

## TEPALŲ SU BIČIŲ PRODUKTAIS MODELIAVIMAS IR KOKYBĖS VERTINIMAS

Kristina Ramanauskienė<sup>2,3</sup>, Asta Marija Inkėnienė<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Kauno kolegijos Medicinos fakulteto Farmakoteknikos katedra,*

<sup>2</sup>*Šv. Ignaco Lojolos kolegijos Sveikatos mokslų ir technologijų katedra*

<sup>3</sup>*Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Klinikinės farmacijos katedra*

**Raktažodžiai:** puskiečiai preparatai, geltonasis vaškas, propolis, *in vitro* atpalaidavimas.

### Santrauka

Aktualu sumodeliuoti tokią sistemą, kuri būtų sudaryta ne tik iš natūralios veikliosios medžiagos, bet ir iš natūralaus pagrindo. Tyrimo tikslas – sumodeliuoti tepalus su bičių vašku ir propolio tirštuoju ekstraktu ir įvertinti jų kokybę biofarmaciniais tyrimais *in vitro*. Tepalų pagrindui buvo pasirinktos natūralios medžiagos: geltonasis bičių vaškas, alyvuogių aliejus. Pagamintos stabilios pusketės sistemos su bičių vašku ir propolio tirštuoju ekstraktu yra priimtinių fizinių savybių ir pH. Propolis, kaip veiklioji medžiaga, buvo įterptas į pusketės nešiklio sistemas tirštojo ekstrakto pavidalu. Tyrimo rezultatai parodė, kad bičių vaškas kaip pagalbinė medžiaga ir jo kiekis turi įtakos propolio fenolio junginių atpalaidavimui iš puskiečių tepalų.

### Įvadas

Šiuo metu populiarėja gydymas natūraliomis priemonėmis, todėl aktualu sumodeliuoti pusketę preparatą iš natūralių medžiagų, šiuo atveju iš bičių produktų, kuris pasižymėtų apsauginiu bei odos pažeidimus gydančiu poveikiu ir būtų tinkamas vartoti ilgą laiką. Dermatologiniai preparatai iš natūralių žaliavų tampa vis populiareni, todėl tyrėjai ir gamintojai siekia sukurti stabilius produktus, kurie atitiktų šiuolaikinius reikalavimus [1]. Aktualu sumodeliuoti tokią sistemą, kuri būtų sudaryta ne tik iš natūralios veikliosios medžiagos, bet ir iš natūralaus pagrindo [2]. Modeliuojant puskiečius preparatus, vienas iš svarbių uždavinių yra tinkamo pagrindo parinkimas. Pagrindiniais komponentais puskiečių preparatų modeliavimui pasirinkti bičių vaškas, alyvuogių aliejus. Alyvuogių aliejus ir bičių vaškas yra natūralios kilmės medžiagos, savo sudėtyje turinčios flavonoidų, antioksidantų, antibakterinių ir priešgrybelinių medžiagų,

