

RAZVOJ I ISPITIVANJE ANTISEPTIČNIH BIOAKTIVNIH KOZMETIČKIH FORMULACIJA PRIRODNOG POREKLA

Slobodan Glišić, Milorad Cakić, Nebojša Cekić, Goran Nikolić*

Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet, Leskovac, Srbija

(ORIGINALAN NAUČNI RAD)

UDK 615.454.1:615.322:547.296

Razvoj i ispitivanje novih bioaktivnih kozmetičkih formulacija u formi kreme sa antiseptičnim svojstvima, na bazi prirodnih (ekstrakti lišaja *Usnea barbata* L. i cvasti kamilice *Matricaria recutita* L.) i sintetskih (dekstran sulfat) komponenta sa dokazanim bioaktivnim svojstvima, predmet su ovog rada. Formulacije su koncipirane sa aspekta poznavanja biohemijskih procesa u koži. Zato su korišćene bioaktivne materije koje treba da ispolje fiziološko, mikrobiološko i farmakološko dejstvo, pri čemu se njihovo delovanje na funkciju kože može dokazati. U kontroli kvaliteta krema primenjene su fizičko-hemijske metode u skladu sa regulativama za kozmetičke proizvode. Za utvrđivanje tipa tečenja proizvoda, u cilju boljeg aplikovanja na kožu, primenjena su reološka ispitivanja. Bioaktivne kreme su ispitivane sa aspekta utvrđivanja efikasnosti i bezbednosti topikalne primene na kožu. Efikasnost proizvoda je utvrđivana testovima za ispitivanje antimikrobne aktivnosti. Poznavanje karakteristika kozmetički aktivnih materija i mehanizma njihovog delovanja, omogućilo je da se izvrši optimizacija formulacija sa aspekta funkcionalnosti preparata za negu i tretman kože, kako bi se njihova aktivnost mogla bolje kontrolisati i postiglo ciljano delovanje na određenu regiju kože.

Ključne reči: bioaktivne kreme, usninska kiselina, kamilica, dekstran sulfat

Uvod

Tradicionalni kozmetički proizvodi imaju za cilj da održe, ulepšaju ili poprave izgled kože. Savremeni kozmetički proizvodi, pored ove tradicionalne uloge, imaju bioaktivno dejstvo, kompatibilni su sa kožom, bezbedni za primenu i utiču na očuvanje zdravlja kože. Zbog toga se u sastav kozmetičkih proizvoda uvode »kozmetički aktivne supstance«, a proizvodi postaju bioaktivni. Evidentan je veći broj kompanija koje intenzivno rade na razvoju i primeni kozmetički aktivnih materija. Aktivni sastojci sintetskog porekla u ovim proizvodima se danas sve češće zamenjuju prirodnim komponentama, koje su znatno prihvatljivije od strane organizma. Sa druge strane, efikasnost savremenih kozmetičkih proizvoda uglavnom podrazumeva multifunkcionalnost. Navedeni zahtevi nameću proizvođačima kozmetičkih sirovina i preparata stalno usavršavanje formulacija postojećih emulzionih nosača za kozmetički aktivne supstance, upotrebu novih sirovina i tehnologija za izradu preparata, kao i razvoj potpuno novih nosača aktivnih komponenti i veliki broj različitih izvora i koncepta za dobijanje kozmetički aktivne supstance [1]. Obzirom da ovi proizvodi još uvek ne podležu strogim zakonskim

propisima po pitanju kvaliteta i efikasnosti, kao i to da na tržištu postoje proizvodi čija delotvornost nije dokazana, predmet ovog rada je priprema kozmetičkih proizvoda na bazi prirodnih bioaktivnih komponenta, njihova efikasnost i bezbednost topikalne primene na koži.

U farmaceutsko-kozmetičkoj praksi su široko zastupljeni proizvodi emulzionog tipa. Emulzije se koriste kao nosači, odnosno vehikulumi za lekovite supstance u dermato-farmaceutskim (topikalnim) preparatima. Primenom emulzija kao vehikuluma može se postići olakšana aplikacija lekovite supstance, poboljšanje resorpcije ili produženo oslobađanje lekovite supstance. Osnovni preduslov za primenu emulzija u praksi je odgovarajuća fizička stabilnost u predviđenom roku upotrebe, koji za većinu farmaceutsko-kozmetičkih preparata iznosi dve do pet godina. Dispergovanje ulja u vodi je termodinamički nefavorizovan proces jer zahteva veliku kontaktnu međupovršinu između dve faze koje se ne mešaju. Za stvaranje novih međupovršina potrebno je dovesti energiju u sistem, odnosno uložiti rad (u obliku toplote i/ili mehaničkog mešanja). Uložena energija se ugrađuje u sistem kao slobodna međupovršinska ener-

* Adresa autora: Goran Nikolić, Tehnološki fakultet, Bulevar oslobođenja 124, 16000 Leskovac, Srbija
E-mail: goranchem_yu@yahoo.com
Rukopis primljen: 17. decembra 2012. godine
Rad prihvaćen: 28. januara 2013. godine

gija koja u stvari predstavlja potencijalnu energiju sistema. Po prestanku dovođenja energije, faze se najčešće razdvoje tako da samo dovođenje energije dvofaznom sistemu ulja i vode nije dovoljno za stvaranje stabilne mešavine u dužem vremenskom periodu. Zbog toga se mora voditi računa o sastavnim komponentama emulzi-odnog sistema, što zahteva razvoj i optimizaciju novih formulacija krema.

Kod bioaktivnih proizvoda, pored nosača kao pomoćne komponente, važnu ulogu imaju i bioaktivne supstance. Prve aktivne materije koje su korišćene u kozmetici su biljnog porekla. Povoljno dejstvo lekovitog bilja na kožu i sluzokožu potiče od biološki aktivnih sastojaka, pa su kozmetički najaktivnije biljne materije: flavonoidi, terpeni, glikozidi, saponini, tanini, organske i neorganske kiseline. Ova jedinjenja, naneta na kožu, izazivaju omekšavanje epiderma, poboljšanje cirkulacije krvi i prokrvljenje perifernih kapilara, bržu epitelizaciju i regeneraciju kože, ideluju adstringentno, antiseptično, antiflogistički. Posebnu pažnju privlače supstance izolovane iz biljaka kao što su: bisabolol (iz kamilice), fitosterini, esencijalne masne kiseline itd. Aktivne materije u biljnim ekstraktima uglavnom deluju sinergistički [2].

