



**KAUNO TECHNOLOGIJOS  
UNIVERSITETAS  
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS  
FAKULTETAS**



**LIETUVOS SVEIKATOS  
MOKSLŲ UNIVERSITETAS  
FARMACIJOS  
FAKULTETAS**

**Augustina Tamulytė**

**VIETINIO POVEIKIO FARMACINIŲ FORMŲ SU PROPOLIO  
EKSTRAKTAIS TECHNOLOGIJA IR BIOFARMACINIS  
VERTINIMAS**

Baigiamasis magistro projektas

**Vadovas**

Prof. dr. Kristina Ramanauskienė

**KAUNAS, 2018**

**KAUNO TECHNOLOGIJOS  
UNIVERSITETAS  
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS  
FAKULTETAS**

**LIETUVOS SVEIKATOS  
MOKSLŲ UNIVERSITETAS  
FARMACIJOS  
FAKULTETAS**

**VIETINIO POVEIKIO FARMACINIŲ FORMŲ SU PROPOLIO  
EKSTRAKTAIS TECHNOLOGIJA IR BIOFARMACINIS  
VERTINIMAS**

Baigiamasis magistro projektas

**Medicininė chemija (kodas 628F10001)**

**Vadovas**

Prof. dr. Kristina Ramanauskienė

2018 05 31

**Recenzentas**

Prof. dr. Daiva Majienė

2018 05 31

**Projektą atliko**

Augustina Tamutytė

2018 05 31

**KAUNAS, 2018**



**KAUNO TECHNOLOGIJOS  
UNIVERSITETAS**

**LIETUVOS SVEIKATOS  
MOKSLŲ UNIVERSITETAS**

Augustina Tamulytė

Studijų programa Medicininė chemija (kodas 628F10001)

„Vietinio poveikio farmacinių formų su propolio ekstraktais technologija ir  
biofarmacinis vertinimas“

**AKADEMINIO SAŽINGUMO DEKLARACIJA**

2018 m. 05 mėn. 31 d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano **Augustinos Tamulytės** Baigiamasis projektas tema „Vietinio poveikio farmacinių formų su propolio ekstraktais technologija ir biofarmacinis vertinimas“ yra parašytas visiškai savarankiškai, o visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena darbo dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymu nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

---

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

---

(parašas)

## Turinys

<b>Įvadas</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Literatūros apžvalga</b> .....	<b>13</b>
1.1. Propolio fizikinės ir cheminės savybės .....	13
1.2. Biologinis propolio aktyvumas .....	15
1.2.1. Antioksidacinis aktyvumas .....	15
1.2.2. Antimikrobinis aktyvumas.....	17
1.2.3. Uždegimą slopinantis aktyvumas .....	18
1.3. Pusiau kietų vaisto formų charakteristika .....	18
1.4. Pusiau kietų vaisto formų kokybės tyrimai.....	20
1.4.1. Veikliųjų junginių atpalaidavimo iš pusiau kietų vaisto formų tyrimai <i>in vitro</i> .....	20
1.4.2. Veikliųjų junginių skvarbos iš pusiau kietų vaisto formų tyrimai.....	20
1.5. Modeliuojamų pusiau kietų vaisto formų su propolio ekstraktais komponentai .....	22
1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas.....	23
<b>2. Tyrimo metodika ir metodai</b> .....	<b>25</b>
2.1. Tyrimo objektas, naudotos medžiagos ir įranga .....	25
2.2. Pusiau kietų vaisto formų su propolio ekstraktais gamybos technologija .....	27
2.2.1. Propolio etanolinio ekstrakto gamyba .....	27
2.2.2. Tirštojo propolio ekstrakto gamyba.....	27
2.3. Propolio ekstraktų kokybės vertinimas .....	27
2.3.1. Bendras fenolinių junginių kiekio nustatymas propolio ekstraktuose.....	27
2.3.2. Propolio ekstraktų analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.....	27
2.3.3. Antioksidacinis propolio ekstrakto aktyvumas.....	28
2.3.4. Priešgrybelinis ir antibakterinis propolio ekstrakto aktyvumai .....	28
2.4. Pusiau kietų vaisto formų su propolio ekstraktais modeliavimas .....	29
2.4.1. Tepalų su tirštuoju propolio ekstraktu modeliavimas.....	29
2.4.2. Kremų su tirštuoju propolio ekstraktu modeliavimas.....	30
2.4.3. Gelių su etanoliniu propolio ekstraktu modeliavimas .....	31
2.5. Pusiau kietų vaisto formų su propolio ekstraktais kokybės vertinimas .....	32
2.5.1. Pusiau kietų vaisto formų pH ir reologinių savybių vertinimas .....	32
2.5.2. Fenolinių junginių atpalaidavimas iš pusiau kietų vaisto formų <i>in vitro</i> .....	32
2.5.3. Fenolinių junginių skvarbos į odą tyrimai <i>ex vivo</i> .....	33
2.6. Statistinė duomenų analizė.....	33
<b>3. Rezultatai</b> .....	<b>34</b>

3.1. Tirštojo ir etanolinio propolio ekstraktų kokybinis vertinimas.....	34
3.1.1. Bendras fenolinių junginių kiekis tirštajame ir etanoliniame propolio ekstraktuose .....	34
3.1.2. Fenolinių junginių nustatymas tirštajame ir etanoliniame propolio ekstraktuose efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.....	34
3.1.3. Antioksidacinis propolio ekstrakto aktyvumas.....	36
3.1.4. Priešgrybelinis ir antibakterinis propolio ekstrakto aktyvumai .....	37
3.2. Pusiau kietų vaisto formų su propolio ekstraktais kokybės vertinimas ir atranka .....	38
3.2.1. Pusiau kietų vaisto formų pH reikšmės nustatymas ir organoleptinių savybių vertinimas ...	38
3.2.2. Pusiau kietų vaisto formų reologinių savybių vertinimas.....	41
3.2.3. Veikliųjų junginių iš tepalų atpalaidavimas <i>in vitro</i> ir jų kiekio nustatymas spektrofotometrijos metodu .....	44
3.2.4. Veikliųjų junginių iš kremų ir gelio atpalaidavimas <i>in vitro</i> ir jų kiekio nustatymas spektrofotometrijos metodu.....	46
3.2.5. Veikliųjų junginių iš tepalų atpalaidavimas <i>in vitro</i> ir jų kiekio nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.....	48
3.2.6. Veikliųjų junginių iš kremų bei gelio atpalaidavimas <i>in vitro</i> ir jų kiekio nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.....	50
3.3. Fenolinių junginių iš pusiau kietų vaisto formų su propolio ekstraktais skvarba į odą <i>ex vivo</i>	51
<b>Išvados .....</b>	<b>55</b>
<b>Literatūros šaltiniai .....</b>	<b>57</b>

Tamutytė, Augustina. Vietinio poveikio farmacinių formų su propolio ekstraktais technologija ir biofarmacinis vertinimas. *Chemijos magistro* Baigiamasis projektas / vadovė prof. dr. Kristina Ramanauskienė; Lietuvos Sveikatos Mokslų universitetas, Farmacijos fakultetas, Klinikinės farmacijos katedra.

Mokslo kryptis ir sritis: Fiziniai mokslai, chemija

Reikšminiai žodžiai: *propolis, pusiau kietos farmacinės formos, fenoliniai junginiai, biologinis aktyvumas*

Kaunas, 2018. 69 p.

## SANTRAUKA

Tyrimų objektas: suformuluotos pusketės vaisto formos su tirštuoju propolio ekstraktu (tepalai, kremai) ir etanoliniu propolio ekstraktu (gelis).

Tikslas: sumodeliuoti pusiau kietas vaisto formas (tepalus, kremus, gelius) su propolio ekstraktais ir įvertinti jų kokybę, remiantis įvairiais biofarmaciniais tyrimais.

Uždaviniai: 1. pagaminti tirštąjį ir etanolinį propolio ekstraktus ir juose nustatyti bendrą fenolinių junginių kiekį, efektyviosios skysčių chromatografijos metodu nustatyti fenolinių rūgščių ir vanilino kiekius; 2. įvertinti propolio ekstrakto priešgrybelinį ir antibakterinį aktyvumus ir nustatyti antioksidacinį propolio ekstrakto poveikį; 3. sumodeliuoti pusiau kietas vaisto formas su propolio ekstraktais ir atliktį jų kokybės vertinimą pagal šiuos parametrus: pH reikšmė, organoleptinės ir reologinės savybės; 4. įvertinti pusiau kietų vaisto formų kokybę, remiantis fenolinių junginių atpalaidavimo *in vitro* rezultatais, ir atrinkti pusiau kietas vaisto formas tolimesniems tyrimams; 5. įvertinti atrinktų pusiau kietų vaisto formų su propolio ekstraktu kokybę, remiantis fenolinių junginių skvarbos į odą *ex vivo* rezultatais.

Metodika. Bendras fenolinių junginių kiekis propolio ekstraktuose nustatomas spektrofotometrijos metodu. Pasirinktų fenolinių junginių kokybinė ir kiekybinė analizė atliekama naudojant efektyviosios skysčių chromatografijos metodą. Atliekami antioksidacinio aktyvumo tyrimai naudojant DPPH reagentą ir antimikrobinio aktyvumo tyrimai naudojant etalonines mikroorganizmų rūšis. Sumodeliuotų farmacinių formų kokybė vertinama pagal pH ir reologinių parametrų reikšmes. Atliekami junginių atpalaidavimo iš pusiau kietų vaisto formų tyrimai *in vitro* ir junginių skvarbos tyrimai į odą *ex vivo*.

Rezultatai: Tirštajame propolio ekstrakto fenolinių junginių kiekis nustatytas didesnis nei etanoliniame ekstrakto. Tirštasis propolio ekstraktas pasižymėjo antikoksidaciniu aktyvumu ir

antimikrobinėmis savybėmis. Kartu su propolio ekstraktu sumaišius šaltalankių aliejų, inaktyvuoto DPPH kiekis išaugo  $9,28 \pm 0,41$  %. Propolis veikė gram-teigiamas *S. aureus*, *En. faecalis* ir gram-neigiamas *Ps. Aeurigonosa*, *E. coli* bakterijas, taip pat ir *M. canis* grybelį. Sumodeliuotų tepalų su propolio ekstraktu pH reikšmė svyravo nuo  $5,06 \pm 0,14$  iki  $6,44 \pm 0,11$ . Konsistencijos koeficiento reikšmė šioje grupėje svyravo nuo  $36,01 \pm 0,11$  iki  $204,6 \pm 0,48$  Pa·s<sup>n</sup>. Kremų pH reikšmė svyravo nuo  $5,41 \pm 0,21$  iki  $7,14 \pm 0,09$ . Konsistencijos koeficiento reikšmė svyravo nuo  $42,23 \pm 0,14$  iki  $145,36 \pm 0,22$  Pa·s<sup>n</sup>. Vienintelės stabilios gelio sistemos pH reikšmė nustatyta  $8,11 \pm 0,17$ . Gelio konsistencijos koeficiento reikšmė esant skirtingiems temperatūrų režimams keitėsi nuo  $52,13 \pm 0,17$  iki  $91,52 \pm 0,35$  Pa·s<sup>n</sup>. Daugiausiai fenolinių junginių *in vitro* tyrimo metu atpalaiduota iš gelio sistemos (G-1). Gausiausiai nustatytas fenolinis junginys buvo p-kumaro rūgštis. Daugiausiai junginių į odą skverbėsi iš tepalo T-7. Iš šios sistemos į odą prasiskverbusių junginių kiekis buvo  $2,05 \pm 0,2$  %.

Išvados. 1. Didesnis veikliųjų junginių kiekis nustatytas tirštame propolio ekstrakto, todėl kremų ir tepalų gamyboje naudotas tirštasis propolio ekstraktas, ir tik hidrogelių gamyboje panaudotas etanolinis propolio ekstraktas. 2. Antioksidacinio tyrimo rezultatai parodo, jog norint sustiprinti propolio antioksidacinį poveikį tikslinga naudoti kitus augalinius aliejus, pvz. šaltalankių. Kadangi propolis sėkmingai stabo tiek gram-neigiamų, tiek gram-teigiamų bakterijų, tiek grybelio augimą, jį galima panaudoti modeliuojant antimikrobinus farmacinius preparatus. 3. Pusiau kietos vaisto formos modeliuotos naudojant skirtingus pagrindus ir tai lėmė skirtingas puskiečių formų organoleptines, reologines savybes ir tarpusavyje besiskiriančias pH reikšmes. 4. Atpalaiduotų junginių kiekiui tiesioginę įtaką daro tiek įterpto propolio kiekis, tiek pasirinktas vaisto pagrindas. Iš sistemų, kuriose propolio ekstrakto buvo daugiau, atpalaiduotų junginių kiekis irgi buvo didesnis. Taip pat nustatyta, jog geresnis medžiagų atpalaidavimas vyksta iš tų pusiau kietų vaisto formų, kurių konsistencijos koeficientas yra mažesnis. 5. Skvarbos į odą tyrimo metu iš gelio sistemos junginių skvarba neįvyko. Tai parodo, jog oda yra gerokai sudėtingesnė sistema nei naudota celiuliozinė membrana *in vitro* tyrime. Geriausiai fenoliniai junginiai iš *ex vivo* eksperimento metu skverbėsi iš tepalo sistemos, kurio pagrindas formuotas iš vaško ir saulėgrąžų aliejaus ir tai pagrindžia teoriją, jog riebiosios rūgštys lemia efektyvesnę veikliųjų junginių skvarbą.

Tamutyte, Augustina. Technology And Biopharmaceutical Researches Of Semisolid Dosage Forms With Propolis Extracts Having Local Effect; *Master's* thesis in Chemistry / supervisor prof. dr. Kristina Ramanauskiene, The Faculty of Pharmacy, Department of Clinical Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences.

Research area in: Physical Sciences, Chemistry.

Key words: *propolis, dosage forms, phenolic compounds, biological activity*

Kaunas, 2018, 69 p.

## SUMMARY

Object of the study: semisolid dosage forms with the soft extract of propolis (creams, ointments) and the ethanol extract of propolis (gel).

Objective: to model semisolid dosage forms with different extracts of propolis and to evaluate these forms quality on the strength of the biopharmaceutical researches.

Tasks: 1 to make ethanol and soft extracts of propolis and to find out the amount of total phenolics and the amount of specific phenolic acids and vanillin in them; 2. to evaluate an antioxidant capacity and antimicrobial activity of the extract of propolis; 3. to make stable semisolid dosage forms with the extract of propolis and to evaluate their quality by these parameters: pH value, organoceptical and rheological properties; 4. to evaluate quality of semisolid dosage forms with propolis, based on the results of *in vitro* release test of phenolic compounds and to choose the appropriate forms for next researches; 5. to evaluate quality of semisolid dosage forms with propolis, based on the results of phenolic compounds penetration into the skin *ex vivo*.

Methods. The total amount of phenolic compounds was determined by the spectrophotometric method. Quality and quantity analysis of the selected phenolic compounds was made by high performance liquid chromatography. Antioxidant activity was evaluated by using DPPH reagent. Antimicrobial activity was evaluated by using benchmarked microorganisms. Quality of the semisolid dosage forms was evaluated by pH values and rheological parameters. Also we evaluated the release of active compounds *in vitro* and the penetration of these compounds into the skin *ex vivo*.

Results. In the soft extract of propolis there were more phenolic compounds comparing to the ethanol extract of propolis. Propolis mixed with buckthorn bot sea oil inactivated more DPPH reagent. Inactivation was  $9,28 \pm 0,41$  % higher. The extract of propolis was active against gram-positive *S. aureus*, *En. faecalis* and gram-negative *Ps. Aeurigonosa* ir *E. coli* bacteria., also it was active against



*M. canis* fungus. pH values of ointments with the extract of propolis were in the range from  $5,06 \pm 0,14$  to  $6,44 \pm 0,11$  and the consistency coefficient values were in the range from  $36,01 \pm 0,11$  to  $204,6 \pm 0,48$  Pa·s<sup>n</sup>. pH values of creams were in the range from  $5,41 \pm 0,21$  to  $7,14 \pm 0,09$  and the consistency coefficient values of this group were in the range from  $42,23 \pm 0,14$  to  $145,36 \pm 0,22$  Pa·s<sup>n</sup>. The one and only stable gel system pH value was  $8,11 \pm 0,17$ . The consistency coefficient values of the gel in different temperatures were in the range from  $52,13 \pm 0,17$  to  $91,52 \pm 0,35$  Pa·s<sup>n</sup>. The biggest amount of phenolic compounds *in vitro* was realised from gel system (G-1) and main component was p-coumaric acid. The best penetration into the skin was from ointment T-7. Total amount of active compounds which penetrated from this system into the skin was  $2,05 \pm 0,2$  %.

Conclusions. 1. Bigger amount of active compounds was determined in the soft extract of propolis, for that reason it was used to model creams and ointments. Only for hydrogels the ethanol extract of propolis was used. 2. The results shows that for the improvment of antioxidant properties it is worth to use natural oils, e.g buckthorn bot sea oil. In this case that propolis was active against gram-negative, gram-positive bacteria and fungus, this extract could be used to model antimicrobial drugs. 3. pH value, organoceptical and rheological properties of semisolid dosage forms were different and depended on the base used in modelling process. 4. The amount of realised active compounds also depended of the base. The amount of propolis extract had an influence as well. Realise of active compounds was greater from semisolid forms holding more extract. It was also found out that better realise of compounds was from semisolid forms having lower consistency coefficient values. 5. There was no active penetration process into the skin from gel. It shows that skin is more complicated system than celiuliose membrane which is used *in vitro* researches. The best penetration *ex vivo* was from ointment system, which was made of bees wax and sunflower oil. It confirms the theory that fatty acids act as skin penetration enhancers.

## Santrumpos

% – procentai

°C – laipsniai Celcijaus

A/V – aliejus vandenyje

CAPE – kavos rūgštis fenetilo esteris

DNR – deoksiribonukleorūgštis

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo radikalas

ESC – efektyvioji skysčių chromatografija

K – konsistencijos koeficientas

LogP – n-oktanolio/vandens pasiskirstymo koeficientas

n – tekėjimo indeksas

Pa – paskalis

pav. – paveikslas

r. – rūgštis

RNS – aktyvieji azoto junginiai

ROS – aktyvieji deguonies junginiai

SD – standartinis nuokrypis

V/A – vanduo aliejuje

val. – valandos

## Ivadas

Iš gamtos gaunami natūralūs produktai vis dar stebina naujai atrandamomis savybėmis, kurios gali būti sėkmingai pritaikytos gydyti įvairias ligas. Vienas iš natūraliai gamtoje aptinkamų naudingų produktų – propolis, arba kitaip bičių pikis, kuris yra dervinga, lipni augalinės ir gyvulinės kilmės medžiaga [1, 2]. Bitės biologiškai aktyvias medžiagas surenka nuo įvairių augalų ir sumaišo su savo seilėmis ir fermentais, ir būtent taip išgauta medžiaga vadinama propoliu. Bitės šį produktą panaudoja aviliams tvirtinti ir jiems dezinfekuoti, o žmogus jau nuo senovės propolį atrado kaip priemonę sveikatai gerinti. Nors propolio gydomosios savybės pastebėtos jau labai seniai, mokslininkai dabar vis dažniau atsigręžia į senąjį produktą ir vykdo įvairius eksperimentus siekiant sukurti naujus farmacinius preparatus [1, 3].

Propolio sudėtyje yra įvairių fenolinių rūgščių, esterių, flavonoidų, aminorūgščių ir vitaminų. Dėl tokios cheminės kompozicijos produktai su propoliu gali veikti prieš daug sveikatai kenksmingų veiksmų [3]. Sumodeliuotos pusiau kietos formos su propolio ekstraktais puikiai veikė gydant makšties kandidozę [4], periodontitą [5, 6], taip pat odos egzema [7]. Propolis geba veikti prieš mikroorganizmus, slopina uždegimą, oksidacinį stresą, taip pat tinka nudegimams gydyti, gali veikti net ir prieš vėžines ląsteles [1, 3]. Pabrėžtina tai, jog propolis naikina skirtingų rūšių bakterijas, virusus, taip pat ir grybelius, todėl yra labai svarbus gydant odos ligas [3]. Antimikrobinis propolio veikimas itin reikšmingas vėl gali tapti šiame amžiuje, kada taip sparčiai didėja antibiotikams atsparių bakterijų kiekis, tad farmacinių formų su natūraliais antibiotikais modeliavimas yra itin perspektyvus [8].

Pusiau kietų vaisto formų kūrimas yra gana sudėtingas procesas, svarbu atsižvelgti ar aktyvoji medžiaga hidrofilinė ar lipofilinė, tinkamai parinkti tirpiklius, pusiau kietos vaisto formos pagrindą, emulsiklius bei tirštiklius [9]. Kuriant pusiau kietą vaisto formą verta modeliuoti kuo daugiau skirtingų sistemų ir atlikti įvairius šių farmacinių formų kokybės tyrimus [9, 10].

Šiuo metu vis populiariesni tampa natūralūs farmaciniai preparatai, todėl būtų išties naudinga sumodeliuoti pusiau kietą vaisto formą su propoliu. Aktualu atrasti koks vaisto pagrindas yra tinkamiausias norint į jį sėkmingai įterpti propolio ekstraktą. Šio tyrimo tikslas – sumodeliuoti pusiau kietas vaisto formas (tepalus, kremus, gelius) su propolio ekstraktais ir įvertinti jų kokybę, remiantis įvairiais biofarmaciniais tyrimais. Šiam tikslui pasiekti išskelti uždaviniai:

1. Pagaminti tirštąjį ir etanolinį propolio ekstraktus ir juose nustatyti bendrą fenolinių junginių kiekį, efektyviosios skysčių chromatografijos metodu nustatyti fenolinių rūgščių ir vanilino kiekius.
2. Įvertinti propolio ekstrakto priešgrybelinį ir antibakterinį aktyvumus ir nustatyti antioksidacinį propolio ekstrakto poveikį.
3. Sumodeliuoti pusiau kietas vaisto formas su propolio ekstraktais ir atlikti šių formų kokybės vertinimą pagal šiuos parametrus: pH reikšmė, organoleptinės ir reologinės savybės.
4. Įvertinti pusiau kietų vaisto formų kokybę, remiantis fenolinių junginių atpalaidavimo *in vitro* rezultatais, ir atrinkti pusiau kietas vaisto formas tolimesniems tyrimams.
5. Įvertinti atrinktų pusiau kietų vaisto formų su propolio ekstraktu kokybę, remiantis fenolinių junginių skvarbos į odą *ex vivo* rezultatais.

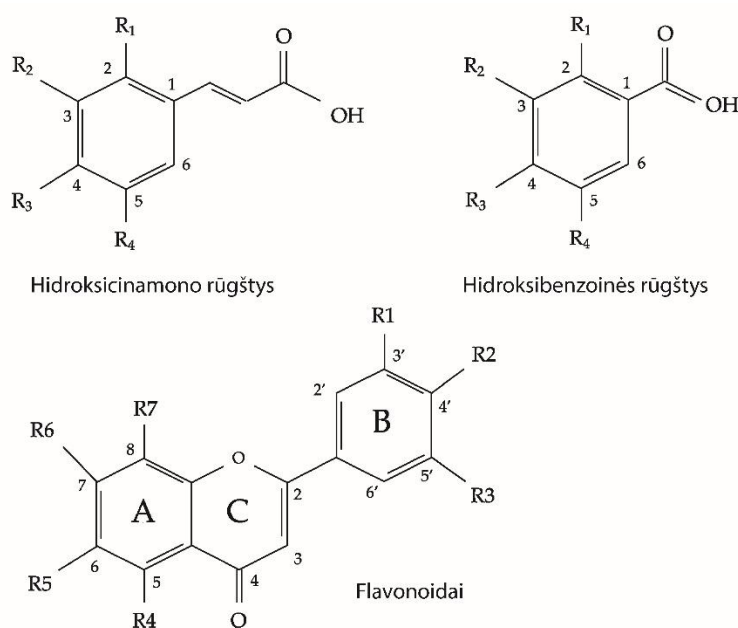
## 1. Literatūros apžvalga

### 1.1. Propolio fizikinės ir cheminės savybės

Propolis yra lipofilinė medžiaga, kuri būdama šalta yra kieta ir lūžtanti, tačiau pašildžius virš 45 C° tampa minkšta, lipni ir lanksti. Padidinus temperatūrą iki 60 C°, propolis tampa skystas. Propolio ekstrahavimas gali būti vykdomas naudojant vandenį, metanolį, etanolį, chloroformą, eterį, acetoną. Propolio spalva gali būti nuo šviesiai geltonos iki tamsiai rudos. Naudinga propolio fizikinė savybė yra tai, jog jis pasižymi puikiu ir aromatingu kvapu [1, 3].

Pagrindiniai cheminiai propolio komponentai yra dervos (apie 50 %), vaškas (apie 30 %), eteriniai aliejai (apie 10 %), žiedadulkės (apie 5 %) ir kitos medžiagos, tokios kaip įvairūs mineralai, fenolinės rūgštys, jų esteriai, flavonoidai, terpenai, aromatiniai aldehidai, alkoholiai (apie 5 %) [1, 11, 12].

Vieni iš dažniausiai nustatomų fenolinių junginių propolyje yra flavonoidai, kurie yra itin svarbūs žmogaus organizmui dėl antioksidacinio poveikio [3, 11]. Flavonoidai gali egzistuoti kaip laisvieji aglikonai, arba būti glikozilinti. Jų struktūra susideda iš A ir B benzeno žiedų, kurie sujungti heterociklo žiedu C, susidedančio iš trijų anglies atomų (žr. 1 pav.) [13, 14].