kurios, vartojamos odos paviršiuje, paveikia odos ląstelės citokinų gamybą [3-6]. Geltonasis bičių vaškas dažnai naudojamas dermatologijoje (tepalų, kremų, balzamų formose) kaip natūralus produktas, maitinantis, minkštinantis odą, saugantis ją nuo drėgmės netekimo ar neigiamo aplinkos poveikio. Šis bičių produktas pasižymi emulsuojančiomis, klampą didinančiomis bei antispjetinėmis savybėmis [7]. Mokslinėje literatūroje galima rasti duomenų, jog bičių vaško ir aliejaus mišiniai gali būti taikomi atopinio dermatito, egzemos, psoriazės, odos grybelinėms infekcijoms gydyti [8-11]. Propolis puskiečių preparatų gamyboje naudojamas kaip veiklioji medžiaga dėl antioksidacinių, antiradikalinių, antibakterinių, antigrybelinių, antivirusinių, priešušdegiminių savybių. Propolio ir sumodeliuotų puskiečių sistemų su tirštuoju propolio ekstraktu kokybė vertinama, nustatant fenolinių junginių kiekį. Mokslinių tyrimų metu nustatyta, jog dominuojančios fenolinės rūgštys lietuviškame propolyje yra ferulo ir p-kumaro rūgštis bei vanilinas. Propolio cheminė sudėtis priklauso nuo jo surinkimo vietovėje dominuojančių augalų. Didžiausias fenolinių rūgščių kiekis nustatytas propolyje, kur jo surinkimo vietovėje dominavo lapuočiai medžiai ir pievos [11,12]. Atlikti eksperimentiniai tyrimai rodo, jog tirštasis propolio ekstraktas, turintis didžiausią fenolinių junginių kiekį, lyginant su kitais skystaisiais ekstraktais, yra tinkamas įterpti į įvairias pusketės sistemas – tepalus, kurių pagrindą sudaro vaško-aliejaus sistema [13], vaško-aliejaus tipo kremus [2], nes gaunamos stabilios pusketės farmacinės formos. Puskiečiai preparatai su propolio ekstraktu gali būti naudojami kaip apsauginio poveikio preparatai, saugantys odą nuo neigiamų aplinkos veiksnių, tokių kaip mikrobinė tarša, UV spinduliuotė ir laisvieji radikalai [14]. Apsauginio poveikio preparatai turi veikti odos paviršiuje ir nesiskverbti į gilesnius odos sluoksnius. Bičių vaškas, kuris naudojamas kaip tirstiklis puskiečių pagrindų modeliavimui, sudaro plėvelę ant odos ir užtikrina preparatų paviršinį poveikį [2]. Aktualu puskiečių preparatų

kokybę įvertinti biofarmaciniais tyrimais *in vitro*. Šie tyrimai atspindi keleto fizikinių ir cheminių parametrų, tokių kaip vaistinės medžiagos tirpumo nešiklyje, dalelių dydžio, vaisto formos, klampos įtaką vaistinės medžiagos atpalaidavimui iš vaisto formos per sintetinę membraną [15] ir leidžia prognozuoti preparato poveikį ant odos.

Įvertinus bičių produktų pritaikymo galimybes puskiečių pagrindų gamyboje, suformuluotas **tyrimo tikslas** – sumodeliuoti tepalus su bičių vašku ir propolio tirštuoju ekstraktu ir įvertinti jų kokybę biofarmaciniais tyrimais *in vitro*.

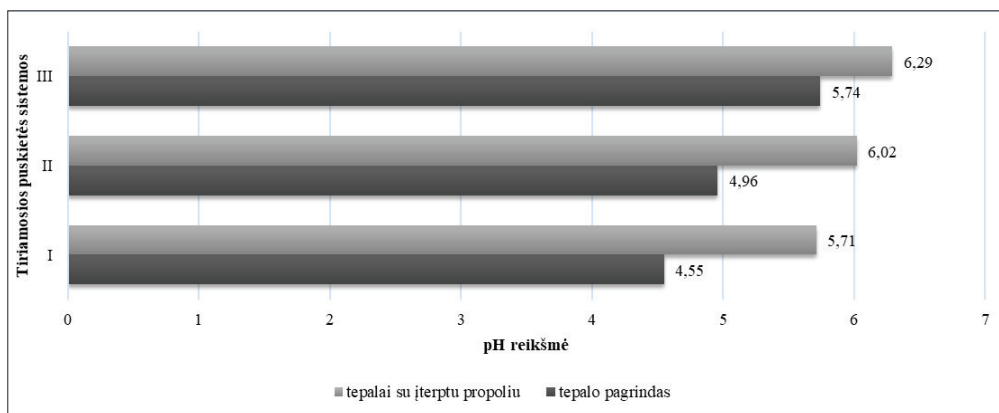
### Tyrimo medžiagos ir metodai

**Tepalų gamyba.** Tepalų pagrindų modeliavimui buvo pasirinktos tik gamtinės kilmės medžiagos: geltonasis bičių vaškas ir alyvuogių aliejus. Bičių vaškas išlydomas ant vandens vonelės, po to pilamas reikiamas alyvuogių aliejaus kiekis. Šildoma bei maišoma iki vienalytės masės. Gauta masė atvėsinama ir įterpiama veiklioji medžiaga – tirštasis propolio ekstraktas (2,5 proc. nuo visos pusiau kieto preparato masės). Maišoma iki vienalytės masės. Tiriamosios tepalų sudėty pateikiamos 1 lentelėje.

