedenih istraživanja pokazuju kako ekstrakti nusproizvoda prerade agruma, osobito kore pokazuju potencijal za primjenu u inhibiciji melanogeneze.

### 3.6. Zaštita od UV zračenja

Izloženost UV zračenju glavni je čimbenik ekstrinzičnog starenja kože i odgovorna je za 80% fotostarenja kože. UV zračenje u koži uzrokuje kroničnu upalu interakcijom s njezinim različitim dijelovima. Prvo potiče fotokemijske reakcije u površinskim lipidima, a nakon toga i modifikaciju komponenti keratinocita i međustaničnih lipida u rožnatom sloju kože te direktno ili preko fotokemijskih posrednika dolazi do aktivnih slojeva epiderme. Upalni odgovori inducirani UV zračenjem uključuju dilataciju dermalnih krvnih žila, vaskularnu hiperpermeabilnost, kutani edem, hiperplaziju, infiltraciju leukocita, povećan broj proupalnih citokina i generaciju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i ostalih slobodnih radikala koji posljedično reagiraju s vezivnim tkivom i staničnim membranama. Navedeni učinci povezuju se s ireverzibilnom štetom na staničnim makromolekulama, uključujući DNA i proteine. ROS nastale djelovanjem UV zračenja iniciraju kaskadu signalnih reakcija koje rezultiraju povećanom aktivacijom AP-1 i NF- $\kappa$ B i smanjenom aktivnosti TGF- $\beta$  što dovodi do smanjene sinteze i povećane razgradnje kolagena (120). Specifični učinci UV zračenja na koži ovise o valnoj duljini. UVB zračenje ima valnu duljinu 290–310 nm te čini 2–5% ukupnog UV zračenja. Prodire u kožu u rasponu 160–180  $\mu$ m, a uzrokuje oštećenje DNA i povećava incidenciju mutacija povezanih s aktiničnim eritemom i melanomom. UVA zračenje valne duljine 320–400 nm čini 95–98% ukupnog UV zračenja te prodire u kožu do

dubine 1 mm uzrokujući masivnu proizvodnju slobodnih radikala. Dugotrajna izloženost UVA zračenju povezuje se s razvojem raka kože uslijed oštećenja na DNA (121,122). Rožnati sloj kože uslijed produljenog i ponavljano izlaganja UV zračenju zadebljava uslijed povećane diobe stanica keratinocita uzrokovane povećanom ekspresijom čimbenika rasta keratinocita (KGF) te se formira fizička barijera (epidermalna hiperkeratoza) diferencijacijom keratinocita u korneocite (123). Melanin ima zaštitnu ulogu u epidermi tako što apsorbira UV zrake i umanjuje njihove negativne učinke, no produljena izloženost UV zračenju može dovesti do formacije melanoma. Melanom je rjeđa vrsta raka kože, no odgovoran je za većinu smrti povezanih s rakom kože (124). UV zračenje stimulira melanocite da pokrenu sintezu melanina povećavajući ekspresiju enzima tirozinaze. Apsorpcija i smanjenje prijenosa UVB zračenja smatraju se prvom linijom obrane od fotokarcinogeneze. U tome veliku ulogu imaju fotoprotektivna sredstva koja umanjuju štetne učinke UV zračenja na kožu. Učinkovitost aktivnih sredstava za zaštitu opisuje se zaštitnim faktorom (eng. *sun protection factor*; SPF) koji se definira kao UV energija potrebna za nastanak minimalne doze eritema (MDE) na zaštićenoj koži, podijeljen s UV energijom potrebnom za nastanak MDE na nezaštićenoj koži. MDE se definira kao najkraći vremenski interval ili doza UV zračenja dovoljna da proizvede minimalan, vidljiv eritem na koži. Što je SPF faktor veći, veća je zaštita kože od UV zračenja (125).

Zbog neadekvatnog načina primjene i izlaganja tijekom duljeg perioda nego što je predviđeno trajanje zaštite, UV zaštita je najčešće manja u praksi nego što je navedeno na deklaracijama. Također, kreme sa zaštitnim faktorom trenutno prisutne na tržištu najčešće nude veću zaštitu od UVB nego od UVA zračenja čime potencijalno nedovoljno štite od nastanka ROS. Primjerice, u jednom istraživanju pokazalo se kako kreme sa zaštitnim faktorom širokog spektra UV zaštite smanjuju formaciju slobodnih radikala samo za 55% (126). Zbog toga, topikalna primjena antioksidanasa može komplementirati zaštitu UV

filtera. Polifenolni spojevi iz biljnih ekstrakata u posljednje vrijeme se istražuju za primjenu u formulacijama krema sa zaštitnim faktorom zbog svoje strukturalne sličnosti s kemijskim UV filterima te potencijalnog djelovanja istim mehanizmom odbijanja UVB zraka, budući da tipično apsorbiraju UV zračenje valne duljine 300–400 nm. Primjerice, kavena kiselina ima apsorpcijski maksimum u blizini raspona UVB i UVA zraka te procijenjenu vrijednost SPF 7.2 (127).

### 3.6.1. Nusproizvodi vinarstva

U istraživanju Martincigh i Olengo (128), dodatak metanolnog ekstrakta sjemenki grožđa rezultirao je značajnim smanjenjem fotonestabilnosti triju UV filtera (2-etilheksil-p-metoksicinamat, benzofenon-3, terc-butilmetoksi-dimenzoilmetan) prilikom simuliranog zračenja. Nakon četiri sata izloženosti, mješavina navedenih triju filtera bez ekstrakta sjemenki grožđa degradirala se za 32,4%, dok se mješavina koja je sadržala ekstrakt degradirala 16,9% što je gotovo dvostruko manje. Povećanje stabilnosti autori povezuju s redukcijskim kapacitetom polifenolnih ekstrakata i sposobnošću keliranja metalnih iona. U prilog ovim rezultatima, koji su dobiveni primjenom metanolnog ekstrakta, a ne kozmetičke formulacije govore i rezultati sljedećih dvaju istraživanja. Hubner i suradnici (129) proizveli su 6 kozmetičkih formulacija sa i bez liofiliziranog 70% etanolnog ekstrakta polifenolnih spojeva komine grožđa sorte Cabernet Sauvignon gdje je kao baza korišten hidrofilni kopolimer amonijeva akriloidimetiltaurat vinilpirilidona s UV filterima te je ispitana učinkovitost fotozaštite i fotostabilnost difuznim spektrofotometrom. Pokazalo se kako su UV filteri pojačani liofiliziranim ekstraktom polifenola rezultirali dvostruko i trostruko povećanom zaštitom u odnosu na same UV filtere s vrijednosti SPF 17 nakon 2 h pri pH 5, dok samostalni ekstrakt bez filtera nije ponudio zaštitu. U još jednom istraživanju (130), isti autori proizveli su 9 različitih U/V emulzija s UV filterima i 70% etanolnim ekstraktom polifenolnih spojeva komine grožđa sorte Cabernet Sauvignon u različitim udjelima, gdje se

na temelju ispitivanja fotostabilnosti i fotozaštite *in-vitro* formulacija s 10% ekstrakta i 11,5% UV filtera pokazala najučinkovitijom s SPF vrijednosti 16. Nakon 2 sata, SPF vrijednost formulacije koja je sadržavala 10% polifenolnog ekstrakta bila je 39,93% viša od formulacije bez ekstrakta te je pokazala 17,98% veću zaštitu od UVA zračenja u odnosu na formulaciju bez ekstrakta. Navedene dvije formulacije potom su ispitane *in-vivo* u kliničkoj studiji na 60 sudionika u dobi 18–64 g., tipova kože I-IV po Fitzpatricku gdje se pokazalo kako je formulacija s 10% polifenolnog ekstrakta bila uspješnija u zaštiti od UVB zračenja zbog kasnije pojave eritema. Nije zabilježena fototoksičnost, iritacija ni fotosenzibilizacija kože što upućuje da formulacije koje sadrže ekstrakt komine grožđa imaju poboljšana svojstva zaštite, a istovremeno su prikladna za upotrebu.