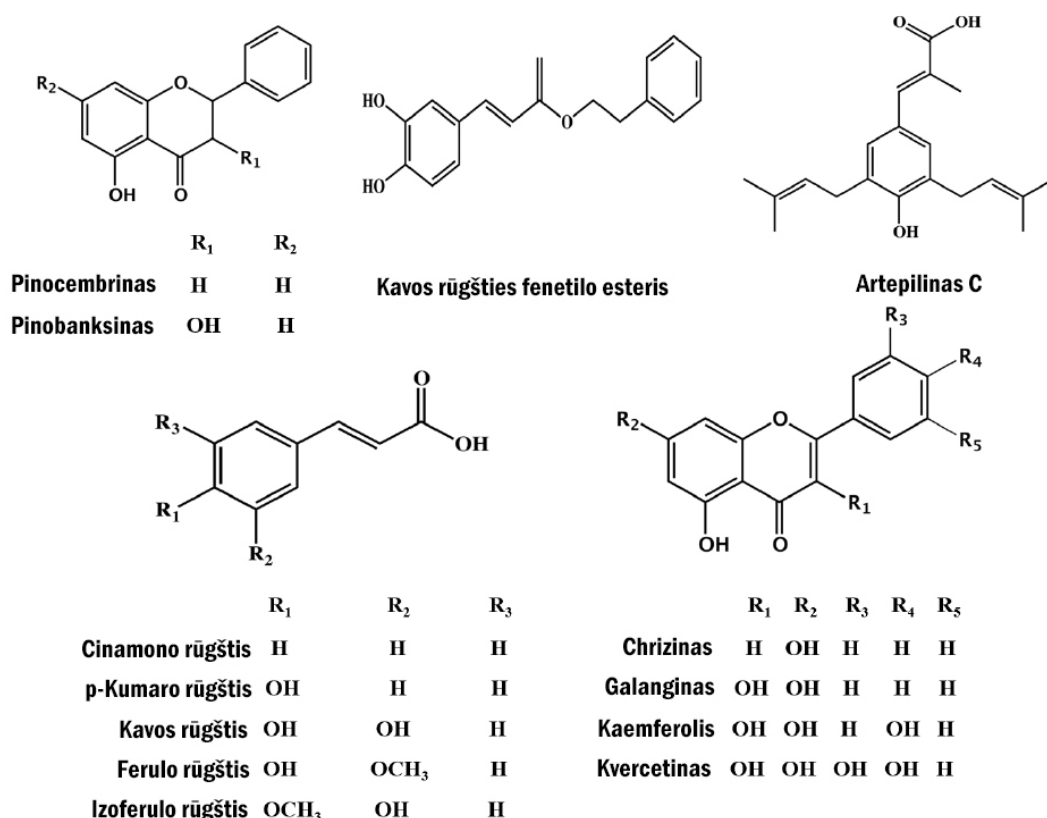


1 pav. Flavonoidų ir fenolinių rūgščių struktūra [14]

Atsižvelgiant į tai, ar C žiedo C<sub>4</sub> atomas oksiduotas, ar šiame žiede yra dvigubas ryšys tarp C<sub>2</sub> ir C<sub>3</sub> atomų, ar C<sub>3</sub> padėtyje prijungta hidroksilo grupė ir priklausomai nuo hidroksilo grupių išsidėstymo B žiede, flavonoidai skirstomi į tam tikras grupes, iš kurių keletas yra itin gausiai nustatomos propolyje. Propolyje nustatomi flavonoliai, iš kurių itin reikšmingi yra rutinas, galanginas,

kvercetas, kaempferolis. Propolyje įprastai nustatomi ir flavanoliai: katechinas, epikatcehinas, flavonai: chirizinas, luteolinas, apigeninas, taip pat flavanonai: naringinas, hesperetinas. Fenilo grupei esant ne C<sub>2</sub>, o C<sub>3</sub> padėtyje, junginiai vadinami izoflavanoidais, iš kurių propolyje nustatomas daidzeinas ir genisteinas [13, 14, 15].

Kiti fenoliniai junginiai randami propolyje yra fenolinės rūgštys, kurios yra sudarytos iš benzeno žiedo, karboksilo ir hidroksilo grupių. Fenolinės rūgštys skirstomos į hidroksibenzoines rūgštis, kurios turi C<sub>6</sub>–C<sub>1</sub> struktūrą, ir hidroksicinamono rūgštis, kurioms priklauso fenolinės rūgštys, turinčios C<sub>6</sub>–C<sub>3</sub> struktūrą (žr. 1 pav.) [14]. Propolyje nustatomos vanilino, kumaro, ferulos, kavos, cinamono rūgštys, tam tikri jų dariniai, iš kurių vienas svarbiausių yra kavos rūgšties fenetilo esteris (CAPE). Taip pat propolyje dažnai nustatomas ir vienas iš cinamono rūgšties derivatų – artepilinas C [11, 12]. Fenolinės rūgštys bei jų dariniai pasižymi biologiniu aktyvumu ir lemia propolio panaudojimo galimybes medicininiais tikslais [14]. Svarbiausi fenoliniai junginiai nustatomi propolyje pavaizduoti 2 pav.



2 pav. Dažniausiai nustatomi fenoliniai junginiai propolyje [11]

Cheminė kompozicija, propolio spalva (geltona, žalia, ruda, raudona) gali būti skirtinga ir priklauso nuo įvairių faktorių, tokių kaip augalų tipas ir jų geografinė vietovė, klimatas ir propolio rinkimo metas [1, 3, 13]. Propolis Europos šalyse dažniausiai išgaunamas iš tuopų pumpurų, ir tokiame propolyje daugiausiai randama įvairių flavonoidų, fenolinių rūgščių ir jų esterių. Propolyje iš Brazilijos, kurioje tuopų nėra, pagrindiniai propolio cheminiai dariniai yra terpenoidai, prenilintos p-kumaro rūgštys ir diterpeninės rūgštys [3]. Svarbiausi cheminiai junginiai propolyje iš Irano yra aromatinės rūgštys (benzoinės ir benzenpropano), kofeino ir feniletil-trans-4-kumaro rūgščių esteriai, flavonoidai [16]. Pagrindiniai komponentai propolyje iš Indijos yra riebalų rūgščių dariniai [3, 17]. Lietuviškajame propolyje kaip dominuojančios rūgštys nustatytos galo, kavos, kumaro, ferulo, cinamono bei rozmarino fenolinės rūgštys [18]. Skirtingų šalių propolio cheminiai komponentai nėra tokie patys, sudėtis itin priklauso nuo vietovės, todėl tai tampa pagrindine problema siekiant standartizuoti propolio žaliavą [3, 11].

## **1.2. Biologinis propolio aktyvumas**

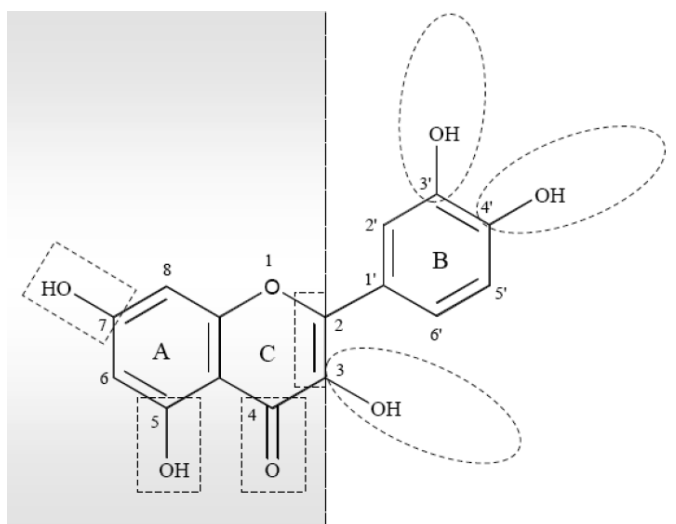
### **1.2.1. Antioksidacinis aktyvumas**

Laisvieji radikalai yra nestabilios molekulės, kurių išoriniame elektrone trūksta vieno elektrono. Šios molekulės organizme prisijungia trūkstamą elektroną ir taip pakenkia sveikosioms ląstelėms – sukeliama oksidacinis stresas [19]. Oksidacinis stresas yra vienas iš svarbių veiksnių, lemiančių tam tikrų ligų atsiradimą ir progresiją. Jis itin susijęs su širdies ligomis, vėžiu, diabetu bei neurodegeneratyviniais sutrikimais [20]. Taip pat laisvieji radikalai slopina imuniteto aktyvumą, skatina organizmo senėjimą. Maži kiekiai aktyviųjų deguonies (ROS) ir aktyviųjų azoto (RNS) junginių yra visiškai natūralus ląstelių metabolizmo rezultatas. Šie dariniai gali būti natūraliai detoksikuojami organizme esančių makromolekulių ir fermentų, tokių kaip glutationo peroksidazės ar katalazės, tačiau dažnai natūralūs ląstelės apsauginiai mechanizmai tampa nebepajėgūs apsaugoti nuo atsiradusio per didelio ROS ir RNS kiekio [19, 21]. Jei laisvųjų radikalų atsiranda itin daug, ląstelėje pažeidžiamos nukleorūgštys, baltymai. Kovoti su laisvaisiais radikalais reikalingi papildomi antioksidantai, kurie atiduoda savo elektronus ir taip neutralizuoja laisvuosius radikalus bei apsaugo organizmo ląsteles [19, 20].

Iširta, jog propolio sudėtyje esančios fenolinės rūgštys (ypač svarbi kavos rūgštis) ir įvairūs flavonoidai veikia kaip puikūs antioksidantai ir geba apsaugoti ląsteles nuo lipidų peroksidacijos [3, 22, 23]. Nustatyta, jog polifenolių kiekis propolyje tiesiogiai lemia jo antioksidacines savybes [24]. Propolio ekstraktuose iš Italijos ir Rusijos nustatytas panašus polifenolių kiekis, ir tai nulėmė panašų antioksidacinį aktyvumą, tuo tarpu Brazilijoje tirtame propolyje nustatytas gerokai mažesnis polifenolių kiekis, ir tai lėmė ženkliai mažesnį antioksidacinį aktyvumą [25]. Kito tyrimo, aprašančio

propolio galimybes mažinti oksidacinį stresą, rezultatai parodė, jog žiurkių, kurioms buvo sukeltas diabetas ir pažeistos jų kepenys bei inkstai, būklė ženkliai pagerėjo suleidus propolio injekcijas. Dėl sumažėjusio oksidacinio streso pagerėjo bendra žiurkių būklė, kepenyse sumažėjo vakuolizuotų ląstelių skaičius, pagerėjo riebalų rūgščių metabolizmas [26].

Fenolinių rūgščių antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo hidroksilo grupių skaičiaus molekulėse, pvz. kavos rūgšties benzeno žiede yra dvi hidroksilo grupės, todėl ši rūgštis pasižymi geresnėmis antioksidacinėmis savybėmis nei kumaro rūgštis, kurios molekulėje yra tik viena hidroksilo grupė. Antioksidacinis aktyvumas priklauso ir nuo karboksilo grupės padėties. Hidroksicinamono rūgštys dėl trijų anglies atomų šoninės grandinės lengviau atiduoda vandenilį, ir taip užtikrinamos geresnės antioksidacinės savybės nei hidrosibenzoinių rūgščių [3, 27]. Flavonoidų antioksidacinis aktyvumas priklauso ir nuo hidroksilo grupių esančių C žiedo C<sub>3</sub> pozicijoje ir B žiedo C<sub>3</sub> bei C<sub>4</sub> padėtyse (žr. 3 pav.). Stiprus antioksidacinis CAPE aktyvumas pasireiškia dėl molekulėje esančio katecholo žiedo [27]. Kitas puikus pavyzdys, įrodantis hidroksilo grupių svarbą, tai kvercetino, kaempferolio bei galangino molekulių struktūros palyginimas. Šie junginiai tarpusavyje skiriasi tik hidroksilo grupių skaičiumi B žiede. Antioksidacinis aktyvumas stiprėja didėjant hidroksilo grupių kiekiui ir pagal antioksidacinio poveikio stiprumą junginiai išsidėsto tokia tvarka: kvercetinas < kaempferolis < galanginas [22, 27].

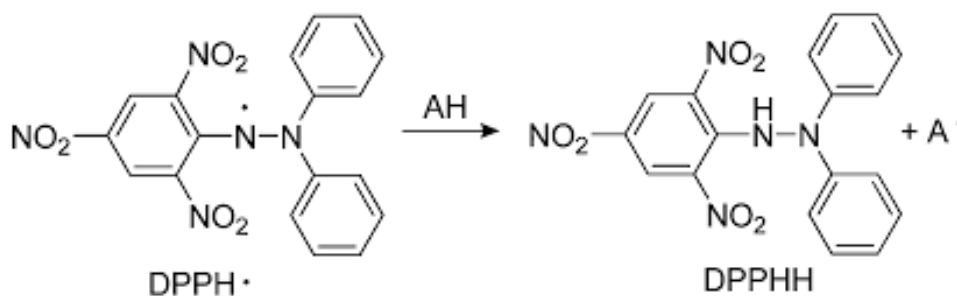


3 pav. Flavonoidų funkcinės grupės lemiančios uždegimo slopinimą ir antioksidacinį poveikį [27]

Tiriant junginių antioksidacinį aktyvumą viena iš dažniausių reakcijų reakcijų yra atliekama panaudojant 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH•) reagentą ir surišant laisvuosius radikalus. DPPH•



radikalui sureagavus su medžiaga, kuri geba atiduoti savo vandenilio atomą, tirpalo spalva kinta iš mėlynos į gelsvą ir spalvos pokyčiai išmatuojami spektrofotometru (žr. 4 pav.) [28].



4 pav. DPPH• surišimo reakcija [28]

### 1.2.2. Antimikrobinis aktyumas

Propolis vadinamas natūraliuoju antibiotiku, nes pasižymi ir antimikrobinėmis savybėmis. Jis gali būti naudojamas bakterijų, virusų bei grybelių sukeltoms infekcijoms gydyti, pvz. sergant viršutinių kvėpavimo takų ligomis ar gydant ar žaizdų infekcijas [3, 29, 30]. Geriausiai propolis veikia prieš gram-teigiamas bakterijas. Nustatytas itin veiksmingas propolio veikimas prieš tokias rūšis kaip *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Paenibacillus larvae* [3, 30] ir *Salmonella enterica* [29]. Nors propolio antibakterinis aktyvumas yra stipresnis prieš gram-teigiamas bakterijas [3, 30], visgi Lietuvoje atlikto tyrimo metu propolis sėkmingai veikė ir prieš gram-neigiamas *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* ir *Escherichia coli* bakterijas [31]. Dar viena ypač svarbi propolio savybė – gebėjimas veikti prieš antibiotikams atsparias bakterijas (pvz. gaminančias plataus veikimo spektro  $\beta$ -laktamazės). Taip pat nustatytas ir antibiotikų, tokių kaip vankomicinas, oksacilinas, levofloksacinas, ir propolio sinergistiškas veikimas. Tai yra itin svabu, nes pastaruoju metu pasaulyje itin sparčiai didėja antibiotikams atsparių bakterijų kiekis [32].

Antimikrobinis propolio aktyvumas pasireiškia dėl propolyje nustatomų fenolinių rūgščių ir flavonoidų. Įtaka daro ir fenolinių rūgščių esteriai, ypač ferulo ir kofeino rūgščių [33]. Antibakterinis veikimas gali pasireikšti dėl bakterinės ląstelės metabolizmo sutrikdymo. Bakterines ląsteles pažeidžiamos sutrikdant nukleorūgščių sintezę dėl DNR girazės ar topoizomerazės inhibicijos, ypač efektyviai topoizomerazę inaktyvina rutinas. Kitas bakterinės ląstelės pažeidimo mechanizmas siejamas su bakterinės ląstelės plazminės membranos funkcijos pakitimu: sutrikdoma skysčių skvarba, o dėl membranos vientisumo praradimo reikšmingai sumažėja kalio kiekis bakterinės ląstelės viduje. Flavonoidai gali sutrikdyti ir bakterijų energijos metabolizmo procesus. Gali būti paveikiami vienas ar net ir keli kvėpavimo grandinės kompleksai, pvz. likochalkonai sėkmingai inhibuoja NADH-citochromo c reduktazę [34, 33].

Propolis puikiai veikia ir prieš grybelius. Nustatyta, jog paveikiamos *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, bei *Candida tropicalis* rūšys [32]. Taip pat propolis veikia ir prieš daugiausiai grybelinių infekcijų žmogaus organizme sukeltantį *Candida albicans* grybelį [35, 3].

Nustatyta, jog propolis dėl sudėtyje esančių kavos, p-kumaro, benzoinės rūgščių, o taip pat dėl galangino ir pinocembrino veikia ir prieš virusus [3, 36]. Išaiškintas antivirusinis veikimas prieš *Herpes simplex 1* (HSV-1), bei *Herpes simplex 2* (HSV-2) [27] virusus, taip pat jau anksčiau pastebėtas propolio veikimas ir prieš paukščių gripo virusą [30].

Flavonoidai, kurie yra vieni iš pagrindinių propolio sudedamųjų dalių, *in vitro* reikšmingai veikė ir prieš žmogaus imuno deficito virusą 1 (ŽIV-1). Dėl aktyviųjų medžiagų propolyje buvo sutrikdomas ŽIV atvirkštinės transkriptazės veikimas [37].

### **1.2.3. Uždegimą slopinantis aktyvumas**

Nustatyta, jog propolis gali slopinti ir uždegimą. Tokį aktyvumą nulemia sudėtyje esantys aktyvieji flavonoidai ir fenolinės rūgštys [3, 23]. Dėl šių junginių blokuojami įvairūs tarpiniai uždegimo mediatoriai, nes inhibuojama ciklooksigenazės, lipooksigenazės ir kitų fermentų ekspresija. Uždegimo slopinimą aktyvina tokios propolio cheminės medžiagos kaip acacetinas, kvercetas, naringenas, kavos rūgštis, p-kumaro rūgštis o stipriausią poveikį lemia CAPE ir galanginas [27]. Pastarosios medžiagos efektyviai gydė žiurkes, kurioms dėl karagenino poveikio buvo atsiradę edemos, pleuritas ir adjuvantinis artritas [26]. Literatūroje aprašoma, jog *in vitro* propolis slopina pelių makrofagų ekspresuojamų prostaglandinų ir leukotrienų išskyrimą, o *in vivo* CAPE slopina lipooksigenazės fermentą, kuris reikalingas arachidono rūgščiai išsiskirti. Pastaroji rūgštis yra viena iš pagrindinių signalinių molekulių uždegiminėje reakcijoje [3]. CAPE taip pat inhibuoja ir uždegiminei reakcijai vykti reikalingų citokinų ir vėžio nekrozės  $\alpha$  faktoriaus (TNF- $\alpha$ ) gamybą [27].

Flavonoidai veikia uždegiminą slopinančiai dėl C žiede esančios dvigubos jungties tarp C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> atomų, taip pat ir dėl karbonilo grupės prijungtos prie C<sub>4</sub> atomo. Uždegimo slopinimas pasireiškia ir dėl A žiede esančių C<sub>3</sub> ir C<sub>5</sub> hidroksilo grupių (žr. 3 pav.) [27].

### **1.3. Pusiau kietų vaisto formų charakteristika**

Pusiau kietos vaisto formos, tai pusiau kietos konsistencijos produktai, kurie įprastai naudojami ant odos ir įvairių gleivinių, pvz. akies, nosies ar ausies. Taip pat pusketės vaisto formos gali būti įvedamos į kūno ertmes rektaliniu ar vaginaliniu būdu. Šių farmacinių formų paskirtis gali būti terapinė, kai vaistas skirtas ligai gydyti, arba apsauginė, kai liga nėra diagnozuojama, o preparatas odą ar gleivinę drėkina, minkština arba apsaugo nuo kenksmingų medžiagų. Pusketės vaisto formos

naudojamos terapiniais tikslais gali veikti lokaliai, pvz. gydyti įvairias odos ligas, tokias kaip atopinis dermatitas ar seborėja. Taip pat vaistas gali veikti ir sistemiškai, tokiu atveju puskietyje formoje esantys veiklieji junginiai patenka į sisteminę organizmo kraujotaką [38, 39]. Vartojant pusiau kietas vaisto formas nėra pažeidžiamos kepenys, sukeliama mažiau šalutinių efektų nei vartojant vaistus peroraliai ar parenteraliai, taip pat vaisto formą galima vartoti taip, jog lengvai užtikrinama pastovi veikliosios medžiagos koncentracija kraujyje. Tinkamos pusiau kietos farmacinės formos turėtų pasižymėti tam tikromis savybėmis: ne per didelis riebumas, paprastas naudojimas, patraukli išvaizda ir kvapas. Jei vaisto forma vartojama ant odos, oda neturėtų būti dirginama, alergizuojama bei dehidratuojama [39].

Pagal fizikochemines savybes pusiau kietos farmacinės formos gali būti skirstomos į hidrofobines, hidrofilines ir emulsines sistemas [10].

Hidrofobinėms formuluotėms priskiriamos tokios farmacinės formos kaip aliejiniai tepalai, bevandeniai tepalai, oleogeliai [10]. Hidrofobiniai tepalai įprastai būna vienfaziai. Tokių tepalų hidrofobinis pagrindas modeliuojamas iš vieno tam tikro komponento pvz. skystojo parafino, vazelino, augalinio aliejaus. Vaisto pagrinde veiklioji medžiaga yra tirpinama arba disperguojama [10, 40]. Oleogelių pagrindas taip pat sudaromas iš lipofilinės medžiagos, kuri gali būti gelifikuojama naudojant pasirinktus polimerus pvz. celiuliozės [41].

Hidrofilinėms formuluotėms priskiriamos tokios farmacinės formos kaip hidrogeliai ar hidrofiliniai tepalai. Hidrogelių pagrindą sudaro skystoji hidrofilinė medžiaga (vanduo, glicerolis), kuri gelifikuojama pasirinkta medžiaga. Ši medžiaga gali būti natūrali (guma), pusiau sintetinė (metilceliuliozė) arba sintetinė (karbomeras) [10, 42]. Hidrofilinių tepalų pagrindas sudarytas iš vandenyje gerai tirpių medžiagų, pvz. didelės molekulinės masės skystojo ir kietojo makrogolio mišinio [42].

Dažniausiai vartojamos pusiau kietos vaisto formos, kurių pagrindo sudėtyje yra ir hidrofilinių, ir hidrofobinių komponentų. Tokios sistemos vadinamos emulsijomis ir joms priskiriama heterogeniniai tepalai, aliejus/vandenyje (a/v) ir vanduo/aliejuje (v/a) kremai, bigeliai, mikroemulsijos ir kt. [10]. Priklausomai nuo to ar didesnę pagrindo dalį sudaro lipofilinė, ar hidrofilinė medžiaga, skiriasi hidrofilinio/lipofilinio balanso vertė. Apskaičiavus šią vertę parenkami tinkami emulsikliai, jų proporcijos. Vieni iš dažniausiai naudojamų emulsiklių yra polisorbatai (*Tween*) ir sorbitano/riebalų rūgščių esteriai (*Span*). Taip pat naudojami ir riebalų alkoholiai, pvz. stearilo alkoholis, ar monogliceridai [43].

#### **1.4. Pusiau kietų vaisto formų kokybės tyrimai**

Vaistinės medžiagos atpalaidavimas iš sistemos ir šios medžiagos skvarba į odą yra gana sudėtingas procesas, lemiamas daug veiksnių. Labai svarbi yra odos sąveika su vaisto formos pagrindu ir veikliosiomis medžiagomis, tačiau nemažiau reikšminga ir sąveika tarp pagrindo bei įterptų veikliųjų medžiagų [10]. Parenkant pusiau kietos vaisto formos pagrindą svarbu atkreipti dėmesį į tai, kokia veikliosios medžiagos molekulinė masė, ar medžiaga gali tirpti pasirinktame pagrinde ir vandenyje, svarbi ir veikliosios medžiagos koncentracija vaisto formoje, termodinaminis aktyvumas. Nemažiau reikšmingos ir paties pagrindo fizikocheminės savybės, taip pat svarbu ar jo sudėtyje bus medžiagų veikiančių kaip veikliųjų medžiagų skvarbos skatintojai. Labai svarbi ir odos ar gleivinės, ant kurios bus vartojamas vaistas, pH reikšmė [39].

##### **1.4.1. Veikliųjų junginių atpalaidavimo iš pusiau kietų vaisto formų tyrimai *in vitro***

Reikšmingiausi medžiagų atpalaidavimo ir skvarbos į odą rezultatai gaunami atliekant tyrimus *in vivo* bei *ex vivo*, tačiau tam tikruose tyrimų etapuose, pvz. tiriant medžiagų atpalaidavimą iš vaisto formos, sėkmingai panaudojamos ir studijos *in vitro* [10]. *In vitro* tyrimo metu vaisto formuluotė patalpinama į celę virš pusiau pralaidžios membranos. Ši membrana pusiau kietą vaisto formą skiria nuo akceptorinės terpės (vanduo, etanolis arba vandens ir etanolio mišinys), kurią eksperimento pabaigoje tiriant ir yra nustatomas atpalaiduotų veikliųjų medžiagų kiekis [44]. Tokie *in vitro* tyrimai itin naudingi pirmose vaistinės formuluotės kūrimo stadijose, kai nustatoma sąveika tarp aktyviosios medžiagos ir pusiau kietos vaisto formos pagrindo [10]. Hidrofilinės ir sąlyginai lipofilinės medžiagos *in vitro* tyrimuose geriausiai atpalaiduojamos iš tų sistemų, kurių didžiąją pagrindo dalį sudaro hidrofilinė dalis. Tokiame pagrinde aktyvieji junginiai gerai tirpsta, o hidrorfilinių medžiagų difuzija į hidrofilinę akceptorinę terpę tampa itin greita. Netirpi vandenyje hidrofobinė bazė negali sąveikauti su hidrofiline akceptorine terpe, todėl net jei ir paviršiuje esančios aktyviųjų medžiagų molekulės gali labai greitai difunduoti pro šalia esančią pusiau pralaidžią membraną, tačiau veikliųjų junginių difuzija iš giliųjų hidrofobinės terpės sluoksnių yra labai lėta. Visgi stipriai lipofilinės medžiagos *in vitro* geriau atpalaiduojamos iš hidrofobinio pagrindo, nes tik pastarajame lipofilinės medžiagos gali būti ištirpinamos. Hidrofiliniame pagrinde lipofilinės medžiagos tampa suspenduotos, o tai neužtikrina efektyvaus jų atpalaidavimo [44, 45].

##### **1.4.2. Veikliųjų junginių skvarbos iš pusiau kietų vaisto formų tyrimai**

Atlikus veikliosios medžiagos atpalaidavimo tyrimus ir nustačius ar veiklioji medžiaga gali difunduoti iš pagrindo, atliekami kiti tyrimai ir nustatoma veikliųjų junginių skvarbos galimybė į odą. Veikliųjų medžiagų patekimas į odą yra gana sudėtingas ir daugybės veiksnių lemiamas procesas.

Pirmiausiai veiklioji medžiaga turi būti atpalaiduojama iš vaisto formos ir tik tada svarbus tampa difuzijos procesas per odos barjerą t.y lipofilinį epidermio raginį sluoksnį. Vėliau tiriant dermatologinius preparatus yra nustatoma kaip veiklioji medžiaga, kuri jau yra prasiskverbusi pro odos barjerą, skverbiasi ir juda į gilesnius odos sluoksnius [10].

