

Invenția se referă la domeniul farmaceutic, în special la o cremă antimicrobiană și antioxidantă pentru tratamentul afecțiunilor cutanate inflamatorii.

Este cunoscută în practica medicală medicația topică antibacteriană și antifungică utilizată la tratarea infecțiilor de piele primare și secundare [1].

Dezavantajul utilizării ei constă în aceea că substanțele active sunt produse sintetice și prezintă un șir de reacții adverse ca reacții alergice, prurit, eritem etc., fapt care limitează aplicabilitatea lor.

Sunt cunoscute cremele cosmetico- dermatologice pe baza extractelor de polifenoli naturali. Polifenolii extrași din semințele de struguri sunt recunoscuți pentru proprietățile lor antimicrobiene, care sunt în dependență de valorile activităților lor antioxidante [2].

Dezavantajul acestei soluții constă în ceea ce majoritatea produșilor polifenolici extrași din semințe de struguri prezintă proprietăți antimicrobiene și antioxidante neînsemnate și au un caracter lipofilic, ceea ce limitează aplicabilitatea lor pentru prepararea cremurilor sau presupune utilizarea unor stabilizatori și solvenți cu toxicitate ridicată.

În calitate de cea mai apropiată soluție pot fi considerate soluțiile de taninuri hidrosolubilizate tratate cu peroxid de hidrogen (Enoxil), care manifestă proprietăți antimicrobiene și antioxidante [3].

Dezavantajul celei mai apropiate soluții constă în aceea că nivelul activității antioxidante nu este unul înalt, de asemenea în timp se observă o diminuare al acestei activități, ceea ce confirmă o stabilitate redusă a proprietăților antioxidante al soluțiilor de taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen și implicit micșorarea proprietăților lor terapeutice.

Problema rezolvată de invenție constă în prepararea unei creme pe bază de substanțe biologice active de origine naturală cu preț de cost redus, proprietăți antimicrobiene și antioxidante amplificate și stabile în timp.

Conform invenției, crema revendicată conține: enotanină tratată cu peroxid de hidrogen, unt de cacao, ceară, alcool cetilic, cetearat 20, izopropil miristat, glicerină, apă purificată, luate în următorul raport, în % mas.:

enotanină tratată cu peroxid de hidrogen	1,5...2,0
unt de cacao	12,0...14,0
ceară	16,0...18,0
alcool cetilic	5,0...7,0
cetearat 20	1,5...2,0
izopropil miristat	8,0...10,0
glicerină	22,0...24,0
apă purificată	24,0...26,0.

Avantajul cremei elaborate constă în aceea că ea prezintă activități antioxidante superioare decât sub formă de soluție la aceleași valori ale concentrațiilor. Proprietățile antioxidante ale cremei se manifestă la același nivel după 30 și 60 de zile de la prepararea ei, pe când în formă de soluție se observă o diminuare în timp al acestei activități, ceea ce denotă activități terapeutice mai stabile a cremei propuse. Aceasta se datorează interacțiunii reciproce a compușilor din taninurile hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen cu componenții de bază a cremei. Obținerea produsului pe bază de cremă este benefică atât din punct de vedere terapeutic, cât și din punct de vedere comercial, ea având un preț mult mai redus față de alte cremuri cu proprietăți antimicrobiene.

Rezultatul tehnic al invenției constă în aceea că sporul activității antioxidante a cremei față de soluțiile de enotaninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen este de 11,19...28,74% la aceleași valori ale concentrațiilor substanței active(Enoxil). De asemenea, cremurile cu diferite concentrații de Enoxil prezintă proprietăți antioxidante superioare soluțiilor de Enoxil cu 21,21...39,62% peste 30 de zile și de 30,19...49,12 % peste 60 de zile de la prepararea acestor forme medicamentoase.