Fitokozmetika koristi standardizovane ekstrakte ili prečišćene komponente prirodnog porekla i na taj način se obezbeđuje konstantno delovanje, koje se može kvantifikovati. Istovremeno, korišćenjem standardizovanih preparata izbegavaju se neželjena dejstva nakoži, najčešće u vidu kontaktnog dermatitisa ili povećane senzibilizacije. Naročito su u tom smislu reaktivni sastojci biljaka male molekulske mase, koji su u stanju da se vežu na proteine površinskih antigena, koji funkcionišu kao nosači. Veliki broj poznatih lekovitih biljaka poseduje senzibilizirajuća svojstva. Njihova stabilnost je manja nego hemijski čistih supstanci zbog složenog međusobnog delovanja različitih jedinjenja koja ulaze u sastav ekstrakta, načina dobijanja i uslova čuvanja. Tokom čuvanja preparata može doći do promena fizičke, hemijske ili mikrobiološke prirode. Od fizičkih promena najčešće su promene pH, viskoziteta, taloženje, razdvajanje faza, zamućenje i dr. Česte hemijske promene su oksidoredukcija pojedinih sastojaka, hidroliza, kondenzacija i polimerizacija. Dešavaju se takođe i fotohemijske promene, što ukazuje na potrebu adekvatnog čuvanja preparata. Da bi se obezbedila i pratila stabilnost ekstrakta, fizičkim, hemijskom ili biološkim metodama, potrebno je prethodno izvršiti njegovu standardizaciju. Proizvod se smatra stabilnim, sve dok je sadržaj aktivnih principa veći od 90 % deklarisanog sadržaja i dok nastali degradacioni proizvodi nisu toksični [3].

Kamilica (*Matricaria recutita* L.), porodica *Asteraceae*, glavočike, odavno je poznat i ekonomski najvažniji predstavnik lekovitih biljaka [3]. Ublažava i smiruje sve vrste upala, delujući kao antiseptik i antibaktericid. Od cvasti kamilice prave se čajevi, tinkture itd. Kamilica obiluje aktivnim komponentama, a glavna komponenta je lako izdvojivo etarsko ulje (0,3 do 1,3 %). Važni sastojci ulja kamilice su: alfa bisabolol, farnezen i bisabolol ok-

sidi. Ulje se primenjuje u kozmetici i farmaciji za negu kože i sastavni je deo lekova protiv upala [4]. Ekstrakt (*Chamomillae extractum fluidum* PG) se dobija iz cvetova kamilice *M. recutita* posebnim postupkom ekstrakcije, smešom propilenglikol/voda. Aktivni sastojci ekstrakta pospešuju cirkulaciju i imaju antiflogističko, antiinflamatorno, bakteriostatično i umirujuće delovanje [4]. Po izgledu ekstrakt je bistra tečnost, svetlobraon boje, karakterističnog mirisa. Sastojci: etarsko ulje, bisabolol, azulen, flavonoidi, apigenin i glikozidi [5]. Ekstrakt je konzervisan natrijum benzoatom (0,1 %). Biljni ekstrakt kamilice se zahvaljujući širokom spektru delovanja koristi kao sastojak kozmetičkih preparata. Njegova antiinflamatorna svojstva posebno dolaze do izražaja u kremama, gde se zapažaju pozitivni efekti na kožu. Zbog omekšavajućeg i spazmolitičkog delovanja, teško je zamisliti proizvode za kupanje bez ovog ekstrakta. U kozmetičkim proizvodima preporučuju se doze od 1–10 %, u zavisnosti od proizvoda. Proizvod se čuva na hladnom i tamnom mestu [6].

Jevrejska brada (*Usnea barbata* L.) se koristi u kineskoj medicini (već 3000. godina), savremenoj homeopatiji i tradicionalnoj medicini širom sveta [7]. Ekstrakti lišaja se koriste u medicini i kozmetologiji. Istraživanja lišaja *U. barbata* pokazuju da je glavni aktivni princip usninska kiselina. Radi se o supstanci sa izraženom antibakterijskom aktivnošću [7,8]. To je antibiotik, koji selektivno inhibira uzročnike infekcije, a da pri tome ne oštećuje zdravu kožu. Ekstrakt *U. barbata*, dobijen superkritičnom ekstrakcijom pomoću CO₂ zbog visokog sadržaja usninske kiseline (4 %) dodaje se preparatima u vrlo niskoj koncentraciji (od 0,5 %) kako bi sprečio rast i razvoj mikroorganizama. Usninska kiselina ispoljava jako antibiotsko delovanje na veliki broj gljivica i bakterija, pa čak i na *Staphylococcus aureus*, a uporedjivanje sa 9 različitih prirodnih konzervansa šumski lišaj se pokazao najkoptentniji [9,10]. Prisustvo usninske kiseline u prirodnom proizvodu u niskim dozama deluje i na bakterijske i gljivične promene na koži i sluznici tako da se koristi i u lečenju akni. Usninska kiselina uspešno deluje na mikroorganizame, pogotovo na gram pozitivne bakterije neke patogene gljivice poput *Candida albicans*. Ekstrakt *U. barbata* i njegova aktivna komponenta, usninska kiselina, imaju izraženo antibakterijsko, antifungicidno i antivirusno delovanje [11-16].

Potencijalne kozmetički aktivne supstance su i proizvodi metabolizma mikroorganizama. Najpoznatije su α -hidroksi kiseline, koje često nastaju kao fermentacioni proizvod (mlečna kiselina). Pošto je njihova izolacija iz voća skupa, sve češće se proizvode biotehnoški. Mikroorganizmi sintetišu i antibiotike, vitamine, glukopolisaharide i još čitav niz supstanci koje mogu biti i kozmetički aktivne. Njihova kombinacija daje na tržištu svakodnevno nove aktivne sirovine. Jedna od njih je polisaharid dekstran, koji se u praksi koristi u obliku dekstran sulfata ili natrijumove soli zbog bolje rastvorljivosti i aplikacije. Dekstran sulfat se vezuje za viruse i inhibira početnu adsorpciju u osetljive ćelije [17]. Aktivne supstance proizvedene mikrobiološki, u kozmetici kao i farmaciji dobijaju

vrlo značajno mesto, a mogućnosti sinteze novih supstanci su praktično neograničene [16].

Formulacije krema u ovom radu su koncipirane sa aspekta poznavanja biohemijskih procesa u koži, što je doprinelo boljem sagledavanju realnih potreba kože i načina da se te potrebe zadovolje. Zato su i korišćene takve bioaktivne materije u ovim kozmetičkim proizvodima koje treba da ispolje fiziološko, mikrobiološko i farmakološko dejstvo, pri čemu se njihovo delovanje na strukturu ili funkciju kože može dokazati. Sa druge strane, poznavanje karakteristika kozmetički aktivnih materija i mehanizma njihovog delovanja, omogućilo je da se izvrši optimizacija formulacija sa aspekta funkcionalnosti preparata za negu kože, kako bi se njihova aktivnost mogla bolje kontrolisati i postiglo ciljano delovanje na regiju.

EKSPERIMENTALNI DEO

Aktivne komponente

Usninska kiselina. Ekstrakt je dobijen iz biljnog materijala *U. barbata* natkritičnom CO₂ ekstrakcijom, na 60 °C, pritisku 300 bara za vreme od 3 h, pri protoku 20 kg/h CO₂. Usninska kiselina (C₁₈H₁₆O₇, 344,34 g/mol) u obliku svetlo žutih kristala ima sledeće karakteristike: gustina: 1,49 g/cm³, tačka topljenja: 200 °C, tačka ključanja: 594,8 °C na 760 mmHg, tačka paljenja: 219,1 °C.

