

Invenția se referă la domeniile cosmetic și farmaceutic, și anume la preparate cu efect cheratolitic, care pot fi utilizate în tratamentul cheratozelor de diferită etiologie și în exfolierea blândă în cadrul tratamentelor cosmetice.

Există două grupuri de preparate cu efect cheratolitic - de sinteză chimică și de origine naturală. Dintre cele mai cunoscute preparate cheratolitice obținute prin sinteză chimică este rezorcina (benzen-1,3-diol; $C_6H_4(OH)_2$). Această substanță în concentrație de 5-10% are efect cheratolitic și de cauterizare a stratului cornos al pielii [1]. Neajunsul acestui preparat constă în faptul că pielea absoarbe activ substanța, iar aplicarea pe suprafețe mari sau în concentrații mari poate provoca efecte adverse pronunțate: amețeli, tinitus, transpirație, dificultăți de respirație, ritm cardiac accelerat, convulsii, cianoză ș.a. De asemenea, rezorcina atribuie o nuanță roșietică pronunțată părului blond, iar în cazul unui nivel insuficient de purificare a rezorcinei pielea pe locul aplicării obține o nuanță mov.

Sunt cunoscute mai multe preparate de origine naturală cu efect cheratolitic. De exemplu, este cunoscută o compoziție pentru îngrijirea pielii, care acționează în baza a trei enzime proteolitice care asigură eliminarea celulelor moarte și renovarea epidermei. Această compoziție se obține prin combinarea a trei enzime proteolitice - o tiol protează, o serin protează primară, derivată din procesele metabolice ale *Aspergillus melleus*, și o serin protează secundară. Afară de aceasta preparatul mai include un alfa hidroxiacid de origine vegetală, obținut prin extragere din plante, precum și un antioxidant, care, de asemenea, poate fi de origine vegetală, ori sintetică [2].

Dezavantajul acestui preparat constă în prețul înalt al produsului finit, care este determinat de obținerea a trei tipuri de enzime proteolitice cu un grad înalt de puritate, precum și în potențialul iritativ înalt al preparatului, determinat de componența lui, în special de prezența alfa hidroxiacizilor. De asemenea, acest preparat nu conține componente, care facilitează procesul de refacere a pielii pe locurile, care au fost afectate de cheratoze.

Mai este cunoscut un preparat biologic pentru lezarea alunițelor, nevilor, polipilor, cheloizilor, carcinoamelor și a altor formațiuni cutanate [3]. Acest preparat biologic este constituit din 51,7-52,0% de proteină specifică, care conține 10% de substanță biologic activă, ce are la bază aminoacizii: Gly, Asp, Ley, Pir, Fen, Liz, împreună cu lanolină 25%, glicerină 25%, lapte praf 25%, extract de nucă 10%, nipagin 0,12%, nipasol 0,08%, apă bidistilată 4,8%, procentele fiind exprimate în greutate. Pentru obținerea preparatului se realizează colectarea pupelor de *Lymantria dispar* din pădurile infestate.

Dezavantajul acestui preparat constă în aceea că materialul biologic este obținut prin colectare din natură, în așa mod, fiind imposibil controlul asupra componenței substanței active. Afară de aceasta, colectarea materialului biologic din natură nu permite de a planifica un anumit volum de producere, fiind dependentă de condițiile de mediu și de fluctuațiile numerice a speciei *Lymantria dispar*.

Se mai cunoaște un procedeu de obținere a unui complex de origine entomologică în propilenglicol cu acțiune cheratolitică, care se obține din insecte din ordinul Lepidoptera, familia Pyralidae, genurile *Galleria*, *Asopia* sau *Aglossa*, conține subtilizină, polizaharide de tipul chitosanului, aminoacizi și propilenglicol, și manifestă o activitate cheratolitică de 46,5-51,0 U/ml. Procedeu de obținere a acestui complex entomologic constă în aceea că se cresc insecte din genurile *Galleria*, *Asopia* sau *Aglossa* pe diferite medii nutritive artificiale, apoi se colectează larvele de ultima vârstă, se spală, se dezinfectează cu raze UV și se mojarază. Biomasa obținută se liofilizează și se extrage cu apă bidistilată timp de 2-8 ore, apoi extractul se separă prin decantare, se concentrează, se adaugă propilenglicol și se evaporă apa. Complexul activ se aplică pentru fabricarea produselor farmaceutice cu acțiune cheratolitică sub formă de unguent și de gel și a produselor cosmetice cu acțiune cheratolitică sub formă de cremă, loțiune tonică și de curățare și sub formă de gel exfoliant [4].