Exemplu de realizare a invenției

La prepararea cremei, inițial a fost preparată faza uleioasă obținută la amestecarea următorilor componenți: unt de cacao, ceară și izopropil miristat, după care a fost adăugat alcoolul cetilic și Cetearat-20. Faza uleioasă a fost supusă încălzirii la 60...70°C.

Taninurile hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen în cantitate de 1...2 g sunt omogenizate în soluție apoasă apă-glicerină care mai apoi, conform metodei de amestecare a fazei apoase și celei uleioase după încălzirea ambelor faze în mod separat la 60°C(Linda Ed Felton, Remington: Essentials of Pharmaceutics. Retrieved from <http://books.google.com>, 2013 pp.452), este obținută crema în concentrația de 2% de masă de taninuri modificate.

Componenții de baza a cremei: taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, unt de cacao, ceară, alcool cetilic, cetearat-20, izopropil miristat, glicerină, apă purificată.

În calitate de compus emolient a fost utilizată cearea, untul de cacao și compusul izopropil miristat. Acești compuși nu sunt toxici și nu exercită reacții adverse.

Printre proprietățile remarcabile ale untului de cacao se menționează stabilitatea lui în produsul cosmetic, proprietatea de a penetra profund, a calma și catifela pielea. Untul de cacao este indicat pentru profilaxia primelor semne de îmbătrânire a pielii. Fiind bogată în vitamine și minerale oferă cantitatea necesară de nutrienți naturale precum Vitamina E.

Glicerina este pe larg utilizată în industria cosmetică în calitate de agent de umectare și emoliere a pielii, ajută la hidratarea pielii și menținerea stratului uleios pe suprafața pielii.

În calitate de surfactant a fost utilizat alcoolul cetilic pentru a nu permite separarea fazelor și distrugerea emulsiei. În calitate de agent de solubilizare și îmbunătățirea penetrării barierei epidermice a substanței active Enoxil este utilizat Cetearth-20, întrebuițat la prepararea cremelor cosmetice.

Compoziția finală, % de masă:

enotanină tratată cu peroxid de hidrogen	1,5...2,0
unt de cacao	12,0...14,0
ceară	16,0...18,0
alcool cetilic	5,0...7,0
cetear 20	1,5...2,0
izopropil miristat	8,0...10,0
glicerină	22,0...24,0
apă purificată	24,0...26,0.

Exemplu 1

Testarea activității antimicrobiene a cremurilor

Metoda difuziei în agar a fost eficient utilizată pentru această determinare. Aproximativ 0,2 ml de suspensii microbiene standardizate pentru testare s-au amestecat cu 20 ml de agar topit pentru a conferi o densitate a populației microbiene de 10⁶ UFC ml⁻¹. Agarul însămânțat a fost aseptizat în vase Petri sterile și lăsat să se solidifice. Ulterior au fost efectuate godeuri în agarul uscat cu diametru de 8,0 mm, folosind o baghetă sterilă. Astfel 0,1 g de cremă sau unguent au fost introduse în aceste cupe folosind spatule sterile. S-a lăsat un timp de pre-incubare de 2 ore la temperatura camerei pentru difuzia cremei. Ulterior, plăcile au fost incubate la 37°C timp de 24 ore și 30°C timp de 48 h pentru bacterii și fungii *C. albicans*, respectiv. Diametrele obținute ale zonelor de inhibiție după incubare au fost măsurate în milimetri.

Tabel 1

Rezultatele obținute la testarea activității antimicrobiene a cremei cu enotaninuri nemodificate și cremei cu taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen

Denumirea produsului	Diametrul zonei de inhibiție pentru fiecare cultură de m/o testat, mm			
	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>C.albicans</i>
Cremă cu enotaninuri nemodificate	10,0	8,0	8,0	8,5
Cremă cu taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen	14,0	11,0	11,0	14,5

Conform datelor din tabel se observă că sporul activității antimicrobiene a cremei cu Enoxil în raport cu soluția cea mai apropiată este de 40; 37,5; 37,5% față de speciile de bacterii *S.aureus*, *P.aeruginosa* și *E.coli*, respectiv și de 70% față de specia de fungi *C.albicans*.