Ekstrakt kamilice. Ekstrakt je dobijen iz cvetova kamilice *M. recutita* postupkom ekstrakcije sa smešom propilenglikol/voda kao ekstragensom. Analitičke karakteristike ekstrakta su: indeks refrakcije n_D²⁰: 1,370 - 1,390; relativna gustina d₂₀²⁰: 1,040 - 1,060; ostatak nakon sušenja, 105 °C (%): min 4,4; pH vrednost: 5,8; sadržaj propilen glikola (vol.%): 38 - 41.

Dekstran sulfat. U radu je korišćen dekstran sulfat (SIGMA - ALDRICH, Švedska), u obliku natrijumove soli Mw = 500.000, što ga čini rastvornim i stabilnim u vodi i upotrebljen je bez prethodnog prečišćavanja. Sadrži 17 % sumpora, koji je ekvivalentan sa 2,3 sulfatne grupe po glukoznom ostatku [18]. Hemijske karakteristike dekstran sulfata u obliku natrijumove soli: sadržaj sumpora 16 -19 %; specifična optička rotacija + 90 do +105 °; maksimalni gubitak sušenjem 7 %; pH 6-8; maksimalni višak sulfata 0,5 %; maksimalna zamućenost 5,0 NTU; kinematička viskoznost (1 % u vodi na + 25 °C) i specifična viskoznost (1 % u 1M NaCl) su u opsegu 0,35 - 0,45.

Metode ispitivanja

Organoleptička ispitivanja. Vizuelnim pregledom se procenjuju boja, sjaj i homogenost, dok se konzistencija, razmazivost i film koji emulzija ostavlja na koži posmatra premazivanjem kože [19].

Određivanje tipa emulzije.

Metoda razblaživanja - Ukapati jednu kap emulzije u čašu sa 50 ml vode i posmatrati da li se ona meša sa vodom (U/V) ili ne (V/U).

Metoda sa kobalt papirom - Komadi filter papira

veličine 2,5×2 cm natapaju se sa 10 % rastvorom CoCl₂ i osuše se u sušnici na 105 °C dok ne poplave. Posle sušenja kobalt papir se čuva u zatvorenim staklenim posudama. Kapanjem jedne kapi emulzije na ovako pripremljen kobalt papir nastaje roza mrlja koja se postepeno uvećava ako je emulzija U/V. Kod emulzija V/U nastaje tamno plavi uljani prsten oko mrlje.

Konduktometrijska metoda - Ovom metodom se ispituje provodljivost električne struje. Merenje se vrši direktnim uranjanjem konduktometrijske ćelije u ispitivani uzorak. Očitava se vrednost električne provodljivosti (ako je specifična provodljivost manja od 1 μS/cm - V/U, ako je do 100 μS/cm to su emulzije mešovitog tipa i ako je preko 100 μS/cm to su emulzije tipa U/V).

Određivanje pH vrednosti. Merenja su vršena direktno i nakon ekstrakcije. Kod emulzije tipa ulje u vodi merenje se vrši direktno, bez posebnog pripremanja uzorka. Kod emulzije tipa voda u ulju merenje se vrši u vodenoj fazi posle ekstrakcije jednog dela uzorka sa pet delova vode. Pripremanje uzorka: u 5 g uzorka doda se 25 ml vode i zagreva 10 min na temperaturi od 60 °C, uz mešanje staklenim štapićem. Posle hlađenja odvoji se vodena faza od uljane faze.

Ispitivanje fizičke stabilnosti. Fizička stabilnost se ispituje čuvanjem preparata na -4 °C, 30 °C i 40 °C u toku 15 dana i na sobnoj temperaturi u toku 60 dana (ne bi trebalo da dođe do promene izgleda, boje, konzistencije).

Određivanje mikrobiološke ispravnosti. Metoda se zasniva na izolovanju i identifikaciji prisutnih bakterija, kvasaca i plesni u uzorku. Uzorak je zasejan na hranljivoj podlozi i inkubiran pri optimalnim uslovima. Kod proizvoda koji se mešaju sa vodom ispitivani uzorci se pripremaju tako što se u erlenmajer odmeri 10 g uzorka i pripremi se razređenje 0,1 % fiziološkim rastvorom ili puferisanim rastvorom peptona. Kod proizvoda koji se ne mešaju sa vodom odmeri se 10 g uzorka u erlenmajer sa staklenim kuglicama. Pre ispitivanja, svi čvrsti uzorci moraju se usitniti.

Postupak za utvrđivanje prisustva i izolovanje i identifikaciju mikroorganizama u skladu sa Pravilnikom [20], obuhvata:

- Određivanje ukupnog broja mezofilnih aerobnih bakterija i ukupnog broja kvasaca i spora plesni.
- Izolovanje i identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokoka.
- Izolovanje i identifikacija *Pseudomonas aeruginosa*.
- Izolovanje i identifikacija *Escherchia coli*.
- Izolovanje i identifikacija Proteus vrsta.

Metoda po Ph. Eur. 1997. daje ograničenja za prisustvo pojedinih vrsta mikroorganizama u preparatima za topikalnu primenu, izuzev za one preparate za koje se zahteva da budu sterilni: ukupan broj aeroba - ne više od ukupno 10² aerobnih bakterija i gljiva po 1 g preparata;

ne više od 10^1 entero bakterija i drugih gram negativnih bakterija po 1 g preparata; odsustvo *Pseudomonas aeruginosa* (po 1 g); odsustvo *Staphylococcus aureus* (po 1 g).

Reološka analiza. Kontinualna (rotaciona) reološka merenja izvedena su primenom rotacionog reometra upotrebom kupa - ploča mernog sistema. Ovaj aparat integrisan je sa softverskim paketom Rheocalc V3.3 Build 49-1 (Brookfield, USA) koji omogućava elektronsku kontrolu merenja i automatsku obradu dobijenih rezultata. U ovoj fazi izabrana je CSR (eng. Controlled Shear Rate) merna procedura koja podrazumeva kontinualnu promenu brzine smicanja (tj. rotiranja kupe), u zadatom mernom opsegu, pri čemu aparat ima mogućnosti da registruje kao odgovor sistema i napona smicanja i promene prividnih viskoziteta sistema. Merenja su veoma precizna i izvedena su najmanje u triplikatu za svaki uzorak, a koeficijent varijacije je bio manji od 15 %. Merenja se izvode na konstantnoj temperaturi (25 °C) što se postiže temperiranjem uz pomoć digitalnog termostatairajućeg kupatila, model TC-502 (Brookfield, USA). Upotrebljen je konus CP-52.

Antimikrobna aktivnost. Antimikrobna aktivnost biljnih ekstrakata i krema testirana je in vitro, agar-difuzionom metodom, na hranljivoj podlozi Müller-Hinton agar [21]. Ispitivani uzorci su rastvarani u dimetilsulfoksidu (DMSO). Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti korišćeni su test mikroorganizmi: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* i *Candida albicans*. Rezultati antimikrobne aktivnosti su izraženi veličinom zona inhibicije (u mm), nakon inkubacije 24 h na 37 °C. Svaki eksperiment je ponavljan dva puta.