### 3.6.2. Nusproizvodi proizvodnje maslinova ulja

U istraživanju koje su proveli da Silva i suradnici (131) ekstrakt lista masline standardiziran na 20% oleuropeina primijenjen je na stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koje su zatim tretirane *in-vitro* simuliranim sunčevim zračenjem. Primjena ekstrakta rezultirala je zaštitom od mutageneze, fotozaštitom i preživljenjem stanica kvasca. Nakon toga formulirane su U/V emulzije s tri UV filtera i navedenim ekstraktom u udjelima 1, 3 i 5%. U sva tri slučaja zabilježen je sinergijski učinak UV filtera i ekstrakta u učinkovitosti fotozaštite, a udio ekstrakta od 5% pokazao se najučinkovitijim te je pri tom postotku postignuta vrijednost SPF od 56. Za razliku od njih, Nunes i suradnici (74) u svom istraživanju na ekstraktima lista masline nisu primijetili povezanost koncentracije polifenolnih spojeva u ekstraktu s učinkovitosti zaštite, a SPF vrijednost samih ekstrakata bez UV filtera *in-vitro* iznosila je 5,2–10,1. Svi ekstrakti pokazali su inhibiciju reaktivnih vodikovih vrsta *in-vitro*. S navedenim ekstraktima formulirane su U/V emulzije za topikalnu primjenu te je formulacija s najvećim udjelom hidroksitirozola i tirozola rezultirala smanjenom oksidacijom  $\beta$ -karotena prilikom izloženosti UVA zračenju, ukazujući kako u

formulaciji ipak udio fenolnih spojeva ima značajnu ulogu. Pri tome su pH vrijednosti emulzija bile prikladne za primjenu na koži, a konzistencija emulzije bila je lošija u usporedbi s onom bez ekstrakta što ostavlja prostor za daljnje istraživanje adekvatnog formuliranja. U istraživanju koje su proveli Galanakis i suradnici (132) ekstrakt polifenolnih spojeva otpadne vode iz mlina dobiven centrifugom povećao je učinkovitost zaštite UV filtera (titanijev dioksid i Uvinul A) od UVB zračenja, a pri jednakim koncentracijama pokazao je bolju apsorpciju UVA zračenja od često korištenih kemijskih UV filtera (benzofenon A, etil heksil metoksicinamat, oktildimetil p-aminobenzojeva kiselina). Osim povećanja zaštite od UV zračenja, ekstrakti nusproizvoda proizvodnje maslinova ulja pokazali su i djelovanje protiv oštećenja kože nastalih djelovanjem UV zračenja. Ha i suradnici (117) ispitali su 5 frakcija 80% etanolnog ekstrakta lista masline, gdje je butanolna frakcija imala višestruko veći udio oleuropeina od ostalih frakcija. Međutim, etilacetatna frakcija primijenjena u postotku 0,01% koji nije imao negativne učinke na održivost keratinocita, pokazala je najbolje smanjenje (55%) TNF- $\alpha$  nakon izlaganja UVB zračenju. Sam etanolni ekstrakt nije pokazao učinke na TNF- $\alpha$ . Lecci i suradnici (133) utvrdili su da ultrafiltrirana frakcija otpadne vode iz mlina ima selektivni prooksidacijski i proapoptički učinak na potencijalno karcinogene keratinocite oštećene UVA zračenjem.

### 3.7. Aktivacija TRPA-1 kanala

U posljednje vrijeme, sve je više dokaza koji upućuju na to da su tranzitorni receptori (TRP) uključeni u regulaciju metaboličkih procesa u koži. TRP kanali, originalno opisani kao polimodalni stanični receptori koji mogu biti aktivirani različitim fizičkim, kemijskim i termalnim podražajima, sada se smatraju pleiotrofnim molekulama jer osim spomenutih uloga mogu imati i ulogu efektor. Na taj način, TRP kanali uključeni su u održavanje stanične homeostaze i regulaciju rasta, imunskih mehanizama te endokrinih i egzokrinih procesa izlučivanja te tako sudjeluju u formiranju i održavanju kožne barijere, rastu i

diferencijaciji kožnih stanica te u upalnim procesima u koži (134). U jednoj studiji, istraženo je djelovanje eteričnog ulja čvrstih dijelova gorke naranče (*C. × aurantium*) na aktivaciju TRPA 1 kanala za kojeg se pokazalo kako sudjeluje u održavanju epidermalne homeostaze, a njegovi agonisti posljedično uzrokuju oporavak kožne barijere (135). Primjenom eteričnog ulja gorke naranče koje je sadržavalo 10 terpena (95% limonena) u koncentraciji 1000 µg/ml postignuta je aktivacija TRPA-1 kanala. Daljnjim ispitivanjem djelovanja izoliranih terpena pokazalo se kako je ostol, derivat kumarina, najučinkovitiji u aktivaciji jer je za postizanje djelovanja bila potrebna najniža koncentracija od svih spojeva.

## 4. Rasprava

Pregled dostupne literature pokazao je kako ekstrakti nusproizvoda vinarstva, proizvodnje maslinova ulja i prerade agruma mogu sudjelovati u različitim mehanizmima povezanim s funkcioniranjem kože. U tablici 1 prikazan je pregled zabilježenih učinaka nusproizvoda, a može se vidjeti kako su općenito najistraženija anti-aging i antimikrobno djelovanje te utjecaj na melanogenezu. Od nusproizvoda vinarstva, najbolje istražen dio je komina grožđa, dok o lišću vinove loze ima najmanje podataka. Od nusproizvoda proizvodnje maslinova ulja, najbolje su istraženi ekstrakti lista masline, dok najmanje podataka ima o komini uključujući koštice. Od nusproizvoda prerade agruma, najbolje su istražena djelovanja ekstrakata i eteričnih ulja lišća, dok o otpadnim vodama od procesiranja uopće nema podataka.


Anti-aging djelovanje nusproizvoda vinarstva istraženo je u 9 studija (7, 63–70), a ispitani su samo ekstrakti *in-vitro* gdje je zabilježena korelacija udjela ukupnih polifenolnih spojeva i djelovanja na enzime uključene u proces starenja kože (67, 71) i SIRT-1 koji održava dugovječnost stanica, transkripcijskih faktora i proteina koji sudjeluju u reparaciji DNA (69). Jedna od najvažnijih sastavnica nusproizvoda vinarstva je resveratrol koji bi, direktno ili indirektno, mogao biti odgovoran za opažene učinke (136). Izražen je utjecaj ekstrakcijskog otapala na sastav polifenolnih spojeva, a pokazalo se kako etanolni ekstrakti imaju veći udio ukupnih polifenola, antocijana i flavonola, dok vodeni ekstrakti sadrže više fenolnih kiselina i flavan-3-ola čiji je sadržaj u sirovim vodenim ekstraktima doveden u vezu s jačim inhibitornim djelovanjem na enzime kroz hidrofobne interakcije koje rezultiraju promjenom konformacije enzima (66). S druge strane, etanolne frakcije s visokim sadržajem flavonola kvercetina imale su učinkovitije inhibitorno djelovanje na enzime, moguće zbog reakcija kvercetina s aktivnim mjestom enzima (66). Osim toga, pokazalo se i kako niskomolekulske frakcije s visokim udjelom galne kiseline imaju izraženije inhibitorno djelovanje od



visokomolekulskih (63), kao i da imaju veću sposobnost permeacije u dublje slojeve kože (64).

	Dio nusproizvoda	Anti-aging djelovanje	Antimikrobno djelovanje	Zacjeljivanje rana	Protuupalno djelovanje	Utjecaj na melanogenezu	Zaštita od UV zračenja	Aktivacija TRPA-1
<b>Vinarstvo</b>	Komina							-
	Lišće		-	-	-	-	-	-
	Vinski talog		-	-	-		-	-
	Trska		-	-	-		-	-
<b>Proizvodnja maslinova ulja</b>	Komina			-	-		-	-
	Otpadna voda iz mlina			-	-			-
	Košnice			-	-		-	-
	Lišće							-
<b>Prerada agruma</b>	Kora			-	-		-	
	Sjemenke	-		-	-	-	-	
	Otpadne vode od procesiranja	-	-	-	-	-	-	-
	Lišće						-	-

Tablica 1. Pregled zabilježenih učinaka nusproizvoda vinarstva, proizvodnje maslinova ulja i prerade agruma na kožu i uz nju povezane mehanizme

 djelovanje je utvrđeno u najmanje jednom uključenom istraživanju; (-) nema podataka

Pokazalo se, međutim, kako i složeni procijanidini mogu permeirati dublje u kožu kada se kao otapalo primjenjuje vodena otopina etanola za kojeg je poznato kako omogućuje penetraciju aktivnih sastojaka u kožu (64), što ukazuje na to da se adekvatnim formuliranjem može postići maksimalno iskorištenje potencijala različitih struktura polifenolnih spojeva.