Exemplul 2

Testarea activității antioxidante a cremurilor

Pentru determinarea activității antioxidante a cremei cu taninurile nemodificate și cremei cu taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen au fost utilizate metoda cation a radicalului ABTS și testul DPPH. Aceste metode au fost selectate datorită timpului scurt de analiză, utilizarea minimumului de reagenți, simplitatea și exactitatea interpretării datelor obținute conform repetițiilor efectuate.

Conform principiul metodei elaborate de (Roberta Re et. al. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine, Vol. 26, Nos. 9/10, 1999, pp. 1231–1237) cation-radicalul de ABTS+ este produs prin reacția dintre ABTS+ (soluție de 7 mM) și persulfatul de potasiu (2.45 mM; concentrația finală), timp de 12-16 ore la în tunic la temperatura camerei. Soluția de ABTS+ (2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonic acid)) obținută este diluată cu etanol de 70 % pînă la $A = 0,700 \pm 0,020$ determinată la 734 nm. Introducerea a 30 μ l de antioxidant la 3 ml de ABTS+ trebuie să producă o inhibiție de 20-80% față de soluția martor inițială. Timpul interacțiunii radicalilor cu antioxidant este de 1 min și 6 min. Procentul de inhibiție (%) se calculează conform relației:

$$\% \text{ inhibiție} = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100,$$

unde A_0 – absorbanta soluției ABTS martor, înregistrată la 1 min; A_i – absorbanta soluției ABTS după interacțiunea cu antioxidant, înregistrată la 1 min; Fiecare probă se efectuează de 3 testări consecutive. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2. Activitatea antioxidantă a fost determinată și exprimată în % de inhibiție față de soluția inițială. Astfel crema cu enotaninuri nemodificate are 4.18% de inhibiție, ceea ce denotă capacitatea slabă de reducere a radicalilor liberi. La adăugarea în cremă a taninurilor hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen obținem 56,46% de inhibiție, fapt ce ar caracteriza crema cu taninuri hidrosolubilizate chimic ca un produs cosmetic cu proprietăți antioxidante amplificate.

Determinarea capacității antioxidante a cremei cu enotaninuri nemodificate și cu enotaninuri hidrosolubilizate chimic prin testul DPPH a fost executată conform principiul de lucru utilizată de (Rodrigo Scherer, Helena Teixeira Godoy. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. Food Chemistry 112, 2009, pp. 654–658): la 3,9 ml de soluție etanolică de 70% de DPPH• cu concentrația inițială de 60 μM, s-a adăugat 0,1 ml de soluție de antioxidant. Densitatea optică s-a măsurat la lungimea de undă de 517 nm peste 30 și 90 minute la spectrofotometrul T80, în cuve de cuarț cu lățimea de 1 cm.

Timpul interacțiunii radicalilor cu antioxidant este de 30 min și 60 min. Procentul de inhibiție (%) se calculează conform relației:

$$\% \text{ inhibiție} = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100,$$

unde A₀ – absorbanta soluției DPPH martor, înregistrată la 30 min; A_i - absorbanta soluției DPPH după interacțiunea cu antioxidant, înregistrată la 30 min; pentru fiecare probă se efectuează câte 3 testări consecutive. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3.

Tabelul 2

Determinarea activității antioxidante a cremei inițiale și a cremei cu taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, exprimat în procent de inhibiție a radicalilor liberi prin metoda ABTS

Probele testate în 3 repetiții	Crema cu enotaninuri nemodificate, % inhibiție	Probele testate în 3 repetiții	Crema cu taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, % inhibiție
Proba 1	4.1	Proba 1	56.3
Proba 2	4.3	Proba 2	56.6
Proba 3	4.15	Proba 3	56.5

Conform rezultatelor prezentate se observă că procentul inhibiției radicalilor liberi de către crema cu taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen prezintă rezultate superioare celei cu enotaninuri nemodificate cu aproximativ 52,3%.