REZULTATI I DISKUSIJA

Prema eksperimentalnom planu pripremljeno je i ispitivano pet formulacija bioaktivnih hidrantnih krema: HK₁ - hidratantna krema bez aktivnih principa, HK₂ - hidratantna krema sa ekstraktom kamilice, HK₃ - hidratantna krema sa usninskom kiselinom, HK₄ - hidratantna krema sa dekstranom sulfatom, HK₅ - hidratantna krema sa usninskom kiselinom i dekstran sulfatom. Formulacije krema su razrađene bez sintetičkih mirisa, boja i agresivnih tenzida, a za izradu je razvijen i primenjen tehnološki postupak na laboratorijskom nivou. Kvalitet polaznih komponenti i dobijenih proizvoda analiziran je u skladu sa regulativama kozmetičkih proizvoda, a sami proizvodi su podvrgnuti ispitivanju antimikrobne aktivnosti.

Tehnološki postupak izrade krema

Hidratantne bioaktivne kreme su formulisane kao tečni emulzioni sistemi za spoljašnju primenu. Hidrantna krema sa biljnim ekstraktima sastoji iz dve faze: masne i vodene faze.

Kao masna faza emulzionih sistema korišćene su sledeće sirovine: Sabowax SX, stearin, izopropil miristat, lanolin, parafinsko ulje, propil paraben i silikonsko ulje. Sabowax SX predstavlja smešu viših al-

kohola, pretežno cetil-alkohola. U koncentracijama od 2-5 % koristi se kao emolijens i kao emulgujuće sredstvo, može da poboljša stabilnost i konzistenciju preparata. Stearin, osnovna komponenta krema, je bezbojan, bez mirisa, estar glicerola i stearinske kiseline, dobijen iz životinjske masti. Isopropil miristat je emolijentno ulje, dobro se nanosi na kožu i slabo masti kožu. Koristi se za poboljšanje razmazivosti masti. Lanolin (*Lanolinum anhydricum*) predstavlja kompleksnu mešavinu estara, diestara i hidroksilisanih estara lanolinskih kiselina i po hemijskoj strukturi pripada voskovima. Dobar je emulgator za formiranje emulzija V/U tipa, što je omogućeno prisustvom slobodnih masnih alkohola, pre svega holesterola i izoholesterola. Pored emulgujućih svojstava lanolin ima emolijentna svojstva i omekšavajuće deluje na kožu. Može biti dobar korastvarač i plastifikator u određenim preparatima. Preporuka je da se lanolin u kozmetičkim proizvodima koristi u koncentraciji do 10 %. Parafinsko ulje (*Paraffinum liquidum*), bistra, bezbojna, uljasta tečnost, bez mirisa i ukusa, prečišćena je smeša viših tečnih ugljovodonika, dobijena destilacijom nafte. Propil paraben se koristi u kozmetičkim formulacijama kao konzervans u koncentraciji od 0,1 %.

Kod vodene faze, voda koja se koristi za pripremu emulzija mora biti mikrobiološki čista i za te svrhe obično se koristi demineralizovana voda. DAB 10 zahteva da se kod izrade preparata koristi sveže prokuvana voda, pri čemu se izbegava mogućnost mikrobiološke kontaminacije i istiskivanje eventualno prisutnog CO₂. U vodenu fazu kod emulzija tipa U/V neophodno je dodati humektanse (glicerol, sorbitol, propilenglikol), da bi sprečili isušivanje preparata. Kod emulzija tipa V/U mogu se dodati u malim količinama jer povećavaju relativnu gustinu vode. U vodenu fazu V/U emulzija se često dodaju i elektroliti (MgSO₄ × 7H₂O ili NaCl) jer povećavaju stabilnost sistema na višim temperaturama.

Postupak izrade krema. Odvojeno se zagreju vodena faza (70-80 °C) i lipofilne komponente (masna faza). Još na početku u pripremi vodene faze dodaju se različite koncentracije aktivnih komponentata (usninska kiselina i dekstran sulfat) u zavisnosti od formulacije i izvrši se emulgovanje tako da se topla vodena faza uz mešanje određenom brzinom, postepeno dodaje u toplu masnu fazu. Temperatura izrade ne treba da bude manja od 70 °C. Dok je smeša topla i tečna treba izvršiti homogenizaciju. Sastav masne i vodene faze prikazane su u tabelama 1 i 2, a koncentracije aktivnih komponenti koje ulaze u formulaciju kreme prikazane su u tabeli 3.

Tabela 1. Supstance koje se rastvaraju u masnoj fazi
Table 1. Substances that are dissolved in the fat phase

Supstanca	Udeo %	Uloga
Sabowax SX	6,00	Samoemulgujuća baza
Stearin	4,25	Faktor konzistencije
Izopropil miristat	5,00	Emolijens
Lanolin	3,00	Faktor konzistencije, koemulgator
Parafinsko ulje	5,00	Emolijens
Silikonsko ulje	1,00	Emolijens
Propil paraben	0,10	Konzervans
Metil paraben	0,20	Konzervans

Tabela 2. Supstance koje se rastvaraju u vodenoj fazi
Table 2. Substances that are dissolved in the aqueous phase

Supstanca	Udeo %	Uloga
Voda	69,08	Konstituent
Glicerol	5,00	Humektans
Imidazolidinil urea	0,25	Konzervans
Trilon B	0,05	Helatni agens

Tabela 3. Različite koncentracije aktivnih komponenata koje ulaze u sastav formulacija krema
Table 3. Different concentrations of active ingredients which are part of the composition of cream formulation phase

Komponente	Koncentracija (g/ml)
Usninska kiselina	0,025; 0,05; 0,15
Dekstran sulfat	0,1; 0,5; 1,0
Usninska kiselina + Dekstran sulfat	0,1 + 0,1
Ekstrakt kamilice	0,1; 0,5; 1,0
Ekstrakt kamilice + Usninska kiselina + Dekstran sulfat	0,1 + 0,1 + 0,1

Ispitivanje kvaliteta krema

Organoleptička ispitivanja. Vizuelnim pregledom se procenjuju boja, sjaj i homogenost, dok se konzistencija, razmazivost i film koji emulzija ostavlja na koži posmatra premazivanjem kože. Rezultati organoleptičkog ispitivanja su prikazani u tabeli 4.

Ispitivane formulacije svojim izgledom, homogenošću, konzistencijom i razmazivošću ispunjavaju uslove koji se postavljaju za jedan tečni emulzioni sistem. Čuvanjem uzoraka na sobnoj temperaturi, na povišenoj temperaturi (40 °C) i u frižideru (-4 °C) nije dovelo do organoleptičkih promena. Preparat je zadržao ista svojstva u toku 15 dana.