Dezavantajul acestui procedeu constă în aplicarea unor medii nutritive foarte complexe, alcătuit din peste 30 de componente. De exemplu, pentru creșterea insectelor din genul *Galleria* mediul conține extract din porumb galben, extract din porumb roșu, glucoză, fructoză, sucroză, maltoză, cazeină, retiol, tocoferol acetat, vitamina C, riboflavina, pantotenat de calciu, tiamină, piridoxină, biotină, niacină, pinobanksin, pinocembrin, glicerol, $NaNO_3$, KH_2PO_4 , $NaCl$, $CaCl_2$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, EDTA, ceară galbenă, apă purificată. De asemenea, biomasa de larve este colectată imediat după năpârlire, perioadă, când cantitatea de enzime cu efect cheratolitic scade ca rezultat al utilizării lor în procesul de eliminare a scheletului extern vechi.

Cea mai apropiată soluție de obiectul invenției îl constituie un procedeu de obținere a biomasei de larve de *Galleria mellonella* cu activitate cheratolitică înaltă. Procedeu constă în creșterea larvelor de *Galleria mellonella* la temperatura de 27°C și umiditatea de 75% timp de 19 zile cu transferul larvelor de cel puțin 2 ori pe un mediu nutritiv proaspăt compus din făină de grâu, făină de porumb, tărâțe de grâu, extract de drojdie, lapte praf, miere de albine, glicerol, pulbere de ceară, pinobanksin, pinocembrin, apă purificată [5].

Neajunsul acestui procedeu constă în aceea că se utilizează larve de vârstă a 6-a, care este penultima în ciclul vital normal al insectei, masa larvelor fiind mai mică față de cea maxim posibilă și deci, și activitatea cheratolitică este sub nivelul maximal posibil.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unui complex entomologic cu o cantitate mai mare de biomasă și o activitate cheratolitică mai înaltă.

Problema se rezolvă prin procedeu de obținere a complexului entomologic cu activitate cheratolitică, care constă în creșterea larvelor de *Galleria mellonella* până la vârstă a 7-a pe un mediu nutritiv, care conține, g/kg: făină de grâu 185, făină de porumb 180, tărâțe de grâu 110, extract de drojdie 15, lapte praf 120, miere de albine 75, glicerol 80, pulbere de ceară 40, pinobanksin 0,02, pinocembrin 0,02, apă purificată restul, transferarea lor pe un mediu nutritiv, care conține, g/kg: făină de grâu 185-200, făină de porumb 180-190, tărâțe de grâu 110-130, extract de drojdie 15-20, lapte praf 120-140, miere de albine 40-50, glicerol 80-90, pulbere de ceară 65-85, pinobanksin 0,02-0,03,

pinocembrin 0,02-0,03, acetat de zinc dihidrat 0,01-0,02, apă purificată restul, creșterea timp de 180 de ore, colectarea larvelor, congelarea, spălarea, mărunțirea, liofilizarea, mărunțirea repetată la temperatura de -55°C , omogenizarea, ambalarea și păstrarea în congelator.

