



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00029**

(22) Data de depozit: **16/01/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/07/2019** BOPI nr. **7/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/08/2013 BOPI nr. **8/2013**

(73) Titular:
• **ZBUCHEA ANDREI-GHEORGHE,**
STR.DORNEI NR.112, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **ZBUCHEA ANDREI GHEORGHE,**
STR.DORNEI NR.112, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
EP 0952839 B1; RO 107087 B1

(54) **UNGUENT PENTRU TRATAMENTUL ARSURILOR
ȘI PLĂGILOR, CU ACȚIUNE COMPLEXĂ, REALIZAT
EXCLUSIV DIN PRODUSE NATURALE**



RO 128713 B1

1 Prezenta invenție se referă la o compoziție de unguent pentru tratamentul arsurilor și
plăgilor.

3 Arsurile și, în general, diferitele tipuri de plăgi cutanate reprezintă o importantă problemă
de sănătate publică, cu multiple și serioase implicații medicale, economice, familiale, sociale.

5 Vindecarea plăgilor implică un proces complex, dinamic, care duce la restabilirea
continuității și funcțiilor pielii [1], și implică interacțiuni între mediatorii matricii extracelulare și
7 diferite celule, cum ar fi fibroblastele și keratinocitele. În procesul de vindecare, se generează
și specii reactive de oxigen, iar prezența acestora poate provoca leziuni celulare prin meca-
9 nisme diferite, cum ar fi peroxidarea lipidelor membranare [2, 3]. Acest fenomen sugerează că
prezența antioxidantilor în tratamentul plăgilor și arsurilor poate fi favorabilă vindecării [3].

11 Numeroase cercetări experimentale au demonstrat efectele benefice pe care le au
preparatele de origine vegetală în ameliorarea (și chiar vindecarea) plăgilor de diverse etiologii.
13 În prezent, se derulează numeroase cercetări pe plan mondial pentru a descoperi noi produse
naturale și noi formulări farmaceutice dedicate tratamentului plăgilor.

15 Majoritatea soluțiilor oferite de industria farmaceutică se bazează pe substanțe sintetice
și pot produce diverse efecte secundare. De exemplu, crema cu sulfadiazină de argint, actualul
17 medicament topic gold-standard în tratamentul arsurilor, întârzie vindecarea plăgii, scade viteza
de epitelizare, iar în tratamentul prelungit, conduce la formarea de cicatrici hipertrofice sau
19 atrofice, poate prezenta citototoxicitate locală (asupra keratinocitelor și fibroblastelor) și poate
să genereze tulburări sistemice, ca: neutropenie, eritem multiform, toxicitate renală și methemo-
21 globinemie [4,5].

23 O alternativă pentru produsele de sinteză este oferită de plantele medicinale. Acestea
au o utilizare îndelungată în istoria omenirii pentru tratamentul diverselor afecțiuni ale pielii,
inclusiv plăgi și arsuri. Numeroase studii științifice actuale demonstrează capacitatea de
25 vindecare a plăgilor cu preparate de origine vegetală [6-13], și evidențiază numeroasele
avantaje, precum costul redus, eficacitatea, ușurința aplicării, siguranța la exploatare și efectele
27 secundare relativ reduse (îndeosebi hipersensibilizarea locală).

29 Implicarea în multiple mecanisme de reparare a plăgii și vindecare tisulară a remediilor
tradiționale necesită validarea prin studii științifice. Dintre compușii bioactivi vegetali, polifenolii
reprezintă o clasă semnificativă. Acidul galic prezintă activitate antimicrobiană, antifungică și
31 antioxidantă [14, 15], iar acidul cafeic și esterii acestuia au acțiuni antiinflamatorie [2] și
antioxidantă [16], accelerează vindecarea plăgilor cutanate [2], și stimulează sinteza de colagen
33 [3]. Acidul ferulic promovează vindecarea pielii prin accelerarea epitelizării [17, 18] și acționează
ca antioxidant prin inhibarea peroxidării lipidelor [17]. Activitatea antioxidantă este o
35 caracteristică comună a flavonoidelor; s-a demonstrat acțiunea protectoare a quercetinelor și
rutinului asupra celulelor neurovasculare cutanate dermice supuse stresului oxidativ [19].
37 Prezența rutinului în formulări dermatologice a stimulat vindecarea plăgilor prin încetinirea
peroxidării lipidice, creșterea activității catalazei și scăderea carboxilării proteinelor [20].