Į odą vaistas gali patekti per kelis skirtingus kelius: 1) per plauko folikulus ir prakaito liaukas 2) judėti per tarpus tarp ląstelių 3) judėti per epidermio ląstelių vidų. Koku keliu skverbis medžiaga priklauso nuo jos fizikocheminių savybių. Vienu metu gali būti panaudoti ir keli skirtingi keliai. Kadangi plaukų folikulai ir prakaito liaukos sudaro tik apie 0,1 % odos paviršiaus struktūros, šiuo keliu transportuojama ir itin mažas kiekis molekulių, todėl dažniausi medžiagų judėjimo keliai yra per arba pro epitelines ląsteles [46].

Oda yra gerokai sudėtingesnė sistema nei poringa, pusiau pralaidi membranai kuri naudojama *in vitro* tyrimų metu, todėl gauti geri veikliųjų medžiagų atpalaidavimo *in vitro* rezultatai iš hidrofiliųjų pagrindų, dažnai nesutampa su skvarbos į odą tyrimų rezultatais [10]. Skvarba iš emulsijų ar vien tik iš hidrofobinio pagrindo dažnai būna geresnė nei iš pagrindų su hidrofilišomis medžiagomis [47]. Esminę įtaką skvarbos į odą rezultatams daro viršutinis raginis epidermio sluoksnis, sudarytas iš keratinocitų, kurių pagrindinis komponentas yra vandeniui nelaidžios  $\alpha$ -keratino skaidulos [46]. Hidrofilišoms medžiagoms skverbti pro šį sluoksnį yra itin sudėtinga, todėl svarbu, jog vaisto pagrinde būtų medžiagų, gebančių tirpinti aktyviausias medžiagas, hidratuoti raginį epidermio sluoksnį, ar ardyti šio sluoksnio lipidinius darinius ir taip gerinti medžiagų skvarbą. Įveikus raginį sluoksnį aktyvioji medžiaga jau gali judėti į gilesnius epidermio ir dermos sluoksnius, kuriuose atsparumas polinių medžiagų skvarbai jau gerokai mažesnis. Pasiekusiuos dermą, kurią sudaro jungiamasis audinys, limfos ir kraujotakos sistema, medžiagos patenka į kraują ir gali judėti po visą organizmą [10, 46].

Ypač svarbu, jog veiklioji medžiaga būtų tirpi vaisto pagrinde, todėl daugelyje tyrimų pranašumą turi emulsinės sistemos, kuriose yra ir hidrofiliųjų ir lipofilinių medžiagų, todėl padidėja skirtingomis cheminėmis savybėmis pasižyminčių junginių įterpimo galimybė. Be to, emulsikliai gali veikti ne tik kaip tirpikliai, bet ir kaip skvarbą pro raginį sluoksnį skatinantys junginiai [47]. Visgi Australijos tyrėjų darbe nustatyta, jog modeliuoto kremo sudėtyje naudoti emulsikliai terpenus sulaukė suformuotose micelėse, ir tirtų terpenų skvarba gerokai efektyvesnė buvo iš hidrogelių nei kremų [49]. Sąveikos tarp medžiagų vaisto formoje nulemia aktyvųjų medžiagų skvarbos greitį. Iš to paties pagrindo vienos medžiagos gali būti atpalaiduojamos itin gerai, o kitų medžiagų atpalaidavimas dėl tam tikrų sąveikų gali ir neįvykti, todėl modeliuojant naują pusiau kietą vaisto formą yra būtina atlikti tiek atpalaidavimo, tiek svarbos į odą tyrimus [10].

### **1.5. Modeliuojamų pusiau kietų vaisto formų su propolio ekstraktais komponentai**

Bičių vaškas. Tai bičių gaminamas produktas, jo sudėtyje yra nustatomi angliavandeniliai, laisvosios riebalų rūgštys, monoesteriai, diesteriai, triesteriai, hidroksimetilo esteriai, riebiųjų rūgščių poliesteriai [50, 51]. Taip pat bičių vaškas yra vitamino A šaltinis. Šis vitaminas skatina žaizdų gyjimą, slopina uždegimą, apsaugo ląsteles nuo UV spindulių [50]. Bičių vaško lydymosi temperatūra yra apie 60 °C, jis nėra tirpus vandenyje, glicerolyje [52]. Bičių vaškas dažnai naudojams muodeliuojant pusiau kietas vaisto formas, nes dėl savo stiprių hidrofobinių savybių sudaro apsauginę plėvelę ant odos, todėl oda nedžiūsta, ir taip pat yra maitinama. Kita naudinga bičių vaško savybė, jog jis veikia kaip emulsiklis, tirština įvairius aliejus [53, 50].

Šaltalankių aliejus. Šis aliejus ekstrahuojamas iš šaltalankių uogų bei sėklų, jame gausu naudingų medžiagų. Šaltalankių aliejaus sudėtyje nustatoma palmitolio rūgštis (omega-7), gama-linoleno (omega-6) rūgštis. Šios rūgštys ypač svarbios odai regeneruoti. Taip pat šaltalankių aliejuje nustatomi vitaminai A, C, E, karotenoidai, organinės ir amino rūgštys, fenoliniai junginiai, kurie lemia antioksidacinį aliejaus aktyvumą. Aliejus yra tinkamas pažeistai odai gydyti, naudingas stabdant uždegimą, dermatitą, egzemą, taip pat apsaugo nuo aplinkos poveikio, mažina strazdanų ir raukšlių kiekį. Šaltalankių aliejus gerina kraujotaką, detoksikuoja. Iš šaltalankių aliejaus gilyn į dermą patekusi gama-linoleno rūgštis virsta į prostaglandinus, todėl organizmas apsaugomas nuo infekcijų, malšinamas uždegimas, karščiavimas, senėjimo procesai [54, 55, 56].

Saulėgrąžų aliejus. Tai skaidrus, geltonas, natūralus aliejus, išgaunamas iš saulėgrąžų sėklų. Šio aliejaus sudėtyje gausu palmitino, stearino, oleino (omega-9), gama-linoleno (omega-6) rūgščių. Svarbu, jog tai vienas iš daugiausiai polinesočiųjų rūgščių turinčių aliejų. Saulėgrąžų aliejuje gausu vitamino E, taip pat tokių elementų kaip selenas, cinkas, geležis [57]. Dėl savo cheminės kompozicijos saulėgrąžų aliejus naudojamas sudirgusiai odai minkštinti ir maitinti, žaizdoms gydyti, taip pat šis aliejus pasižymi antioksidacinėmis, antimikrobinėmis ir uždegimą slopinančiomis savybėmis [57,58].

Baltasis vazelinas. Tai iš naftos išgauta, minkšta medžiaga, kuri sudaryta iš įvairių angliavandenilių. Medicinoje naudojamo vazelino spalva yra balta. Ši medžiaga netirpi vandenyje, tirpsta tik tam tikruose organiniuose tirpikliuose: eteriye, chloroforme [59]. Baltasis vazelinas naudojamas tepalų, kremų gamyboje. Tai viena iš dažniausių medžiagų, naudojamų gaminant hidrofobinius pagrindus. Vazelinas labai gerai apsaugo odą nuo vandens netekimo, tačiau atpalaiduotų junginių kiekis iš šio pagrindo įprastai nebūna itin didelis [10].

„Basalis Clinic“. Tai LSMU vaistinės sukurtas produktas. Sudėtyje nurodomi tokie junginiai: vanduo, skystas parafinas, vazelinas, stearino rūgštis, glicerolio monostearatas, karbomeras, trolaminas, fenoksietanolis. Kremas skirtas odai maitinti ir drėkinti, tinka vartoti su gydomaisiais tepalais ir kremais [60].

Karbomeras 940. Tai baltos spalvos, sintetinis poliakrilo rūgšties polimeras. Išbrinkintas vandenyje šis karbomeras sukuria žemą pH reikšmę, kuri vėliau padidinama neutralizavus rūgštį pasirinktu šarmu. Karbomeras itin efektyviai keičia sistemos reologines savybes, nes didina klampą, tačiau ant odos nesukuria sunkumo ir lipnumo jausmo [5]. Dažniausiai šis komponentas naudojamas įvairiems geliams, kremams, šampūnams, plaukų kondicionieriams, dezinfekuojantiems geliams, kūno prausikliams gaminti [61].

Pionier KWH. Tai pagrindas naudojamas v/a kremų gamyboje. Šis pagrindas sudarytas iš skystojo parafino, polietileno ir izopropilo palmitato [62], kuris itin efektyviai minkština odą [63]. Dėl didelio kiekio hidrofobinių medžiagų šis pagrindas tinka sausai odai gydyti [62].

Bevandenis lanolinas. Tai išvalytas, natūralūs, iš avių vilnos riebalų išgautas produktas. Lanolinas sudaro 10 % – 25 % avies vilnos svorio. Maždaug 87 % lanolino sudaro didelės molekulinės masės esteriai, likusią dalį sudaro alifatiniai alkoholiai, steroliai, riebalų rūgštys ir angliavandeniai. Dėl didelio kiekio esterių lanolinas dažniau apibūdinamas kaip vaškas. Tai specifinio kvapo, labai klampi, geltonos spalvos medžiaga, kurios lydymosi temperatūra apie 40 °C. Lanolinas kremų ir tepalų gamyboje naudojamas kaip emulsiklis, itin gerai minkština odą, todėl tinka naudoti trūkinėjančiai, šerpetojančiai ir jautriai odai gydyti [64].

Stearilo alkoholis. Kieta, balta, silpnu kvapu pasižyminti medžiaga. Jos lydymosi temperatūra yra apie 60 °C. Šis komponentas kosmetikoje naudojamas kaip emulsiklis, tirštiklis, kuris apsaugo nuo putų susidarymo. Stearilo alkoholis yra sintezuojamas iš stearino rūgšties. Komponentas naudojamas kuriant plaukų kondicionierius ir odą drėkinančius ar valančius produktus [65, 66].

## **1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas**

Propolis dėl sudėtyje esančių naudingų junginių, tokių kaip fenolinės rūgštys, flavonoidai ir mineralai, yra itin tinkamas gydyti įvairias ligas. Propolis pasižymi įvairiomis naudingomis savybėmis: antioksidacinėmis, antimikrobinėmis, uždegimą slopinančiomis. Siekiant pagerinti odos bei gleivinių būklę, kuriamos įvairios pusiau kietos vaisto formos, kurios sėkmingai gali paveikti pažeistas vietas. Tam, kad būtų užtikrinamas medžiagų atpalaidavimas ir skvarba į odą, svarbu parinkti tinkamą modeliuojamo vaisto pagrindą ir papildomas medžiagas. Atsižvelgiant į naudojamo pagrindo savybes, pusiau kietos vaisto formos gali būti hidrofilinės arba hidrofobinės, o jei vaisto

formos pagrindą sudaro tiek hidrofiliniai, tiek lipofiliniai komponentai, tokia sistema vadinama emulsine. Junginiai pusiau kietoje vaisto formoje, priklausomai nuo cheminių savybių, tarpusavyje sąveikauja, todėl iš to paties pagrindo vienos medžiagos gali atsipalaiduoti ir skverbtis į odą itin gerai, o kitų medžiagų atpalaidavimas gali būti itin ribotas. Dėl šios priežasties sumodeliavus stabilią pusiau kietą vaisto formą būtini kokybės tyrimai. Atpalaidavimo tyrimai *in vitro* yra patys pirmieji atliekami tyrimai, ir jų rezultatai parodo ar veiklioji medžiaga gali judėti ir difunduoti iš sumodeliuotos sistemos, tačiau šie rezultatai neparodo ar medžiaga skverbsis į odą. Tam, kad būtų galima sužinoti kaip sistema veiks odos sluoksnius reikalingi ir svarbūs *in vivo* arba *ex vivo* tyrimai.



## **2. Tyrimo metodika ir metodai**

### **2.1. Tyrimo objektas, naudotos medžiagos ir įranga**

#### **Tyrimo objektas**

Suformuluotos pusketės vaisto formos su tirštuoju propolio ekstraktu (tepalai, kremai) ir propolio etanoliniu ekstraktu (gelis).

#### **Naudotos medžiagos ir reagentai**

Propolio žaliava iš bitininko J. Aguonio, Lazdijų raj., Lietuva

Bičių vaškas iš UAB „Bičių korys“, Vilnius, Lietuva

Vanilo rūgštis  $\geq 98$  % iš Sigma – Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija

Kavos rūgštis  $\geq 98$  % iš Sigma – Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija

Vanilinas  $\geq 99$  %. iš Sigma – Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija

Kumaro rūgštis  $\geq 98$  % iš Sigma – Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija

Ferulo rūgštis  $\geq 99$  % iš Sigma – Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija

Etanolis (96,3 %) iš AB „Stumbras“, Kaunas, Lietuva

Folin-Ciocalteu's reagentas iš Sigma – Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija

Natrio karbonatas, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> iš Sigma-Aldrich, Saint Luisas, JAV

Acetonitrilas  $\geq 99,9$  % grynumo iš Sigma – Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija

Acto rūgštis  $\geq 99,9$  % grynumo iš Sigma – Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija

Baltasis vazelinas iš Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija

Bevandenis lanolinas iš CPC W. M. GmbH, Saksamaa-Tootja, Vokietija

Karbomeras 980 iš Lubrizol, Ohajo valstija, JAV

Metanolis 99,9 % iš HPLC Roth, Vokietija

Natrio hidroksidas, NaOH iš Erba Lachema, Čekija

2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas DPPH – Sigma-Aldrich, Vokietija

Šaltalankių aliejus iš Kauno Technologijos Universiteto, Maisto mokslo ir technologijos katedros, Kaunas, Lietuva

„Basalis Clinic“ kremas iš Lietuvos Sveikatos Mokslų Universiteto vaistinės, Kaunas, Lietuva

Pionier KWH-soft iš Hansen & Rosentha, Vokietija

Pionier KWH 2020 emulsiklis iš Hansen & Rosentha, Vokietija

Stearilo alkoholis iš Sigma – Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija

Saulėgražų aliejus iš Sigma – Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija

### **Naudota įranga**

Kapiliarinis skysčių chromatografas – Agilent Infinity 1260 Capillary LC – DAD, Agilent technologies®, JAV

pHmetras – ph-meter 766 su elektrodu Knick SE 104 N, Knick Elektronische Meßgeräte GmbH & Co, Vokietija

Spektrofotometras – Agilent 8453 UV-Vis, Agilent Technologies, JAV

Reometras – Anton Paar® GmbH, Modular Compact Rheometer, MCR 102, Austrija

Svarstyklės – Scaltec SBC 31, Scaltec Instruments GmbH, Vokietija

Magnetinė maišyklė su kaitinamuoju paviršiumi – IKAMAG C-MAG HS7, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Vokietija

Celiuliozinės dializės membranos – Cuprophan®, Medicell International Ltd., Londonas, Didžioji Britanija

Cirkuliacinė vandens vonelė su termostatu – Grant GD120, Grant Instruments Ltd., Kembridžas, Didžioji Britanija

Peristaltinis siurblys su daugiakanale siurblio galva – Cole-Parmer Instrument Co., Ilinojus, JAV

Ultragarso vonelė – DT 156, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlynas, Vokietija

## **2.2. Pusiau kietų vaisto formų su propolio ekstraktais gamybos technologija**

### **2.2.1. Propolio etanolinio ekstrakto gamyba**

Kaip geriausias ekstrahentas naudojamas 70 % etanolis [31]. Propolio etanolinė ištrauka gaminama santykiu 1:10. 2,5 g sausos, susmulkintos propolio žaliavos užpilama 70 % etanoliumi iki 25 ml bendro tūrio ir 7 dienoms paliekama maceruoti kambario temperatūroje. Po savaitės ištrauka filtruojama naudojant popieriaus filtrą, filtratas supilamas į tamsaus stiklo talpyklę ir laikomas sandariai uždarytas.

### **2.2.2. Tirštojo propolio ekstrakto gamyba**

Santykiu 1:1 pagaminama propolio etanolinė ištrauka, kaip ekstrahentas naudojamas 70 % etanolis. 50 g sausos, susmulkintos propolio žaliavos užpilama 70 % etanoliumi iki 100 ml bendro tūrio ir 7 dienoms paliekama maceruoti kambario temperatūroje. Po savaitės ištrauka filtruojama naudojant popieriaus filtrą, gautas ekstraktas garinamas ant vandens vonelės iki tirštos, klampios masės, kuri talpinama į tamsaus stiklo sandarų buteliuką.

## **2.3. Propolio ekstraktų kokybės vertinimas**

### **2.3.1. Bendras fenolinių junginių kiekio nustatymas propolio ekstraktuose**

Bendras fenolinių junginių kiekis tirštajame ir etanoliniame propolio ekstraktuose nustatytas atliekant spalvinę reakciją su *Folin – Ciocalteu* reagentu ir išmatuojant absorbciją po reakcijos. Tirštasis propolio ekstraktas skiedžiamas 70 % etanoliumi santykiu 1:100, etanolinis propolio ekstraktas skiedžiamas 70 % etanoliumi santykiu 1:50. Reakcija vykdoma 10 ml kolbutėje. Reakcijos eiga: įpilama 3 ml distiliuoto vandens, įpilama 1 ml tiriamojo tirpalo ir 1,5 ml 20 % vandeninio natrio karbonato tirpalo. Praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki 10 ml. Mišinys gerai supurtomas ir paliekamas tamsoje. Po 30 minučių spektrofotometru (*Agilent 8453 UV-Vis, Agilent Technologies, JAV*) absorbcija išmatuojama 765 nm bangos ilgyje. Bendras fenolinių junginių kiekis skaičiuojamas pagal sudarytą p-kumaro rūgšties kalibracinę grafiką (nuo 20 iki 140 µg/ml) ir išreiškiamas p-kumaro rūgšties ekvivalentu mg/g [67]. Atliekami 3 matavimo pakartojimai, apskaičiuojamas aritmetinis vidurkis ir standartinis nuokrypis (SD).

### **2.3.2. Propolio ekstraktų analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu**

Pirmiausiai gaminami analizei reikalingi tirštojo ir etanolinio propolio ekstraktų etanoliniai tirpalai. Tirštasis propolio ekstraktas skiedžiamas 70 % etanoliumi santykiu 1:500, o etanolinis propolio ekstraktas skiedžiamas 70 % etanoliumi santykiu 1:300. Tiek tirštojo, tiek etanolinio propolio ekstraktų kokybinei ir kiekybinei analizei atlikti naudojamas kapiliarinis skysčių chromatografas (*Agilent*

*Infinity 1260 Capillary LC-DAD, Agilent technologies®, JAV*) su diodų matricos detektoriumi. Analizuojamiems fenoliniams junginiams atskirti naudojama ACE C18 kolonėlė (150 × 0,5 mm, 5 µm dydžio dalelės) su prieškolone ACE C18 (5 µm). Judrioji fazė susideda iš 0,5 % acto rūgšties vandeninio tirpalo (eliuentas A) bei acetonitrilo (eliuentas B). Fenolinių junginių nustatymas atliktas prie 290 nm bangos ilgio. Visi mėginiai prieš analizę filtruoti naudojant nailoninius membraninius švirkštų filtrus, kurių porų dydis yra 0,2 µm (*Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Vokietija*) [67].

### **2.3.3. Antioksidacinis propolio ekstrakto aktyvumas**

Tirštojo propolio ekstrakto, šaltalankių aliejaus ir šių dviejų komponentų mišinio antioksidacinis aktyvumas nustatytas panaudojant DPPH• radikalo sujungimo metodą [70, 71]. Nustatoma, kiek procentų DPPH• radikalo yra inaktyvuojama dėl antioksidacinių poveikį turinčių medžiagų, esančių pasirinktuose mėginiuose. Propolio ekstraktas ir šaltalankių aliejus ištirpinami pasirinktame vienodame 96 % etanolio kiekyje. 1 cm kiuvetėse po 0,1 ml šių tirpalų sumaišoma su 2,8 ml 0,1 mM etanolinio DPPH• tirpalo. Trečioji kiuvetė užpildoma 0,1 ml propolio ir 0,1 ml šaltalankių aliejaus etanolinių tirpalų ir pripildoma 2,8 ml 0,1 mM etanolinio DPPH• tirpalo. Visi mėginiai paliekami tamsoje ir po 30 min. spektrofotometru (*Agilent 8453 UV-Vis, Agilent Technologies, JAV*) matuojamas absorbcijos sumažėjimas prie 518 nm bangos ilgio. Kaip palyginamasis tirpalas naudojamas 96 % etanolis. Inaktyvuoto DPPH• radikalo kiekis procentais apskaičiuojamas pagal formulę:

$DPPH_{inaktiv. \%} = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100$ , kai  $A_0$  – tuščiojo bandinio absorbcija ( $t=0$  min.),  $A_1$  – bandinio su tiriamuoju mėginiu absorbcija ( $t=30$  min.).

Matavimai atlikti 3 kartus, apskaičiuotas aritmetinis vidurkis ir SD.

### **2.3.4. Priešgrybelinis ir antibakterinis propolio ekstrakto aktyvumai**

Kokybinis bakterijų jautrumo/atsparumo tyrimas atliktas naudojant etalonines mikroorganizmų kultūras: *Microsporium canis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Į bakterijų suspensijas įmerkiamas medvilninis tamponas ant kojelės (*FL medical, Italija*) ir bakterijos tolygiai paskleidžiamos ant Miulerio-Hintono (*Liofilchem, Italija*) terpės paviršiaus. *Microsporium canis* grybelis analogiškai sėjamas ant Saburo (*Liofilchem, Italija*) terpės [72]. Kiekvienoje Petri lėkštelėje vienodu, 6 cm atstumu, padaromi 6 šulinėliai. Į paruoštus šulinėlius įdedama po 0,5 g propolio ekstrakto, taip pat teigiamos ir neigiamos kontrolės mėginiai. Kaip neigiama kontrolė tyrime naudojamas 70 % etanolis, kaip teigiama kontrolė lėkštelėse su grybeliu naudojamas terbinafino

hidrochlorido 0,5 % kremas, o lėkštelėse su bakterijų padermėmis – chlorheksidino 0,02 % tirpalas. Kiekviena tiriamoji medžiaga lėkštelėse talpinama į du šulinėlius.

Paruoštos Petri lėkštelės su bakterijomis termostate (*Memert, Vokietija*) kultivuojamos 24 valandas 36,5 °C temperatūroje, o Petri lėkštelės su grybeliu kultivuojamos 25 °C temperatūroje. Po kultivavimo atliekama rezultatų analizė, matuojamas susidariusių skaidrių zonų dydis (mm). Kuo didesnė skaidri zona susidaro aplink tiriamą medžiagą, tuo geresnis šios medžiagos antimikrobinis aktyvumas.

## 2.4. Pusiau kietų vaisto formų su propolio ekstraktais modeliavimas

### 2.4.1. Tepalų su tirštuoju propolio ekstraktu modeliavimas

Sumodeliuotos trys tepalų formuluotės (T-1, T-2, T-3) su tirštuoju propolio ekstraktu. Į pasirinktą riebiają fazę (baltąjį vazeliną) įterpiami skirtingi propolio ekstrakto kiekiai (2 %, 3 %, 4 %) [67]. Siekiant nustatyti lanolino įtaką pusiau kietoms farmacinėms formoms, buvo suformuluoti T-4, T-5, T-6 tepalai, į kuriuos papildomai įterpta 1 % lanolino.

Kitas tepalų gamybai naudotas pagrindas suformuluotas iš natūralaus bičių vaško ir saulėgrąžų aliejaus [50, 68].

T-1–T-6 tepalai gaminami pasvėrus nustatytus kiekius reikalingų medžiagų, ir vėliau grūstuvėje visas šias medžiagas sumaišant iki vienalytės masės.

Modeliuojant T-7, T-8, T-9 tepalus, bičių vaškas pirmiausiai lydomas porcelianinėje lėkštelėje ant vandens garų vonelės, palaipsniui pilamas pašildytas saulėgrąžų aliejus. Šie du komponentai šildomi ir maišomi iki vienalytės masės, kuri paliekama atvėsti. Į jau atvėsusią masę įterpiami atitinkami kiekiai (2 %, 3 %, 4 %) tirštojo propolio ekstrakto, maišoma iki vienalytės masės.

Visi pagaminti tepalai patalpinami į sandarias talpykles ir laikomi kambario temperatūroje. Tepalų sudėtys nurodytos 1 lentelėje.

1 lentelė. Tepalų su tirštuoju propolio ekstraktu sudėtys

I gr. TEPALAI					
Tepalo Nr.	Tirštas propolio ekstraktas, %	Vazelinas, %	Lanolinai, %	Bičių vaškas, %	Saulėgrąžų aliejus, %
T-1	2	98	-	-	-
T-2	3	97	-	-	-
T-3	4	96	-	-	-

<b>T-4</b>	2	97	1	-	-
<b>T-5</b>	3	96	1	-	-
<b>T-6</b>	4	95	1	-	-
<b>T-7</b>	2	-	-	9,1	88,9
<b>T-8</b>	3	-	-	9	88
<b>T-9</b>	4	-	-	8,9	87,1

#### 2.4.2. Kremų su tirštuoju propolio ekstraktu modeliavimas

Suformuluotos įvairios kremų kompozicijos naudojant skirtingas riebalines fazes. Naudotas baltasis vazelinas, Pionier KWH-soft, saulėgrąžų aliejus. Taip pat panaudoti skirtingi emulsikliai: stearilo alkoholis, emulsiklis Pionier KW 2020, lanolinas. Kaip vandeninė fazė naudotas išgrynintas vanduo. Kita dalis kremų formuluoti veikliąją medžiagą įterpiant į LSMU vaistinės kremą „Basalis Clinic“. Kremų kompozicijų sudėtys nurodytos 2 lentelėje.

2 lentelė. Kremų su tirštuoju propolio ekstraktu sudėtys

II gr. KREMAI									
Kremo Nr.	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7	K-8	K-9
<b>Tirštas propolio ekstr., %</b>	2	3	4	2	3	4	2	3	4
<b>Vanduo, %</b>	27	27	27	10	10	10	-	-	-
<b>Vazelinas, %</b>	43	42	41	-	-	-	-	-	-
<b>Stearilo alk., %</b>	20	20	20	-	-	-	-	-	-
<b>Saulėgrąžų al., %</b>	8	8	8	-	-	-	-	-	-
<b>Pionier KWH-soft, %</b>	-	-	-	88	87	86	-	-	-

<b>Emulsiklis Pionier KW- 2020</b>	-	-	-	Keli lašai	Keli lašai	Keli lašai	-	-	-
<b>Lanolinas, %</b>	-	-	-	-	-	-	1	1	1
<b>Basalis Clinic, %</b>	-	-	-	-	-	-	97	96	95

Prieš gaminant K-1, K-2, K-3 kremus pasveriamas nustatytas vazelino ir stearilo alkoholio kiekis. Šios dvi medžiagos išlydomos porcelianinėje lėkštelėje ant vandens garų vonelės iki vientisos masės. Į šią masę maišant įterpiamas pašildytas saulėgrąžų aliejus, vėliau lėtai maišant įpilamas nustatytas kiekis vandens. Į gautą masę įterpiamas tirštas propolio ekstraktas. Maišoma kol susidaro vienalytė, puri masė.