Activitatea cheratolitică a complexului entomologic a fost determinată în baza unui test spectrofotometric cu utilizarea cheratin-azurului (keratin azure) (Cai C., Chen J., Qi J., Yin Y., Zheng X. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain. Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 2008, 9(9), p. 713-720), care se realizează în modul următor: 5 mg de pulbere de cheratin-azur se suspendă în 1 mL tampon Tris-HCl de 50 mM (pH 8,0). Amestecul de reacție conține 1 mL de suspensie de cheratin-azur și 1 mg complex cu activitate cheratolitică. Reacțiile se efectuează la 50°C într-o baie de apă cu agitare constantă de 200 rot/min timp de 30 de min. După incubare, reacția se întrerupe prin adăugarea a 2 mL de acid tricloroacetic de 0,4 M, urmată de centrifugarea la 3000g timp de 20 de min. Absorbanța supernatantului se măsoară la 595 nm. Controlul se prepară la fel, iar extractul se înlocuiește cu cheratinază. Activitatea cheratolitică exprimată în unități de activitate per mg de substanță (UN/mg) prezintă cantitatea de enzimă care determină creșterea absorbției cu 0,01 între probă și martor la 595 nm în condițiile date. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabel.

Tabel

Parametrul monitorizat	Conform celei mai apropiate soluții	Conform procedurii propus
Masa unei larve, mg	278,5±22,4	328,2±17,1
Cantitatea de biomasă larvală (mg) la 1 g de mediu	149,7±2,9	185,2±22,4
Activitatea cheratolitică, UN/mg substanță uscată	4,05±0,04	6,85±0,13

Datele din Tabel demonstrează că aplicarea procedurii propus asigură creșterea cantității de biomasă obținută la utilizarea unui gram de mediu cu 23,7% comparativ cu soluția proximală. De asemenea, crește și activitatea cheratolitică a complexului activ cu 69,1%.

Rezultatul tehnic al invenției, în comparație cu cea mai apropiată soluție, constă în faptul că utilizarea larvelor de vârstă a 7-a asigură obținerea unei biomase mai mari de larve, iar mediul cu conținut redus de miere și cu conținut sporit de ceară, precum și cu conținut de acetat de zinc stimulează eliminarea proteazelor cu activitate cheratolitică.

Complexul activ cu acțiune cheratolitică obținut conform acestui procedeu poate fi utilizat în calitate de substanță activă în produse cosmetice și farmaceutice.

Pentru prepararea produselor cosmetice complexul activ va fi utilizat în cantitate de 0,3-2,0%, preferabil 1,0-1,5% din masa totală a compoziției.

De asemenea, compozițiile cosmetice vor include solvenți, preferabilă este apa purificată, care în dependență de forma fizică selectată poate varia de la 3% la 87% din greutatea compoziției; sau alternativ - glicerolul, benzil alcoolul ș.a.

De asemenea, produsele cosmetice (în formă de loțiune, cremă, gel ori ser) vor include unul sau mai mulți emulgatori, ca de exemplu: alcoolii organici cu catena de 14-22 atomi de carbon (alcooli C14-22), alchil glicozide C14-20, alchil sulfat, alchil fosfați, acil izotioionat, cetil alcool, stearil alcool, gliceril stearat ș.a., substanțe cu asemenea proprietăți, ori combinații ale acestor substanțe. Masa componentelor cu proprietăți de emulgator va fi cuprinsă între 1% și 12% din masa totală a compoziției.

În calitate de stabilizatori ai emulsiilor produsele cosmetice vor conține alcoolii organici C14-22, esteri ai glicerolului, așa ca stearat glicerolul, polimeri sintetici, ori alte componente cu proprietăți de stabilizatori ai emulsiilor, inclusiv în diferite combinații.

În mod obligatoriu compozițiile cosmetice vor conține substanțe emoliente, ca de exemplu: unul sau mai multe grăsimi ori uleiuri, hidrogenate ori nehidrogenate, esterii lor ori diferite combinații ale emolienților acceptați pentru acest tip de produse. Conținutul acestui tip de componente în formule va constitui de la 0,5% până la 10% din masa totală a compoziției.

Formulele cosmetice vor conține și umectanți, capabili de a reține apa în țesuturile pielii. În calitate de astfel de substanțe pot fi utilizate urea, acidul piroglutamic, aminoacizi, ori alte substanțe cu proprietăți higroscopice, acceptate pentru asemenea tip de produse, precum și combinațiile acestor substanțe. Cantitatea substanțelor cu proprietăți higroscopice în formulele produselor va constitui de la 0,1% până la 10,0% din masa compoziției.