Tabela 4. Rezultati organoleptičkog ispitivanja krema
Table 4. The results of sensory testing of creams phase

Uzorak	Osobine					
	Boja	Konzistencija	Sjaj	Razmazivost	Homogenost	Film
HK ₁	bela	polučvrsta prihvatljiva	sjajna	zadovoljavajuća	homogena	-
HK ₂	bela	polučvrsta prihvatljiva	sjajna	dobra	homogena	-
HK ₃	žuta	polučvrsta prihvatljiva	sjajna	dobra	homogena	-
HK ₄	mlečno bela	meka ali nezadovoljavajuća	nema sjaja	dobra	homogena	-
HK ₅	žuta	polučvrsta prihvatljiva	sjajna	dobra	homogena	primetan

Određivanje tipa emulzije. Ispitivane formulacije krema se prema tipu emulzije mogu svrstati u emulzije tipa U/V. U ispitivanim kremama nalaze se tri emulgatora: tipa U/V (Sabowax SX), emulgator tipa U/V (stearin) i holesterol (iz lanolina) koji diktira tip emulzije V/U.

Određivanje pH vrednosti. Rezultati pH vrednosti

Tabela 5. Rezultati pH vrednosti ispitivanih uzoraka krema
Table 5. The results of pH values of the investigated cream samples

Uzorak	pH vrednost
HK ₁	5,73
HK ₂	5,76
HK ₃	5,95
HK ₄	5,80
HK ₅	5,90

Određivanje mikrobiološke ispravnosti. Mikrobiološkom analizom uzoraka hidrantnih krema utvrđeno je da ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija u 1 ml uzorka i ukupan broj kvasaca i spora plesni u 1 ml uzorka odgovara dozvoljenom broju mikroorganizama u skladu sa Pravilnikom. Utvrđeno je da u 0,1 ml uzorka patogene bakterije nisu prisutne ni u jednoj formulaciji.

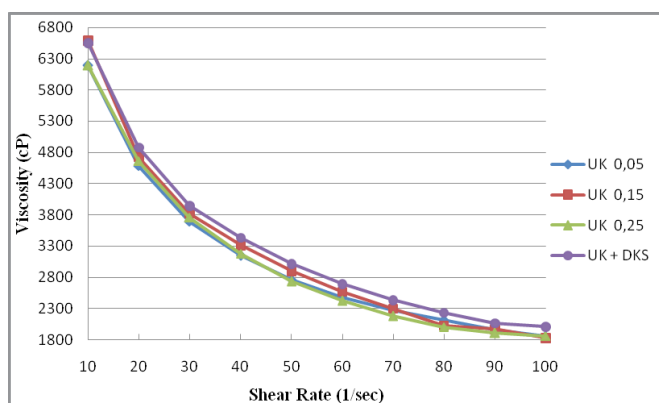
Reološka analiza

Princip kontinualnih reoloških merenja je da se na uzorak deluje određenom silom smicanja i prati ponašanje sistema pod uticajem te sile. Brzina i napon smicanja su u vezi preko koeficijenta viskoziteta ($\eta = \tau/D$) koji predstavlja otpor tečenju, odnosno otpor viskoznoj deformaciji. Na osnovu ovakvih merenja moguće je proceniti tip tečenja, graničnu vrednost sistema (napon smicanja pri kome sistem počinje da teče) i viskozitet na željenom naponu, odnosno brzini smicanja. Ako se uzorak podvrgne rastućim brzinama ili naponima smicanja (uzlazna kriva tečenja) nakon čega sledi postepeno smanjenje brzine odnosno napona smicanja (silazna kriva tečenja), vrednost brzine odnosno napona smicanja će kod tiksotropnih uzoraka biti manje na silaznoj krivoj nego na uzlaznoj. Površina između uzlazne i silazne krive tečenja je tiksotropna petlja. U praksi je prihvaćeno da je postojanje tiksotropne petlje dokaz, a njena površina merilo tiksotropije. Dakle, tiksotropija je reverzibilno, vremenski zavisno opadanje viskoziteta pri konstantnoj brzini smicanja. Tiksotropija je poželjna osobina za topikalne preparate jer omogućava lakšu primenu i razmazivost preparata.

Rezultati reoloških merenja izvođenih na kremama prikazani su na slikama 1-10. Na osnovu izvršenih reoloških analiza utvrđeno je sledeće:

Između emulzoida izrađenih sa usninskom kiselinom kao aktivnom supstancom, nema značajnih reoloških razlika, što se može videti i sa grafika zavisnosti viskoziteta u funkciji brzine smicanja (broj obrtaja konusa, slika 1).

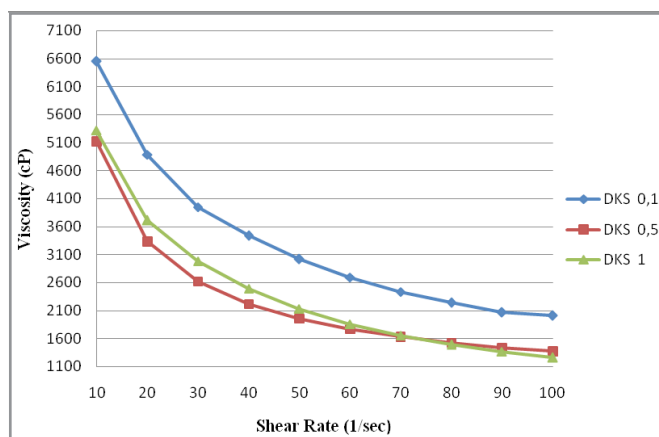
ispitivanih uzoraka krema prikazani su u tabeli 5. Zavisno od formulacije, pH vrednost se nalazi u opsegu 5,73 do 5,95. Prosečna pH vrednost uzoraka je oko 5,82 što odgovara zahtevu Pravilnika o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti predmeta opšte upotrebe koji se mogu stavljati u promet (dozvoljena pH je 3,5 - 8).



Slika 1. Viskozitet emulzoida sa usninskom kiselinom (UK) u funkciji brzine smicanja.

Figure 1. Viscosity of the emulsion with usnic acid as a function of shear rate.

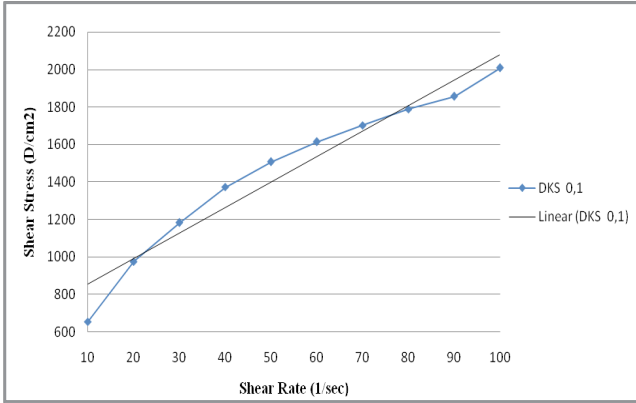
Kod emulzoida izrađenih sa dekstran sulfatom, evidentan je pad viskoziteta sa porastom koncentracije ove komponente (slika 2). Krema sa najvećom koncentracijom dekstran sulfata (1,0 g/ml) gubi polučvrstu konzistenciju i poprima konzistenciju losiona.