Prieš gaminant K-4, K-5, K-6 kremus pasveriamas reikiamas Pionier KWH kiekis. Medžiaga įdedama į grūstuvę, įpilamas nustatytas kiekis vandens ir įlašinami keli lašai emulsiklio Pionier KW-2020. Maišoma kol gaunama vienalytė masė, į kurią įterpiamas tirštas propolio ekstraktas.

Prieš gaminant K-7, K-8, K-9 kremus pasveriamas reikiamas kiekis „Basalis Clinic“ kremo. Grūstuvėje jis sumaišomas su lanolinu ir įterpiamas nustatytas kiekis tirštojo propolio ekstrakto.

#### 2.4.3. Gelių su etanoliniu propolio ekstraktu modeliavimas

Gaminami geliai, kurių pagrindas sudaromas iš atitinkamų koncentracijų (0,5 % ir 1 %) karbomero miltelių, kurie išbrinkinami išgrynintame vandenyje. Į sudarytą dispersinę sistemą įterpiamas atitinkamas kiekis etanolinio propolio ekstrakto (1 %, 2 %, 4 %), lašinamas 10 % NaOH tirpalas ir maišoma kol sistema gelifikuojasi [69]. Gelių sudėtys pateiktos 3 lentelėje. Gauti karbomero geliai laikomi sandarioje talpyklėje, kambario temperatūroje.

3 lentelė. Gelių su etanolinių propolio ekstraktu sudėtys

<b>III gr. GELIAI</b>				
<b>Gelio Nr.</b>	<b>Vanduo, %</b>	<b>Karbomeras, %</b>	<b>Etanolinis propolio ekstraktas, %</b>	<b>10 % NaOH</b>
<b>G-1</b>	98,5	0,5	1	Keli lašai
<b>G-2</b>	97,5	0,5	2	Keli lašai

<b>G-3</b>	95,5	0,5	4	Keli lašai
<b>G-4</b>	98	1	1	Keli lašai
<b>G-5</b>	97	1	2	Keli lašai
<b>G-6</b>	95	1	4	Keli lašai

## 2.5. Pusiau kietų vaisto formų su propolio ekstraktais kokybės vertinimas

### 2.5.1. Pusiau kietų vaisto formų pH ir reologinių savybių vertinimas

Visų pusiau kietų vaisto formuluočių (tepaly, kremų, gelio) pH reikšmė nustatyta pH-metru (*pH-meter 766 su elektrodu Knick SE 104 N, Knick Elektronische Meßgeräte GmbH & Co, Vokietija*) kambario temperatūroje. Kiekvienos vaisto formulotės pH reikšmės matavimai atlikti 3 kartus, apskaičiuotas aritmetinis vidurkis ir SD.

Pusiau kietų vaisto formų reologinės savybės vertintos reometru (*Anton Paar® GmbH, Modular Compact Rheometer, MCR 102, Austrija*). Naudotas matematinis *power law slope* modelis ir nustatytas kiekvienos pusiau kietos vaisto formos klampumo koeficientas ( $K, Pa \cdot s^n$ ), taip pat ir takumo indeksas ( $n$ ). Naudoti trys temperatūriniai režimai: 20 °C, 32 °C ir 37 °C. Kiekvienos formulotės reologiniai matavimai atlikti 3 kartus, išvestas aritmetinis vidurkis ir apskaičiuotas SD.

### 2.5.2. Fenolinių junginių atpalaidavimas iš pusiau kietų vaisto formų *in vitro*

Fenolinių junginių atpalaidavimo matavimai atlikti naudojant modifikuotas Franz difuzinės celes [73, 74, 75]. Kaip akceptorinė terpė naudotas išgrynintas vanduo (20 ml). Donorinė fazė – sumodeliuotos pusiau kietos vaisto formos (~1 g). Prieš eksperimentą celiuliozinės dializės membranos (*Cuprophane®*, *Medicell International Ltd., Londonas, Didžioji Britanija*) pamerkiamos į distiliuotą vandenį ir laikomos 12 valandų. Po 12 valandų donorinė fazė talpinama į cilindą, kurio atvirasis galas atsargiai uždengiamas paruošta celiuliozine membrana ir sutvirtinamas gumelėmis. Sukūriamas difuzijos plotas celėje yra lygus 1,77 cm<sup>2</sup>. Donorinė fazė su membrana merkiama į akceptorinę terpę, kuri yra maišoma ir joje pastoviai palaikoma 32±0,1 °C temperatūra. Temperatūrai palaikyti naudojama magnetinė maišyklė su kaitinimo įranga (*IKA® C-MAG HS 7, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Vokietija*). Po 1 val., 2 val., 4 val. ir 6 val. paimama po 1 ml akceptorinės terpės, o atgal po kiekvieno ėmimo įpilama po 1 ml šviežios terpės [67]. Tiriamosios akceptorinės terpės mėginiuose nustatomas atpalaiduotas bendras fenolinių junginių kiekis naudojant spektrofotometrijos metodą aprašytą 2.3.1 skyriuje. Po 6 val. akceptorinėje terpėje esančių fenolinių junginių analizė vykdoma ir



efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodu aprašytu 2.3.2 skyriuje. Matavimai atliekami 3 kartus, apskaičiuojamas aritmetinis vidurkis ir SD

### **2.5.3. Fenolinių junginių skvarbos į odą tyrimai *ex vivo***

Fenolinių junginių skvarbos į odą tyrimai atlikti naudojant Bronaugh pratikas difuzines celes. Pirmiausiai *ex vivo* tyrimams paruošiama žmogaus oda, kuri gaunama po plastinių operacijų ir iki tyrimo laikoma šaldiklyje. Oda atšildoma, įvertinama jos būklė, pažeidimai, pašalinami riebalų likučiai ir tik tada oda sukarpoma ir patalpinama į 0,64 cm<sup>2</sup> ploto celes. Paruoštos difuzinės celės dedamos ant 37 °C temperatūros metalinio bloko. Temperatūra palaikoma naudojant cirkuliacinę vandens vonelę su termostatu (*Grant GD120, Grant Instruments Ltd., Kembridžas, Didžioji Britanija*). Į celes talpinama ~150 mg donorinės fazės (pusiau kietos vaisto formos). Akceptorinė terpė, kuri sudaryta iš 0,9 % natrio chlorido ir 0,005 % natrio azido tirpalo, cirkuliuoja 0,6 ml/min greičiu. Cirkuliacijai užtikrinti naudotas peristaltinis siurblys su daugiakanale siurblio galva (*Cole-Parmer Instrument Co., Ilinojus, JAV*). Po 24 valandų donorinė fazė pašalinama nuo odos, o oda ne mažiau kaip 3 kartus plaunama su 96,3 % etanoliu ir su 0,9 % NaCl tirpalu. Po odos plovimo “sausos karščio” metodu derma atskiriama nuo epidermio. Oda iš epidermio pusės 1-2 sekundes palaikoma prie įkaitinto metalinio instrumento, o tada epidermis nuo dermos atskiriamas naudojant pincetą ir sluoksniai patalpinami į skirtingus Ependorfo mėgintuvėlius. Dermos ir epidermio sluoksnių ekstrakcija vykdoma 30 min. ultragarso vonelėje (*DT 156, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlynas, Vokietija*). Kaip ekstahentas naudojamas metanolio ir vandens mišinys (1 ml). Šis mišinys paruoštas sumaišius komponentus santykiu 1:1. Po ekstrakcijos odos likučiai iš mėgintuvėlių pašalinami, o tirpalai filtruojami pro nailoninius membraninius švirkštų filtrus (*Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Vokietija*) [67]. Tirpalai analizuojami ESC metodu, kuris plačiau aprašytas 2.3.2 skyriuje. Matavimai atliekami 3 kartus, apskaičiuojamas aritmetinis vidurkis ir SD.

### **2.6. Statistinė duomenų analizė**

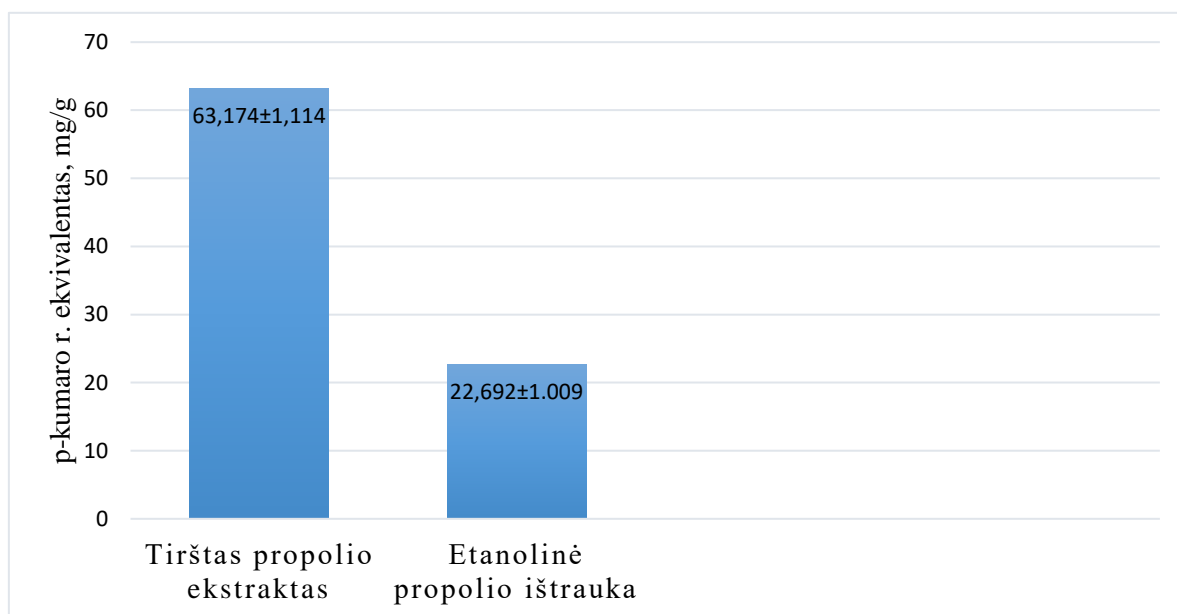
Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant MS Excel 2016 (*Microsoft, JAV*) ir SPSS 22 (*IBM SPSS Inc., Chicago, IL*) statistines programas. Visi matavimai atlikti po 3 kartus. Kiekybiniai duomenys vertinti remiantis aritmetiniu vidurkiu, standartiniu nuokrypiu (SD). Rezultatų skirtumai buvo laikomi statistiškai reikšmingais, jei  $p < 0,05$ .

### 3. Rezultatai

#### 3.1. Tirštojo ir etanolinio propolio ekstraktų kokybinis vertinimas

##### 3.1.1. Bendras fenolinių junginių kiekis tirštajame ir etanoliniame propolio ekstraktuose

Bendras fenolinių junginių kiekis tirštajame propolio ekstraktoje ir etanolinėje propolio ištraukoje nustatytas spektrofotometrijos būdu. Bendras fenolinių junginių kiekis išreikštas p-kumaro rūgšties, kuri propolyje yra viena iš dominuojančių [76, 77], ekvivalentu mg/g (žr. 5 pav.)



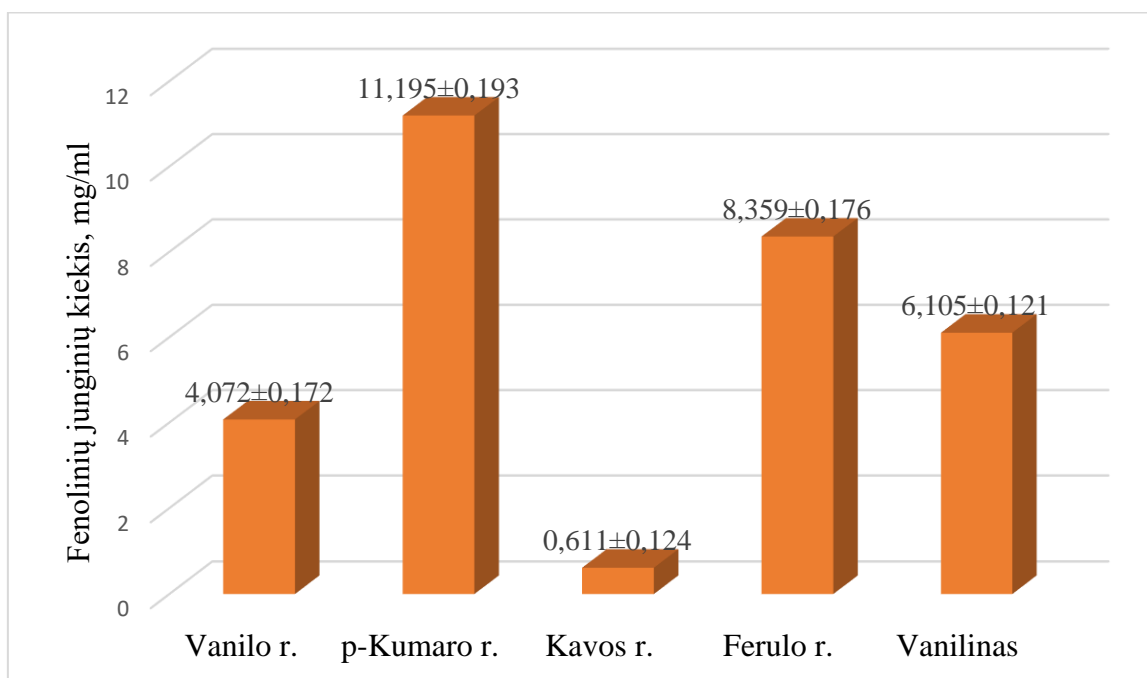
5 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis išreikštas p-kumaro r. mg/g ekvivalentu

Gauti rezultatai parodė, jog tirštajame propolio ekstraktoje bendras fenolinių junginių kiekis yra 35,92 % didesnis nei etanolinėje ištraukoje, ir šis junginių kiekio skirtumas nustatytas kaip statistiškai reikšmingas ( $p < 0,05$ ). Dėl šios priežasties tik gelių gamybai naudoti pasirinkta etanolinė propolio ištrauka. Kremų ir tepalų formuluočių kompozicijos pasirinktos tokios, kuriose naudotinas tirštas propolio ekstraktas.

##### 3.1.2. Fenolinių junginių nustatymas tirštajame ir etanoliniame propolio ekstraktuose efektyviosios skysčių chromatografijos metodu

Nustačius bendrą fenolinių junginių kiekį, tikslinga įvertinti ir konkrečių fenolinių komponentų kiekį etanoliniame ir tirštajame propolio ekstraktuose. ESC metodu nustatytos vienos iš dažniausiai propolyje aptinkamų fenolinių rūgščių: p-kumaro, ferulo, kavos ir vanilino [78, 79, 80]. Taip pat nustatytas ir vanilinas, kuris remiantis literatūra, propolyje yra nustatomas gausiai [80, 81, 82].

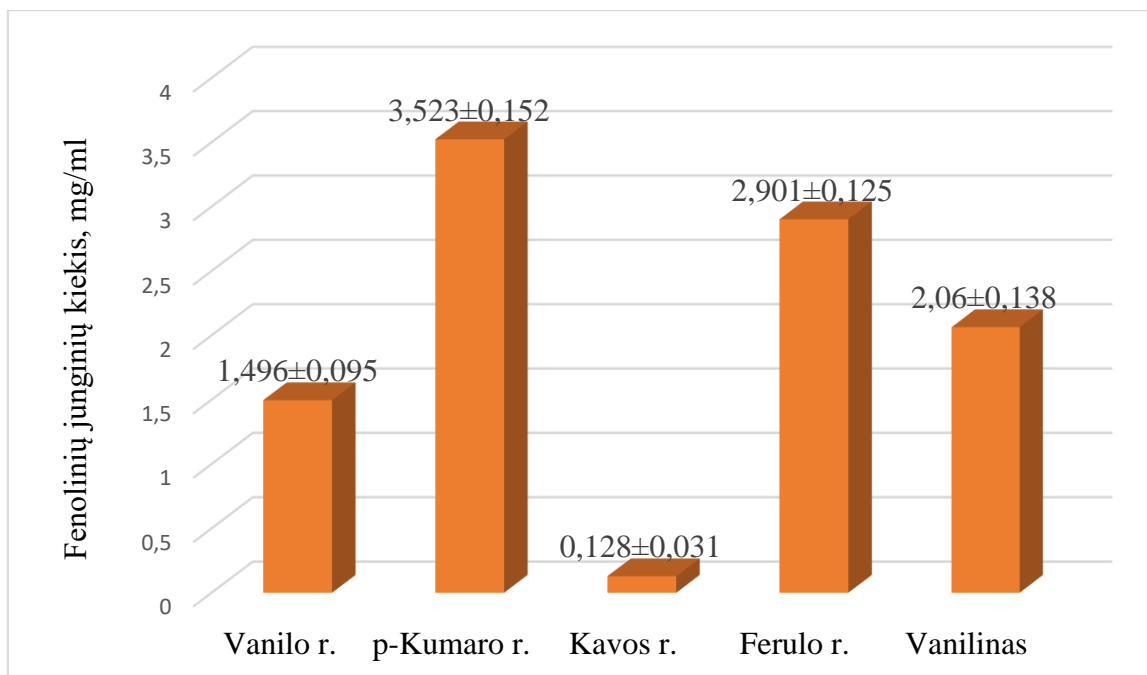
Nustatyti fenolinių junginių kiekiai tirštajame propolio ekstraktoje pateikti 6 paveiksle.



6 pav. Fenoliniai junginiai tirštajame propolio ekstrakto (mg/ml)

Nustatyta, jog propolyje dominuojanti yra p-kumaro rūgštis. Jos kiekis sudarė  $36,90 \pm 0,64$  % visų fenolinių junginių kiekio. Tokie rezultatai, jog daugiausiai propolyje yra būtent p-kumaro rūgštis, sutampa ir su kitų tyrėjų tyrimų duomenimis [77, 79]. Antroji pagal kiekį nustatyta rūgštis yra ferulo ( $27,55 \pm 0,02$  %), o trečiasis komponentas – vanilinas ( $20,12 \pm 0,4$  %). Tai, jog ferulo rūgštis kiekis propolyje yra didesnis nei vanilino aprašoma ir kitų tyrėjų darbuose [80, 83], tačiau Ivanauskas L., Jakštas V. ir kt. [81] savo darbe, atvirkščiai, nustatė vanilino dominavimą prieš ferulo rūgštį. Iš 6 pav. matome, jog vanilo rūgštis kiekis propolyje yra ženkliai didesnis nei kavos rūgštis, atitinkamai buvo nustatyta  $13,42 \pm 0,57$  % ir tik  $2,01 \pm 0,41$  % šių rūgščių. Visgi kitų mokslininkų tyrimuose kavos rūgštis propolio ekstrakto buvo daugiau nei vanilo rūgštis [81, 84]. Tokie skirtumai gali atsirasti dėl skirtingų propolio surinkimo vietų, taip pat dėl to, jog propolis išgautas iš skirtingų augalų rūšių [3, 23].

Vanilo, p-kumaro, ferulo, kavos rūgščių bei vanilino kiekiai ESC metodu nustatyti ir etanoliniame propolio ekstrakto, o gauti duomenys pateikti 7 paveiksle.

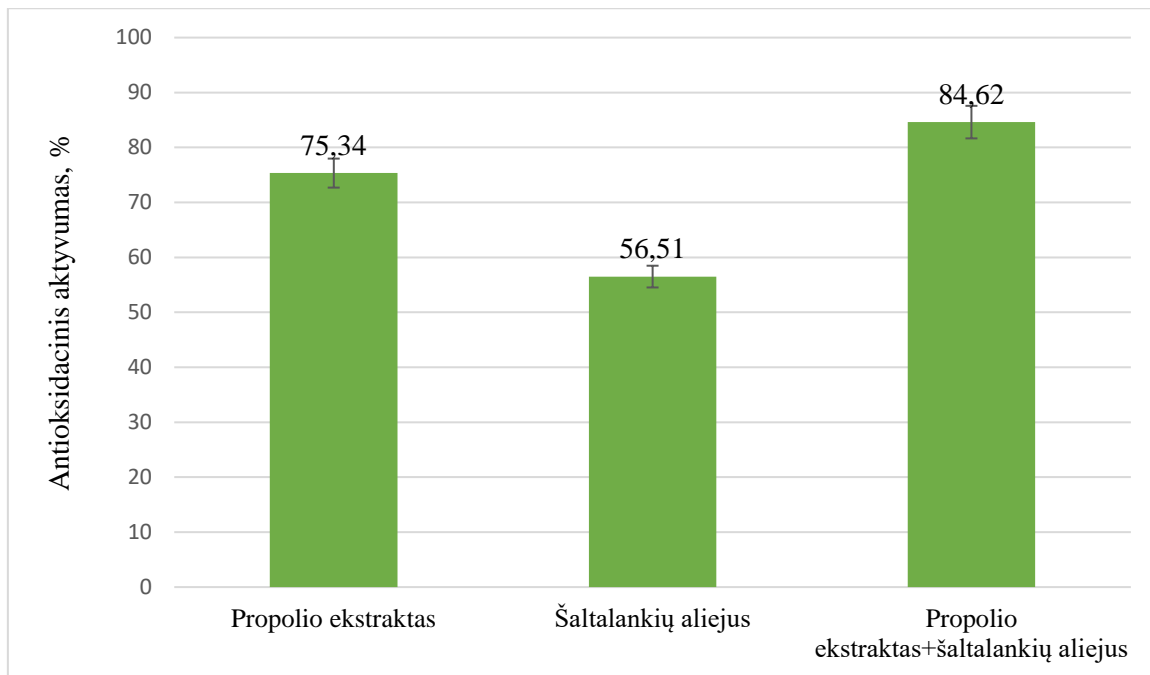


7 pav. Fenoliniai junginiai etanoliniame propolio ekstrakte (mg/ml)

Etanoliniame propolio ekstrakte, kaip ir tirštajame, junginiai pagal nustatytą kiekį išsidėstė ta pačia tvarka. Daugiausiai,  $34,05 \pm 1,5$  %, nustatyta p-kumaro rūgšties, ferulo rūgšties etanoliniame propolio ekstrakte nustatyta  $28,04 \pm 1,23$  %, vanilino –  $19,94 \pm 1,36$  %, vanilo rūgšties –  $14,46 \pm 0,94$  %, o kavos rūgšties –  $0,128 \pm 0,31$  %.

### 3.1.3. Antioksidacinis propolio ekstrakto aktyvumas

Propolis pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, tačiau norint efektyviai gydyti pažeistą odą, tikslinga vaisto sudėtį tobulinti ir papildomai įterpti medžiagų didinančių antioksidacinį aktyvumą [24]. Šaltalankių aliejus taip pat pasižymi antioksidaciniu aktyvumu [85], todėl naudinga nustatyti, ar į pusiau kietas vaisto formas su propoliu verta papildomai įterpti ir šaltalankių aliejų. Išmatuotas propolio ekstrakto, šaltalankių aliejaus ir šių dviejų komponentų mišinio antioksidacinis aktyvumas, rezultatai pateikti 8 pav.

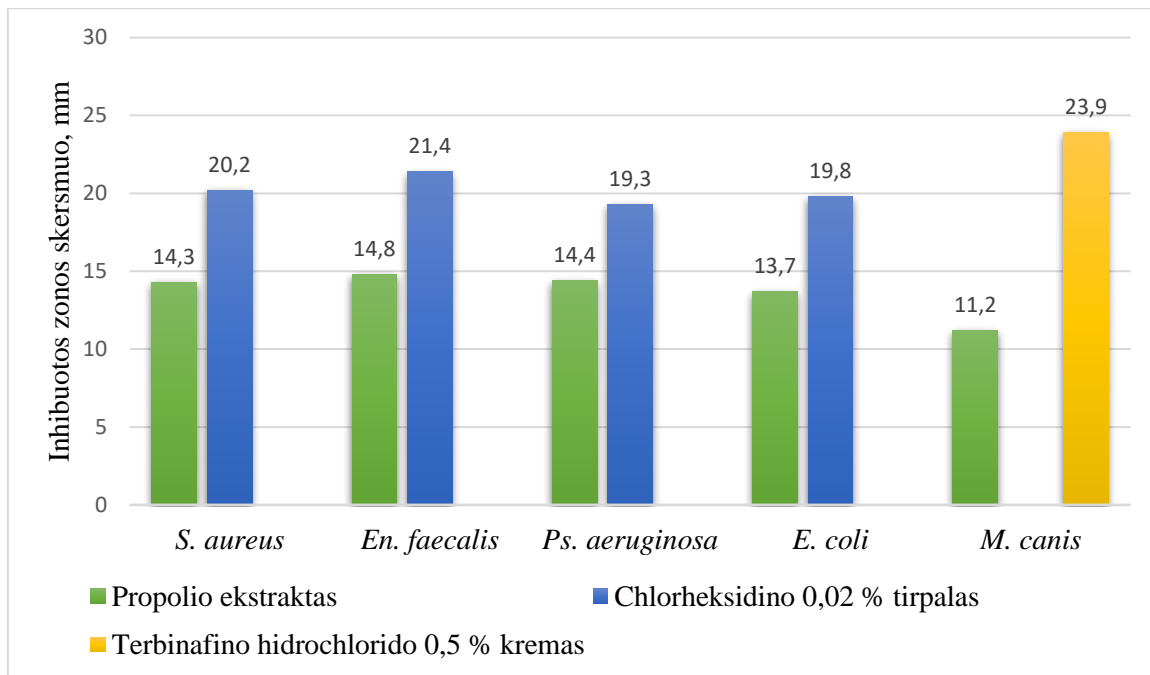


8 pav. Propolio ir šaltalankių aliejaus antioksidacinis aktyvumas

Nustatyta, jog tiek propolio ekstraktas, tiek šaltalankių aliejus pasižymėjo antioksidacinėmis savybėmis. Šių dviejų komponentų mišinys veikė sinergistiškai ir antioksidacinis aktyvumas padidėjo. Nustatytas  $9,28 \pm 0,41$  % didesnis šių dviejų komponentų mišinio antioksidacinis aktyvumas nei gryno propolio ekstrakto.