Produsele cosmetice vor conține conservanți, ca de exemplu: fenoxietanolul, EDTA, acizi grași conjugați cu EDTA, izotioazolina, parabenele, ca metil parabena și propil parabena, propilen glicolul, sorbații, derivații ureei, așa ca diazolidinil urea ori imidazolidinil urea și alte substanțe cu proprietăți de conservanți, acceptați pentru asemenea produse, ori combinații ale lor. Cantitatea conservanților în componența produselor va constitui 0,3-2,0% din masa compoziției finale.

În componența produselor cosmetice va fi inclus și un agent de chelatare, așa ca derivatele EDTA, ori combinațiile lor. Cantitatea acestor componente în produsele cosmetice va constitui 0,01-0,2% din masa compoziției finale.

Produsele cosmetice vor include de asemenea și compuși tampon, care asigură menținerea pH-ului necesar. În calitate de astfel de substanțe pot fi utilizate acidul adipic, glicina, acidul citric, hidroxidul de calciu, trietanolamina ori alte substanțe cu asemenea proprietăți, acceptate pentru asemenea produse și combinațiile lor.

Produsele cosmetice vor conține de asemenea și substanțe antioxidante, ca de exemplu acidul ascorbic, tocoferolul, extracte din plante, cum ar fi extractul din semințe de Moringa, struguri, ori oricare alte substanțe cu asemenea proprietăți ori combinații ale lor.

De asemenea, toate produsele cosmetice în bază de complex activ de origine entomologică pot conține substanțe odorizante, coloranți, factori de protecție contra razelor UV-A și UV-B, extracte naturale din plante ori altă materie primă organică.

Astfel, este posibil de a selecta o mare varietate de formule, care vor asigura activitatea maximală a complexului activ, fără a modifica acțiunea lui cheratolitică.

Compozițiile cosmetice pot include, de asemenea, extracte vegetale de calitate farmaceutică: de Carica papaya, Ficus carica, Ananas sp., Actinidia deliciosa, etc. sau/și alte substanțe, cum ar fi enzime proteolitice purificate cu acțiuni similare și/ori complementare și care nu modifică acțiunea componentelor active ale complexului entomologic.

Forma fizică a produsului cosmetic nu poate fi limitată doar la amestecuri omogene, ci poate fi reprezentată și de faze compartimentalizate.

Produsele farmaceutice ce conțin complex entomologic pot fi fabricate în formă de unguent, gel, ser, spray ori alte forme fizice acceptate pentru produsele farmaceutice de acest tip. Compozițiile farmaceutice pot include orice materiale active și componente adecvate, acceptate pentru asemenea formule.

Toate produsele farmaceutice vor conține complex entomologic în cantitate de 1,0-4,0%, preferabil 1,5-2,0% din masa totală a compoziției.

Compozițiile farmaceutice în bază de complex activ de origine entomologică în propilenglicol vor include solvenți (în cazul dat preferabilă este apa purificată, care în dependență de forma fizică selectată poate varia de la 3% la 87% din greutatea compoziției; sau alternativ - glicerolul, benzil alcoolul ș.a.).

De asemenea, produsele farmaceutice (în formă de spray, unguent, gel ori ser) vor include unul sau mai mulți emulgatori, ca de exemplu: alcoolii organici cu catena de 14-22 atomi de carbon (alcooli C14-22), alchil glicozide C14-20, alchil sulfat, alchil fosfați, acil izotionat, cetil alcool, stearil alcool, gliceril stearat ș.a. substanțe cu asemenea proprietăți, ori combinații ale acestor substanțe. Masa componentelor cu proprietăți de emulgator va fi cuprinsă între 1% și 12% din masa totală a compoziției.

În mod obligatoriu compozițiile farmaceutice conțin substanțe emoliente ca de exemplu: unul sau mai multe grăsimi ori uleiuri, hidrogenate ori nehidrogenate, esteri ai lor, parafine, vaselină ori diferite combinații ale emolienților acceptați pentru acest tip de produse. Conținutul acestui tip de componente în formulele farmaceutice va constitui de la 0,5% până la 10% din masa totală a compoziției.