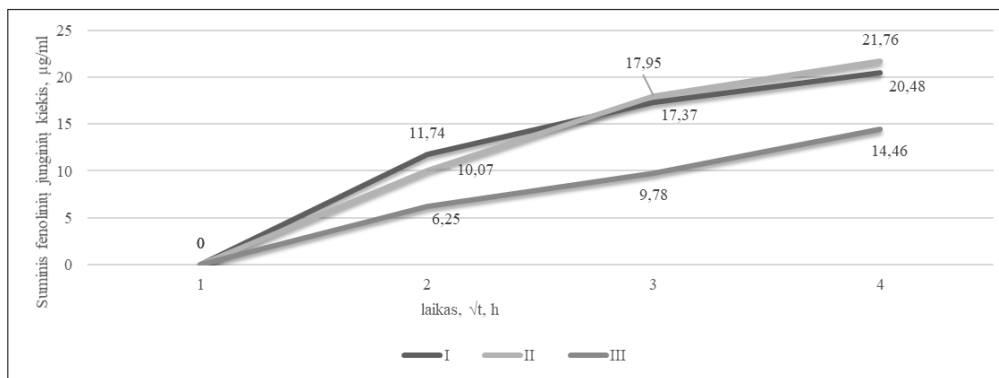
**1 lentelė.** Puskiečių sistemų – tepalų su bičių produktais sudėtis pH reikšmės nustatymui išmatuotos tiriamųjų puskiečių sistemų pH reikšmės aparatu pH-meter 766 Calimatic (Knick, Vokietija)

Tepalo Nr.	Bičių vaškas, (g)	Alyvuogių aliejus (g)	Tirštasis propolio ekstraktas (g)
I	7,5	90,0	2,5
II	15,5	82,0	2,5
III	22,5	75,0	2,5

**Fenolinių junginių atpalaidavimo iš tepalų *in vitro* tyrimai.** Atpalaidavimo tyrimai (n=3) *in vitro* atlikti naudojant modifikuotas Franz tipo difuzines celes. Tepalo (1,0±0,2 g) dedama į celę su regeneruotos celiuliozės dializės membrana Cuprophan® (Medicell International Ltd., Londonas, JK). Difuzinė celė patalpinama į termostatuojamą akceptorinę terpę. Akceptorinė terpė – išgrynintasis vanduo. Akceptorinės terpės temperatūra 32 °C. Akceptorinė terpė nuolat maišoma magnetine maišykle IKAMAG® C-MAG HS-7. Mėginiai (1 ml) imami po 1, 2, 4 ir 6 valandų nuo tyrimo pradžios. Iškart po mėginio paėmimo papildoma tokiu pat tūriu šviežios akceptorinės terpės. Mėginiai analizuoti spektrofotometriškai



**1 pav.** Tiriamųjų puskiečių sistemų: pagrindų ir su įterptu propoliu pH reikšmės



**2 pav.** Iš puskiečių sistemų – tepalų (I-III) atpalaiduotas suminis fenolinių junginių kiekis (µg/ml ± SD, n=3)

metodu, naudojant UV-Vis spektrofotometrą (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, JAV), atliekant spalvinę reakciją su Folin – Ciocalteu reagentu ir išmatuojant absorbciją po reakcijos. Reakcija vykdoma 10 ml matavimo kolbutėje, kurioje pirmiausiai 2 ml išgrynintojo vandens sumaišoma su 1 ml tiriamojo tirpalo ir 1,5 ml 20 proc. vandeninio natrio karbonato tirpalo. Praskiedžiama išgrynintuoju vandeniu iki 10 ml. Mišinys gerai supurtomas ir paliekamas tamsoje. Po 30 minučių spektrofotometru išmatuojama absorbcija 765 nm bangos ilgyje. Bendras fenolinių junginių kiekis išreiškiamas p-kumaro rūgšties ekvivalentu.