#### 3.1.4. Priešgrybelinis ir antibakterinis propolio ekstrakto aktyvumai

Siekiant įvertinti propolio ekstrakto kokybę ir tinkamumą, atlikti priešgrybelinio ir antibakterinio aktyvumų tyrimai. Tyrimuose naudotas daugiausiai veikliųjų medžiagų sudėtyje turėjęs tirštasis propolio ekstraktas. Kaip neigiama kontrolė panaudotas 70 % etanolis, kaip teigiama kontrolė priešgrybelio aktyvumo tyrime naudotas terbinafino hidrochlorido 0,5 % kremas, o antimikrobinio aktyvumo tyrime – chlorheksidino 0,02 % tirpalas. Gauti rezultatai pateikti 9 pav.



9 pav. Propolio ekstrakto antimikrobinis veikimas

Nustatyta, jog propolis, kaip ir aprašoma literatūroje [3, 31], stabdo mikroorganizmų dauginimąsi ir augimą. Kaip ir kitame tyrime [31] propolio ekstraktas veikė prieš *S. aureus*, *En. faecalis*, *Ps. aeruginosa* ir *E. coli* mikroorganizmus. Etanolis nestabdė mikroorganizmų augimo, o chlorheksidino 0,02 % tirpalas bakterijas veikė stipriau nei propolis. Terbinafino hidrochlorido 0,5 % kremas taip pat pasižymėjo stipresniu priešgrybeliniu aktyvumu nei tirtas propolio ekstraktas. Statistiškai reikšmingai ( $p < 0,05$ ) didesnės slopinamosios zonos aplink propolio ekstraktą susidarė lėkštelėse su bakterijų kultūromis nei lėkštelėse su *M. canis* grybeliu. Stipriausiai propolio ekstrakto paveiktos buvo gram-teigiamos *En. faecalis* bakterijos, tačiau svarbu pabrėžti ir tai, jog propolis veikė ir gram-neigiamas *E. coli* bei *Ps. aeruginosa* bakterijų padermes. Pastaroji bakterijų rūšis pasižymi itin dideliu atsparumu antimikrobiniam preparatams [86], todėl toks stiprus propolio ekstrakto antimikrobinis veikimas prieš *Ps. aeruginosa* bakterijas gali būti itin naudingai pritaikomas kuriant farmacinius preparatus.

### 3.2. Pusiau kietų vaisto formų su propolio ekstraktais kokybės vertinimas ir atranka

#### 3.2.1. Pusiau kietų vaisto formų pH reikšmės nustatymas ir organoleptinių savybių vertinimas

Siekiant atrinkti tinkamas farmacines formas įvertintos jų organoleptinės savybės (konsistencija, spalva, kvapas), fazių atsiskyrimas, taip pat išmatuotos ir nustatytos visų sistemų pH reikšmės. Šių savybių vertinimas pateiktas 4 lentelėje.

4 lentelė. Pusiaus kietų vaisto formų pH reikšmės ir organoleptinių savybių vertinimas

Kompozicijos Nr.	pH reikšmė	Organoleptinės savybės	Fazių atsiskyrimas
T-1	5,22±0,11	Kieta, sunkiai tepi, itin riebalinga, geltonos spalvos, malonaus kvapo	Nėra
T-2	5,12±0,23	Kieta, sunkiai tepi, itin riebalinga, geltonos spalvos, malonaus kvapo	Nėra
T-3	5,18±0,06	Kieta, sunkiai tepi, itin riebalinga, geltonai-rudos spalvos, malonaus kvapo	Nėra
T-4	5,06±0,14	Kieta, sunkiai tepi, itin riebalinga, geltonos spalvos, malonaus kvapo	Nėra
T-5	6,12±0,05	Kieta, sunkiai tepi, itin riebalinga, geltonos spalvos, malonaus kvapo	Nėra
T-6	5,98±0,14	Kieta, sunkiai tepi, geltonai-rudos spalvos, malonaus kvapo	Nėra
T-7	6,44±0,11	Minkšta, tepi, gelsvos spalvos, malonaus kvapo	Nėra
T-8	6,12±0,07	Minkšta, tepi, gelsvos spalvos, malonaus kvapo	Nėra
T-9	5,36±0,16	Minkšta, tepi, gelsvos spalvos, malonaus kvapo	Nėra
K-1	7,04±0,04	Minkšta, lengvai tepi, šviesiai gelsvos spalvos, malonaus kvapo	Nėra
K-2	6,44±0,08	Minkšta, lengvai tepi, gelsvos spalvos, malonaus kvapo	Nėra
K-3	7,14±0,09	Minkšta, lengvai tepi, gelsvos spalvos, malonaus kvapo	Nėra
K-4	5,62±0,11	Labai minkšta, lengvai tepi, geltonos spalvos, malonaus kvapo	Nėra
K-5	5,94±0,32	Labai minkšta, lengvai tepi, geltonos spalvos, malonaus kvapo	Nėra
K-6	5,51±0,14	Labai minkšta, lengvai tepi, tamsiai geltonos spalvos, malonaus kvapo	Nėra
K-7	5,41±0,21	Labai minkšta, lengvai tepi, šviesiai rusvos spalvos, malonaus kvapo	Nėra
K-8	5,94±0,18	Labai minkšta, lengvai tepi, šviesiai rusvos spalvos, malonaus kvapo	Nėra
K-9	5,86±0,21	Labai minkšta, lengvai tepi, rusvos spalvos, malonaus kvapo	Nėra

G-1	8,11±0,17	Minkšta, drebutinė, tepi, tamsiai rudos spalvos, malonaus kvapo	Nėra
G-2	-	Skysta, tamsiai žalsvos spalvos, specifinio kvapo, gelifikacija nesėkminga	Yra
G-3	-	Skysta, tamsiai rudos spalvos, specifinio kvapo, gelifikacija nesėkminga	Yra
G-4	-	Skysta, tamsiai rudos spalvos, specifinio kvapo, gelifikacija nesėkminga	Yra
G-5	-	Skysta, tamsiai žalsvos spalvos, specifinio kvapo, gelifikacija nesėkminga	Yra
G-6	-	Skysta, tamsiai žalsvos spalvos, specifinio kvapo, gelifikacija nesėkminga	Yra

Visos tepalų ir kremų sistemos pasižymėjo geromis organoleptinėmis savybėmis, buvo homogeniškos ir fazių atsiskyrimo nenustatyta. Penki geliai nesudarė stabilios sistemos ir iš karto buvo matomas aiškus fazių atsiskyrimas, todėl tokios vaisto formos tolimesniems tyrimams nebuvo tinkamos. Gelis, kuriame propolio koncentracija lygi 1 %, o karbomero kiekis lygus 0,5 %, gautas homogeniškas ir minkštas, fazių atsiskyrimo nebuvo, todėl jis tolimesniems tyrimams naudoti buvo tinkamas.

Kitas tolimesnių tyrimų atrankai labai svarbus rodiklis, tai pusiau kietų vaisto formų pH reikšmė. Natūrali žmogaus odos pH reikšmė yra artima 5, ir tokia silpnai rūgštinė terpė labai svarbi apsauginei odos funkcijai. Odai prižiūrėti ir gydyti skirtų pusiau kietų farmacinių formų pH reikšmė turėtų svyruoti tarp 4,5-6,5. Šarminėje pH ypač gerai dauginasi įvairios bakterijos, todėl pusketė vaisto forma su aukštu pH yra netinkama gydyti odos ligas, tad pagal literatūros duomenis [82, 83] tolimesniems tyrimams grupėse atrinkti mėginiai, kurių pH reikšmė neviršija 6,5. Jei grupėje visų formuluočių pH reikšmė viršija šią nustatytą reikšmę, iš grupės atrenkama tinkamiausia pH reikšmę turinti sistema.

Tepalų pH svyravo nuo 5,06±0,14 iki 6,44±0,11, todėl visi tepalai dėl tinkamos pH reikšmės buvo pasirinkti tolimesniems tyrimams. Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp didėjančios propolio koncentracijos ir pH reikšmės tepaluose nenustatyta ( $p>0,05$ ).

Kremų pH svyravo nuo 5,41±0,21 iki 7,14±0,09. Tolimesniems tyrimams dėl netinkamos pH reikšmės toliau naudojamos nebuvo K1 (pH 7,04±0,04) bei K3 (pH 7,14±0,09) sistemos. Šių sistemų aukštesis pH galėjo būti nustatytas dėl panaudoto stearilo alkoholio, jei šis komponentas formulotėje išlieka stabilus, visos formulotės pH reikšmė nustatoma didesnė [89]. Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp didėjančios propolio koncentracijos kremuose, kaip ir tepaluose, nenustatyta ( $p>0,05$ ).



Vienintelio neišsisluoksniavusio gelio pH reikšmė viršijo nustatytą reikšmę, tačiau eksperimento metu neatradus gelio alternatyvos, nes visos kitos sistemos išsisluoksniavo, tyrimams pasirinkta G-1 gelio sistema.

### 3.2.2. Pusiau kietų vaisto formų reologinių savybių vertinimas

Reologiniai tyrimai labai svarbūs vertinant kremų, tepalų bei gelių pritaikomumą, norint nustatyti koks bus pojūtis, kai gaminys padengs odą, ar gaminys bus takus ir ar galės tinkamai pasidengti [90]. Vienas iš klampumą keičiančių veiksnių yra temperatūra [91], todėl reologinės savybės vertintos naudojant skirtingus temperatūrinius režimus – 20 °C, 32 °C ir 37 °C. Naudotas *power law slope* matematinis modelis ( $R^2$  svyravo nuo 0,9104 iki 0,9978). Šis modelis yra vienas iš dažniausių modelių, taikomų tiriant farmacines formuluotes [92]. Pritaikius šį modelį nustatytas konsistensijos koeficientas ( $K, Pa \cdot s^n$ ) bei tėkmės indeksas ( $n$ ), kuris yra rodiklis parodantis nuokrypį nuo niutoninių skysčių savybių. Kai  $n < 1$ , medžiagos, kuri veikiama jėga (šlyties greičiu), klampa mažėja, jei  $n > 1$ , klampa didėja ir sistema laikoma kietėjančia. Šio tyrimo metu visų sistemų klampa veikiant jėgai mažėjo,  $n$  nebuvo didesnis už 1, ir svyravo nuo  $0,087 \pm 0,0029$  iki  $0,674 \pm 0,0024$ . Tepalų reologinių parametų reikšmės pateiktos 5 lentelėje.

5 lentelė. Tepalų reologiniai parametrai

Tepalo nr.	20 °C		32 °C		37 °C	
	K, Pa·s <sup>n</sup>	n	K, Pa·s <sup>n</sup>	n	K, Pa·s <sup>n</sup>	n
<b>T-1</b>	164,15±0,41	0,143±0,0028	88,16±0,18	0,156±0,0019	72,87±0,23	0,237±0,0015
<b>T-2</b>	148,09±0,34	0,132±0,0015	87,67±0,16	0,154±0,0031	64,95±0,15	0,195±0,0027
<b>T-3</b>	157,05±0,22	0,121±0,0031	88,56±0,25	0,123±0,0024	70,45±0,19	0,142±0,0029
<b>T-4</b>	204,6±0,48	0,105±0,0019	97,15±0,31	0,094±0,0011	74,69±0,24	0,175±0,0017

<b>T-5</b>	196,36±0,39	0,087± 0,0029	94,35±0,15	0,106± 0,0029	70,36±0,18	0,169± 0,0029
<b>T-6</b>	161,69±0,21	0,091± 0,0031	90,31±0,25	0,101± 0,0014	70,08±0,25	0,123± 0,0018
<b>T-7</b>	61,63±0,37	0,315± 0,0036	49,62±0,19	0,385± 0,0018	38,24±0,14	0,542± 0,0022
<b>T-8</b>	60,25±0,41	0,482± 0,0018	51,47±0,17	0,312± 0,0014	37,54±0,09	0,674± 0,0024
<b>T-9</b>	61,23±0,35	0,406± 0,0024	49,45±0,20	0,435± 0,0018	36,01±0,11	0,531± 0,0011

Tyrimo metu, kaip ir aprašoma literatūroje [95], nustatyta, jog visų tirtų tepalų K reikšmė mažėjo didėjant temperatūrai, o n reikšmė didėjo ir artėjo link 1. Didžiausios K reikšmės visų temperatūrų režimuose nustatytos T-4 formuluotėje, kurios kompoziciją sudarė vazelinas, 2 % tiršto propolio ekstrakto bei emulsiklis lanolinas. Kadangi atpalaiduotų junginių kiekis didėjant klampai mažėja, daroma prielaida, jog iš šios sistemos atpalaiduotų junginių kiekis gali būti nedidelis [10]. Visos formuluotės, kuriose buvo įterptas lanolinas, pasižymėjo aukštesne K reikšme, lyginant su atitinkamomis kompozicijomis, kurių sudėtyje nėra lanolino. Nustatytas statistiškai reikšmingas K reikšmių skirtumas tarp tepalų be lanolino (T-1, T-2, T-3) ir tepalų su lanolinu (T-4, T-5, T-6) esant 32 °C temperatūrai ( $p < 0,05$ ). Taip pat, lyginant šiuos tepalus, nustatytas statistiškai reikšmingas n skirtumas esant 20 °C ir 32 °C temperatūroms. Tokie rezultatų skirtumai galėjo atsirasti dėl didelės lanolino klamos, ir panaudojus šį komponentą statistiškai reikšmingai galėjo padidėti visos formuluotės klampa [64]. Statistiškai reikšmingai ( $p < 0,05$ ) visų temperatūrų režimuose tiek pagal K, tiek pagal n reikšmę nuo kitų tepalų skyrėsi T-7, T-8, T-9 tepalai, kurių pagrindai pagaminti iš saulėgrąžų aliejaus ir bičių vaško. Didžiausia K reikšmė šio tipo tepaluose nustatyta T-7 sistemoje, esant 20 °C temperatūrai ( $44,12 \pm 0,21 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ ), o mažiausia K reikšmė nustatyta T-8 sistemoje, esant 37 °C temperatūrai ( $21,12 \pm 0,25 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ ). Lyginant su kitų sudėčių tepalais, šiose sistemose reikšmingai didesnė buvo ir n reikšmė, tačiau ji visada buvo mažesnė už 1, todėl visos devynios tepalų sistemos pasižymi pseudoplastinių medžiagų savybėmis [94, 95].

Buvo įvertintos ir kremų bei gelio reologinės savybės. Šių sistemų reologinių parametrų duomenys pateikti 6 lentelėje.

6 lentelė. Kremų ir gelio reologiniai parametrai

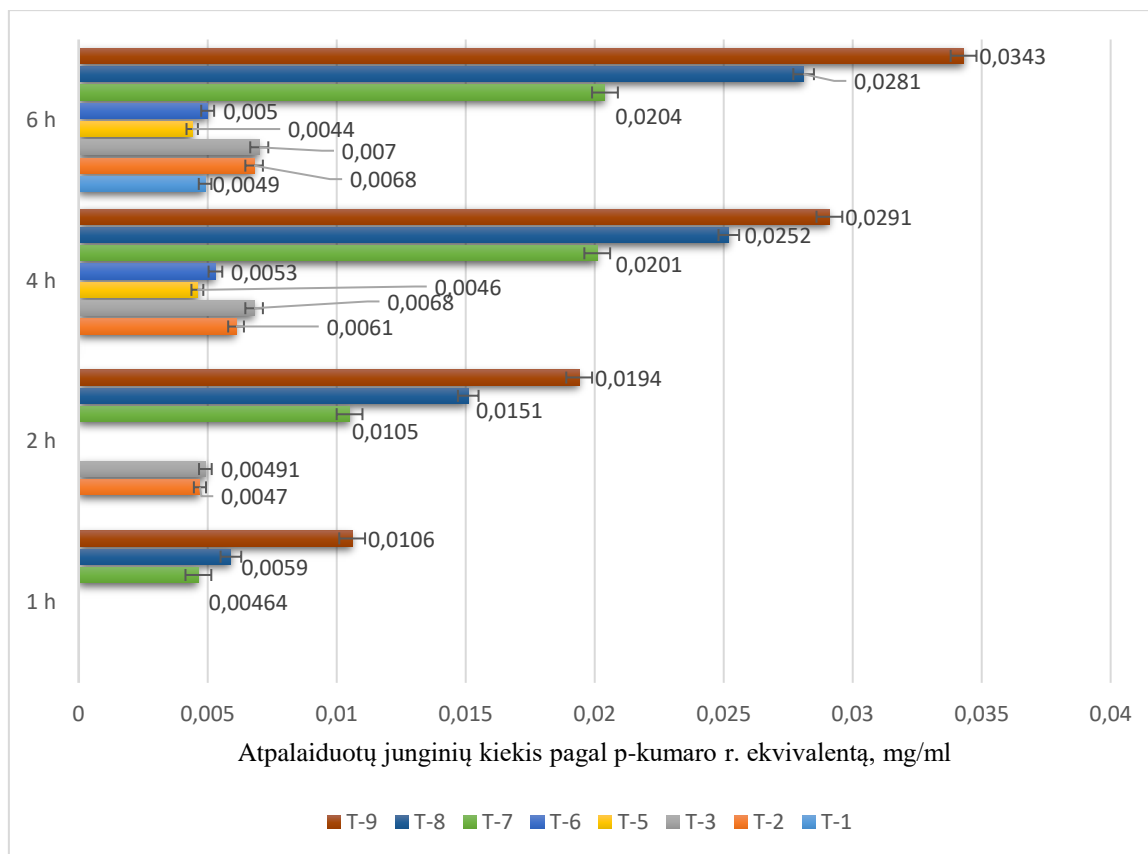
Kremo nr.	20 °C		32 °C		37 °C	
	K, Pa·s <sup>n</sup>	n	K, Pa·s <sup>n</sup>	n	K, Pa·s <sup>n</sup>	n
<b>K-2</b>	145,36±0,22	0,105± 0,0031	95,23±0,17	0,193± 0,0035	67,76±0,17	0,195± 0,0015
<b>K-4</b>	84,97±0,21	0,191± 0,0011	69,75±0,17	0,163± 0,0031	55,12±0,07	0,197± 0,0015
<b>K-5</b>	90,14±0,16	0,180± 0,0025	68,95±0,24	0,182± 0,0017	50,30± 0,11	0,191± 0,0029
<b>K-6</b>	89,21±0,14	0,185± 0,0017	69,14±0,24	0,184± 0,0009	52,54±0,08	0,192± 0,0015
<b>K-7</b>	74,12±0,21	0,195± 0,0032	58,91±0,11 2	0,193± 0,0024	42,23±0,14	0,204± 0,0017
<b>K-8</b>	70,62±0,18	0,212± 0,0034	57,38±0,17	0,214± 0,0014	44,12±0,25	0,227± 0,0014
<b>K-9</b>	73,56±0,22	0,189± 0,0025	55,54±0,25	0,196± 0,0035	43,14±0,16	0,201± 0,0031
<b>G-1</b>	91,52±0,35	0,168± 0,0218	79,62±0,29	0,181± 0,0021	52,13±0,17	0,187± 0,0034

Didžiausia K reikšmė nustatyta K-2 sistemoje, todėl daroma prielaida, jog junginių atpalaidavimo rezultatai, lyginant su kitų kremų sistemomis, iš šios sistemos bus blogiausi [10]. Mažiausia klampa nustatyta K-7 sistemoje (42,23±0,14 Pa·s<sup>n</sup>), esant 37 °C temperatūrai. Gelio klampos koeficientas

nustatytas panašus kaip ir K-5 sistemoje. Statistiškai reikšmingai mažesnės K reikšmės visų trijų temperatūrų režimuose ( $p < 0,05$ ) buvo nustatytos K-7–K-9 sistemose, lyginant su K-4–K-6 kremais.

### 3.2.3. Veikliųjų junginių iš tepalų atpalaidavimas *in vitro* ir jų kiekio nustatymas spektrofotometrijos metodu

Atliekant fenolinių junginių atpalaidavimo eksperimentą *in vitro*, atpalaiduotų junginių kiekis matuotas 1-ąją, 2-ąją, 4-ąją ir 6-ąją valandą. Atpalaidavimo rezultatai iš tepalų sistemų nurodyti 10 pav.



10 pav. Bendras atpalaiduotų fenolinių junginių kiekis iš tepalų su propolio ekstraktu

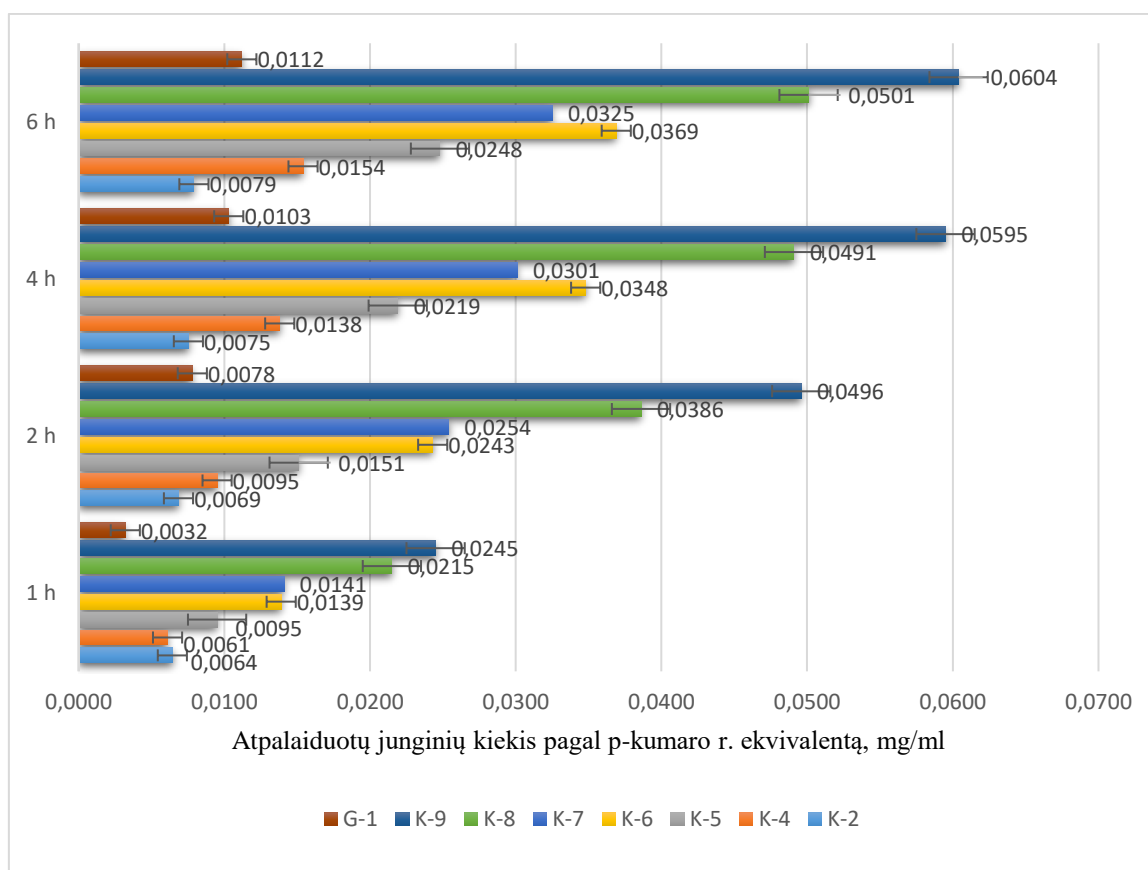
Atlikus bendrą fenolinių junginių kiekio matavimą nustatyta, jog per 1-ąją valandą fenolinių junginių atpalaidavimas vyko iš sistemų, kurių pagrindas buvo sudarytas iš saulėgrąžų aliejaus ir bičių vaško. Iš T-7 sistemos atpalaiduota  $7,28 \pm 1,21$  % visų fenolinių junginių kiekio, iš T-8 sistemos nustatyta  $6,23 \pm 0,93$  % atpalaiduotų fenolinių junginių, o iš T-9 sistemos atpalaiduota  $8,39 \pm 1,15$  % visų fenolinių junginių kiekio iš įterpto tirštojo propolio ekstrakto. Iš visų likusių sistemų, kurių pagrindą sudarė vazelinai arba vazelinai ir lanolinas, per 1-ąją valandą atpalaiduotų fenolinių junginių nebuvo nustatyta. Atlikus atpalaiduotų junginių kiekio matavimus po 2-jų valandų nustatyta, jog didžiausias atpalaiduotų junginių kiekio augimas nustatytas iš T-7 sistemos, iš kurios atsipalaidavo  $16,62 \pm 0,06$  % fenolinių junginių, iš T-8 sistemos atpalaiduota  $15,93 \pm 1,34$  % tepale buvusių fenolinių junginių,

iš T-9 sistemos atpalaiduota  $15,35 \pm 1,52$  % junginių. Po 2-jų valandų nustatytas atpalaidavimas ir iš T-2 sistemos, atpalaiduota  $4,96 \pm 0,88$  % junginių, bei iš T-3 sistemos, atpalaiduota  $3,88 \pm 0,97$  % viso fenolinių junginių kiekio. Iš T-1, T-4, T-5 bei T-6 formuluočių fenolinių junginių atpalaidavimas po 2-jų valandų neįvyko. Tiriant fenolinių junginių atpalaidavimą po 4-rių valandų, daugiausiai išaugęs atpalaiduotų junginių kiekis buvo iš T-9 sistemos, ir siekė jau  $23,03 \pm 1,2$  %. Iš T-8 sistemos atpalaiduota  $26,59 \pm 1,63$  % visų įterptų fenolinių junginių kiekio, o iš T-7 sistemos atpalaiduota  $31,82 \pm 0,84$  % fenolinių junginių. Iš T-2 bei T-3 sistemų atpalaiduotų fenolinių junginių kiekis taip pat padidėjęs, atitinkamai nustatyta  $6,44 \pm 1,01$  % bei  $5,38 \pm 1,06$  % fenolinių junginių. Po 4-ių valandų pirmą kartą nustatytas junginių atpalaidavimas iš T-5 sistemos, atpalaiduota  $4,85 \pm 1,14$  % visų fenolinių junginių, ir iš T-6 sistemos, atpalaiduota  $4,19 \pm 0,62$  % junginių. Iš T-1 ir T-4 sistemų atpalaiduotų junginių nustatyta vis dar nebuvo. Atlikus matavimus po 6-ių valandų tam tikri atpalaiduotų junginių kiekiai nustatyti visose sistemose, išskyrus T-4. Didžiausias nustatytas atpalaiduotų junginių kiekis vėl buvo nustatytas iš T-9 sistemos, ir šis kiekis sudarė  $26,36 \pm 0,92$  % visų įterptų fenolinių junginių kiekio. Iš T-8 sistemos iš viso atpalaiduota  $29,65 \pm 1,41$  % bendro fenolinių junginių kiekio, o iš T-7 sistemos –  $32,29 \pm 1,25$  % įterptų junginių kiekio. Iš T-2 sistemos atpalaiduotų fenolinių junginių kiekis siekė  $7,18 \pm 0,84$  %, iš T-3 formulotės atpalaiduotų junginių kiekis padidėjo iki  $5,54 \pm 0,45$  %. Po 6-ių valandų pirmą kartą nustatytas fenolinių junginių atpalaidavimas ir iš T-1 sistemos, junginių kiekis buvo  $3,96 \pm 1,21$  %. Iš T-4 sistemos atpalaiduotų fenolinių junginių kiekis taip ir nenustatytas, o iš T-5 ir T-6 sistemų atpalaiduotas junginių kiekis stebėtas netgi sumažėjęs, atitinkamai po 6-ių valandų atpalaiduotų junginių kiekis buvo jau tik  $4,64 \pm 0,81$  % ir  $3,96 \pm 0,73$  %. Tokie veikliųjų junginių atpalaidavimo rezultatai gali būti tiesiogiai siejami su nustatyta tepalų klampa, kurios didelės reikšmės yra viena iš problemų modeliuojant tepalus [96]. T-1–T-6 formulotėse nustatyta aukšta klampos koeficiento reikšmė, o būtent lėtas medžiagų judėjimas sistemoje dėl aukštos klampos gali būti veiksnys lemiantis maža atpalaiduotų medžiagų kiekį iš tokių vaisto formų [10, 98]. T-7–T-9 tepalų klampos koeficientai nustatyti reikšmingai mažesni, lyginant su kitomis tepalų sistemomis, o fenolinių junginių atpalaidavimo rezultatai nustatyti geriausi ir statistiškai reikšmingai didesni ( $p < 0,05$ ). Taip pat šiuose tepaluose nustatyta ir aukšta koreliacija tarp įterpto propolio ekstrakto kiekio ir atsipalaidavusių fenolinių junginių kiekio ( $r = 0,99$ ). Lanolinas, kurio didelis klampos koeficientas lėmė visos sistemos klampos padidėjimą, statistiškai reikšmingai ( $p < 0,05$ ) sumažino ir atpalaiduojamų fenolinių junginių kiekį. T-1–T-6 sistemų pagrindai yra vandenyje netirpūs, o klampa labai didelė, todėl akceptorinės terpės vanduo negali tirpdyti vaisto pagrindo, molekulėms sunku judėti vaisto formoje [97]. Nors T-7–T-9 pagrindai taip pat nėra hidrofiliniai, mažesnė klampa molekulėms leidžia salyginai geriau judėti visoje sistemoje, ir tai gali lemti geresnį veikliųjų medžiagų atpalaidavimą *in vitro*. Tokie tyrimo

rezultatai patvirtina tai, jog pasirinktas pagrindas daro didelę įtaką veikliųjų medžiagų atpalaidavimui [49].