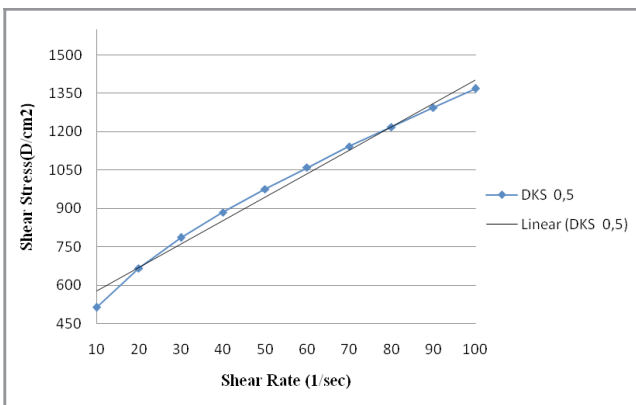
Slika 2. Viskozitet emulzoida sa dekstran sulfatom (DKS) u funkciji brzine smicanja.

Figure 2. Viscosity of the emulsion with dextran sulphate as a function of shear rate.

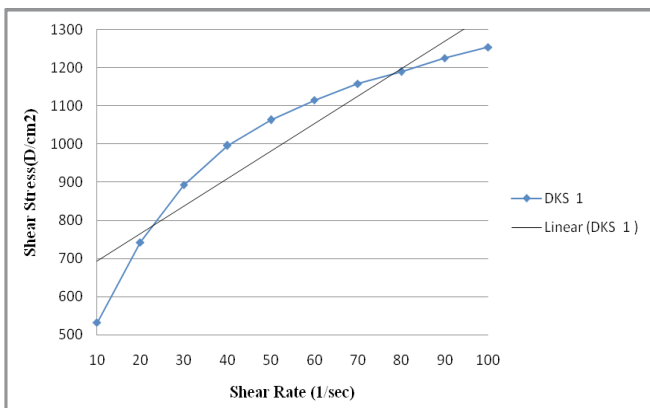
Na razlike u tendenciji tečenja ukazuju i razlike u vrednostima prinosnog napona (prinosna vrednost, *yield stress*) dobijenih ekstrapolacijom prema Casson-ovom matematičkom modelu tečenja. Reološki profili ispitivanih emulzoida prikazani su na slikama 3-10.



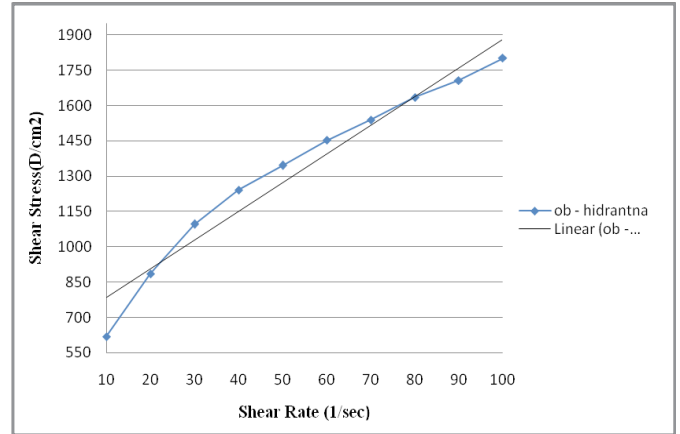
Slika 3. Reološki profil emulzoida sa dekstran sulfatom (0,1 g/ml) po Casson-u.
Figure 3. Rheological profile of the emulsion with dextran sulphate (0,1 g/ml) by Casson.
 Plastic viscosity = 689,2 Yield stress =369,6 CoF = 97,7



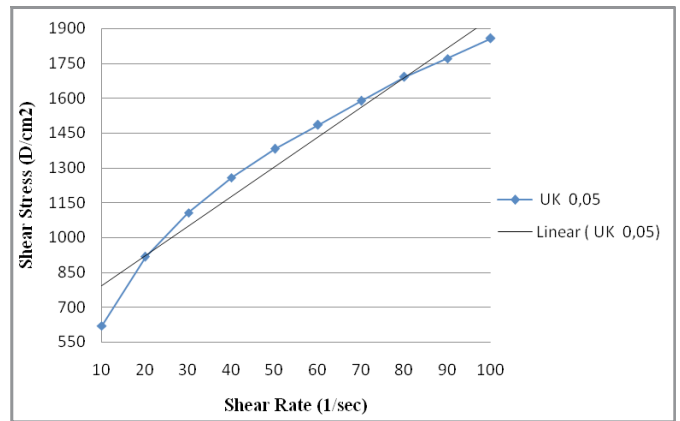
Slika 4. Reološki profil emulzoida sa dekstran sulfatom (0,5 g/ml) po Casson-u.
Figure 4. Rheological profile of the emulsion with dextran sulphate (0,5 g/ml) by Casson.
 Plastic viscosity = 427,3 Yield stress =271,8 CoF = 99,5



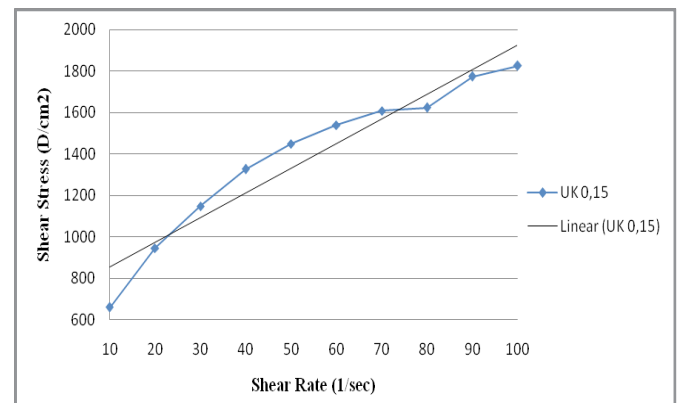
Slika 5. Reološki profil emulzoida sa dekstran sulfatom (1 g/ml) po Casson-u.
Figure 5. Rheological profile of the emulsion with dextran sulphate (1 g/ml) by Casson.
 Plastic viscosity = 450,8 Yield stress =169,7 CoF = 99,1



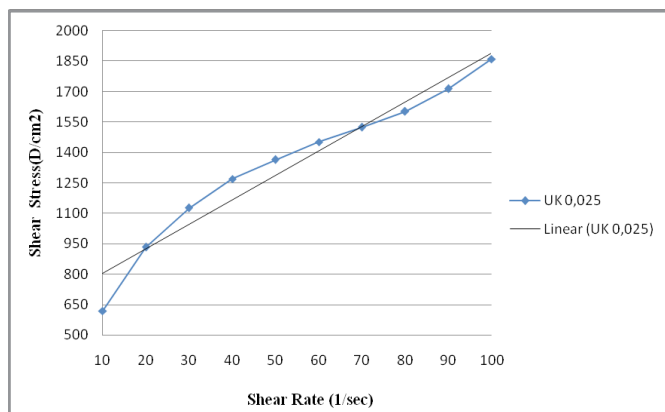
Slika 6. Reološki profil hidratantne kreme po Casson-u.
Figure 6. Rheological profile hidratanting cremes for Casson.
 Plastic viscosity = 598,3 Yield stress =351,2 CoF = 98,1



Slika 7. Reološki profil emulzoida sa usninskom kiselinom (0,05 g/ml) po Casson-u.
Figure 7. Rheological profile of the emulsion with usnic acid (0,05 g/ml) by Casson.
 Plastic viscosity = 643,5 Yield stress =344,1 CoF = 98,1