U 7 studija istraženo je anti-aging djelovanje nusproizvoda proizvodnje maslinova ulja gdje su također uglavnom ispitani ekstrakti *in-vitro* (70–75). Ekstrakt pulpe masline pokazao je najveći potencijal u promociji proizvodnje kolagena, unatoč tome što je ekstrakt lista imao najveći udio polifenolnih spojeva (72). Ipak, važno je napomenuti da je sastav polifenola u pulpi nešto drugačiji nego u listu jer uglavnom sadržava hidroksitirozol (~1.8%), tirozol i *p*-kumarnu kiselinu. Pulpa sadržava i važne lipidne sastavnice poput skvalena, tokoferola, fosfolipida, i sterola (137) koji bi, uz polifenole, mogli imati važnu ulogu u opaženom učinku (37). Pokazalo se kako ekstrakti standardizirani na 20% i 30% oleuropeina različito utječu na različite enzime te je primjerice 20% ekstrakt učinkovitiji u inhibiciji hijaluronidaze, dok je 30% nešto učinkovitiji u inhibiciji elastaze (74). Također, veće koncentracije oleuropeina pokazale su negativni učinak na vijabilnost keratinocita zbog čega je nužno pronaći granicu kod koje se postiže maksimalno djelovanje na različite enzime uz izostanak negativnih učinaka. Eutektička otapala pokazala su prednost u smislu da se ne moraju eliminirati prije formulacije proizvoda budući da je zabilježeno njihovo inhibicijsko djelovanje na kolagenazu, te izostanak učinaka na druge enzime (75). Međutim, ekstrakti dobiveni primjenom eutektičkih otapala ispitanih u navedenoj studiji imali su slabije djelovanje od samostalnih otapala pokazujući kako se njihovom primjenom ne postiže željeni učinak ekstrakata. U dvije kliničke studije na malom broju ispitanika ispitana je i učinkovitost komercijalne kreme s ekstraktom lišća maslina gdje su zabilježeni pozitivni učinci na teksturu kože i trensepidermalni gubitak vlage (76) te U/V emulzije sa šećernom frakcijom ekstrakta

komine masline gdje je potvrđeno smanjenje transepidermalnog gubitka vlage i poboljšanje izgleda kože (77).

Samo su 2 studije ispitale anti-aging djelovanje nusproizvoda prerade agruma gdje je od 17 vrsta agruma najveći potencijal u inhibiciji enzima uključenih u starenje kože pokazao ekstrakt flaveda gorke naranče (70), koji je u drugoj studiji (78) uklopljen u fosfolipidni kompleks zajedno s drugim sastavnicama te je utvrđena bolja permeacija u odnosu na primjenu bez uklapanja u fosfolipide, ukazujući na važnost formuliranja.

Antimikrobno djelovanje nusproizvoda vinarstva istraženo je samo u 2 studije (68, 83) gdje je utvrđeno djelovanje ekstrakta peteljki i celuloznog hidrogela s uklopljenim ekstraktom komine protiv Gram-pozitivnih bakterija *in-vitro*. U 6 studija istraženi su ekstrakti nusproizvoda proizvodnje maslinova ulja te su pokazali *in-vitro* djelovanje protiv različitih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija uključenih u patologiju kožnih oboljenja (72, 74, 84–87). Rezultati studija ukazuju na to da viši udio polifenolnih spojeva rezultira jačim antimikrobnim djelovanjem (87), te da izolirani spojevi primijenjeni u jednakoj ukupnoj koncentraciji polifenolnih spojeva imaju slabije djelovanje od sirovog ekstrakta ukazujući na sinergijsko djelovanje (72, 85). Jedna od sastavnica nusproizvoda vinarstva koja bi zacijelo mogla pridonositi navedenom učinku je resveratrol. Naime, resveratrol pokazuje antimikrobno djelovanje protiv velikog broja bakterija, virusa i gljivica. Može utjecati na bakterijsku virulenciju što rezultira smanjenom proizvodnjom otrovnih tvari, inhibicijom nastanka biofilma te smanjenjem bakterijske pokretljivosti (138).

U 4 studije (82, 88–90) utvrđeno je *in-vitro* djelovanje ekstrakata i eteričnih ulja nusproizvoda agruma na Gram-pozitivne, ali i Gram-negativne bakterije. Kod polifenolnih ekstrakata nusproizvoda agruma također se pokazalo kako visok sadržaj ukupnih polifenolnih spojeva te flavonoida nobiletina korelira s antimikrobnim djelovanjem (88, 89), dok se kod

eteričnih ulja antimikrobna aktivnost pripisuje najzastupljenijim hlapljivim spojevima – citronelalu i citronelolu (90). Srodne studije utvrdile su da citronelal, citronelol i njihove smjese s drugim hlapivim sastavnicama eteričnih ulja pokazuju brojne učinke koji bi mogli biti relevantni za kožu. To osim antimikrobnog uključuje i antioksidativni kao i učinak na cijeljenje rana (139). Utvrđeno je kako proizvodnja srebrnih nanočestica s ekstraktom kore agruma dovodi do iznimno jakog inhibitornog djelovanja na stvaranje biofilmova te pospješuje permeaciju kroz staničnu stijenku bakterija (82). Istraživanja pokazuju potencijal svih triju vrsta nusproizvoda za primjenu u proizvodima namijenjenima potpori kože zahvaćene oboljenjima povezanima s patogenima, a osim uključenosti u patologiju kožnih oboljenja, mnogi patogeni ispitani u studijama odgovorni su za kvarenje kozmetičkih proizvoda što ukazuje na potencijal ekstrakata za primjenu ne samo kao kozmeceutika, već i kao prirodnih konzervansa ukoliko bi učinak bio sličan i unutar kozmetičkih formulacija pri prikladnim koncentracijama.

Djelovanje nusproizvoda vinarstva na zacjeljivanje rana istraženo je u 5 studija, od kojih je u 4 (93–96) ispitan učinak ekstrakata *in-vitro* na proliferaciju keratinocita i fibroblasta, dok je provedena i jedna klinička studija na 40 ispitanika gdje je potvrđena učinkovitost kreme s uklopljenim ekstraktom komine grožđa (97). Pokazalo se kako odabir otapala ima značajan učinak na ishod zacjeljivanja rane prilikom primjene samostalnih ekstrakata te da prirodna eutektička otapala imaju obećavajući učinak u smislu postizanja maksimalnih prinosa polifenolnih spojeva te značajno uspješnijim djelovanjem na zacjeljivanje rana u usporedbi s vodenim otopinama etanola (95, 96). Brojne studije ukazuju na to da resveratrol potpomaže zacjeljivanje rana i prevenira nastakan ožiljaka (140). Primjena etanolnih ekstrakata samostalno rezultirala je i smanjenom vijabilnosti keratinocita, dok je uklapanje u liposome rezultiralo eliminacijom takvih negativnih učinaka (96). Navedeni učinak nije neočekivan jer liposomi poboljšavaju terapijsku učinkovitost lijekova

stabilizirajući uklopljene spojeve, olakšavajući njihov ulazak u stanice i tkiva i povećavajući biodistribuciju lijekova na ciljana mjesta *in vivo*, uz minimiziranje sistemske toksičnosti (141). Sve navedeno ukazuje na važnost formulacije kozmetičkih proizvoda kako bi se postigao maksimalni učinak uz eliminaciju potencijalnih nuspojava. Također, pokazalo se kako je poželjno istražiti kombinirano djelovanje različitih frakcija ekstrakata nusproizvoda budući da je lipidna frakcija iz sjemenki grožđa pokazala sinergijsko djelovanje s prisutnim flavonoidima (96).

Djelovanje nusproizvoda proizvodnje maslinova ulja istraženo je u 2 studije, gdje je u prvoj ispitano i utvrđeno djelovanje ekstrakta komine na keratinocite i mikro-RNA molekule uključene u proces zacjeljivanja (98), a u drugoj je vodeni ekstrakt lista uklopljen u kremu koja je prilikom usporedbe sa standardnim lijekom Madecassol® pokazala učinkovitost od 87% u zacjeljivanju kože štakora, dok krema s heksanskim ekstraktom nije pokazala djelovanje (99). Navedeni rezultati pokazuju kako su polarni spojevi ekstrahirani u vodi u najvećoj mjeri odgovorni za učinak u nusproizvoda proizvodnje maslinova ulja na zacjeljivanje rana, a zanimljivo bi bilo procijeniti moguće sinergijsko djelovanje vodenog ekstrakta uklopljenog u formulaciju lijeka Madecassol®.