### 3.2.4. Veikliųjų junginių iš kremų ir gelio atpalaidavimas *in vitro* ir jų kiekio nustatymas spektrofotometrijos metodu

Iš kremų bei gelio sistemų, taip pat kaip ir iš tepalų, atliktas bendro fenolinių junginių kiekio atpalaidavimo *in vitro* tyrimas. Šio tyrimo rezultatai pateikti 11 pav.



11 pav. Bendras atpalaiduotų fenolinių junginių kiekis iš kremų ir gelio su propolio ekstraktu

Atlikus matavimus jau po 1-osios valandos iš visų tirtų kremų bei gelio buvo nustatyti atpalaiduoti fenoliniai junginiai. Daugiausiai fenolinių junginių atpalaiduota iš K-9 sistemos, atpalaiduotas kiekis sudarė  $19,39 \pm 1,14$  % visų į kremą įterptų fenolinių junginių kiekio. Iš K-7 bei K-8 sistemų nustatyta mažesnė atpalaiduotų fenolinių junginių koncentracija nei iš K-9 kremo, tačiau šiose sistemose bendro atpalaiduoto fenolinių junginių kiekio išraiška procentais nustatyta šiek tiek didesnė, atitinkamai  $22,32 \pm 0,84$  % ir  $22,69 \pm 0,73$  %. Atpalaiduotų fenolinių junginių kiekis iš K-4, K-5, K-6 sistemų priklausė nuo įterpto propolio kiekio, atitinkamai šiose sistemose nustatyta  $9,66 \pm 1,25$  %,  $10,03 \pm 0,94$  % bei  $11,0 \pm 1,36$  % atpalaiduotų fenolinių junginių. Iš K-2 sistemos nustatytas mažiausias procentinis kiekis atpalaiduotų junginių –  $6,75 \pm 0,92$  %. Iš gelio nustatyta mažesnė bendro fenolinių junginių kiekio koncentracija, lyginant su kremais, tačiau procentinis atpalaiduotų junginių kiekis

buvo didžiausias –  $28,20 \pm 1,93$  %. Po 2-jų valandų daugiausiai junginių atpalaiduota iš K-9 sistemos, šis kiekis sudarė  $39,26 \pm 0,65$  % fenolinių junginių. Mažesnė junginių koncentracija nustatyta iš G-1 sistemos, tačiau šis kiekis po 2-os valandos sudarė jau net  $68,75 \pm 1,22$  % bendro fenolinių junginių kiekio buvusio etanoliniame propolio ekstrakto. Iš K-2 sistemos po 2-jų valandų nustatyta mažiausia koncentracija ir mažiausias procentinis kiekis atpalaiduotų junginių, kuris buvo lygus  $7,28 \pm 0,98$  %. Iš K-4, K-5, K-6 sistemų atpalaiduotų fenolinių junginių kiekis atitinkamai sudarė  $15,03 \pm 0,78$  %,  $15,93 \pm 0,94$  % ir  $19,23 \pm 1,12$  %. Iš K-7 bei K-8 sistemų atpalaiduotų junginių procentinis kiekis buvo šiek tiek didesnis nei iš K-9 sistemos, atitinkamai  $40,21 \pm 0,84$  % ir  $40,73 \pm 0,72$  %, tačiau skirtumas tarp iš šių sistemų atpalaiduotų junginių kiekio statistiškai nebuvo reikšmingas ( $p > 0,05$ ). Po 4-rių valandų didžiausia atpalaiduota koncentracija vėlgi buvo nustatyta iš K-9 sistemos, kiekis sudarė  $47,09 \pm 0,65$  % fenolinių junginių kiekio. Iš K-8 sistemos atpalaiduotas procentinis fenolinių junginių kiekis buvo šiek tiek didesnis –  $51,85 \pm 1,21$  %, iš K-7 atpalaiduota  $47,65 \pm 1,24$  % fenolinių junginių. Iš K-2 kremo nustatyta tiek mažiausia fenolinių junginių koncentracija, tiek mažiausias jų procentinis kiekis –  $7,91 \pm 0,92$  %. Iš K-4, K-5, K-6 sistemų tiek atpalaiduotų junginių koncentracija, tiek procentinis atpalaiduotų fenolinių junginių kiekis tiesiogiai priklausė nuo įterpto propolio kiekio ir atitinkamai sudarė  $21,84 \pm 0,54$  %,  $23,11 \pm 0,83$  %,  $27,54 \pm 1,14$  %. Iš gelio sistemos atpalaiduotų junginių kiekis išaugo daugiausiai ir pasiekė  $90,78 \pm 0,69$  %. Atlikus paskutinius matavimus po 6-ių valandų nustatyta, jog junginių atpalaidavimo augimo greitis, lyginant su kitais matavimais, sumažėjo. Iš K-9 sistemos nustatyta  $47,80 \pm 0,84$  %, iš K-7 –  $51,45 \pm 0,92$  %, iš K-8 –  $52,87 \pm 1,12$  % sistemose buvusio bendro fenolinių junginių kiekio. Koreliacija tarp įterpto junginių kiekio ir atpalaiduotų junginių kiekio koncentracijų nustatyta stipri ( $r=0,99$ ). K-4, K-5, K-6 sistemose atpalaidavimo augimas buvo tolygus ir ištirpusių junginių priklausomybė nuo įterpto jų kiekio taip pat reikšminga ( $r=0,99$ ). Procentinės atpalaiduoto bendro fenolinių junginių kiekio išraiškos atitinkamai šiose sistemose išsidėstė taip:  $24,38 \pm 1,14$  %,  $26,17 \pm 0,98$  %,  $29,21 \pm 0,84$  %. Tiek atpalaiduotų junginių koncentracija, tiek augimo greitis K-2 sistemoje, kurios klampos koeficientas didžiausias iš visų kremų, nustatyti mažiausi. Procentinis atpalaiduotų junginių kiekis tyrimo pabaigoje iš šios sistemos buvo mažiausias –  $8,34 \pm 0,64$  %. Iš G-1 sistemos po 6-ių valandų nustatytas itin didelis kiekis atpalaiduotų fenolinių junginių –  $98,72 \pm 0,52$  %.

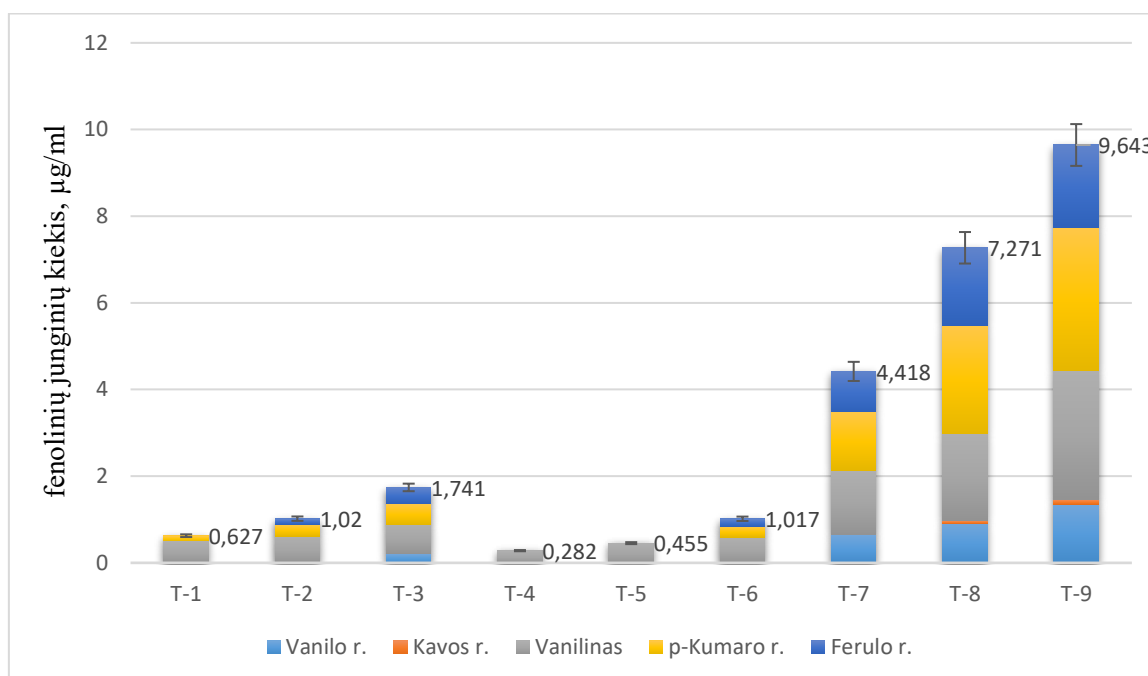
Tokie eksperimento rezultatai patvirtina mokslininkų teiginius, jog vandenyje tirpūs junginiai į vandeninę akceptorinę terpę pro pusiau pralaidžią membraną geriausiai atpalaiduojami iš hidrofiliinio pagrindo sistemų, tad tokios sistemos kaip hidrogeliai pasižymi puikiais junginių atpalaidavimo rezultatais *in vitro* [45, 10]. Tai gali būti grindžiama tuo, jog vanduo laisvai difunduoja pro membraną ir pasiekęs pusiau kietą vaisto formą ją tirpdo, taip veikliosios medžiagos iš donorinės terpės sparčiai difunduoja į akceptorinę. Tai, jog atpalaidavimas *in vitro* geresnis iš hidrofiliųjų gelių sistemų nei iš

krema ar tepalo formuluočės parodo ir kito tyrimo rezultatai: metronizadolas efektyviau buvo atpalaiduojamas iš gelio nei iš krema [98]. Literatūroje nurodoma, jog didėjant gelifikuojančių medžiagų kiekiui, veikliųjų medžiagų iš propolio atpalaidavimas mažėja [99], tad toks didelis atpalaiduotų medžiagų kiekis iš G-1 sistemos galėjo būti nustatytas ir dėl naudoto mažo karbomero kiekio (0,5 %).

Junginių atpalaidavimas iš kremų, kaip ir iš tepalų, priklausė nuo reologinių parametru. Statistiškai reikšmingai didesnis ( $p < 0,05$ ) atpalaiduotas bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas iš K-7, K-8, K-9 sistemų, kurių klampa buvo mažesnė nei K-4, K-5, K-6 kremų. Nors klampa statistiškai reikšmingai mažesnė tepalų T-8, T-8, T-9 sistemose nei kremų K-7, K-8, K-9 farmacinėse formose, didesnis fenolinių junginių kiekis nustatytas pastarosiose. Toks efektas sietinas su jau aprašyta prielaida dėl geresnės vandenyje tirpių junginių skvarbos iš hidrofiliškesnių pagrindu. Tai, jog klamos rodiklių lyginamas yra pagrįstesnis tik tarp tos pačios rūšies pusiau kietų vaisto formų įrodo ir kito tyrimo rezultatai [100]. Šiame tyrime aprašoma, jog nepaisant aukštesnės gelio klamos, iš jo buvo atpalaiduota daugiau veikliųjų medžiagų nei iš mažesnės klamos kremų sistemų.

### 3.2.5. Veikliųjų junginių iš tepalų atpalaidavimas *in vitro* ir jų kiekio nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu

ESC metodu nustatyti atpalaiduoti fenolinių rūgščių bei vanilino kiekiai iš tepalų sistemų. Šie kiekiai nurodyti 12 pav.



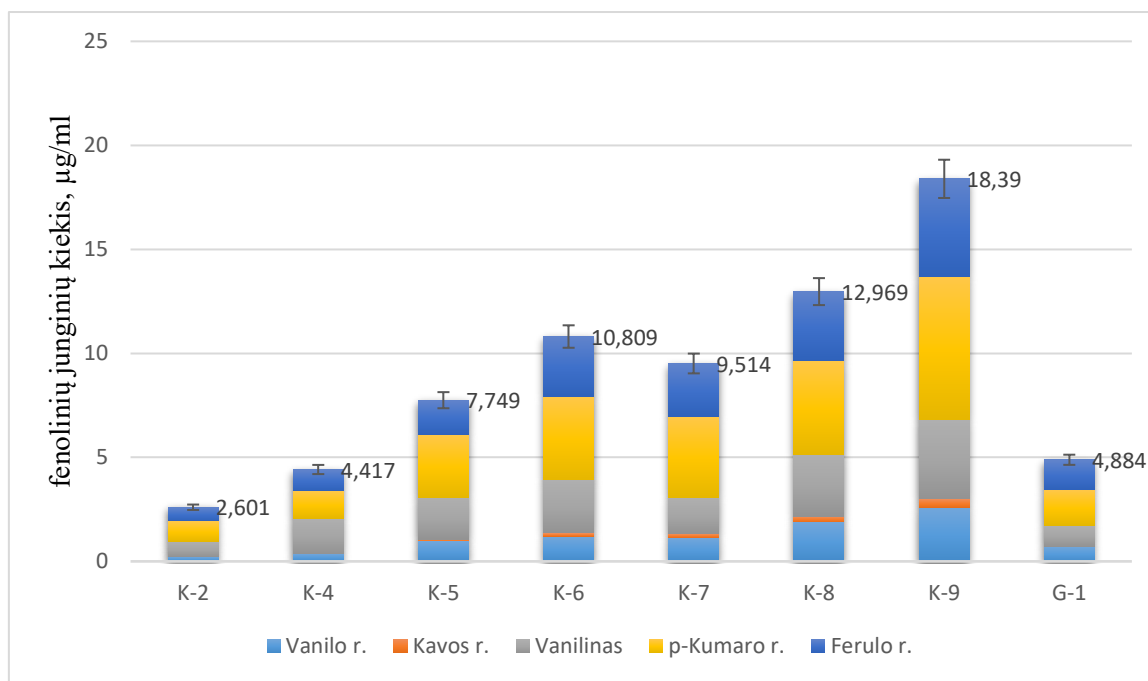
12 pav. Fenolinių rūgščių ir vanilino atpalaidavimas iš tepalų po 6 val.



Kaip ir spektrofotometrijos būdu, taip ir ESC metodu nustatyti rezultatai rodo, jog geriausiai atpalaidavimas vyko iš T-7–T-9 sistemų. Mažiausiai atpalaiduotų medžiagų nustatyta iš didžiausią klampos koeficiento įvertį turinčių T-4–T-6 tepalų. Iš T-1 sistemos atpalaiduota  $8,27 \pm 0,64$  % tirštajame ekstrakto buvusio vanilino ir  $1,09 \pm 0,34$  % p-kumaro rūgštis. Iš T-2 ir T-3 tepalų atitinkamai atpalaiduota  $6,75 \pm 0,52$  % ir  $5,50 \pm 0,83$  % vanilino,  $1,66 \pm 0,24$  % ir  $2,18 \pm 0,35$  % p-kumaro rūgštis, skirtingai nei iš T-1 sistemos, atpalaiduota dar ir  $0,99 \pm 0,19$  % ir  $2,18 \pm 0,32$  % ferulo rūgštis, taip pat iš T-3 sistemos atpalaiduota ir  $2,60 \pm 0,51$  % vanilo rūgštis. Iš T-4 ir T-5 sistemų atpalaiduotas buvo tik vanilinas, jo kiekiai sistemose atitinkamai lygūs  $4,62 \pm 0,67$  % ir  $4,97 \pm 1,01$  %. Iš T-6 sistemos nustatyta  $4,89 \pm 0,98$  % vanilino, ir skirtingai nei T-4 ir T-5 sistemose, nustatyta ir  $1,13 \pm 1,14$  % p-kumaro ir  $1,0 \pm 0,39$  % ferulo rūgštis. Iš T-7, T-8, ir T-9 sistemų nustatytas statistiškai reikšmingas didesnis atpalaiduotas junginių kiekis nei kitose tepalų sistemose ( $p < 0,05$ ). Iš T-7, T-8 ir T-9 sistemų atitinkamai nustatyta  $15,86 \pm 0,24$  %,  $14,93 \pm 0,51$  %,  $16,65 \pm 0,32$  % vanilo rūgštis,  $24,48 \pm 0,25$  %,  $21,86 \pm 0,87$  %,  $24,36 \pm 0,65$  % vanilino,  $12,02 \pm 0,87$  %,  $14,90 \pm 0,54$  % ir  $14,76 \pm 0,57$  % p-kumaro rūgštis,  $8,75 \pm 0,87$  %,  $12,66 \pm 0,97$  % ir  $11,33 \pm 0,63$  % ferulo rūgštis, o taip pat iš vienintelių T-8, ir T-9 tepalų nustatyta ir nedideli atpalaiduotos kavos rūgštis kiekiai, atitinkamai šie kiekiai lygūs  $7,42 \pm 0,47$  % ir  $9,33 \pm 0,38$  %. Vienas iš atpalaidavimą lemiančių veiksnių yra medžiagų molekulinė masė. Nustatyta, jog mažesnės molekulinės masės molekulės difunduoja greičiau [101], kadangi vanilino masė yra mažiausia –  $152,15$  g/mol, [102] lyginant su visais kitais junginiais (kavos r. –  $180,16$  g/mol [103], p-kumaro r. –  $164,05$  g/mol [104], ferulo r. –  $194,18$  g/mol [105], vanilo r. –  $168,14$  g/mol [106]), tai galėjo būti vienas iš lemiančių veiksnių, jog iš klampiausių T-1–T-6 sistemų vanilinas tepalų sluoksniuose galėjo judėti lengviau. Taip pat hidrofilinės ir sąlyginai lipofilinės medžiagos į hidrofilinę akceptorinę terpę juda greičiau [10], todėl vanilinas, kurio kiekis sistemose didelis, o n-oktanolio/vandens pasiskirstymo koeficiento (logP) reikšmė yra viena žemiausių –  $1,37$  [104], galėjo patekti į akceptorinę terpę greičiau nei didesnes logP reikšmes turintys junginiai [67]. Palyginimui, kitų junginių logP reikšmės: vanilo rūgštis –  $1,43$  [108], ferulo rūgštis –  $1,51$  [105], kavos rūgštis –  $1,15$  [103], p-kumaro rūgštis –  $1,79$  [106]. Tepalų sistemų T-7, T-8, T-9 klampa buvo reikšmingai mažesnė, todėl efektyviau atpalaiduoti ir visi fenoliniai junginiai. Nustatant procentinius atpalaiduotų junginių kiekius iš šių sistemų, kaip ir iš T-1–T-6 tepalų, daugiausiai nustatyta atpalaiduoto vanilino. Pabrėžtina ir tai, jog T-8, ir T-9 koncentracija buvus pakankama tam, kad būtų atpalaiduota itin mažais kiekiais propolyje nustatyta kavos rūgštis.

### 3.2.6. Veikliųjų junginių iš kremų ir gelio atpalaidavimas *in vitro* ir jų kiekio nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu

ESC metodu nustatyti ir atpalaiduotų junginių kiekiai iš kremų bei gelio sistemos, gauti rezultatai pateiki 13 pav.



13 pav. Fenolinių rūgščių ir vanilino atpalaidavimas iš kremų ir gelio po 6 val.

Geriausiai atpalaidavimas vyko iš K-9 sistemos, iš jos atpalaiduota  $31,67 \pm 1,21$  % ekstrakto buvusios vanilo rūgšties,  $35,10 \pm 0,98$  % kavos rūgšties,  $31,27 \pm 1,14$  % vanilino,  $30,66 \pm 0,98$  % p-kumaro rūgšties ir  $28,11 \pm 0,57$  % ferulo rūgšties. Iš K-7 ir K-8 kremų atpalaiduotų junginių kiekis taip pat sudarė apie 30 %, atitinkamai šiose sistemose nustatyta  $28,07 \pm 0,94$  % ir  $31,02 \pm 0,78$  % vanilo rūgšties,  $31,26 \pm 0,97$  % ir  $31,21 \pm 1,11$  % kavos rūgšties,  $28,58 \pm 0,57$  % ir  $32,24 \pm 0,94$  % vanilino,  $34,87 \pm 0,68$  % ir  $26,88 \pm 0,97$  % p-kumaro rūgšties,  $30,28 \pm 0,87$  % ir  $26,49 \pm 0,78$  % ferulo rūgšties. Iš v/a K-4–K-6 sistemų, atpalaidavimas buvo blogesnis nei iš daugiau hidrofilino pagrindo turinčių K-7–K-9 sistemų, ir tokie rezultatai sutampa su kito tyrimo duomenimis [107]. Šiame tyrime [107] taip pat nustatytas a/v kremų pranašumas atpalaiduojant junginius *in vitro*. Iš K-4–K-6 sistemų atitinkamai nustatyta  $9,68 \pm 0,99$  %,  $16,08 \pm 0,84$  %,  $19,68 \pm 1,14$  % atpalaiduotos vanilo rūgšties,  $27,42 \pm 1,16$  %,  $21,93 \pm 0,98$  %,  $21,08 \pm 0,95$  % vanilino,  $11,82 \pm 0,87$  %,  $18,0 \pm 0,87$  % bei  $17,85 \pm 0,85$  % p-kumaro rūgšties,  $12,26 \pm 0,57$  %,  $13,18 \pm 1,01$  % ir  $17,19 \pm 0,82$  % ferulo rūgšties. Atpalaiduota kavos rūgštis nustatyta tik iš K-5 ir K-6 sistemų, šios rūgšties kiekis atitinkamai buvo  $9,27 \pm 0,67$  % ir  $13,26 \pm 0,53$  %. Iš K-2 sistemos nustatyti mažiausi atpalaiduotų junginių kiekiai:  $3,98 \pm 0,48$  % vanilino rūgšties,  $7,80 \pm 0,97$  % vanilino,  $5,87 \pm 0,84$  % p-kumaro rūgšties ir  $5,25 \pm 0,87$  % ferulo rūgšties.

Kadangi akceptorinės terpė pateko į gelio sistemą ir ją tirpdė [10], kaip ir matuojant spektrofotometru, nustatyti itin geri junginių atpalaidavimo rezultatai. Iš gelio atpalaiduota  $97,86 \pm 0,41$  % vanilo rūgšties,  $96,89 \pm 0,54$  % vanilino,  $97,19 \pm 0,48$  % p-kumaro rūgšties ir  $99,41 \pm 0,69$  % ferulo rūgšties.

### **3.3. Fenolinių junginių iš pusiau kietų vaisto formų su propolio ekstraktais skvarba į odą *ex vivo***

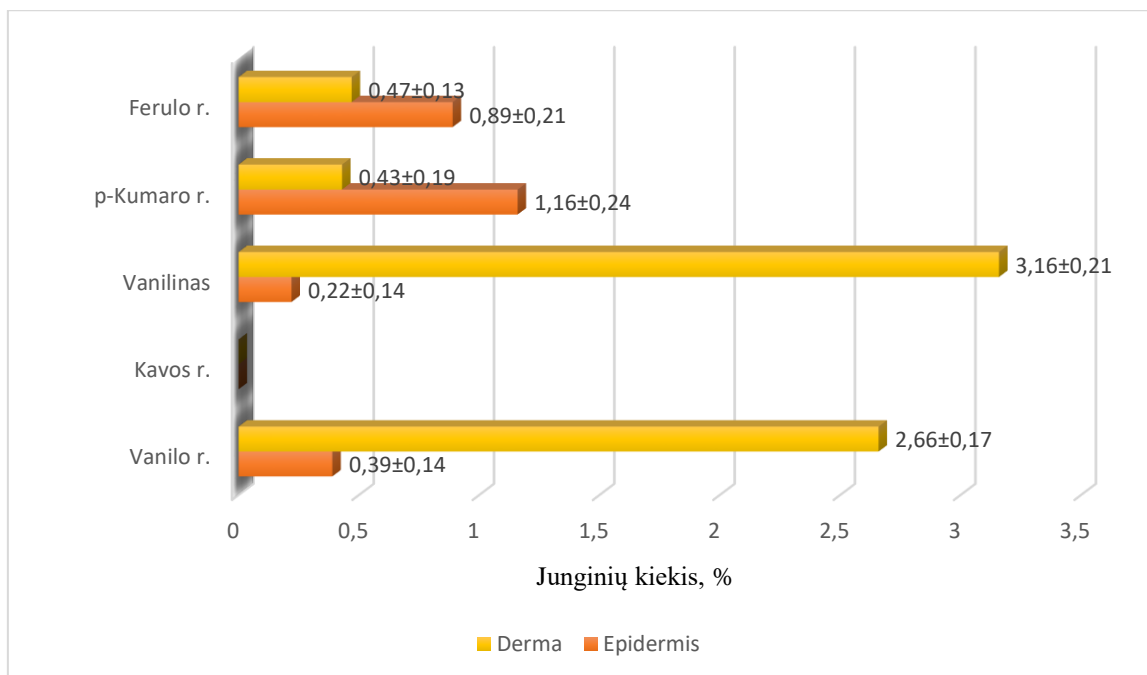
Atlikus fenolinių junginių atpalaidavimo tyrimus, atrinktos 4 formuluotės (T-9, K-6, K-9 ir G-1) iš kurių atpalaidavimas vyko geriausiai. Šios formuluotės buvo pasirinktos tolimesniems junginių skvarbos į odą *ex vivo* tyrimams. Nustatyta fenolinių junginių skvarba *ex vivo* į žmogaus odos epidermį bei dermą.