Slika 8. Reološki profil emulzoida sa usninskom kiselinom (0,15 g/ml) po Casson-u.
Figure 8. Rheological profile of the emulsion with usnic acid (0,15 g/ml) by Casson.
 Plastic viscosity = 559,6 Yield stress =404,5 CoF = 97,5

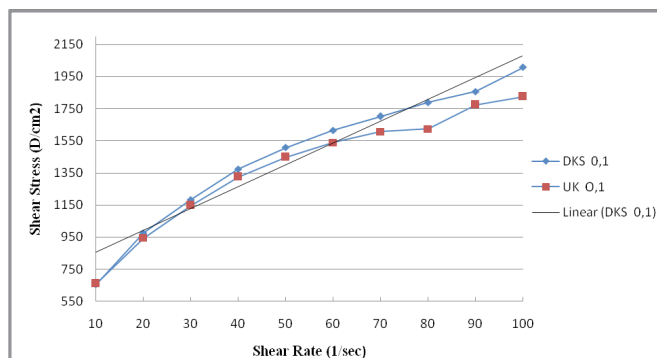


Slika 9. Reološki profil emulzoida sa usninskom kiselinom (0,025 g/ml) po Casson-u.

Figure 9. Rheological profile of the emulsion with usnic acid (0,025 g/ml) by Casson.

Plastic viscosity = 577,8 Yield stress 370,7 CoF = 97,7

Vrednosti prinosnog napona (*yield stress*) u funkciji koncentracije različitih formulacija hidratantnih krema sa usninskom kiselinom i dekstran sulfatom prikazane su u tabeli 6. Kod svih ispitivanih uzoraka utvrđeno je da sa porastom brzine smicanja viskozitet opada, što ukazuje da su u pitanju nenjutnovski sistemi sa pseudoplastičnim tečenjem (*shear - thinning*). Ovo omogućava ujednačenu i efikasnu aplikaciju topikalnih preparata na tretiranu površinu kože.



Slika 10. Reološki profil emulzoida sa kombinacijom usninske kiseline (0,1 g/ml) i dekstran-sulfata (0,1 g/ml) po Casson-u.

Figure 10. Rheological profile of the emulsion with usnic acid (0,1 g/ml) and dextran sulphate (0,1 g/ml) combination by Casson.

Plastic viscosity = 602,5 Yield stress = 379,5 CoF = 98,6

Iz prikazanih rezultata u tabeli 6, kod hidratantne kreme sa dekstran sulfatom utvrđeno je da sa porastom koncentracije aktivne supstance dekstran sulfata opada vrednost prinosnog napona. Matematičko fitovanje je izvršeno prema Casson-ovom matematičkom modelu jer je vrednost u procentima za korekcionni faktor (CoF) bila najveća za dobijeni set podataka analiziranih sistema sa dekstran sulfatom.

Tabela 6. Vrednosti prinosnog napona ispitivanih krema

Table 6. The values of the yield stress of the investigated creams

Uzorak	Koncentracije (g/ml)	Prinosni napon
Dekstran sulfat	0,1	369,6
	0,5	271,8
	1	169,7
Usninska kiselina	0,025	370,7
	0,05	344,1
	0,15	404,5
Usninska kiselina + Dekstran sulfat	0,1 + 0,1	379,5
Hidratantna krema	bez aktivnih supstanci	351,2

Antimikrobna aktivnost krema

Za određivanje antimikrobne aktivnosti krema korišćeni su uzorci sa usninskom kiselinom (0,2 g/ml) i sa ekstraktom kamilice (0,1 g/ml), a radi poređenja aktivnosti u ispitivanja su uključeni uzorci hidratantne kreme bez aktivnih supstanci (u količini 0,1 i 0,2 g/ml), kao i same aktivne supstance usninska kiselina (0,005 g/ml) i ekstrakt kamilice (0,1 g/ml). Svi ispitivani uzorci su rastvarani u DMSO. Antimikrobna aktivnost je testirana

na gram negativne bakterije (*Escherichia coli* i *Sallmonella enteritidis*), gram pozitivne bakterije (*Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*), kao i na gljivicu *Candida albicans*, agar difuzionom metodom. Rezultati antimikrobne aktivnosti ispitivanih uzoraka prikazani su u tabeli 7.

Tabela 7. Antimikrobna aktivnost ispitivanih uzoraka.
Table 7. The antimicrobial activity of the investigated samples

Uzorak	Zona inhibicije (mm)				
	Gram negativne		gljivica	Gram pozitivne	
	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
Hidratantna krema bez aktivne supstance	-	-	-	-	-
Ekstrakt kamilice	-	20	-	14	15
Usninska kiselina	26	21	36	32	40
Hidratantna krema sa ekstraktom kamilice	-	18	-	10	10
Hidratantna krema sa usninskom kiselinom	13	11	20	24	25
Hidratantna krema sa ekstraktom kamilice i usninskom kiselinom	9	10	25	26	31
Hidratantna krema sa ekstraktom kamilice, usninskom kiselinom i dekstran sulfatom	8	10	22	24	28
(-) nema inhibicije					

Iz prikazanih podataka se može uočiti da hidratantna krema bez aktivnih supstanci ne pokazuje delovanje na testirane mikroorganizme. Umereno dejstvo je pokazala hidratantna krema sa ekstraktom kamilice u slučaju testiranja na *Salmonella enteritidis* i gram pozitivne bakterije. Hidratantna krema sa usninskom kiselinom pokazuje jako delovanje na gljivicu *Candida albicans* i nagram pozitivne bakterije, dok na *Salmonella enteritidis* i *Escherichia coli* ima umereno dejstvo. Aktivna supstanca usninska kiselina je pokazala dejstvo na sve testirane mikroorganizme, a najbolju aktivnost na *Bacillus subtilis* i na gljivicu *Candida albicans*. Ekstrakt kamilice je pokazao visoku aktivnost samo na gram negativnu bakteriju *Salmonella enteritidis*, što se odrazilo i na dejstvo kreme sa ovim ekstraktom. Iz literature je poznato da ulje kamilice ima visok sadržaj alfa-bisabolola koji je zaslužan za antibakterijsku i antifungalnu aktivnost, iako tačan mehanizam delovanja ostaje i dalje nejasan [22-24]. Sinergističko dejstvo ekstrakta kamilice i usninske kiseline uočeno je u slučaju testiranja na gljivicu *Candida albicans* i gram pozitivne bakterije.