Utjecaj nusproizvoda prerade agruma na zacjeljivanje rana ispitan je u tri studije. U prvoj je istražen i potvrđen *in-vitro* učinak ekstrakta kore japanskog agruma *C. tamurana* na proliferaciju fibroblasta *in-vitro* (100), a još su dvije studije provedene na štakorima. Pokazalo se kako je topikalna primjena eteričnog ulja kore mandarine (*C. reticulata* Blanco) rezultirala ubrzanim zacjeljivanjem rana (101), dok je primjena srebrnih nanočestica proizvedenih s vodenim ekstraktom lista limuna (*C. limon* (L.) Osbeck) uklopljenih u mast rezultirala uspješnijim djelovanjem od masti samostalno, kao i od samostalnog ekstrakta uklopljenog u mast (102) ukazujući, kao i kod antimikrobnog djelovanja, na izniman potencijal primjene srebrnih nanočestica, prethodno potvrđen brojnim studijama (142).

Ekstrakti različitih dijelova nusproizvoda vinarstva pokazali su protuupalno djelovanje u 6 istraživanja (65, 68, 96, 106–108) gdje su *in-vitro* ispitani učinci na proupalne citokine, dušikov oksid te enzime uključene u upalni proces. Pokazalo se kako je protuupalno djelovanje u korelaciji s udjelom ukupnih polifenolnih spojeva kod ekstrakta komine (106), ali i pojedinih spojeva kao što su flavonol glikozidi koji su izolirani iz ekstrakta peteljke pokazali jače djelovanje u odnosu na sirovi ekstrakt (107). Također, uočen je potencijal za kombinaciju s drugim antioksidansima jer je kombinacija maldivin-3-glukozida iz peteljki s vitaminom E pokazala najjače protuupalno djelovanje od svih ispitanih uzoraka (107). Dodatkom vitamina C u navedenu formulaciju, učinkovitost je pala što pokazuje nužnost procesa formuliranja i istraživanja međusobnih interakcija komponenti. Karotenoidi iz lipidne frakcije sjemenki grožđa pokazali su protuupalno djelovanje utjecajem na transkripcijske čimbenike uključene u upalni odgovor (96), dok je kod polifenolnih ekstrakata sjemenki različitih sorti grožđa izražen utjecaj sadržaja flavan-3-ola na učinkovitost protuupalnog djelovanja (108). Općenito, različite sorte grožđa imale su značajno različite razine inhibicije upalnih procesa ukazujući na važnost istraživanja svake pojedine sorte i sastava pojedinačnih spojeva koji utječu na navedeno djelovanje. Jedna od važnih sastavnica koja pridonosi protuupalnom učinku je resveratrol. Pokazalo se da taj fitoaleksin modulira mnoge stanične i molekularne procese koji dovode do upale. Ipak, molekularni mehanizmi njegovog učinka su složeni i uključuju višestruke putove transdukcije signala te nisu u potpunosti razjašnjeni (143).

Protuupalno djelovanje nusproizvoda proizvodnje maslinova ulja i prerade agruma istraženo je u po jednoj studiji, a pokazalo se kako je ekstrakt lista masline imao slabiju sposobnost inhibicije 5-lipoksigenaze od korištenog standarda oleuropeina te primijenjenih otapala samostalno (75), dok je eterično ulje lista pomela (*C. maxima* (Burm.) Merr.) dobiveno dvjema različitim metodama ekstrakcije bilo relativno učinkovito u inhibiciji



navedenog enzima (90). U navedenoj studiji, viši udio citronelola rezultirao je jačim djelovanjem, ukazujući na važnost odabira prikladne metode ekstrakcije kao prvog koraka u procesu nastanka kozmetičkog proizvoda obogaćenog biljnim ekstraktom.

U 6 studija (67–71, 106) potvrđeno je *in-vitro* inhibitorno djelovanje ekstrakata različitih dijelova nusproizvoda vinarstva na enzim tirozinazu, koji je ključan u procesu melanogeneze. Razina inhibicije bila je u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem polifenolnih spojeva u ekstraktima koji je uvelike varirao ovisno o primijenjenom otapalu i sorti grožđa, a generalno su alkoholni ekstrakti bili uspješniji od vodenih. Različiti dijelovi nusproizvoda proizvodnje maslinova ulja također su u 4 studije pokazali *in-vitro* djelovanje inhibicijom tirozinaze (74) i smanjenjem sadržaja melanina u testiranim stanicama (72, 117) gdje je veći udio polifenolnih spojeva rezultirao izraženijim djelovanjem. Pokazalo se kako je etanolni ekstrakt lista masline uspješniji od arbutina u smanjenju sadržaja melanina što ukazuje na veliki potencijal za primjenu u smanjenju hiperpigmentacija, a također je zabilježen i sinergijski učinak ekstrakta u odnosu na izolirani oleuropein (72). Osim toga, zabilježeno je i djelovanje na izlučivanje melanina bez utjecaja na unutarstanični dio melanogeneze pokazujući potencijal za primjenu u svrhu smanjenja hipopigmentacija (116). U jedinoj kliničkoj studiji provedenoj na malom broju ispitanika ispitana je komercijalna krema s ekstraktom lista masline te se pokazalo kako je indeks melanina ostao jednak te je izostalo djelovanje pripravka (76).

Nusproizvodi prerade agruma istraženi su u tri studije od kojih je u dvije (89, 118) potvrđeno *in-vitro* inhibitorno djelovanje na enzim tirozinazu, koje je dovedeno u vezu sa sadržajem flavonoida nobiletina, poznatog i učinkovitog inhibitora tirozinaze (144). i ukupnih polifenolnih spojeva kada se radilo o ekstraktu kore slatke naranče (*C. sinensis* (L.) Osbeck) (89). Kod istraživanja eteričnih ulja značajno veći su potencijal pokazala eterična ulja kore različitih agruma u usporedbi s eteričnim uljem lišća (118). U trećoj studiji,

fomuliran je sapun s ekstraktom kore slatke naranče (*C. sinensis* (L.) Osbeck) koji je ispitan u kliničkoj studiji na malom broju ispitanika (119) te je utvrđeno značajno smanjenje melanina u koži što ukazuje na potencijal nusproizvoda prerade agruma u regulaciji melanogeneze, a veliko područje koje se još treba istražiti je formuliranje proizvoda za dulje djelovanje na koži, kao i mogući utjecaj na hipopigmentacije koji je utvrđen kod nusproizvoda proizvodnje maslinova ulja.

U 3 studije istraženo je UV-zaštitno djelovanje ekstrakata nusproizvoda vinarstva te se pokazalo ispitivanjem *in-vitro* kako dodatak polifenolnih ekstrakata komine grožđa povećava stabilnost UV-filtera (128) te dvostruko povećava SPF vrijednost kozmetičkih formulacija namijenjenih zaštiti od sunca, što je ispitano i u simuliranim laboratorijskim uvjetima (129) te u kliničkoj studiji na relativno malom broju ispitanika gdje također nije bilo nikakvih negativnih reakcija na primjenu formulacije (130). Ekstrakti samostalno bez UV-filtera nisu ponudili zaštitu od UV zračenja, a učinak stabilizacije se pripisuje redukcijskom kapacitetu i kelirajućem djelovanju polifenolnih spojeva u ekstraktima. UV-zaštitno djelovanje nusproizvoda proizvodnje maslinova ulja istraženo je u 5 studija gdje se pokazalo kako ekstrakti lista masline samostalno mogu ponuditi određenu, relativno nisku razinu zaštite od UV zračenja (74) te da u kombinaciji s UV filterima imaju sinergijski učinak *in-vitro* (131, 132). Kod primjene samostalnih ekstrakata nije zabilježen utjecaj udjela polifenolnih spojeva na učinkovitost zaštite od UV-zračenja (74), dok je kod formulacija s UV-filterima veći udio polifenolnog ekstrakta rezultirao jačim sinergijskim učinkom i većom zaštitom od UV zračenja (74, 131). Osim toga, pokazalo se ispitivanjem *in-vitro* kako ekstrakt lista masline te ultrafiltrirane frakcije otpadne vode iz mlina potencijalno mogu umanjiti oštećenja uzrokovana UV zračenjem inhibicijom proupalnih citokina te poticanjem apoptoze oštećenih keratinocita (117, 133). Navedeni rezultati pokazuju kako se nusproizvodi proizvodnje maslinova ulja mogu koristiti za poboljšanje formulacija za zaštitu od UV zračenja, ali i za

prevenciju štetnih posljedica nastalih djelovanjem UV zračenja. Većina navedenih učinaka mogla bi se pripisati sadržaju polifenolnih spojeva. Naime sve veći broj dokaza upućuje na to da se polifenoli mogu koristiti za prevenciju opekline uzrokovanih izlaganjem suncu jer polifenoli smanjuju štetne učinke ultraljubičastog A (UVA) i ultraljubičastog B (UVB) zračenja na kožu (145).