Formulele farmaceutice vor conține și umectanți, capabili de a reține apa în țesuturile pielii. În calitate de astfel de substanțe pot fi utilizate glicerolul, ureea, acidul piroglutamic, aminoacizi, ori alte substanțe cu proprietăți higroscopice, acceptate pentru asemenea tip de produse, precum și combinațiile acestor substanțe. Cantitatea substanțelor cu proprietăți higroscopice în formulele produselor farmaceutice va constitui de la 0,1% până la 10,0% din masa compoziției.

Produsele farmaceutice vor conține conservanți, ca de exemplu sorbați, fenoxietanolul, EDTA, acizi grași conjugați cu EDTA, izotiozolina, parabenele, ca metil parabena și propil parabena, propilen glicolul, derivații ureei, așa ca diazolidinil urea ori imidazolidinil urea și alte substanțe cu proprietăți de conservanți, acceptați pentru asemenea produse, ori combinații ale lor. Cantitatea conservanților în componența produselor farmaceutice va constitui 0,3-2,0% din masa compoziției finale.

Produsele farmaceutice vor conține de asemenea și substanțe antioxidante, ca de exemplu butilhidroxianisolul, acidul ascorbic, tocoferolul, extracte din plante, cum ar fi extractul din semințe de Moringa, struguri, ori oricare alte substanțe cu asemenea proprietăți ori combinații ale lor.

Astfel, este posibil de a selecta o mare varietate de formule, care vor asigura activitatea maximală a complexului activ, fără a modifica acțiunea lui cheratolitică.

Compozițiile farmaceutice pot include, de asemenea, extracte vegetale de calitate farmaceutică: de Calendula officinalis, Aloe vera, Salvia officinalis etc sau/și alte substanțe: alantoina, vitamina E, substanțe antibiotice etc., având acțiuni terapeutice complementare: antiinflamatoare, cicatrizantă, antibiotică.

Forma fizică a produsului farmaceutic nu poate fi limitată doar la amestecuri omogene, ci poate fi reprezentată și de faze compartimentalizate.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Obținerea complexului entomologic din larve de Galleria mellonella cu activitate cheratolitică

Pupele de Galleria mellonella se scot din frigider, unde se păstrează la temperatura de 3-5°C, și se lasă la temperatura camerei timp de 2 ore. După acest interval de timp pupele sunt transferate în recipiente acoperite cu capac găurit, care conțin o cantitate mică de mediu nutritiv (1/10 din volumul recipientului) pentru dezvoltarea ulterioară a pupelor, trecerea lor în faza de imago și depunerea ouălor. Pentru a iniția eclozarea larvelor din ou, recipientele sunt menținute la temperatura de 27°C, și umiditatea relativă de 75%, în condiții de întuneric. După 48 de ore de la plasarea pupelor în recipiente apar larvele de prima vârstă. Procesul se monitorizează pentru a oferi un randament de 80% de ieșire, dar nu mai mult de 6 ore.

Mediul nutritiv utilizat are următoarea componență, g/kg: făină de grâu 185, făină de porumb 180, tărâțe de grâu 110, extract de drojdie 15, lapte praf 120, miere de albine 75, glicerol 80, pulbere de ceară 40, pinobanksin 0,02, pinocembrin 0,02, apă purificată restul.

Se prepară containere noi cu mediu nutritiv. După 6 ore de la începutul eclozării larvele de prima generație sunt scoase cu ajutorul pensetei din recipientele în care au apărut și se plasează în recipientele pregătite.

Creșterea larvelor durează până la obținerea larvelor de vârstă a 7-a, dar nu mai mult de 23 de zile. Temperatura în containere se menține de 27°C și umiditatea relativă de 75% în condiții de întuneric. Pe durata acestor zile se efectuează două-trei transferuri de larve în recipiente cu mediu nutritiv proaspăt.