39 Scopul prezentei invenții este de a introduce un nou preparat, cu o acțiune terapeutică
complexă, în gama preparatelor medicinale pentru arsuri și plăgi. Invenția propune o formulă
41 complexă, bazată pe un amestec de 9 plante medicinale, condiționată sub formă de unguent,
pentru a stimula o vindecare adecvată a plăgilor, care a fost numită "Dermaplant".

43 Unguentul prezentat este realizat exclusiv pe bază de componente naturale și plante
medicinale. Formula conține un extract în ulei de măsline al unui amestec de plante medicinale,
45 alături de alte componente cu acțiune demonstrată de vindecare a plăgilor, precum uleiul de
cătină (*Oleum Hippophae*), uleiul esențial de lavandă (*Lavandulae Aetheroleum*), agenți de
47 creștere a viscozității (ulei de cocos - *Cocos Oleum*), ceară de albine (*Cera Flava*) și rășină de
conifere (*Resina Pini*). Ingredientul activ este reprezentat de extractul uleios al amestecului de
49 plante, iar forma condiționată este reprezentată de un unguent.

RO 128713 B1

Plantele medicinale românești utilizate pentru realizarea extractului uleios sunt: 1
Calendula officinalis L. (Asteraceae), *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae), *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae), *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae), *Achillea millefolium* L. 3
(Asteraceae), *Arctium lappa* L. (Asteraceae), *Plantago major* L. (Plantaginaceae), *Althaea officinalis* L. (Malvaceae), *Quercus robur* L. - scoarță (Fabaceae). 5

Unguentul conține componentele în următoarea relație de masă:

| | | | |
|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------|----|
| Gălbenele | <i>Calendula officinalis</i> | 15...25 părți în greutate | 7 |
| Sunătoare | <i>Hypericum perforatum</i> | 15...25 părți în greutate | |
| Tătăneasă | <i>Symphytum officinale</i> | 15...25 părți în greutate | 9 |
| Brusture | <i>Arctium lappa</i> | 15...25 părți în greutate | |
| Nalbă | <i>Althaea officinalis</i> | 15...25 părți în greutate | 11 |
| Mușețel | <i>Matricaria chamomilla</i> | 20...40 părți în greutate | |
| Pătlagină | <i>Plantago major</i> | 20...40 părți în greutate | 13 |
| Coadă șoricelului | <i>Achillea millefolium</i> | 10...20 părți în greutate | |
| Stejar scoarță | <i>Quercus cortex</i> | 10...20 părți în greutate | 15 |
| Ulei de măsline | <i>Olivarum oleum</i> | 800 părți în greutate | |
| Ulei de cocos | <i>Cocos oleum</i> | 100 părți în greutate | 17 |
| Ulei de cătină | <i>Hippophae oleum</i> | 100 părți în greutate | |
| Ceară de albine | <i>Cera flava</i> | 50...150 părți în greutate | 19 |
| Rășină de conifere | <i>Resina</i> (abies, pini) | 50...150 părți în greutate | |
| Ulei volatil de lavandă | <i>Lavandulae aetheroleum</i> | 5...10 părți în greutate | 21 |

Plantele medicinale din compoziția unguentului au proprietăți multiple, sinergice: 23
epitelizante, cicatrizante, antimicrobiene, antiseptice, calmante, antialgice, imunomodulatorii, 23
antiinflamatorii, antialergice, antipruriginoase etc. [21-30]. Principiile active din plante sunt 25
extrase în ulei de măsline pe baie de apă, sub temperatura de fierbere a apei, în condiții optime, 25
nedistructive, ceea ce asigură biodisponibilitatea terapeutică a principiilor active și concentrația 27
maximă a acestora. 27

Uleiul de măsline este o bază suport pentru celelalte ingrediente, conferind extracția 29
principiilor active ale acestora. Prin conținutul în gliceride, acizi grași, flavonoide, vitaminele A, 29
E și K, acest ulei stimulează regenerarea celulară, formarea de colagen și elastină, și asigură 31
o bună hidratare tisulară. Ca variantă, în aceeași cantitate se poate utiliza uleiul de floarea 31
soarelui (*Helianthi oleum*) în locul uleiului de măsline, având o compoziție asemănătoare, însă 33
uleiul de măsline este de preferat datorită acțiunii specifice antiinflamatoare [31-33]. De altfel, 33
acesta a fost utilizat frecvent în decursul timpului pentru îngrijirea pielii și a părului.