U jednoj studiji istraženo je djelovanje nusproizvoda prerade agruma na TRPA-1 kanal (135) koji sudjeluje u održavanju epidermalne homeostaze i uključen je u brojne mehanizme u koži te se pokazalo kako eterično ulje kore gorke naranče ima aktivirajući učinak u primijenjenoj koncentraciji, primarno zbog sadržaja derivata kumarina ostola. Navedeni rezultati ukazuju na potencijal eteričnog ulja kore gorke naranče u aktivaciji TRPA-1, što otvara područje za daljnja istraživanja drugih dijelova nusproizvoda prerade gorke naranče, kao i eteričnih ulja ostalih sorti agruma u navedenu svrhu.

## 5. Zaključci

Pregled dostupne literature upućuje na to da usproizvodi vinarstva i proizvodnje maslinova ulja pokazuju *anti-aging*, antimikrobno i protuupalno djelovanje te djelovanje na zacjeljivanje rana, melanogenezu i povećanje učinkovitosti pripravaka UV zaštite. Komina grožđa, uključujući peteljke, najbolje je istražen dio nusproizvoda vinarstva. Ekstrakti lista masline najbolje su istražen dio nusproizvoda proizvodnje maslinova ulja. Nusproizvodi prerade agruma pokazali su anti-aging, antimikrobno i protuupalno djelovanje te djelovanje na zacjeljivanje rana, melanogenezu i aktivaciju TRPA-1. Ekstrakti lišća različitih vrsta agruma najbolje su istražen dio nusproizvoda prerade agruma. Sve tri vrste nusproizvoda pokazuju potencijal za primjenu kao kozmeceutici u proizvodima različitih namjena, a izražena je potreba za optimiranjem ekstrakcijskih postupaka s fokusom na pojedine skupine bioaktivnih molekula uzimajući u obzir i sinergijske učinke, kao i za istraživanjem optimalnih oblika dostave koji bi rezultirali maksimalnim iskorištenjem povoljnih djelovanja. Također, nužan je veći broj kliničkih studija s primjenom formuliranih pripravaka na većim uzorcima ispitanika budući da su brojna djelovanja potvrđena većinski na ekstraktima samostalno, te *in-vitro*.

## 6. Popis literature

1. Puh B. Consumers' Purchase Intentions Towards Natural Cosmetics. *Econviews Rev Contemp* 2016.;29(1):53–64.
2. Fortunati S, Martiniello L, Morea D. The strategic role of the corporate social responsibility and circular economy in the cosmetic industry. *Sustain* 2020;12(12):5120.
3. Ribeiro AS, Estanqueiro M, Oliveira MB, Lobo JMS. Main benefits and applicability of plant extracts in skin care products. *Cosmetics* 2015;2(2):48–65.
4. Barbulova A, Colucci G, Apone F. New trends in cosmetics: By-products of plant origin and their potential use as cosmetic active ingredients. *Cosmetics* 2015;2(2):82–92.
5. Donner M, Radić I. Innovative circular business models in the olive oil sector for sustainable mediterranean agrifood systems. *Sustain* 2021;13(5):1–23.
6. Antonelli M, Basile L, Gagliardi F, Riccaboni A, Isernia P. AGRIFOODMED DELPHI Trends, challenges and policy options for Water Management, Farming Systems and Agri-food Value Index Chains in 2020-2030.
7. Dresch RR, Dresch MTK, Biegelmeyer R, Argenta DF, da Rocha RF, Teixeira HF, i ostali. Potential use of secondary products of the agri-food industry for topical formulations and comparative analysis of antioxidant activity of grape leaf polyphenols. *Nat Prod Res* 2018;32(4):486–92.
8. Chouchouli V, Kalogeropoulos N, Konteles SJ, Karvela E, Makris DP, Karathanos VT. Fortification of yoghurts with grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *LWT - Food Sci Technol* 2013;53(2):522–9.
9. Oliveira DA, Salvador AA, Smânia A, Smânia EFA, Maraschin M, Ferreira SRS. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. *J Biotechnol* 2013;164(3):423–32.
10. Barros A, Gironés-Vilaplana A, Texeira A, Baenas N, Domínguez-Perles R. Grape stems as a source of bioactive compounds: application towards added-value commodities and significance for human health. *Phytochem Rev* 2015;14(6):921–31.
11. Ribéreau- Gayon P, Dubourdiou D, Donèche BB, Lonvaud AA, Darriet P, Towey J. *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications*. 2. izd. John Wiley & Sons; 2006, str. 25-41.
12. Behavior P, Badariah T, Ahmad T, Nordin MS. University Students' Subjective Knowledge of Green Computing and Pro-Environmental Behavior. *Int Educ Stud* 2014;7(2):1–11.
13. Amienyo D, Camilleri C, Azapagic A. Environmental impacts of consumption of Australian red wine in the UK. *J Clean Prod* 2014;72:110–9.
14. Mendes JAS, Xavier AMRB, Evtuguin D V., Lopes LPC. Integrated utilization of grape skins from white grape pomaces. *Ind Crops Prod* 2013;49:286–91.

15. Rasouli H, Farzaei MH, Khodarahmi R. Polyphenols and their benefits: A review. *Int J Food Prop* 2017;1–42.
16. Nunes MA, Rodrigues F, Oliveira MBPP. Grape Processing By-Products as Active Ingredients for Cosmetic Proposes. *Handbook of Grape Processing By-Products: Sustainable Solutions*. Elsevier Inc.; 2017, 267–292 str.
17. Favre G, Piccardo D, Sergio G-A, Pérez-Navarro J, García-Romero E, Mena-Morales A, i ostali. Stilbenes in grapes and wines of Tannat, Marselan and Syrah from Uruguay. *OENO One* 2020;54(1):27–36.
18. Moro KIB, Bender ABB, da Silva LP, Penna NG. Green Extraction Methods and Microencapsulation Technologies of Phenolic Compounds From Grape Pomace: A Review. *Food Bioprocess Technol* 2021;14(8):1407–31.
19. Beres C, Costa GNS, Cabezudo I, da Silva-James NK, Teles ASC, Cruz APG, i ostali. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Manag* 2017;68:581–94.
20. González-Centeno MR, Jourdes M, Femenia A, Simal S, Rosselló C, Teissedre P-L. Characterization of Polyphenols and Antioxidant Potential of White Grape Pomace Byproducts ( *Vitis vinifera* L.). *J Agric Food Chem* 2013.;61(47):11579–87.
21. Karvela E, Makris DP, Kalogeropoulos N, Karathanos VT. Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols. *Talanta* 2009;79(5):1311–21.
22. Cao X, Ito Y. Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 2003;1021(1–2):117–24.
23. Bombardelli E, Morazzoni P, Carini M, Aldini G, Maffei Facino R. Biological activity of procyanidins from *Vitis vinifera* L. *BioFactors* 1997;6(4):429–31.
24. Hebash K a H, Fadel HM, Soliman MM. Volatile components of grape leaves. *JIslamic AcadSci* 2012;4(1):26–8.
25. Lesjak M, Beara I, Simin N, Pintač D, Majkić T, Bekvalac K, i ostali. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *J Funct Foods* 2018;40:68–75.
26. Pérez-Serradilla JA, Luque de Castro MD. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chem* 2011;124(4):1652–9.
27. Mazauric J-P, Salmon J-M. Interactions between Yeast Lees and Wine Polyphenols during Simulation of Wine Aging: II. Analysis of Desorbed Polyphenol Compounds from Yeast Lees. *J Agric Food Chem* 2006;54(11):3876–81.
28. Tao Y, García JF, Sun DW. Advances in Wine Aging Technologies for Enhancing Wine Quality and Accelerating Wine Aging Process. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014.;54(6):817–35.
29. Zhijing Y, Shavandi A, Harrison R, Bekhit AE-D. Characterization of Phenolic Compounds in Wine Lees. *Antioxidants* 2018;7(4):48.