Larvele de vârstă a 7-a se transferă pe mediul nutritiv cu următoarea componență, g/kg: făină de grâu 185, făină de porumb 180, tărâțe de grâu 110, extract de drojdie 15, lapte praf 120, miere de albine 40, glicerol 80, pulbere de ceară 80, pinobanksin 0,02, pinocembrin 0,02, acetat de zinc dihidrat 0,015, apă purificată restul.

După 180 de ore după transfer larvele sunt colectate cu ajutorul pensei și sunt transferate în recipiente speciale pentru congelare. Larvele sunt congelate la temperatura de -18°C. În această formă materia primă poate fi păstrată timp de 24 de luni și utilizată în dependență de necesitate.

Înainte de utilizare larvele sunt spălate de 2 ori cu a câte patru volume de soluție fiziologică de 0,9% și încă de două ori cu a câte 4 volume de apă purificată.

În continuare biomasa este supusă mărunțirii într-un tocător cu cuțite de inox, astfel, ca particulele obținute să nu depășească dimensiunea de 2 mm (complexul activ Keratoliz Plus). Complexul activ obținut este supus în continuare procesului de liofilizare.

Ultima etapă constă în mărunțirea complexului activ liofilizat în moară criogenă la o temperatură extrem de joasă, ceea ce asigură obținerea particulelor disperse cu dimensiunea de până la 200 μm.

Complexul activ obținut în modul descris mai sus este ambalat ermetic în pungi de aluminiu și păstrat până la utilizare (până la 24 de luni) în condiții de congelator (-18±3°C).

Activitatea cheratolică a complexului entomologic obținut conform acestui exemplu constituie 6,48 UN/mg de substanță uscată.

Exemplul 2

Rețete de fabricare a produselor farmaceutice pe bază de complex entomologic cu activitate cheratolică

Produs farmaceutic sub formă de cremă cosmetică pe bază de complex entomologic cu activitate cheratolică

Produsul conține, %: complex entomologic cu activitate cheratolică 1,0, poligliceril-3 metilglucoză distearat 5,0, glicerol 3,0, izopropil palmitat 2,0, ulei din semințe de struguri 3,0, trigliceride caprilice/caprice 1,0, unt de Butyrospermum parkii 2,0, ciclopentasiloxan 0,5, polisorbit 80 2,0, gliceril stearat 2,5, glicină din proteină de soia 1,0, diazolidinil urea 0,6, metilparaben 0,3, propilparaben 0,1, disodiu EDTA 0,05, parfum 0,2, apă până la 100.

Produs farmaceutic sub formă de loțiune tonică și de curățire pe bază de complex entomologic cu activitate cheratolică

Produsul conține, %: complex entomologic cu acțiune cheratolică 1,2, glicerol 5,0, pentilen glicol 3,0, d-pantenol 0,5, alantoină 0,1, sodiu lauret sulfat 0,1, diazolidinil urea 0,4, metilparaben 0,3, propilparaben 0,1, apă până la 100.

Produs farmaceutic sub formă de gel exfoliant pe bază de complex activ de origine entomologică în propilenglicol

Produsul conține, %: complex activ de origine entomologică în propilenglicol 1,5, carbomer 0,8, trietanolamină 0,8, sodiu hialuronat 0,2, bisabolol 0,1, diazolidinil urea 0,4, metilparaben 0,3, propilparaben 0,1, apă până la 100.

Produs farmaceutic sub formă de unguent pe bază de complex entomologic cu activitate cheratolică

Produsul conține, %: complex entomologic cu acțiune cheratolică 2,0, butilhidroxianisol 0,1, alcool cetilic 4,0, polisorbit 80 3,0, sorbat de potasiu 0,5, glicerol 4,0, parafină lichidă 3,0, vaselină albă 3,0, apă purificată până la 100.

Produs farmaceutic sub formă de gel pe bază de complex entomologic cu activitate cheratolică

Produsul conține, %: complex entomologic cu acțiune cheratolică 2,0, carbopol 940 2,0, glicerol 6,0, hidroxid de sodiu, soluție de 15% 1,0, propilenglicol 6,0, p-hidroxibenzoat de metil 0,1, p-hidroxibenzoat de propil 0,2, apă purificată până la 100.