Tabelul 3

Determinarea activității antioxidante a cremei cu enotaninuri nemodificate și a cremei cu taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, exprimată în procent de inhibiție a radicalilor liberi prin testul DPPH

Probele testate în 3 repetiții	Crema cu enotaninuri, % inhibiție	Probele testate în 3 repetiții	Crema cu taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, % inhibiție
Proba 1	3.9	Proba 1	55.9
Proba 2	3.8	Proba 2	56.1
Proba 3	4.1	Proba 3	56.3

Conform rezultatelor prezentate se observă că procentul inhibiției radicalilor liberi de către crema cu taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen prezintă rezultate superioare celei cu enotaninuri nemodificate cu aproximativ 52,16%.

De asemenea, s-au efectuat studii comparative ale aprecierii activității antioxidante (conform metodei ABTS și testului DPPH) a cremurilor și soluțiilor la diferite concentrații de taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen (Tabele 4, 5)

Tabel 4

Determinarea activității antioxidante a cremei cu concentrații diferite de taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, exprimată în procent de inhibiție a radicalilor liberi prin metoda ABTS

Concentrația taninurilor hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, %	Soluția taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, % inhibiție	Crema cu taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, % inhibiție
2%	50.2±0.3	56.5±0.2
1%	39.4±0.2	44.3±0.1
0,5%	31.1±0.2	39.8±0.2
0,25	22.2±0.2	26.4±0.3

Calculul exprimă media a 3 măsurări și eroarea mediei.

Tabel 5

Determinarea activității antioxidante a cremei cu concentrații diferite de taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, exprimată în procent de inhibiție a radicalilor liberi prin testul DPPH

Concentrația taninurilor hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, %	Soluția de taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, % inhibiție	Crema cu taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, % inhibiție
2%	50.1±0.1	56.1±0.2
1%	38.7±0.3	44.1±0.3
0,5%	30.8±0.3	39.9±0.3
0,25	21.8±0.2	26.2±0.1

Calculul exprimă media a 3 măsurări și eroarea mediei.

Evaluând datele prezentate în Tabelele 4 și 5, putem concluziona că taninurile hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen sub formă de cremă manifestă proprietăți antioxidante superioare decât sub formă de soluție la aceleași valori ale concentrațiilor substanței active.

Proprietățile antioxidante ale cremei se manifestă la același nivel după 30 și 60 de zile de la prepararea ei, pe când în formă de soluție se observă o diminuare în timp al acestei activități, ceea ce denotă activități antioxidante mai stabile a cremei propuse (Tabele 6,7)

Tabel 6

Determinarea activității antioxidante a cremei cu concentrații diferite de taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, exprimată în procent de inhibiție a radicalilor liberi prin metoda ABTS, după de 30 zile

Concentrația taninurilor hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, %	Soluția de taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, % inhibiție 30 de zile	Crema cu taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, % inhibiție 30 de zile
2%	45.08±0.1	54.69±0.3
1%	35.30±0.1	42.79±0.3
0,5%	27.61±0.3	38.55±0.3
0,25	19.90±0.3	25.57±0.2

Tabel 7

Determinarea activității antioxidante a cremei cu concentrații diferite de taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, exprimată în procent de inhibiție a radicalilor liberi prin metoda ABTS, după de 60 zile

Concentrația taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, %	Soluția de taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, % inhibiție 60 de zile	Crema cu taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, % inhibiție 60 de zile
2%	41.57±0.2	54.12±0.2
1%	32.54±0.1	44.10±0.3
0,5%	25.59±0.1	38.16±0.3
0,25	18.29±0.1	25.30±0.3

Stabilitatea antioxidantă superioară a formei noi elaborate se datorează interacțiunii reciproce a compușilor din taninurile hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen cu componenții de bază a cremei.