Atpalaidavimo tyrimai pro pusiau pralaidžią membraną parodė, jog iš hidrogelio sėkmingai atpalaiduoti visi fenoliniai junginiai išskyrus kavos rūgštį, visgi aprašoma, jog geri atpalaidavimo rezultatai *in vitro* dažnai nekoreliuoja su skvarbos į odą rezultatais [48] ir šiame tyrime fenolinių junginių skvarba į odą iš gelio išvis nebuvo nustatyta. Mažos molekulinės masės hidrofiliniai gelio komponentai lengvai difunduoja į hidrofilinę terpę, tačiau *ex vivo* tyrimo metu pirmiausia susidūriama ne su hidrofiliniu, o lipofiliniu odos sluoksniu [108]. Tai užkerta kelią hidrofilinėms medžiagoms judėti lengvai. Taip pat, nors gelio sudėtyje yra daug vandeninės fazės, o vanduo laikomas kaip vienas iš skvarbos skatintojų [10], visgi po šios fazės išgaravimo tam tikrų gelio komponentų higroskopinės savybės gali paskatinti raginio sluoksnio dehidratacijos procesą [109], o tai taip pat gali mažinti aktyviųjų medžiagų skvarbą. Nors modeliuojant gelį buvo panaudotas etanolis, kuris nėra naudingas odai, tačiau funkcionuoja kaip junginių skvarbos į odą skatintojas [49], visgi propolio koncentracija, net ir panaudojus etanolį nebuvo pakankama. Be to, išmatavus pH reikšmę, buvo nustatyta sąlyginai aukšta reikšmė, todėl gelyje esančios rūgštys tapę jonizuotomis ir dėl šios priežasties *ex vivo* tyrimo metu fenolinės rūgšties galėjo prarasti galimybę skverbtis į odą [110].

Iš visų kitų formuluočių fenoliniai junginiai sėkmingai skverbėsi į epidermį bei dermą.

Visose vaisto formuluotėse propolio koncentracija buvo ta pati (4 %), todėl tikslinga atpalaiduotų junginių kiekius diagramuose (žr. 14 pav., 15 pav., 16 pav.) pateikti išreikštus procentais. Nustatyta, jog vanilo rūgštis ir vanilinas dėl mažesnės šių molekulių logP reikšmės, kaip ir aprašoma kitame tyrime [67], linkę skverbtis gilyn į odą ir kauptis hidrofilinėje dermoje. Ferulo ir p-kumaro rūgštys, kurių logP reikšmės didesnės, yra sąlyginai labiau lipofilinės, tad ilgiau sulaikomos lipofiliniame epidermyje ir jų skvarba į gilesnius odos sluoksnius tampa ribota.

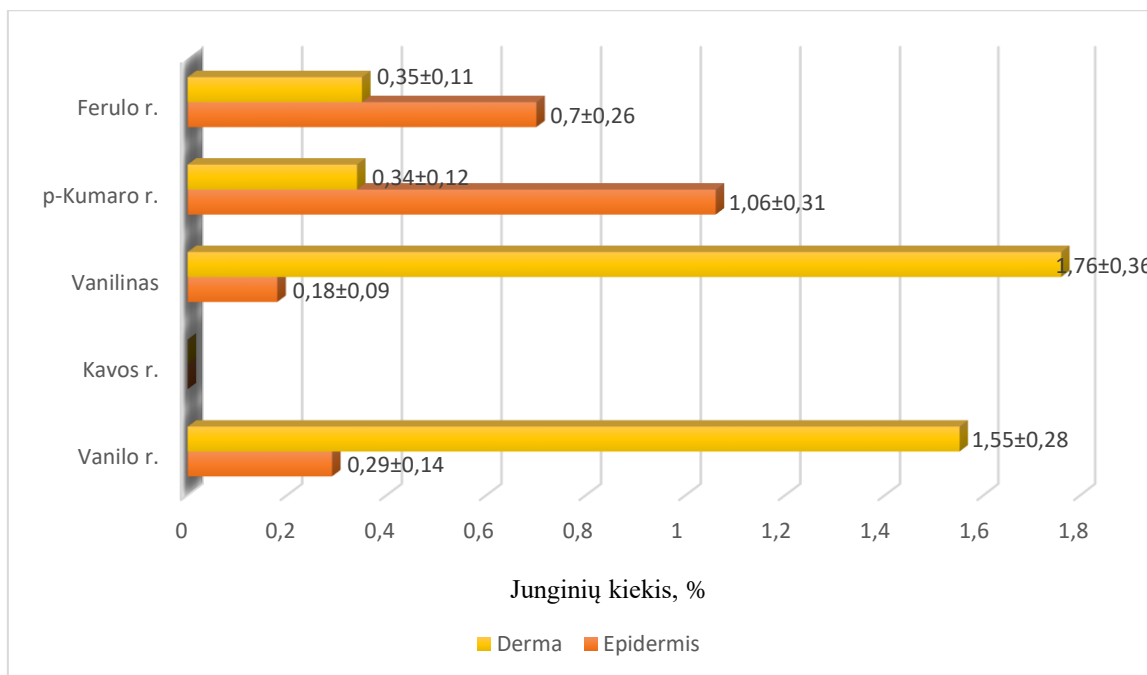
Geriausia visų fenolinių junginių skvarba *ex vivo* tyrime nustatyta iš T-9 sistemos (žr. 14 pav).



14 pav. Fenolinių junginių skvarba į odą iš T-9 sistemos

Iš šios sistemos ir ferulo, ir p-kumaro rūgšties kiekis dermoje buvo statistiškai reikšmingai didesnis ( $p < 0,05$ ) nei epidermyje. Bendrai dermoje ir epidermyje ferulo rūgšties nustatyta  $1,36 \pm 0,34$  %, o kumaro rūgšties  $1,59 \pm 0,43$  %. Vanilino ir vanilo rūgšties kiekis dermoje statistiškai reikšmingai didesnis ( $p < 0,05$ ) buvo nustatytas epidermyje. Vanilino kiekis bendrai visoje odoje siekė  $3,38 \pm 0,35$  %, o vanilo rūgšties  $3,05 \pm 0,31$  %. Sąlyginai didelis prasiskverbęs vanilino kiekis gali būti siejamas su nustatytu geru ir reikšmingai didesniu šio junginio atpalaidavimu iš šios sistemos. Iš viso epidermyje nustatyta  $0,77 \pm 0,12$  % propolyje buvusių fenolinių junginių, dermoje nustatyta  $1,25 \pm 0,12$  %, o bendras prasiskverbusių junginių kiekis buvo  $2,05 \pm 0,2$  %. Kavos rūgšties nei epidermyje, nei dermoje nustatyta nebuvo. Geriausi skvarbos rezultatai, lyginant su kitomis dvejomis sistemomis, iš T-9 sistemos galėjo būti sąlygojami tiek saulėgrąžų aliejuje, tiek bičių vaške esančių riebiųjų rūgščių, kurios literatūroje aprašomos kaip efektyvios veikliųjų junginių skvarbos skatintojos [111, 112].

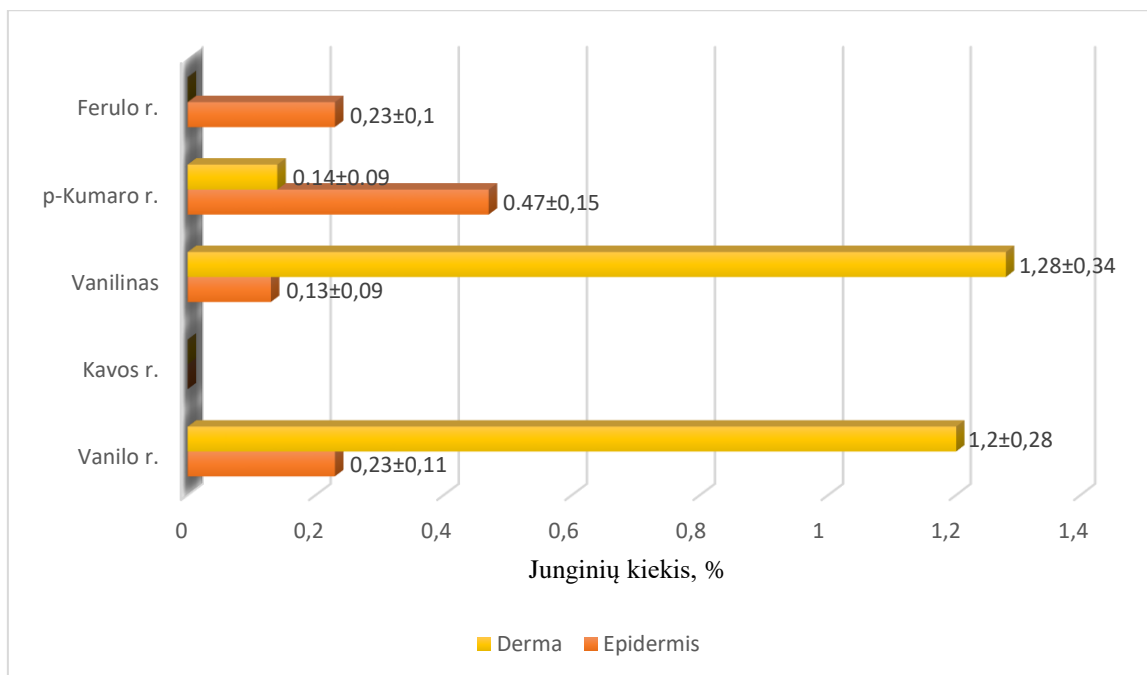
Junginių iš K-6 sistemos skvarbos į odą rezultatai parodė, jog tirti fenoliniai komponentai pagal prasiskverbusių kiekius išsidėstė ta pačia tvarka kaip ir T-9 sistemoje, tačiau visų junginių koncentracijos tiek epidermyje, tiek dermoje buvo mažesnės nei T-9 tepale (žr. 15 pav.).



15 pav. Fenolinių junginių skvarba į odą iš K-6 sistemos

Ferulo ir p-kumaro rūgščių kiekiai statistiškai reikšmingai ( $p < 0,05$ ) didesni buvo epidermyje nei dermoje. Iš K-6 sistemos prasiskverbusio ferulo rūgšties kiekis bendrai odoje sudarė  $1,06 \pm 0,37$  %, o p-kumaro rūgšties kiekis visoje odoje buvo  $1,4 \pm 0,43$  %. Vanilinas ir vanilo rūgštis dėl didesnio hidrofiliškumo, lyginant su kitais junginiais, taip pat kaip ir iš T-9 sistemos, buvo linkę kauptis epidermyje. Vanilo rūgšties kiekis bendrai visoje odoje siekė  $1,85 \pm 0,42$  %, o vanilino  $1,95 \pm 0,45$  %. Iš viso epidermyje nustatyta  $0,66 \pm 0,13$  % fenolinių junginių, dermoje  $0,78 \pm 0,14$  %, o bendrai visoje odoje prasiskverbusių junginių kiekis buvo  $1,45 \pm 0,28$  %.

Trečioji tirta sistema buvo K-9, iš kurios į odą prasiskverbusių fenolinių junginių kiekis nurodytas 16 pav.



16 pav. Fenolinių junginių skvarba į odą iš K-9 sistemos

Visų tirtų fenolinių junginių kiekis šioje sistemoje nustatytas mažiausias, lyginant su kitomis tirtomis pusiau kietomis farmacinėmis formomis. Ferulo rūgštis šioje sistemoje nustatyta tik epidermyje, skvarba į dermos sluoksnį neįvyko. Vanilino kiekis dermoje nustatytas didesnis nei vanilo rūgšties kiekis, tačiau statistiškai skirtumas, kitaip nei kitose sistemose, nebuvo reikšmingas ( $p > 0,05$ ). Iš viso odoje nustatyta  $1,43 \pm 0,39$  % vanilo rūgšties ir  $1,41 \pm 0,45$  % vanilino. Kumaro rūgšties kiekis odoje buvo  $0,61 \pm 0,24$  %. Epidermyje iš viso nustatyta  $0,29 \pm 0,07$  % prasiskverbusių fenolinių junginių, dermoje –  $0,47 \pm 0,12$  %, iš viso iš K-9 sistemos į odą prasiskverbė  $0,76 \pm 0,19$  % propolio ekstrakto buvusių fenolinių junginių. Nors atpalaidavimo rezultatai *in vitro* iš šios formulotės buvo geriausi, visgi junginių skvarba *ex vivo* iš šios formulotės nebuvo efektyviausia. Blogesni skvarbos rezultatai iš šios sistemos galimi dėl anksčiau aprašytų riebiųjų rūgščių skvarbos skatinimo efekto T-9 sistemoje. Taip pat, T-9 ir K-6 sistemų pagrinduose buvo didesnis kiekis lipofilinių medžiagų, tad tokie skvarbos rezultatai gali būti siejami su literatūroje aprašyta teorija, jog lipofiliniai pagrindai patekę ant odos suformuoja sluoksnį apsauganti nuo vandens garavimo. Toks efektas padidina raginio sluoksnio hidrataciją, ir šiame eksperimente tai galimai ir paskatino efektyvesnę veikliųjų medžiagų skvarbą [113, 114].

## Išvados

1. Pritaikius tinkamą technologiją buvo pagaminti skystasis etanolinis ir tirštasis propolio ekstraktai. Tiek skystajame, tiek tirštajame propolio ekstraktuose kaip dominuojanti rūgštis nustatyta p-kumaro rūgštis. Didesnis veiklių junginių kiekis nustatytas tirštame propolio ekstrakto, todėl remiantis tokiais rezultatais kremų ir tepalų gamyboje naudotas tirštasis propolio ekstraktas, ir tik hidrogelių gamyboje panaudotas etanolinis propolio ekstraktas.
2. Propolio ekstraktas pasižymėjo antioksidacinėmis savybėmis ir inaktyvavo DPPH reagentą. Kartu su propolio ekstraktu sumaišius šaltalankių aliejų, kuris taip pat pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, inaktyvuoto DPPH kiekis išaugo  $9,28 \pm 0,41$  %. Tai parodo, jog modeliuojant pusietę vaisto formą su propolio ekstraktu, kurios vienas iš esminių poveikių turėtų būti antioksidacinis aktyvumas, tikslinga naudoti natūralius aliejus. Antimikrobinio tyrimo rezultatai parodė, jog propolis veikia prieš mikroorganizmus ir sėkmingai stabo tiek gram-neigiamų, tiek gram-teigiamų bakterijų, tiek grybelio augimą. Visgi, tirtos bakterijų padermės propolio ekstrakto buvo paveikiamos stipriau nei grybelis, todėl tikslingiausia propolį panaudoti siekiant sukurti antibakterinius preparatus.
3. Pusiau kietos vaisto formos modeliuotos naudojant skirtingus pagrindus ir tai lėmė skirtingas puskiečių formų organoleptines ir reologines savybes, o taip pat ir besiskiriančias pH reikšmes. Visų tepalų pH reikšmė buvo tinkama ir neviršino 6,5. Mažiausia,  $36,01 \pm 0,11 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ , konsistencijos koeficiento reikšmė nustatyta tepalo formuluotėje, kurios pagrindas sudarytas iš bičių vaško ir saulėgrąžų aliejaus, o didžiausia konsistencijos koeficiento reikšmė, lygi  $204,6 \pm 0,48 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ , nustatyta sistemoje, kurios pagrindą sudarė vazelinas ir lanolinas, todėl tikėtina, jog pastaroji sistema, vartotojui sukeltų nemaloniausią pojūtį. Kremų pH reikšmė nustatyta didesnė nei tepalų, tačiau remiantis reologinėmis savybėmis kremų sistemos vartoti ant odos yra tinkamesės nei tepalai, nes yra labiau takūs, ir didžiausia konsistencijos koeficiento reikšmė tebus  $145,36 \pm 0,22 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ . Vienintelės stabilios gelio sistemos pH reikšmė nustatyta šiek tiek per didelė, tačiau konsistencijos koeficiento reikšmė, kuri lygi  $52,13 \pm 0,17 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ , leido iškelti hipotezę, jog veiklių junginių atpalaidavimas iš šios sistemos galėtų būti pakankamai efektyvus.
4. Fenolinių junginių iš pusiau kietų vaisto formų su propolio ekstraktu atpalaidavimo *in vitro* rezultatai parodė, jog atpalaiduotų junginių kiekiui tiesioginę įtaką daro tiek įterpto propolio kiekis, tiek pasirinktas vaisto pagrindas. Iš sistemų, kuriose propolio ekstrakto buvo daugiau, atpalaiduotų junginių kiekis irgi buvo didesnis. Taip pat nustatyta, jog geresnis medžiagų

atpalaidavimas vyksta iš tų pusiau kietų vaisto formų, kurių konsistencijos koeficientas yra mažesnis. Atpalaiduotų junginių kiekiui įtaką daro ir pagrindo hidrofilinės bei lipofilinės savybės. Nustatyta, jog kuo sistemos pagrindas yra labiau hidrofilinis, tuo atpalaiduotų junginių *in vitro* kiekis didesnis. Dėl šios priežasties atpalaiduotų junginių kiekis iš hidrogelių ir siekė beveik 100 %.

5. Geriausiai fenoliniai junginiai iš pusiau kietų vaisto formų su propolio ekstraktu į odą *ex vivo* eksperimento metu skverbėsi iš tepalo, kurio pagrindas formuotas iš vaško ir saulėgrąžų aliejaus. Tokie rezultatai įrodo, jog riebiosios rūgštys yra naudingos ir nulemia efektyvesnę veikliųjų junginių skvarbą į odą. Nors junginių atpalaidavimas iš gelio *in vitro* tyrime buvo itin efektyvus, tačiau skvarba į odą *ex vivo* tyrimo metu iš šios sistemos neįvyko. Tai įrodo, jog oda yra gerokai sudėtingesnė sistema nei celiuliozinė membrana, kuri naudota *in vitro* tyrime. Skvarba į odos sluoksnius yra sudėtingas, daugybės veiksnių lemiamas procesas, todėl tyrimai *ex vivo* yra itin svarbūs siekiant sumodeliuoti tinkamas pusiau kietas vaisto formuluotes.



## Literatūros šaltiniai

1. MIGUEL, M. and M. ANTUNES. Is propolis safe as an alternative medicine? *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* [interaktyvus]. 2011, 3 (4), 479 [žiūrėta 2018-01-26]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.4103/0975-7406.90101>
2. TORETI, V. C., H. H. SATO, G. M. PASTORE and Y. K. PARK. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* [interaktyvus]. 2013, 697390 [žiūrėta 2018-01-26]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1155/2013/697390>
3. WAGH, V. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentialsh [interaktyvus]. *Advances in Pharmacological Sciences* [interaktyvus]. 2013, 1-11 [žiūrėta 2017-12-02]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1155/2013/308249>
4. BERRETTA, A., P. DE CASTRO, A. CAVALHEIRO, V. FORTES, V. BOM, A. NASCIMENTO, F. MARQUELE-OLIVEIRA, V. PEDRAZZI, L. RAMALHO, G. GOLDMAN. Evaluation of Mucoadhesive Gels with Propolis (EPP-AF) in Preclinical Treatment of Candidiasis Vulvovaginal Infection. In *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [interaktyvus]. 2013, 2013:641480 [žiūrėta 2018-01-22]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1155/2013/641480>
5. CHANG, R.K., A. RAW, R. LIONBERGER, R and L. YU. Generic Development of Topical Dermatologic Products: Formulation Development, process Development, and Testing of Topical Dermatologic Products. *The AAPS Journal* [interaktyvus]. 2013, 15(1), 41–52. [žiūrėta 2018-01-26]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1208/s12248-012-9411-0>
6. BRUSCHI, M., D. JONES, H. PANZERI, M. GREMIÃO, O. DE FREITAS and E. LARA. Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: *In Vitro* Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, and Mucoadhesive Properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. 2007, 96(8), 2074-2089 [žiūrėta 2017-12-02]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1002/jps.20843>
7. FIDA Monika, Suela KELICCI, Mehmet HOXHA and Etleva QIRKO. A Case of Allergic Dermatitis after Self-Treatment with Propolis: Case Report. *Macedonian Journal of Medical Sciences* [interaktyvus]. 2013. 6(4), 425-427 [žiūrėta 2018-03-22]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.3889/MJMS.1857-5773.2013.0325>
8. AL-ANI, I., S. ZIMMERMANN, J. REICHLING, M. WINK. Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines* [interaktyvus]. 2018, 5(1), 2 [žiūrėta 2018-01-14]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.3390/medicines5010002>

9. BROWN, C., H. FRIEDEL, A. BARKER, L. BUHSE, S. KEITEL, T. CECIL, J. KRAEMER, J. MORRIS, C. REPPAS, M. STICKELMEYER, C. YOMOTA, V. SHAH. Meeting Report: FIP/AAPS Joint Workshop Report: Dissolution/*In Vitro* Release Testing of Novel/Special Dosage Forms. *Dissolution Technologies* [interaktyvus]. 2011, 12(2), 782-794 [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1208/s12249-011-9634-x>
10. JANKOWSKI, A., R. DYJA, B. HUJAR. Dermal and Transdermal Delivery of Active Substances from Semisolid Bases. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. 2017, 79(4), 488-500 [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.4172/pharmaceutical-sciences.1000255>
11. HUANG, S., C. ZHANG, K. WANG, G. LI, F. HU. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules* [interaktyvus]. 2014, 19(12), 19610-19632 [žiūrėta 2018-01-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.3390/molecules191219610>
12. HEGAZI, A., F. ABD EL HADY, F. ABD ALLAH. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of European Propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C* [interaktyvus]. 2000, 55(1-2), 70-75 [žiūrėta 2018-01-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/0939-5075/2000/0100-0070>
13. PANCHE, A. N., A. D. DIWAN, S.R. CHANDRA. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science* [interaktyvus]. 2016, 5, e4 [žiūrėta 2018-01-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
14. GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E., M. PICOS-SALAS, N. LEYVA-LÓPEZ, M. CRIOLLO-MENDOZA, G. VAZQUEZ-OLIVO, J. HEREDIA. Flavonoids and Phenolic Acids from Oregano: Occurrence, Biological Activity and Health Benefits. *Plants* [interaktyvus]. 2017, 7(1), 2. [žiūrėta 2018-04-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.3390/plants7010002>
15. PASUPULETI, V., L. SAMMUGAM, N. RAMESH, S.GAN. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [interaktyvus]. 2017, 1-21 [žiūrėta 2018-01-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1155/2017/1259510>
16. SHOKRI, H., F. KATIRAEI, M. FATAHINIA, M. MINOOEIANHAGHIGHI. Chemical composition and antifungal potential of Iranian propolis against *Candida krusei* strains. *Journal of Apicultural Research* [interaktyvus]. 2017, 56(5), 581-587 [žiūrėta 2018-01-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1080/00218839.2017.1371534>
17. NAIK, D., H. VAIDYA, T. NAMJOSHI. Essential Oil of Indian Propolis: Chemical Composition and Repellency against the Honeybee *Apis florea*. *Chemistry &*

- Biodiversity* [interaktyvus]. 2013, 10(4), 649-657 [žiūrėta 2018-03-25]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1002/cbdv.201200165>
18. RAMANAUSKIENE, K., A. SAVICKAS, L. IVANAUSKAS, Z. KALVENIENE, G. KASPARAVICIENE, I. BANIONYTE, A. AMSIEJUS, D. MARTIROSYAN. Analysis of Phenolic Acids in Propolis Using the High-Performance Liquid Chromatography Technique. *Current Nutrition & Food Science* [interaktyvus]. 2008, (4), 3, 209-212 [žiūrėta 2018-01-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1080/00664369.2018.154621>
  19. LOBO, V., A. PATIL, A. PHATAK, N. CHANDRA. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* [interaktyvus]. 2010, 4(8), 118-126 [žiūrėta 2018-01-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
  20. ICHIISHI, Ellchiro, Li XIAO-KANG and Iorio L. EUGENIO. Oxidative Stress and Diseases: Clinical Trials and Approaches. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [interaktyvus]. 2016, 1-3 [žiūrėta 2018-03-24]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1155/2016/3458276>
  21. SCHIEBER, Michael, Navdeep S. CHANDEL. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology* [interaktyvus]. 2014, 24(10), R453-R462 [žiūrėta 2018-02-03]. Prieiga per: doi: <http://doi.10.1016/j.cub.2014.03.034>
  22. DALEPRANE, Julio Beltrame, Dulcinea Saes ABDALL. Emerging Roles of Propolis: Antioxidant, Cardioprotective, and Antiangiogenic Actions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [interaktyvus]. 2013, 3458276 [žiūrėta 2018-02-03]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1155/2013/175135>
  23. SILVA-CARVALHO, Ricardo, Fatima BALTAZAR and Christina ALMEIDA-AGUIAR. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [interaktyvus]. 2015, 175135 [žiūrėta 2018-04-03]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1155/2015/206439>
  24. KUMAZAWA, Shigenori, Tomoko HAMASAKA, and Tsutomu NAKAYAMA. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2004, 84 (3), 329-339 [žiūrėta 2018-03-03]. Prieiga per: doi: [http://doi.org/10.1016/s0308-8146\(03\)00216-4](http://doi.org/10.1016/s0308-8146(03)00216-4)
  25. FABRIS, Sabrina, Mariangela BERTELLE, Oxana ASTAFYEVA, Elena GREGORIS, Roberta ZANGRANDO, Andrea GAMBARO, Giuseppina Pace Pereira LIMA and Roberto STEVANATO. Antioxidant Properties and Chemical Composition Relationship of Europeans and Brazilians Propolis. *Pharmacology & Pharmacy* [interaktyvus]. 2013, 4(1), 46-51 [žiūrėta 2018-03-03]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.4236/pp.2013.41006>

