



MD 4290 B1 2014.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4290** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *A61K 9/06* (2006.01)
A61K 36/87 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2013 0054 (22) Data depozit: 2013.08.05	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2014.07.31, BOPI nr. 7/2014
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: GONȚA Alexandru, MD; LUPAȘCU Lucian, MD; ȚÂMBALIUC Nina, MD; LUPAȘCU Tudor, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) Cremă antimicrobiană și antioxidantă pentru tratamentul afecțiunilor cutanate inflamatorii

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la domeniul farmaceutic, în special la o cremă antimicrobiană și antioxidantă pentru tratamentul afecțiunilor cutanate inflamatorii.

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

2	
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

Revendicări: 1

MD 4290 B1 2014.07.31

(54) Antimicrobial and antioxidant cream for the treatment of inflammatory skin diseases

(57) Abstract:

1
The invention relates to the field of pharmaceuticals, particularly to an antimicrobial and antioxidant cream for the treatment of inflammatory skin diseases.

According to the invention, the claimed cream contains: enotantin treated with hydrogen peroxide, cocoa butter, wax, cetyl alcohol, cetareth 20, isopropyl myristate, glycerin, purified water, taken in the following ratio, mass %:

2		
	enotantin treated with hydrogen peroxide	1.5...2.0
	cocoa butter	12.0...14.0
	wax	16.0...18.0
	cetyl alcohol	5.0...7.0
	cetareth 20	1.5...2.0
	isopropyl myristate	8.0...10.0
	glycerin	22.0...24.0
	purified water	24.0...26.0.

Claims: 1

(54) Антимикробный и антиоксидантный крем для лечения воспалительных заболеваний кожи

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к области фармацевтики, в частности к антимикробному и антиоксидантному крему для лечения воспалительных заболеваний кожи.

Согласно изобретению, заявленный крем содержит: энотанин обработанный перекисью водорода, масло какао, воск, цетиловый спирт, цетеарет 20, миристант изопропиловый, глицерин, очищенную воду, взятые в следующем соотношении, масс. %:

2		
	энотанин обработанный перекисью водорода	1,5...2,0
	масло какао	12,0...14,0
	воск	16,0...18,0
	цетиловый спирт	5,0...7,0
	цетеарет 20	1,5...2,0
	миристант изопропиловый	8,0...10,0
	глицерин	22,0...24,0
	очищенная вода	24,0...26,0.

П. формулы: 1

Descriere:

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

5 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.

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

15 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 cremelor 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].

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

Problema pe care o rezolvă invenția revendicată 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.

25 Conform invenției, crema revendicată conține: enotanină tratată cu peroxid de hidrogen, unt de cacao, ceară, alcool cetilic, cetearet 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
cetearet 20	1,5...2,0
izopropil miristat	8,0...10,0
glicerină	22,0...24,0
apă purificată	24,0...26,0.

30 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 și după 30 și 60 de zile de la prepararea ei, pe când sub formă de soluție se observă o diminuare în timp a 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 ai cremei. Produsul sub formă de cremă este benefic atât din punct de vedere terapeutic, cât și din punct de vedere comercial, având un preț mult mai redus față de alte creme cu proprietăți antimicrobiene.

35 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, cremele cu diferite concentrații de Enoxil prezintă proprietăți antioxidante superioare soluțiilor de Enoxil cu 21,21...39,62% peste 30 de zile și 30,19...49,12% peste 60 de zile de la prepararea acestor forme medicamentoase.

Exemplu de realizare a invenției

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

Taninurile hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, în cantitate de 1...2 g, au fost omogenizate în soluție apoasă apă-glicerină, 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 p. 452), obținându-se crema cu concentrația de 2% de masă de taninuri modificate.

Compoziția de bază ai cremei: taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, unt de cacao, ceară, alcool cetilic, cetearet-20, izopropil miristat, glicerină, apă purificată.

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

10 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 bogat în vitamine și minerale oferă cantitatea necesară de substanțe nutritive 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 și la menținerea stratului uleios pe suprafața acesteia.

În calitate de surfactant a fost utilizat alcoolul cetilic pentru a nu permite separarea fazelor și distrugerea emulsiei.

15 În calitate de agent de solubilizare și pentru îmbunătățirea penetrării barierei epidermice a substanței active Enoxil, la prepararea cremelor cosmetice se utilizează cetearet-20.

Compoziția finală, % de masă:

enotanınă 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
cetearet 20	1,5...2,0
izopropil miristat	8,0...10,0
glicerină	22,0...24,0
apă purificată	24,0...26,0.