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant MS Excel 2016 (Microsoft, JAV) ir SPSS 22 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL) statistines programas. Kiekybiniai duomenys vertinti remiantis aritmetiniu vidurkiu, standartiniu nuokrypiu (SD). Tikrinant statistines hipotezes, duomenų skirtumas buvo priskiriamas statistiškai reikšmingam, kai  $p < 0,05$ .

### Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Eksperimentinio tyrimo metu buvo sumodeliuotos pusiau kietos hidrofobinės sistemos – tepalai, naudojant pagrindų gamyboje geltonąjį bičių vašką ir alyvuogių aliejų. Veiklioji medžiaga propolis į puskiečius pagrindus įterptas tirštojo ekstrakto forma. Tiriamieji sumodeliuoti tepalai buvo vertinami pagal fizines savybes: tepumą, nuplaunamumą, spalvą, kvapą ir fazių išsiskyrimą. Nustatyta, kad visos šios puskietai sistemos pasižymėjo panašiomis fizinėmis savybėmis, t.y. buvo tepios, sunkiai nuplaunamos, gelsvos (geltonos) spalvos, malonaus kvapo. Tyrimų rezultatai parodė, jog tepalai stabilūs, nenustatytas fazių atsiskyrimas ir veikliosios medžiagos sedimentavimas.

Kitame eksperimentinių tyrimų etape vertinta tepalų pH reikšmė. Tyrimų rezultatai parodė, kad pagamintų tepalų pH reikšmė priklauso nuo pasirinkto pagrindo (1 pav).

Mažiausia pH reikšmė būdinga puskietai sistemai I, o didžiausia – puskietai sistemai III. Tyrimų rezultatai parodė, jog didėjant vaško kiekiui tepalo pagrindu, didėja pH reikšmė. Pagamintų tepalų su propolio tirštuoju ekstraktu pH reikšmė panaši į odos, todėl sistemos tinkamos vartoti, prognozuojamas kokybiškas, dirginančio poveikio nesukeliantis veikimas. Visi tepalai dėl tinkamos pH reikšmės buvo pasirinkti tolimesniems tyrimams.

*In vitro* atpalaidavimo tyrimo metu vertinta pagrindo įtaka veikliosios medžiagos (propolio) fenolinių junginių atpalaidavimui iš farmacinės formos. Eksperimentinio tyrimo metu nustatyta, kad pagrindu (I-III) didėjant vaško kiekiui, lėtėja veikliųjų medžiagų atpalaidavimas (2 pav).

Didžiausias fenolinių junginių kiekis atpalaiduojamas iš I ir II tepalų, kuriuose yra mažiausias kiekis bičių vaško, lyginant su III sistema. Nustatytas statistiškai reikšmingas

skirtumas ( $p < 0,05$ ) tarp atpalaiduoto suminio fenolinių junginių kiekio ir tirtųjų sistemų. Šis tyrimas parodė, kad propolio fenolinių junginių atsipalaidavimas iš puskiečių nešiklių sistemų priklauso ne tik nuo pagalbinių medžiagų, bet ir nuo jų koncentracijos.

### Išvados

1. Pagaminti stabilūs tepalai su bičių vašku ir propolio tirštuoju ekstraktu yra priimtinių fizinių savybių ir pH.

2. Tyrimų rezultatai parodė, jog bičių vaško kiekis tepaluose lėtina fenolinių junginių atpalaidavimo kinetiką iš pagrindo. Didėjant bičių vaško kiekiui, veikliųjų junginių iš tepalų atpalaiduojama mažiau.