30. Jara-Palacios MJ. Wine lees as a source of antioxidant compounds. *Antioxidants*. 2019.;8(2):1–10.
31. Eurostat: Agriculture, forestry and fishery statistics 2018 Edition. Eurostat. 2018. Dostupno na: <https://ec.europa.eu/eurostat/documents/3217494/9455154/KS-FK-18-001-EN-N.pdf/a9ddd7db-c40c-48c9-8ed5-a8a90f4faa3f> Pristupljeno 24.studenoga 2021.g.
32. Berbel J, Posadillo A. Review and analysis of alternatives for the valorisation of agro-industrial olive oil by-products. *Sustain* 2018;10(1):1–9.
33. Nunes MA, Pimentel FB, Costa ASG, Alves RC, Oliveira MBPP. Olive by-products for functional and food applications: Challenging opportunities to face environmental constraints. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2016;35:139–48.
34. Koprivnjak O. Djevičansko maslinovo ulje od masline do stola. MIH; 2006, str. 9-17.
35. Rodríguez-Gutiérrez G, Rubio-Senent F, Lama-Muñoz A, García A, Fernández-Bolaños J. Properties of Lignin, Cellulose, and Hemicelluloses Isolated from Olive Cake and Olive Stones: Binding of Water, Oil, Bile Acids, and Glucose. *J Agric Food Chem* 2014;62(36):8973–81.
36. Mirabella N, Castellani V, Sala S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *J Clean Prod* 2014;65:28–41.
37. Rodrigues F, Pimentel FB, Oliveira MBPP. Olive by-products: Challenge application in cosmetic industry. *Ind Crops Prod* 2015;70:116–24.
38. Mekki A, Dhouib A, Sayadi S. Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill wastewater. *Microbiol Res* 2006;161(2):93–101.
39. Munin A, Edwards-Lévy F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Sv. 3, Pharmaceutics* 2011; 3: 793–829.
40. Goldsmith C, Vuong Q, Stathopoulos C, Roach P, Scarlett C. Optimization of the Aqueous Extraction of Phenolic Compounds from Olive Leaves. *Antioxidants* 2014;3(4):700–12.
41. Şahin S, Bilgin M. Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: a review. *J Sci Food Agric* 2018;98(4):1271–9.
42. Roselló-Soto E, Koubaa M, Moubarik A, Lopes RP, Saraiva JA, Boussetta N, i ostali. Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds. *Trends Food Sci Technol* 2015;45(2):296–310.
43. Panwar D, Panesar PS, Chopra HK. Recent Trends on the Valorization Strategies for the Management of Citrus By-products. *Food Rev Int* 2021;37(1):91–120.
44. Fadzil NF, Othman SA. Utilization and Valorization Of Citrus Fruit By- Products : A Review. *EKST* 2021;1(2):170–6.

45. Ferrentino G, Asaduzzaman M, Scampicchio MM. Current technologies and new insights for the recovery of high valuable compounds from fruits by-products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2016;1–19.
46. Zema DA, Calabrò PS, Folino A, Tamburino V, Zappia G, Zimbone SM. Valorisation of citrus processing waste: A review. *Waste Manag* 2018.;80:252–73.
47. Aćimović M, Tešević V, Smiljanić K, Cvetković M, Stanković J, Kiprovski B, i ostali. Hydrolates: By-products of essential oil distillation: Chemical composition, biological activity and potential uses. *Adv Technol* 2020;9(2):54–70.
48. Russo C, Maugeri A, Lombardo GE, Musumeci L, Barreca D, Rapisarda A, i ostali. The second life of citrus fruit waste: A valuable source of bioactive compounds. *Molecules* 2021;26(19):1–20.
49. Boukroufa M, Boutekedjiret C, Chemat F. Development of a green procedure of citrus fruits waste processing to recover carotenoids. *Resour Technol* 2017;3(3):252–62.
50. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 2006;99(1):191–203.
51. Anticono M, Blesa J, Frigola A, Esteve MJ. High biological value compounds extraction from citruswaste with non-conventional methods. *Foods* 2020;9(6):811.
52. Zema DA, Calabro PS, Folino A, Tamburino V, Zappia G, Zimbone SM. Wastewater management in citrus processing industries: An overview of advantages and limits. *Water (Switzerland)* 2019;11(12):1–23.
53. Khettal B, Kadri N, Tighilet K, Adjebli A, Dahmoune F, Maiza-Benabdeslam F. Phenolic compounds from Citrus leaves: Antioxidant activity and enzymatic browning inhibition. *J Complement Integr Med* 2017;14(1).
54. Caputo L, Cornara L, Bazzicalupo M, De Francesco C, De Feo V, Trombetta D, i ostali. Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils from Peels of Three Citrus Species. *Molecules* 2020;25(8):1890.
55. Chi PTL, Van Hung P, Le Thanh H, Phi NTL. Valorization of Citrus Leaves: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Essential Oils. *Waste and Biomass Valorization* 2020;11(9):4849–57.
56. Decorps J, Saumet JL, Sommer P, Sigaudou-Roussel D, Fromy B. Effect of ageing on tactile transduction processes. *Ageing Res Rev* 2014;13:90–9.
57. Puizina-Ivić N. Skin aging. *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, Adriat* 2008.;17(2):47–54.
58. Massudi H, Grant R, Braidy N, Guest J, Farnsworth B, Guillemin GJ. Age-Associated Changes In Oxidative Stress and NAD<sup>+</sup> Metabolism In Human Tissue. *PLoS One* 2012;7(7):e42357.
59. Liarte S, Bernabé-García Á, Nicolás FJ. Role of TGF- $\beta$  in Skin Chronic Wounds: A Keratinocyte Perspective. *Cells* 2020;9(2):306.



60. Girotti AW. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J Photochem Photobiol B Biol* 2001;63(1–3):103–13.
61. Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci* 2016;17(6):868.
62. Gkogkolou P, Böhm M. Advanced glycation end products. *Dermatoendocrinol* 2012;4(3):259–70.
63. Wittenauer J, MäcKle S, Sußmann D, Schweiggert-Weisz U, Carle R. Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia* 2015;101:179–87.
64. Wittenauer J, Schweiggert-Weisz U, Carle R. In vitro-study of antioxidant extracts from *Garcinia mangostana* pericarp and Riesling grape pomace - a contribution to by-products valorization as cosmetic ingredients. *J Appl Bot Food Qual.* 2016;89:249–57.
65. Punzo A, Porru E, Silla A, Simoni P, Galletti P, Roda A, i ostali. Grape Pomace for Topical Application: Green NaDES Sustainable Extraction, Skin Permeation Studies, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities Characterization in 3D Human Keratinocytes. *Biomolecules* 2021; 11(8):1181.
66. Mohd Maidin N, Michael N, Oruna-Concha MJ, Jauregi P. Polyphenols extracted from red grape pomace by a surfactant based method show enhanced collagenase and elastase inhibitory activity. *J Chem Technol Biotechnol* 2018;93(7):1916–24.
67. Matos MS, Romero-Díez R, Álvarez A, Bronze MR, Rodríguez-Rojo S, Mato RB, i ostali. Polyphenol-rich extracts obtained from winemakingwaste streams as natural ingredients with cosmeceutical potential. *Antioxidants* 2019;8(9).
68. Leal C, Gouvinhas I, Santos RA, Rosa E, Silva AM, Saavedra MJ, i ostali. Potential application of grape (*Vitis vinifera* L.) stem extracts in the cosmetic and pharmaceutical industries: Valorization of a by-product. *Ind Crops Prod* 2020;154:112675.
69. Malinowska MA, Billet K, Drouet S, Munsch T, Unlubayir M, Tungmunnithum D, i ostali. Grape cane extracts as multifunctional rejuvenating cosmetic ingredient: Evaluation of sirtuin activity, tyrosinase inhibition and bioavailability potential. *Molecules* 2020;25(9):2203.
70. Senol Deniz FS, Orhan IE, Duman H. Profiling cosmeceutical effects of various herbal extracts through elastase, collagenase, tyrosinase inhibitory and antioxidant assays. *Phytochem Lett* 2021; 45:171–83.
71. Odah SM, Salama MM, Aziz WM, El-Alfy TS, Ezzat SM. Anti-wrinkle activity and UPLC-MS/MS Metabolic Profiling of Pomegranate Grape Seeds Extracts. *IJSPR* 2020;11(8):3679–89.
72. Kishikawa A, Ashour A, Zhu Q, Yasuda M, Ishikawa H, Shimizu K. Multiple biological effects of olive oil by-products such as leaves, stems, flowers, olive milled waste, fruit pulp, and seeds of the olive plant on skin. *Phyther Res* 2015;29(6):877–86.