Exemplul 1

Testarea activității antimicrobiene a cremelor

20 Metoda difuziei în agar a fost eficient utilizată în acest scop. 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 10^6 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 diametrul de 8,0 mm, folosind o baghetă sterilă. Astfel 0,1 g de cremă sau unguent au fost introduse în aceste

25 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 la 30°C timp de 48 ore pentru bacteriile și fungii *C. albicans*, respectiv. Diametrele zonelor de inhibiție după incubare au fost măsurate în milimetri.

Tabelul 1

30 Rezultatele obținute la testarea activității antimicrobiene a cremei cu enotanınuri 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 enotanınuri 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

35 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 respectiv, *E.coli*, și de 70% față de specia de fungi *C.albicans*.

Exemplul 2

Testarea activității antioxidante a cremelor

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
5 minimului de reagenți, simplitatea și exactitatea interpretării datelor obținute conform repetițiilor efectuate.

Conform 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, p. 1231–1237) cation-radicalul de ABTS⁺ este produs prin reacția dintre ABTS⁺ (soluție de 7 mM) și
10 persulfatul de potasiu (2,45 mM; concentrația finală), timp de 12...16 ore la întuneric la temperatura camerei. Soluția de ABTS⁺ (2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonic acid)) obținută este diluată cu etanol de 70% până la A = 0,700 ± 0,020 determinată la 734 nm. Introducerea a 30 μl 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
15 (%) se calculează conform relației:

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

unde A₀ este absorbanta soluției ABTS martor, înregistrată la 1 min; A_i – absorbanta soluției ABTS după interacțiunea cu antioxidantul, înregistrată la 1 min. Pentru fiecare probă s-au efectuat cate 3
20 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 principiului de lucru utilizat de (Rodrigo Scherer, Helena Teixeira Godoy. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. Food Chemistry 112, 2009, p. 654–658): la 3,9 ml de soluție etanolică de
25 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 min 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
30 (%) se calculează conform relației:

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

unde A₀ este absorbanta soluției DPPH martor, înregistrată la 30 min;
35 A_i – absorbanta soluției DPPH după interacțiunea cu antioxidantul, înregistrată la 30 min; pentru fiecare probă , s-au efectuat câte 3 testări consecutive. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3.

Tabelul 2

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

Probele testate în 3 repetiții	Crema cu enotaninuri nemodificate, % inhibiție	Probele testate in 3 repetiții	Crema cu taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, % inhibiție
Proba 1	4,10	Proba 1	56,3
Proba 2	4,30	Proba 2	56,6
Proba 3	4,15	Proba 3	56,5

Conform rezultatelor prezentate se observă că procentul inhibiției radicalilor liberi de către
45 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 procente de inhibiție a radicalilor liberi prin testul DPPH

5

Probele testate in 3 repetiții	Crema cu enotaninuri, % inhibiție	Probele testate in 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%.

10

De asemenea, s-au efectuat studii comparative pentru aprecierea activității antioxidante (conform metodei ABTS și testului DPPH) a cremelor și soluțiilor la diferite concentrații de taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen (tabelele 4, 5).

Tabelul 4

15

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

Concentrația taninurilor hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, %	Soluția cu 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.

20

Tabelul 5

Determinarea activității antioxidante a cremei cu concentrații diferite de taninuri hidrosolubilizate chimic cu peroxid de hidrogen, exprimată în procente 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
---	--	--

MD 4290 B1 2014.07.31

	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.

5 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 și după 30 și 60 de zile de la prepararea ei, pe când sub formă de soluție se observă o diminuare în timp a acestei activități, ceea ce denotă activități antioxidante mai stabile a cremei propuse (tabelele 6,7).

10

Tabelul 6

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

Tabelul 7

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

Concentrația taninurilor 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

	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 ai cremei.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. RU 2323729 C1 2008.05.10
2. Cristoph Schempp M. , Timo Windeck, Svea Hezel and Jan Simon C. Topical treatment of dermatites wjth St. johns ort cream - randomized, placebo controlled, double blind half-side comparison. Phytomedicine 10, 2003, Supliment IV, p.31-37
3. LUPAȘCU Lucian. Teză de doctor în medicină. Activitatea antimicrobiană și antioxidantă a preparatului autohton Enoxil. Chișinău 2011.06.07, găsit în internet pe 2014.05.15
< URL: http://www.cnaa.md/files/theses/2011/19783/lucian_lupascu_abstract.pdf >

(57) Revendicări:

Cremă antimicrobiană și antioxidantă pentru tratamentul afecțiunilor cutanate inflamatorii care conține: enotantină tratată cu peroxid de hidrogen, unt de cacao, ceară, alcool cetilic, cetear 20, izopropil miristat, glicerină, apă purificată, luate în următorul raport, în % mas.:

enotantină 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.

Director adjunct Departament:

GROSU Petru

Examinator:

IUSTIN Viorel

Redactor:

LOZOVANU Maria