### Literatūra

- Salama HA, Ammar HO. Effect of Beeswax on the rheological characteristics of soft paraffin. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 2006;79(4):154-157.  
<https://doi.org/10.1002/lipi.19770790405>
- Ramanauskienė K, Inkėnienė AM, Leskauskaitė D. Semisolid propolis preparation, and evaluation of its quality. *Farmacia* 2012;60(4):535-543.
- Al-Waili N. An alternative treatment for pityriasis versicolor, tinea cruris, tinea corporis and tinea faciei with topical application of honey, olive oil and beeswax mixture: an open pilot study. *Complement Ther Med* 2004;12:45-47.  
<https://doi.org/10.1016/j.ctim.2004.01.002>
- Al-Waili N. Mixture of honey, beeswax and olive oil inhibits growth of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Arch Med Res* 2005;36:10-13.  
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2004.10.002>
- Al-Waili N. Clinical and mycological benefits of topical application of honey, olive oil and beeswax in diaper dermatitis. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:160-163.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01013.x>
- Israili ZH. Antimicrobial properties of honey. *Am J Ther* 2014;21(4):304-323.  
<https://doi.org/10.1097/MJT.0b013e318293b09b>
- Duarte S, Koo H, Bowen WH, Hayacibara MF, Cury JA, Ikegaki M, Rosalen PL. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biol Pharm Bull* 2003;26:527-531.  
<https://doi.org/10.1248/bpb.26.527>
- Campos JF, Santos UP, Macorini LFB, Melo AM, Balestieri JB, Paredes-Gamero E, Cardoso CA, Picoli Souza K, Santos EL. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chem Toxicol* 2014;65:374-380.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.008>
- Gallucci MN, Carezzano ME, Oliva MM, Demo MS, Pizzolitto

- RP, Zunino MP, Zygodlo JA, Dambolena JS. In vitro activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: a quantitative structure-activity relationship analysis. *J Appl Microbiol* 2014;116(4):795-804. 9. Abu-Seida AM. Effect of propolis on experimental cutaneous wound healing in dogs. *Vet Med Int* 2015;2015 ID 672643:4. <https://doi.org/10.1111/jam.12432>
10. Bankova V, Popova M, Bogdanov S, Sabatini AG. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z Naturforsch C* 2002;57: 530-533. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-5-622>
11. Ramanauskienė K, Savickas A, Inkėnienė A, Vitkevičius K, Kasparavičienė G, Briedis V, Amšiejus A. Analysis of content of phenolic acids in Lithuanian propolis using high-performance liquid chromatography technique. *Kaunas: Medicina* 2009;45(9):714-717. <https://doi.org/10.3390/medicina45090093>
12. Rocha BA, Bueno PCP, Oliveira Lima Leite Vaz MM, Nascimento AP, Ferreira NU, Moreno GP, Rodrigues MR, Mello Costa-Machado AR, Barizon EA, Campos JCL, Oliveira PF, Acésio NO, Martins SPL, Tavares DC, Berretta AA. Evaluation of a propolis water extract using a reliable rp-hplc methodology and in vitro and in vivo efficacy and safety characterisation. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013 ID 670451:1-11. <https://doi.org/10.1155/2013/670451>
13. Silva JC, Rodrigues S, Feás X, Estevinho LM. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food Chem Toxicol* 2012;50(5): 1790-1795. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.097>
14. Istvan E, Ehab YAE, Ildiko C, Zsuzsa S, Annamaria C, Tunde K. Optimization of drug release from dermatological semisolid preparations. *Drug Dev Res* 2003;59(3):316-325. <https://doi.org/10.1002/ddr.10213>

#### MODELING AND QUALITY ASSESSMENT OF SEMI-SOLIDS WITH BEE PRODUCTS

K. Ramanauskienė, A.M. Inkėnienė

Keywords: semi-solid, yellow beeswax, propolis, *in vitro* release.

##### Summary

It is important to model such a system, which would consist not only of a natural active substance, but also of a natural basis. The aim of the study was to model ointments with beeswax and propolis thick extract and evaluate their quality by *in vitro* biopharmaceutical studies. Natural materials such as yellow beeswax, olive oil were chosen as the basis for the ointments. Manufactured stable semi-solid systems with beeswax and propolis thick extract have acceptable physical properties and pH values. Propolis as an active ingredient was introduced into semi-solid carrier systems in the form of a thick extract. The results of the study show that beeswax as an excipient and its amount influence the release of propolis phenolic compounds from semi-solid oils.

Correspondence to: [asta.inkeniene@go.kauko.lt](mailto:asta.inkeniene@go.kauko.lt)

Gauta 2020-10-28