73. Cádiz-Gurrea M de la L, Pinto D, Delerue-Matos C, Rodrigues F. Olive fruit and leaf wastes as bioactive ingredients for cosmetics—a preliminary study. *Antioxidants* 2021;10(2):1–18.
74. Nunes A, Gonçalves L, Marto J, Martins AM, Silva AN, Pinto P, i ostali. Investigations of olive oil industry by-products extracts with potential skin benefits in topical formulations. *Pharmaceutics* 2021;13(4):1–20.
75. Marijan M, Mitar A, Jakupović L, Kardum JP, Končić MZ. Optimization of Bioactive Phenolics Extraction and Cosmeceutical Activity of Eco-Friendly Polypropylene-Glycol–Lactic-Acid-Based Extracts of Olive Leaf. *Molecules* 2022.;27(2):529.
76. Wanitphakdeedecha R, Ng JNC, Junsuwan N, Phaitoonwattanakij S, Phothong W, Eimpunth S, i ostali. Efficacy of olive leaf extract–containing cream for facial rejuvenation: A pilot study. *J Cosmet Dermatol* 2020;19(7):1662–6.
77. Di Mauro MD, Tomasello B, Giardina RC, Dattilo S, Mazzei V, Sinatra F, i ostali. Sugars and minerals enriched fraction from olive mill wastewater for promising cosmeceutical application: Characterization, in vitro and in vivo studies. *Food Funct* 2017;8(12).
78. Damle M, Mallya R. Development and Evaluation of a Novel Delivery System Containing Phytospholipid Complex for Skin Aging. *AAPS PharmSciTech* 2016;17(3):607–17.
79. Burnett CL, Fiume MM, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, Marks JG Jr, Shank RC, Slaga TJ, Snyder PW, Gill LJ, Heldreth B. Safety Assessment of Citrus-Derived Peel Oils as Used in Cosmetics. *Int J Toxicol* 2019;38:33-59.
80. Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ. Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin. *J Investig Dermatology Symp Proc* 2001;6(3):170–4.
81. Platsidaki E, Dessinioti C. Recent advances in understanding *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*) in acne. *F1000 Research* 2018;7:1953.
82. Dutta T, Ghosh NN, Das M, Adhikary R, Mandal V, Chattopadhyay AP. Green synthesis of antibacterial and antifungal silver nanoparticles using *Citrus limetta* peel extract: Experimental and theoretical studies. *J Environ Chem Eng* 2020;8(4):104019.
83. George D, Begum KMMS, Maheswari PU. Sugarcane Bagasse (SCB) Based Pristine Cellulose Hydrogel for Delivery of Grape Pomace Polyphenol Drug. *Waste and Biomass Valorization* 2020;11(3):851–60.
84. Leouifoudi I, Harnafi H, Zyad A. Olive Mill Waste Extracts: Polyphenols Content, Antioxidant, and Antimicrobial Activities. *Adv Pharmacol Sci* 2015;2015:1–11.
85. Obied HK, Bedgood DR, Prenzler PD, Robards K. Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food Chem Toxicol* 2007;45(7):1238–48.
86. Schlupp P, Schmidts TM, Pössl A, Wildenhain S, Franco G Lo. Effects of a phenol-enriched purified extract from olive mill wastewater on skin cells. *Cosmetics* 2019;6:30.

87. Qidwai A, Pandey M, Kumar R, Dikshit A. Comprehensive evaluation of pharmacological properties of *Olea europaea* L. for Cosmeceuticals prospects. Clin Phytoscience 2017;3(1):12.
88. Atolani O, Adamu N, Oguntoye OS, Zubair MF, Fabiyi OA, Oyegoke RA, i ostali. Chemical characterization, antioxidant, cytotoxicity, Anti-*Toxoplasma gondii* and antimicrobial potentials of the *Citrus sinensis* seed oil for sustainable cosmeceutical production. Heliyon 2020;6(2):e03399.
89. Guo C, Shan Y, Yang Z, Zhang L, Ling W, Liang Y, i ostali. Chemical composition, antioxidant, antibacterial, and tyrosinase inhibition activity of extracts from Newhall navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Newhall) peel. J Sci Food Agric 2020;100(6):2664–74.
90. Tsai ML, Lin C Di, Khoo KA, Wang MY, Kuan TK, Lin WC, i ostali. Composition and bioactivity of essential oil from *Citrus grandis* (L.) Osbeck ‘Mato Peiyu’ leaf. Molecules 2017;22(12):1–19.
91. Guo S, DiPietro LA. Factors Affecting Wound Healing. J Dent Res 2010;89(3):219–29.
92. Martin P. Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. Science 1997;276(5309):75–81.
93. Craciun LM, Dumitru BG, Olariu L, Jurcoane S, Cristea S, Adil A, i ostali. Regenerative and scare healing potential of active compounds from *Camelina sativa* oil and grape pomace. Rom Biotechnol Lett 2019;24(6):1075–80.
94. Panić M, Gunjević V, Radošević K, Bubalo MC, Ganić KK, Redovniković IR. Cosmotherm as an effective tool for selection of deep eutectic solvents based ready- to- use extracts from Graševina grape pomace. Molecules 2021;26(16):4722.
95. Manca ML, Marongiu F, Castangia I, Catalán-Latorre A, Caddeo C, Bacchetta G, i ostali. Protective effect of grape extract phospholipid vesicles against oxidative stress skin damages. Ind Crops Prod 2016;83:561–7.
96. Carullo G, Sciubba F, Governa P, Mazzotta S, Frattaruolo L, Grillo G, i ostali. Mantonico and Pecorello grape seed extracts: Chemical characterization and evaluation of *in vitro* wound-healing and anti-inflammatory activities. Pharmaceuticals 2020;13(5):97.
97. Hemmati AA, Foroozan M, Houshmand G, Moosavi ZB, Bahadoram M, Maram NS. The Topical Effect of Grape Seed Extract 2% Cream on Surgery Wound Healing. Glob J Health Sci 2014;7(3):52-58.
98. Benincasa C, La Torre C, Plastina P, Fazio A, Perri E, Caroleo MC, i ostali. Hydroxytyrosyl oleate: Improved extraction procedure from olive oil and by-products, and *in vitro* antioxidant and skin regenerative properties. Antioxidants 2019;8(7):233.
99. Koca U, Süntar I, Akkol EK, Yilmazer D, Alper M. Wound Repair Potential of *Olea europaea* L. Leaf Extracts Revealed by In Vivo Experimental Models and Comparative Evaluation of the Extracts’ Antioxidant Activity. J Med Food 2011;14(1–2):140–6.

100. Harishkumar M, Masatoshi Y, Hiroshi S, Tsuyomu I, Masugi M. Revealing the mechanism of in vitro wound healing properties of *Citrus tamurana* extract. *Biomed Res Int* 2013;2013:963457.
101. Ishfaq M, Akhtar B, Muhammad F, Sharif A, Akhtar MF, Hamid I, i ostali. Antioxidant and Wound Healing Potential of Essential Oil from *Citrus reticulata* Peel and Its Chemical Characterization. *Curr Pharm Biotechnol* 2021;22(8):1114–21.
102. Abbasi N, Ghaneialvar H, Moradi R, Zangeneh MM, Zangeneh A. Formulation and characterization of a novel cutaneous wound healing ointment by silver nanoparticles containing *Citrus lemon* leaf: A chemobiological study. *Arab J Chem* 2021;14(7):103246.
103. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, i ostali. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 2018.;9(6):7204–18.
104. Martel-Pelletier J. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Rheum Dis* 2003;62(6):501–9.
105. Albanesi C, Scarponi C, Giustizieri M, Girolomoni G. Keratinocytes in Inflammatory Skin Diseases. *Curr Drug Target -Inflammation Allergy* 2005;4(3):329–34.
106. Ferri M, Rondini G, Calabretta MM, Michelini E, Vallini V, Fava F, i ostali. White grape pomace extracts, obtained by a sequential enzymatic plus ethanol-based extraction, exert antioxidant, anti-tyrosinase and anti-inflammatory activities. *N Biotechnol* 2017;39:51–8.
107. Queiroz M, Oppolzer D, Gouvinhas I, Silva AM, Barros AIRNA, Domínguez-Perles R. New grape stems' isolated phenolic compounds modulate reactive oxygen species, glutathione, and lipid peroxidation in vitro: Combined formulations with vitamins C and E. *Fitoterapia* 2017;120:146–57.
108. Harbeoui H, Hichami A, Wannes WA, Lemput J, Tounsi MS, Khan NA. Anti-inflammatory effect of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extract through the downregulation of NF- $\kappa$ B and MAPK pathways in LPS-induced RAW264.7 macrophages. *South African J Bot* 2019;125:1–8.
109. Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm* 2010;78(2):133–54.
110. Li Y, Yu H, Jin Y, Li M, Qu C. Verbascoside Alleviates Atopic Dermatitis-Like Symptoms in Mice via Its Potent Anti-Inflammatory Effect. *Int Arch Allergy Immunol* 2018;175(4):220–30.
111. Ebanks J, Wickett R, Boissy R. Mechanisms Regulating Skin Pigmentation: The Rise and Fall of Complexion Coloration. *Int J Mol Sci* 2009;10(9):4066–87.
112. Chang TS. Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. *Materials (Basel)* 2012;5(9):1661–85.
113. Desai S, Owen J. Progressive macular hypomelanosis: An update. *Pigment Int* 2014;1(2):52.