26. ORŠOLIĆ, Nada, Damir SIROVINA, Marijana Zovko KONČIĆ, Gordana LACKOVIĆ, and Gordana GREGOROVIĆ. Effect of Croatian propolis on diabetic nephropathy and liver toxicity in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine* [interaktyvus]. 2012, 12(1), 117 [žiūrėta 2018-03-03]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1186/1472-6882-12-117>
27. FAROOQUI, Tahira and Akhlaq A. FAROOQUI. Molecular Mechanism Underlying the Therapeutic Activities of Propolis: A Critical Review. *Current Nutrition & Food Science* [interaktyvus]. 2010, 6(3), 186-199 [žiūrėta 2018-04-13]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.2174/157340110792389136>
28. KEDARE, S.B., R.P SINGH. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology* [interaktyvus]. 2011, 48(4), 412-422 [žiūrėta 2018-04-13]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
29. MOHDALY, Adel A.A., Awad A. MAHMOUD, Mohamed H.H ROBY, Iryna SMETANSKA and Mohamed Fawzy RAMADAN. Phenolic Extract from Propolis and Bee Pollen: Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities. *Journal of Food Biochemistry* [interaktyvus]. 2015, 39(5), 538-544 [žiūrėta 2018-01-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1111/jfbc.12160>
30. KUJUMGIEV, A., I. TSVETKOVA, Yu. SERKEDJIEVA, V. BANKOVA, R. CHRISTOV, R and S. POPOV. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology* [interaktyvus]. 1999, 64(3), 235-240. [žiūrėta 2018-04-13]. Prieiga per: doi: [http://doi.org/10.1016/s0378-8741\(98\)00131-7](http://doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00131-7)
31. RAMANAUSKIENĖ, Kristina, Asta Marina INKĖNIENĖ, Vilma PETRIKAITĖ and Vitalis BRIEDIS. Total Phenolic Content and Antimicrobial Activity of Different Lithuanian Propolis Solutions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [interaktyvus]. 2013, 1-5 [žiūrėta 2018-02-11]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1155/2013/842985>
32. AL-ANI, Issam, Stefan ZIMMERMANN, Jurgen REICHLING and Michael WINK. Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines (Basel)* [interaktyvus]. 2018, 5(1), 2 [žiūrėta 2018-04-13]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.3390/medicines5010002>
33. CUSHNIE, T.P Tim, Andrew J. LAMB. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* [interaktyvus]. 2005, 26(5), 343-356 [žiūrėta 2018-02-11]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag>
34. MORI, Akihisa, Chikao NISHINO, Enoki NOBUYASU and Shinkichi TAWATA. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and

- Staphylococcus aureus. *Phytochemistry* [interaktyvus]. 1987, 26(8), 2231-2234 [žiūrėta 2018-02-11]. Prieiga per: doi: [http://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)84689-0](http://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)84689-0)
35. CHUA, E. G., A. PAROLIA, P. AHLAWAT, A. PAU, ALLAN and F.D AMALRAJ. 2014, Antifungal effectiveness of various intracanal medicaments against *Microsporum canis*: an ex-vivo study. *BMC Oral Health* [interaktyvus]. 2014, 14(1) [žiūrėta 2018-04-13]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1186/1472-6831-14-53>
36. SCHNITZLER, Paul, Annett NEUNER, Silke NOLKEMPER, Christine ZUNDEL, Hans NOWACK, Karl Heinz SENSCH and Jurgen REICHLING. Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. *Phytotherapy Research* [interaktyvus] 2009, 24(1), S20-S28 [žiūrėta 2018-04-13]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1002/ptr.2868>
37. HARISH Z., A. RUBINSTEIN, GOLODREN M, ELMALIAM M, MIZRACHI Y. Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. *Drugs Exp Clin Res.* 1997, 23(2) 89-96. ISSN 4654-5478.
38. BROWN, Teahan, Steve PETROVSKI, Hiu CHAN, Michael ANGOVE, Tucci JOSEPH. Semi-Solid and Solid Dosage Forms for the Delivery of Phage Therapy to Epithelia. *Pharmaceuticals* [interaktyvus]. 2018, 11(1), 26. Vol. 11, no. 1, p. 26 [žiūrėta 2018-04-13]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.3390/ph11010026>
39. MURTHY, S.N., SHIVAKUMAR H.N. Topical and transdermal drug delivery. *Non-Invasive and Minimally-Invasive Drug Delivery Systems for Pharmaceutical and Personal Care Products.* 2010, 1-36. ISBN 978-0-8155-2025-2.
40. STAMATAS, Georgios N, De Sterke JOHANNA, Matthias HAUSER, Otto VON STETTEN, and Andre VAN DER POL. Lipid uptake and skin occlusion following topical application of oils on adult and infant skin. *Journal of Dermatological Science* [interaktyvus]. 2008, 50(2), 135-142 [žiūrėta 2018-04-13]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.11.006>
41. AIACHE, J.M., P. GAUTHIER, and S. AIACHE. New gelification method for vegetable oils I: cosmetic application. *International Journal of Cosmetic Science* [interaktyvus]. 199, 14(5), 228-234 [žiūrėta 2018-04-13]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1111/j.1467-2494>
42. HOARE, Todd R., and Daniel S. KOHANE. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* [interaktyvus]. 2008, 49(8), 1993-2007 [žiūrėta 2018-03-14]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.01.027>
43. SAGIRI S.S., B. BEHERA, T. SUDHEEP and K. PAL. Effect of Composition on the Properties of Tween-80–Span-80-Based Organogels. *Designed Monomers and Polymers.* 2012, 15(3), 253-273. ISSN 1568-5551.

44. KANFER, Isadore, Seeprarani RATH, Potiwa PURAZIb and Nyengeterai Amanda MUDYAHOTO. *In Vitro* Release Testing of Semi-Solid Dosage Forms. *Dissolution Technologies* [interaktyvus]. 2017, 24 (3), 52-60 [žiūrėta 2018-04-13]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.14227/dt240317p52>
45. OLEJNIK, Anna, Joanna GOSCIANSKA and Izabela NOWAK. Active Compounds Release from Semisolid Dosage Forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. 2012, 101(11), 4032-4045 [žiūrėta 2018-04-13]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1002/jps.23289>
46. DAYAN Nava. Pathways for skin penetration. *Cosmetics & Toiletries*. 2005, 120(6). ISSN 2061-1597.
47. GARDAVSKA K., Z. VIKOCA J. CIZMARIK. The influence of ointment bases on liberation of some derivatives of phenylcarbamic acids. *Acta Poloniae Pharm.* 1999, 56, 375-380. ISSN 1341-1880.
48. OLIVEIRA G, J. HADGRAFT, M.E Lane. The role of vehicle interactions on permeation of an active through model membranes and human skin. *Int J Cosmetic Science*. 2012, 34, 536-545. ISSN 1920-1569.
49. REICHLING, J., U. LANDVATTER, H. WAGNER, K. KOSTKA and U. SCHAEFER, U. *In vitro* studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [interaktyvus]. 2006, 64(2), 222-228 [žiūrėta 2018-02-14]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.05.006>
50. KASPARAVICIENE, G., A. SAVICKAS, Z. KALVENIENE, S. VELZIENE, L. KUBILIENE and J. BERNATONIENE JURGA. Evaluation of Beeswax Influence on Physical Properties of Lipstick Using Instrumental and Sensory Methods. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [interaktyvus]. 2016, 1-8 [žiūrėta 2018-02-14]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1155/2016/3816460>
51. TULLOCH, A.P. Beeswax: Structure of the esters and their component hydroxy acids and diols. *Chemistry and Physics of Lipids* [interaktyvus]. 1971, 6(3), 235-265 [žiūrėta 2018-02-14]. Prieiga per: doi: [http://doi.org/10.1016/0009-3084\(71\)90063-6](http://doi.org/10.1016/0009-3084(71)90063-6)
52. KAMEDA, TSUNENORI, 2004, Molecular structure of crude beeswax studied by solid-state <sup>13</sup>C NMR. *Journal of Insect Science* [interaktyvus]. 2004, 4(1) [žiūrėta 2018-02-14]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1093/jis/4.1.29>
53. FRATINI Filippo, Cilia GIOVANNI, Barbara TURCHI and Antonio FELICIOLI. Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pacific*

- Journal of Tropical Medicine* [interaktyvus]. 2016, 9(9), 839-843 [žiūrėta 2018-03-12].  
Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.07.003>
54. FATIMA, T., CRYSTAL S. L., W. R SCHROEDER, C. DUSTIN, R. DATLA, D. WISHART, R. J WESELAKE, and P. KRISHNA. Fatty Acid Composition of Developing Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) Berry and the Transcriptome of the Mature Seed. *PLoS ONE* [interaktyvus]. 2012, 7(4), p. e34099 [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0034099>
55. WANI, Touseef Ahmed, S.M WANI, Mukhtar AHMAD, Mudasir AHMAD, Adil GANI and F.A MASOODI. Bioactive profile, health benefits and safety evaluation of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*): A review. *Cogent Food & Agriculture* [interaktyvus]. 2016, 2(1) [žiūrėta 2018-01-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1080/23311932.2015.1128519>
56. ZIELIŃSKA, Aleksandara and Izabela NOWAK. Abundance of active ingredients in sea-buckthorn oil. *Lipids in Health and Disease* [interaktyvus]. 2017, 16(1) [žiūrėta 2018-01-16]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1186/s12944-017-0469-7>
57. GUO, Shuashuangshuang, Yan GE and Kriskamol, NA JOM. A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common sunflower seed and sprouts (*Helianthus annuus L.*). *Chemistry Central Journal* [interaktyvus]. 2017, 11(1) [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1186/s13065-017-0328-7>
58. LIN, Tzu-kai, Lily ZHONG, Juan SANTIAGO. Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2017, 19(1), 70 [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.3390/ijms19010070>
59. 2,3,3-Trimethylbenzoindolenine [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2018-02-13]. Prieiga per: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/41532-84-7#section=Fire-Prevention>
60. *Basalis (Basic) Clinic kremas. LSMU Vaistinė* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2018-02-13]. Prieiga per: <https://univaistine.lsmuni.lt/lt/kosmetika/basalis/odos-bei-paodzio-ligos/basalis-basic-clinic-kremas>
61. SCALZO, Marcello, Clelia ORLANDI, Nicola SIMONETTI and Felice CERRETO. Study of Interaction Effects of Polyacrylic Acid Polymers (Carbopol 940) on Antimicrobial Activity of Methyl Parahydroxybenzoate Against Some Gram-negative, Gram-positive Bacteria and Yeast. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [interaktyvus]. 1996, 48(11), 1201-1205 [žiūrėta 2018-04-05]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1996>
62. *Secto, pharmacy & cosmetics corporate, hansen & rosenthal kg* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2018-03-10]. Prieiga per:

- [https://hur.com/fileadmin/redakteur\\_hurgesamt/gruppe/ueber\\_h\\_r/publikationen/firmenbrochure/hur\\_brochure\\_cosmetic\\_e.pdf](https://hur.com/fileadmin/redakteur_hurgesamt/gruppe/ueber_h_r/publikationen/firmenbrochure/hur_brochure_cosmetic_e.pdf)
63. GUO, Hong, Zhidong LIU, Jizhong LI, Shufang NIE and Wisan PAN. Effects of Isopropyl Palmitate on the Skin Permeation of Drugs. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* [interaktyvus]. 2006, 29(11), 2324-2326 [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1248/bpb.29.2324>
  64. CRONIN, Etain. Lanolin labelling of cosmetics. *Contact Dermatitis* [interaktyvus]. 1981, 7(1), 53-54 [žiūrėta 2018-04-14]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1981>
  65. *Stearyl Alcohol | Cosmetics Info* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2018-03-10]. Prieiga per: <http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/stearyl-alcohol>
  66. *Stearyl alcohol || skin deep® cosmetics database | EWG* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2018-04-04]. Prieiga per: [https://www.ewg.org/skindeep/ingredient/706325/STEARYL\\_ALCOHOL](https://www.ewg.org/skindeep/ingredient/706325/STEARYL_ALCOHOL)
  67. ŽILIUS, Modestas. Dermatologinių puskiečių formų su propolio produktais modeliavimas, optimizavimas ir biofarmacinis vertinimas. *Daktaro disertacija* [interaktyvus]. 2014 [žiūrėta 2018-01-12]. Prieiga per: <https://repository.lsmuni.lt/handle/1/60300>
  68. BUDAI, L., I. ANTAL, I. KLEBOVICH, M. BUDAI. Natural oils and waxes: studies on stick bases. *J. Cosmet. Sci* [interaktyvus]. 2012, 63(2), 93-101. ISSN 1934-1765.
  69. ČIŽAITĖ Indrė. Pusiaus kietų vaisto formų su skystuoju melisų (*Mellisa officinalis* L) ekstraktu modeliavimas ir biofarmacinis vertinimas. *Magistro baigiamasis darbas* [interaktyvus]. 2014 [žiūrėta 2018-02-23]. Prieiga per: <https://publications.lsmuni.lt/object/elaba:8697625/8697625.pdf>
  70. COUTINHO, Henriqued, M., SANTOS, Allanak L. COSTA, M. JOSÉG, Irwinr A. MENEZES, Isaacf CANSANÇÃO, Karlak A. SANTOS and Edinardof F. MATIAS. Antioxidant activity of five Brazilian plants used as traditional medicines and food in Brazil. *Pharmacognosy Magazine* [interaktyvus]. 2010, 6(24), 335 [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.4103/0973-1296.71789>
  71. KASPARAVIČIENĖ, Giedrė, Vitalis BRIEDIS, Liudas IVANAUSKAS. Šaltalankių aliejaus technologijos įtaka jo antioksidaciniam aktyvumui. *Medicina*. 2004, 40(8) 753-757. ISSN 1010-6608
  72. PINTO, E., M. LAGO, L. BRANCO, L.A VALE-SILVA and M.D PINHEIRO. Evaluation of Etest Performed in Mueller–Hinton Agar Supplemented with Glucose for Antifungal Susceptibility Testing of Clinical Isolates of Filamentous Fungi. *Mycopathologia*



- [interaktyvus]. 2014, 177, 3-4, 157-166 [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1007/s11046-014-9730-z>
73. NG, Shiow-fern, Jennifer J. ROUSE, Francis D. SANDERSON, Victor MEIDAN and Gillian M. ECCLESTON. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for *In Vitro* Permeation Studies. *AAPS PharmSciTech* [interaktyvus]. 2010, 11(3), 1432-1441 [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1208/s12249-010-9522-9>
  74. BONFERONI, M. C., S. ROSSI, F. FERRARI and C. CARAMELLA. A Modified Franz Diffusion Cell for Simultaneous Assessment of Drug Release and Washability of Mucoadhesive Gels. *Pharmaceutical Development and Technology* [interaktyvus]. 1999, 4(1), 45-53 [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1080/10837459908984223>
  75. CHATTARAJ, S.C., J. SWARBRICK, I. and KANFER. A simple diffusion cell to monitor drug release from semi-solid dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics* [interaktyvus]. 1995, 120(1), 119-124 [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: [http://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)00426-6](http://doi.org/10.1016/0378-5173(94)00426-6)
  76. SLAVOV, Anton, Atanas TRIFONOV, Lyudmil PEYCHEV, Stela DIMITROVA, Stela PEYCHEVA, Velitchka GOTCHEVA, and Angel ANGELOV, ANGEL. Biologically Active Compounds with Antitumor Activity in Propolis Extracts from Different Geographic Regions. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2013, 27(4), 4010-4013. ISSN 1310-2818.
  77. SOCHA, Robert, Dorota GAŁKOWSKA, Malgorzata BUGAJ and Leslaw JUSZCZAK. Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Natural Product Research* [interaktyvus]. 2014, 29(5), 416-422 [žiūrėta 2018-04-14]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1080/14786419.2014.949705>
  78. NOUR, V., I. TRANDAFIR, S. COSMULESCU. HPLC Determination of Phenolic Acids, Flavonoids and Juglone in Walnut Leaves. *Journal of Chromatographic Science* [interaktyvus]. 2012, 51(9), 883-890 [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1093/chromsci/bms180>
  79. GONZÁLEZ, M., B. GUZMÁN, R. RUDYK, E. ROMANO, M. MOLINA. Spectrophotometric Determination of Phenolic Compounds in Propolis. *Lat. Am. J. Pharm.* 2003, 22(3), 243-8. ISSN 0851-0632.
  80. ŽILIUS, Modestas, Kristina RAMANAUSKIENĖ, Vitalis BRIEDIS. Release of Propolis Phenolic Acids from Semisolid Formulations and Their Penetration into the Human Skin *In*

- Vitro. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [interaktyvus]. 2013(2013), 1-7 [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1155/2013/958717>
81. IVANAUSKAS, Liudas, Valdas JAKSTAS, Jolita RADUSIENE, Audronis LUKOSIUS, Algirdas BARANAUSKAS. Evaluation of phenolic acids and phenylpropanoids in the crude drugs. *Medicina*. 2008, 44(1) 48-55. ISSN 1010-6691.
  82. VARVARA, Simona, Roxana BOSTANA, Otilia BOBIS, Luiza GĂINĂ, Florin POPA, Vicente MENA, and Ricardo M. SOUTO. Propolis as a green corrosion inhibitor for bronze in weakly acidic solution. *Applied Surface Science* [interaktyvus]. 2017, 426, 1100-1112 [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.07.230>
  83. MĂRGHITAȘ, Liviu Al. Daniel S. DEZMIREAN, and Otilia BOBIS. Important Developments in Romanian Propolis Research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [interaktyvus]. 2013(2013), 1-9 [žiūrėta 2018-04-04]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1155/2013/159392>
  84. ALIYAZICIOGLU, Rezzan, Huseyn SAHIN, Omer ERTURK, Esra ULUSOY and Sevgi KOLAYLI. Properties of Phenolic Composition and Biological Activity of Propolis from Turkey. *International Journal of Food Properties* [interaktyvus]. 2013, 16(2), 277-287 [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1080/10942912.2010.551312>
  85. UPADHYAY, N.K., R. KUMAR, S.K MANDOTRA, R.N MEENA, M.S SIDDIQUI, R.C SAWHNEY and A. GUPTA. Safety and healing efficacy of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) seed oil on burn wounds in rats. *Food and Chemical Toxicology* [interaktyvus]. 2009, 47(6), 1146-1153 [žiūrėta 2018-04-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.002>
  86. YAYAN, Josef, Beniam GHEBREMEDHIN and Kurt RASCHE, KURT. Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in Pneumonia at a Single University Hospital Center in Germany over a 10-Year Period. *PLOS ONE* [interaktyvus]. 2015, 10, 10, e0139836 [žiūrėta 2018-04-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0139836>
  87. LAMBERS, H., S. PIESSENS, A. BLOEM, H. PRONK and P. FINKEL. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International Journal of Cosmetic Science* [interaktyvus]. 2006, 28(5), 359-370 [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1111/j.1467-2494>
  88. ALI, S., G. YOSIPOVITCH. Skin pH: From Basic SciencE to Basic Skin Care. *Acta Dermato Venereologica* [interaktyvus]. 2013, 93(3), 261-267 [žiūrėta 2018-01-18]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.2340/00015555-1531>

89. Final Report on the Safety Assessment of Stearyl Alcohol, Oleyl Alcohol, and Octyl Dodecanol. *Journal of the American College of Toxicology* [interaktyvus]. 1985, 4(5), 1-29 [žiūrėta 2018-02-27]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.3109/10915818509078685>
90. KWAK, M., A.H SONG. Rheological investigation of body cream and body lotion in actual application conditions. *Korea-Australia Rheology Journal*. 2015, 27(3), 241-251. ISSN9145-8463.
91. KANFER, Isadore, Seeprarani RATH, Purazi POTIWA and Nyengeterai Amanda MUDYAHOTO. *In Vitro* Release Testing of Semi-Solid Dosage Forms. *Dissolution Technologies* [interaktyvus]. 2017, 24(3), 52-60 [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.14227/dt240317p52>
92. HU, X.G., Q. ZHU, H.V ATKINSON, H.X LU, F. ZHANG, H.B DONG and Y.L KANG. A time-dependent power law viscosity model and its application in modelling semi-solid die casting of 319s alloy. *Acta Materialia* [interaktyvus]. 2017, 124, 410-420 [žiūrėta 2018-04-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1016/j.actamat.2016.11.031>
93. AUGUSTO, Pedro E.D., Marcelo CRISTIANINI, Albert IBARZ. Effect of temperature on dynamic and steady-state shear rheological properties of siriguela (*Spondias purpurea L.*) pulp. *Journal of Food Engineering* [interaktyvus]. 2012, 108(2), 283-289. [žiūrėta 2018-01-28]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.015>
94. ARREDONDO-OCHOA, Teresita, Blanca GARCÍA-ALMENDÁREZ, Monserrat ESCAMILLA-GARCÍA, Olga MARTÍN-BELLOSO, Giovanna ROSSI-MÁRQUEZ, Luis MEDINA-TORRES, and Carlos REGALADO-GONZÁLEZ. Physicochemical and Antimicrobial Characterization of Beeswax–Starch Food-Grade Nanoemulsions Incorporating Natural Antimicrobials. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2017, 18(12), 2712 [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.3390/ijms18122712>
95. SONG, Ki-Won, Kim YOON-JEONG, Chi-Ho LEE. Rheological Behavior of Semi-Solid Ointment Base (Vaseline) in Steady Shear Flow Fields. *Journal of Korean Pharmaceutical Science* [interaktyvus]. 2007, 37(3), 137-148 [žiūrėta 2018-04-15]. DOI 10.4333/kps.2007.37.3.137
96. TSASOP, R.K., G. DJIOBE, K. REGONNE, V. BAMA, A. MBAWALA, M. NGASSOUM. Optimization of Rheological Properties In The Formulation Of An Ointment Base From Natural Ingredients. *International Journal of Scientific and technology research*. 2017, 6(9), 113-121. ISSN 2277-8616.

97. NGUYEN, Hiep X., Ashana PURI, Ajay K. BANGA. Methods to simulate rubbing of topical formulation for in vitro skin permeation studies. *International Journal of Pharmaceutics* [interaktyvus]. 2017, 519 (1-2), 22-33 [žiūrėta 2018-01-15]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.007>
98. DUA Kamal. Application of model independent approach on *in vitro* release of extemporaneously prepared semisolid formulations containing metronidazole with marketed silver sulfadiazine 1% cream, USP: a comparative investigation. *Bulletin of Pharmaceutical Research*. 2013, 3(1), 1-5. ISSN 2249-9245.
99. ASLANI, Abolfazl and Negar MALEKPOUR. Design, formulation, and physicochemical evaluation of periodontal propolis mucoadhesive gel. *Dental Research Journal* [interaktyvus]. 2016, 13(6), 484 [žiūrėta 2018-01-15]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.4103/1735-3327.197037>
100. SIPOS, E., N. SZÁSZ, S. VANCEA, S and A. CIURBA. Evaluation and Selection of Gel Base for the Formulation of Dexpanthenol Products. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* [interaktyvus]. 2015, 13(12), 1987 [žiūrėta 2018-03-14]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.4314/tjpr.v13i12.5>
101. RUELA, André Luís Morais, Aline Gravinez PERISSINATO, Mônica Esselin de Sousa LINO, Paula Silva MUDRIK and Gislaïne Ribeiro PEREIRA. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. 2016, 52(3), 527-544 [žiūrėta 2018-03-14]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1590/s1984-82502016000300018>
102. *Vanillin* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2018-03-10]. Prieiga per: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/vanillin>
103. *Caffeic acid* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2018-03-10]. Prieiga per: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/caffeic\\_acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/caffeic_acid)
104. *p-Coumaric acid* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2018-03-10]. Prieiga per: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/p-coumaric\\_acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/p-coumaric_acid)
105. *Ferulic acid* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2018-03-10]. Prieiga per: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ferulic\\_acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ferulic_acid)
106. *Vanillic acid* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2018-03-10]. Prieiga per: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vanillic\\_acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vanillic_acid)
107. SANNA, V., A.T PEANA, L. MORETTI. Development of New Topical Formulations of Diphenhydramine Hydrochloride: *In Vitro* Diffusion and *In Vivo* Preliminary Studies.

- International Journal of PharmTech research* [interaktyvus]. 2010, 2(1), 863-869 [žiūrėta 2018-03-14]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1590/s1984-82502016000300018>
108. REHMAN, Khurram and Mohd Hanif ZULFAKAR. Recent advances in gel technologies for topical and transdermal drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [interaktyvus]. 2013, 40(4), 433-440 [žiūrėta 2018-03-14]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.3109/03639045.2013.828219>
109. BARRETT, C. W., J. W. HADGRAFT and I. SARKANY. The influence of vehicles on skin penetration. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [interaktyvus]. 1964, 16(s1), 104T-107T [žiūrėta 2018-03-14]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1964.tb07545>
110. IRWIN, W.J., F.D SANDERSON and A. LI WAN PO. Percutaneous absorption of ibuprofen: Vehicle effects on transport through rat skin. *International Journal of Pharmaceutics* [interaktyvus]. 1990, 66(1-3),193-200 [žiūrėta 2018-04-04]. Prieiga per: doi: [http://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90399-o](http://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90399-o)
111. MITTAL, Ashu, U. SARA, Asgar ALI and Mohd AQIL. Status of Fatty Acids as Skin Penetration Enhancers-A Review. *Current Drug Delivery* [interaktyvus]. 2009, 6(3), 274-279 [žiūrėta 2018-04-04]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.2174/156720109788680877>
112. IBRAHIM, Sarah A., S. Kevin LI. Efficiency of Fatty Acids as Chemical Penetration Enhancers: Mechanisms and Structure Enhancement Relationship. *Pharmaceutical Research* [interaktyvus]. 2009, 27(1), 115-125 [žiūrėta 2018-04-04]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1007/s11095-009-9985-0>
113. COOPER, Eugene R. Increased Skin Permeability for Lipophilic Molecules. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. 1984, 73(8), 1153-1156 [žiūrėta 2018-03-12]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1002/jps.2600730831>
114. PATZELT, A., J. LADEMANN, H. RICHTER, M. E DARVIN, S. SCHANZER, G. THIEDE, W. STERRY, T. VERGOU M. HAUSER. *In vivo* investigations on the penetration of various oils and their influence on the skin barrier. *Skin Research and Technology* [interaktyvus]. 2011, 18(3), 364-369 [žiūrėta 2018-04-04]. Prieiga per: doi: <http://doi.org/10.1111/j.160>