ZAKLJUČAK

Na bazi odabranih bioaktivnih komponenti (usninska kiselina, ekstrakt kamilice i dekstran sulfat) izrađene su i analizirane formulacije hidratantnih krema bez sintetičkih mirisa, boja i agresivnih tenzida. Za izradu formulacija krema razvijen je i primenjen tehnološki postupak na laboratorijskom nivou. Kvalitet polaznih komponenti i dobijenih proizvoda analiziran je u skladu sa regulativom za kozmetičke proizvode. Na osnovu mikrobiološke analize zaključeno je da su svi ispitivani uzorci mikrobiološki ispravni, odnosno, ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija i ukupan broj kvasaca i spora plesni u 1 ml uzor-

ka odgovara dozvoljenom broju mikroorganizama. Svi ispitivani uzorci formulisanih krema pokazali su dobra organoleptička svojstva. Na bazi fizičko-hemijske analize formulacija krema zaključeno je da su ispitivani parametri u skladu sa regulativom za kozmetičke proizvode. Na bazi reološke analize formulacija krema zaključeno je kod svih ispitivanih uzoraka da su u pitanju nenjutnovski sistemi sa pseudoplastičnim tečenjem (*shear - thinning*), što omogućava ujednačenu i efikasnu aplikaciju topikalnih preparata na tretiranu površinu kože. Dekstran sulfat ima negativan uticaj na pomoćne komponente kao nosače aktivnih principa, a sa porastom koncentracije dekstran sulfata opada viskoznost krema što utiče na topikalnu primenu. Najbolju antimikrobnu aktivnost na testirane mikroorganizme pokazala je krema sa usninskom kiselinom, a sinergističko dejstvo i širi spektar dejstva su utvrđeni kod kreme sa usninskom kiselinom i ekstraktom kamilice. Ova formulacija ima najbolju aktivnost na gram pozitivnu bakteriju *Bacillus subtilis* i na gljivicu *Candida albicans*. Na osnovu sprovedenih ispitivanja u ovom radu očekuje se da će dobiti rezultati, pored naučnog doprinosa, biti i od veoma praktičnog značaja za farmaceutsko-kozmetičku industriju.

ZAHVALNICA

Rezultati ovog rada su deo projekta TR 34012 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- [1] P. Romanowski, R. Schueller, Definition and Principles of Multifunctional Cosmetics, Marcel Dekker, New York, 2003.

- [2] M. Lindee, Acres of skin, The University of Chicago, Press, 2000.
- [3] N. Kovačević, Osnovi farmakognozije, Srpska školska knjiga: Beograd, Srbija i Crna Gora, 2004.
- [4] M. E. Aggag, R. T. Yossef, Study of antimicrobial activity of chamomile oil. *Planta Med.* 22 (1972) 140-144.
- [5] M. Cinco, E. Banfi, A. Tubaro. A microbiological survey on the activity of a hydroalcoholic extract of chamomile. *Int J Drug Res* 21 (1983) 145-151.
- [6] K. Stojčevski, Priručnik o lekovitim biljkama, raspoznavanje, branje i zaštita, Beograd 2011.
- [7] S. Weckessera, K. Engela, B. Simon-Haarhausa, A. Wittmerb, K. Pelzb, C. M. Schempp, Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance, *Phytomedicine* 14 (2007) 508-516.
- [8] H.J. Dorman, S.G. Deans, Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils, *J. Appl. Microbiol.* 88(2) (2000) 308-316.
- [9] V. Najdenova, K. Lisickov, Z. Đarmati, Antimicrobial activity and stability of usnic acid and its derivatives in some cosmetic products, *Kozmetika* (2001) 158-160.
- [10] M. Ash, I. Ash, Handbook of preservatives. Synapse Info Resources. (2004).
- [11] W. Knop, Chemisch-physiologische untersuchung uber die flechten, *Justus Lieb. Ann. Chem.* 49 (1844) 103-124.
- [12] M. Lauterwein, M. Oethiger, K. Belsner, T. Peterw and R. Marre. In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+) usnic acid and (-) usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(1995) 2451-2543
- [13] K. Ingólfssdóttir, Usnic acid. *Phytochemistry* 61 (2002) 729-736.
- [14] M. Ghione, D. Parello and L. Grasso, Usnic acid revisited, its activity on oral flora. *Chemioterapia* 7 (1988) 302-305.
- [15] L. Grasso, P. Chirardi, M. Ghione. Usnic acid a selective antimicrobial agent against *Streptococcus mutans*: a pilot clinical study. *Curr. Ther. Res.* 45 (1989) 1067-1070.
- [16] J. B. Hinou, C. E. Harvala and E. B. Hinou. Antimicrobial activity screening of 32 common constituents of essential oils. *Pharmazie* 44 (1989) 302-303.
- [17] J. F. Kennedy, C.A. White, Bioactive carbohydrates in chemistry, and biology, Ellis Horwood Limited, Chichester, England (1983).
- [18] P. Kent, M. Hichens, P. Ward, Displacement fractionation of deoxyribonucleoproteins by heparin and dextran sulphate. *Biochem. J.* 68 (1958) 568-570.
- [19] Ph. Jug. IV Farmakopeja SFRJ, Pharmacopoea Jugoslavica, Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu, Beograd, 1984.
- [20] Pravilnik o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti predmeta opšte upotrebe koji se mogu stavljati u promet, "Sl. list SRJ", br. 46 i 18/91.(1983).
- [21] D. Brown, D. Edwards, P. Hawkey, D. Morrison, G. Ridgway, K. Towner, M. Wren, Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56 (2005) 1000-1018.
- [22] I. Szelenyi, O. Isaac, K. Thiemer, Pharmacological experiments with compounds of chamomile.III. Experimental studies of the ulcerprotective effect of chamomile (author's transl). *Planta Med* 35 (1979) 218-227.
- [23] O. Isaac, Pharmacological investigations with compounds of chamomile i. on the pharmacology of (-)-alpha-bisabolol and bisabololoxides: *Review*, (author's transl). *Planta Med* 35 (1979) 118-124.
- [24] O. Isaac, K. Thiemer, Biochemical studies on chamomile components/III. *In vitro* studies about the antipeptic activity of alpha - bisabolol. *Arzeimforshchung* 25 (1975) 1352-1354.

Summary

THE DEVELOPMENT AND TESTING OF ANTISEPTIC BIOACTIVE COSMETIC FORMULATION

Slobodan Glišić, Milorad Cakić, Nebojša Cekić, Goran Nikolić

University of Niš, Faculty of Technology, Leskovac, Serbia

(ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER)
UDC 615.454.1:615.322:547.296

The development and testing of new bioactive cosmetic formulations in the form of creams with antiseptic properties, based on natural (lichen *Usnea barbata* L. and chamomile flowers extracts, *Matricaria recutita* L.) and synthetic (dextran sulphate) components with proven bioactive properties are the subject of this paper. The formulations were designed in terms of knowing the biochemical processes of the skin. The bioactive compounds were used to exhibit physiological, microbiological and pharmacological effects in order to prove their effects on the function of the skin. In the quality control of the cream, physicochemical methods in accordance with the regulations for cosmetics were applied. In order to determine the type of the product flow, for better application on the skin, rheological tests were applied. Bioactive creams were investigated in terms of determining the efficiency and safety of the topical application on the skin. The efficiency of the product was determined by antimicrobial tests. The knowledge of the characteristics of cosmetic active substances and their action mechanism made it possible to carry out the optimization formulation in terms of functionality of the skin care and treatment preparations, in order to achieve better control of their activities and a targeted action on a specific skin region.

Keywords: bioactive cream, usnic acid, chamomile, dextran sulphate