114. Kim SK, Kim EH, Kang HY, Lee E-S, Sohn S, Kim YC. Comprehensive understanding of idiopathic guttate hypomelanosis: clinical and histopathological correlation. *Int J Dermatol* 2010;49(2):162–6.
115. Manga P, Elbuluk N, Orlow SJ. Recent advances in understanding vitiligo. *F1000 Research* 2016;5:2234.
116. Goenka S, Simon SR. A novel pro-melanogenic effect of standardized dry olive leaf extract on primary human melanocytes from lightly pigmented and moderately pigmented skin. *Pharmaceuticals* 2021.;14(3):252.
117. Ha JY, Choi HK, Oh MJ, Choi HY, Park CS, Shin HS. Photo-protective and anti-melanogenic effect from phenolic compound of olive leaf (*Olea europaea* L. var. Kalamata) extracts on the immortalized human keratinocytes and B16F1 melanoma cells. *Food Sci Biotechnol* 2009;18(5):1193–8.
118. Aumeeruddy-Elalfi Z, Gurib-Fakim A, Mahomoodally MF. Kinetic studies of tyrosinase inhibitory activity of 19 essential oils extracted from endemic and exotic medicinal plants. *South African J Bot* 2016;103:89–94.
119. Borse SL, Badwar MR. Formulation and Evaluation of Two Layered Soap Containing Orange Peel Extract. *J Pharm Sci & Res* 2019;11(6):2190–2.
120. Flament F, Bazin R, Rubert, Simonpietri, Piot B, Laquieze. Effect of the sun on visible clinical signs of aging in Caucasian skin. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2013;6:221-232.
121. D’Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV Radiation and the Skin. *Int J Mol Sci* 2013;14(6):12222–48.
122. Beani J-C. [Ultraviolet A-induced DNA damage: role in skin cancer. *Bull Acad Natl Med* 2014;198(2):273–95.
123. Scott TL, Christian PA, Kesler M V., Donohue KM, Shelton B, Wakamatsu K, i ostali. Pigment-independent cAMP-mediated epidermal thickening protects against cutaneous UV injury by keratinocyte proliferation. *Exp Dermatol* 2012;21(10):771–7.
124. Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev* 2012;26(11):1131–55.
125. Dutra EA, Da Costa E Oliveira DAG, Kedor-Hackmann ERM, Miritello Santoro MIR. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Rev Bras Ciencias Farm J Pharm Sci* 2004;40(3):381–5.
126. Haywood R, Wardman P, Sanders R, Linge C. Sunscreens Inadequately Protect Against Ultraviolet-A-Induced Free Radicals in Skin: Implications for Skin Aging and Melanoma? *J Invest Dermatol* 2003;121(4):862–8.
127. Farjadmand F, Karimpour-Razkenari E, Nabavi SM, Ardekani MRS, Saeedi M. Plant Polyphenols: Natural and Potent UV-Protective Agents for the Prevention and Treatment of Skin Disorders. *Mini-Reviews Med Chem* 2021;21(5):576–85.

128. Martincigh BS, Ollengo MA. The Photostabilizing Effect of Grape Seed Extract on Three Common Sunscreen Absorbers. *Photochem Photobiol* 2016;92(6):870–84.
129. Hubner A, Sobreira F, Neto AV, de Oliveira Pinto CAS, Dario MF, Díaz IEC, i ostali. The synergistic behavior of antioxidant phenolic compounds obtained from winemaking waste's valorization, increased the efficacy of a sunscreen system. *Antioxidants* 2019;8(11):530.
130. Hübner AA, Sarruf FD, Oliveira CA, Neto A V., Fischer DCH, Kato ETM, i ostali. Safety and photoprotective efficacy of a sunscreen system based on grape pomace (*Vitis vinifera* l.) phenolics from winemaking. *Pharmaceutics* 2020;12(12):1–22.
131. da Silva ACP, Paiva JP, Diniz RR, dos Anjos VM, Silva ABSM, Pinto AV, i ostali. Photoprotection assessment of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract standardized to oleuropein: In vitro and in silico approach for improved sunscreens. *J Photochem Photobiol B Biol* 2019;193:162–71.
132. Galanakis CM, Tsatalas P, Galanakis IM. Phenols from olive mill wastewater and other natural antioxidants as UV filters in sunscreens. *Environ Technol Innov* 2018;9:160–8.
133. Lecci RM, D'antuono I, Cardinali A, Garbetta A, Linsalata V, Logrieco AF, i ostali. Antioxidant and pro-oxidant capacities as mechanisms of photoprotection of olive polyphenols on uva-damaged human keratinocytes. *Molecules* 2021;26(8):2153.
134. Tóth BI, Oláh A, Szöllősi AG, Bíró T. TRP channels in the skin. *Br J Pharmacol* 2014;171(10):2568–81.
135. Terada Y, Yamashita R, Ihara N, Yamazaki-Ito T, Takahashi Y, Masuda H, i ostali. Human TRPA1 activation by terpenes derived from the essential oil of daidai, *Citrus aurantium* L. var. daidai Makino. *Biosci Biotechnol Biochem* 2019;83(9):1721–8.
136. Gomes BAQ, Silva JPB, Romeiro CFR, Dos Santos SM, Rodrigues CA, Gonçalves PR, Sakai JT, Mendes PFS, Varela ELP, Monteiro MC. Neuroprotective Mechanisms of Resveratrol in Alzheimer's Disease: Role of SIRT1. *Oxid Med Cell Longev* 2018;30:8152373.
137. Skaltsounis AL, Argyropoulou A, Aligiannis A, Xynos N, Recovery of High Added Value Compounds from Olive Tree Products and Olive Processing Byproducts. U: Boskou D, ur. *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*, AOCS Press, 2015, str. 333-356.
138. Abedini E, Khodadadi E, Zeinalzadeh E, Moaddab SR, Asgharzadeh M, Mehramouz B, Dao S, Samadi Kafil H. A Comprehensive Study on the Antimicrobial Properties of Resveratrol as an Alternative Therapy. *Evid Based Complement Alternat Med* 2021; 16:8866311.
139. Sharma R, Rao R, Kumar S, Mahant S, Khatkar S. Therapeutic Potential of Citronella Essential Oil: A Review. *Curr Drug Discov Technol* 2019;16(4):330-339.
140. Hecker A, Schellnegger M, Hofmann E, Luze H, Nischwitz SP, Kamolz LP, Kotzbeck P. The impact of resveratrol on skin wound healing, scarring, and aging. *Int Wound J*. 2022;19(1):9-28.

141. Guimarães D, Cavaco-Paulo A, Nogueira E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *Int J Pharm* 2021;601:120571.
142. Paladini F, Pollini M. Antimicrobial Silver Nanoparticles for Wound Healing Application: Progress and Future Trends. *Materials (Basel)* 2019;12(16):2540.
143. Meng T, Xiao D, Muhammed A, Deng J, Chen L, He J. Anti-Inflammatory Action and Mechanisms of Resveratrol. *Molecules*. 2021;26(1):229.
144. Arroo RRJ, Sari S, Barut B, Özel A, Ruparelia KC, Şöhretoğlu D. Flavones as tyrosinase inhibitors: kinetic studies in vitro and in silico. *Phytochem Anal* 2020;31(3):314-321.
145. Saric S, Sivamani RK. Polyphenols and Sunburn. *Int J Mol Sci* 2016;17(9):1521.