Uleiul de cocos este util datorită structurii biochimice particulare; spre deosebire de 35
celelalte uleiuri vegetale și de grăsimile de origine animală, este constituit în principal din acizi 35
grași saturați cu lanț mediu (acizii lauric, capric, caprilic, miristic și palmitic). Printre altele, 37
această proprietate previne oxidarea și rănirea uleiului, făcându-l astfel potrivit pentru 37
conservarea plantelor medicinale și pentru tratamentul plăgilor, alături de celelalte componente 39
minore biologic active din compoziția sa [34-35]. 39

Uleiul de cătină conține numeroși acizi grași esențiali, caroten, licopen, tocoferoli, 41
fitosteroli etc. și are proprietăți antioxidante, epitelizante, antiinflamatorii, antialgice [36-38]. 41

Extractul uleios de rășină de conifere are acțiune antiseptică, reconfortantă, antiinfla- 43
matoare, cicatrizantă, astringentă, antioxidantă, imunomodulatoare [39-41]. 43

Ceara de albine are acțiune antioxidantă, antiinflamatoare, antiseptică, și este un bun 45
agent de solidificare cu rol atât de protecție a plăgii față de mediul exterior, cât și de 45
condiționare a unguentului. Esterii și flavonoidele din ceară stimulează regenerarea tisulară, 47
contribuie la hidratarea tisulară și au efect antiinflamator [42-43]. 47

RO 128713 B1

1 Uleiul volatil de lavandă asigură o aromă plăcută (benefică în special la pacienții arși) și are acțiune antiseptică, antimicrobiană, anestezică locală și antialergică [44-48].

3 Unguentul propus, pe bază de uleiuri vegetale, plante medicinale, ceară de albine și rășină de conifere, asigură un microclimat umed favorabil regenerării epiteliale, în conjuncție cu acțiunile terapeutice intrinseci, particulare ale ingredientelor utilizate.

5 Managementul umed al plăgilor reprezintă conceptul terapeutic de viitor în tratamentul
7 leziunilor de diverse etiologii, în scopul obținerii unei vindecări mult mai rapide, de o mai bună calitate și cu un confort psihic sporit pentru pacient [49-54].

9 Comparativ cu un mediu uscat, menținerea unui mediu umed la nivelul plăgilor favorizează procesul de vindecare și de epitelizare a acestora prin proprietăți terapeutice multiple:

- 11 - reduce pierderea fluidelor corporale;
- previne deshidratarea tisulară și moartea celulară;
- 13 - izolează plaga de factorii ambientali potențial nocivi;
- accelerează angiogeneza;
- 15 - îmbunătățește microcirculația locală și astfel recuperează celulele semi-viabile;
- crește eliminarea țesutului mort și a fibrinei;
- 17 - reduce durerea în mod semnificativ;
- promovează vindecarea cu reducerea cicatricilor și rezultate estetice acceptabile.

19 Unguentul propus favorizează vindecarea la nivelul plăgilor prin acțiuni multiple:

21 - asigură un microclimat local favorabil vindecării prin izolarea (sigilarea) plăgii față de mediul ambiant, prin stimularea celulelor epiteliale, keratinocitelor și celulelor endoteliale, prin restabilirea barierei lipidice a pielii și stimularea producției de collagen și elastină;

23 - promovează epitelizarea chiar și în cazul plăgilor profunde, prin stimularea rezervelor de celule epiteliale reziduale (din foliculii piloși, glandele sebacee și glandele sudoripare);

25 - efectul antiinflamator și absorbția exsudatului în exces permit o debridare precoce și o îndepărtare facilă a pansamentelor;

- 27 - acțiunea antiseptică și antimicrobiană a diferitelor ingrediente;
- accelerarea vascularizației de neoformație;

29 - creșterea confortului pacientului prin reducerea durerii și lubrifierea locală, permițând astfel mobilizarea precoce;

- 31 - favorizarea dezvoltării unui epiteliu de bună calitate;
- îndepărtarea pansamentului este ușoară și atraumatică, datorită neaderenței față de țesuturi;

33 - ușurința în aplicare chiar și în cazul plăgilor aflate în zone anatomice dificile (pliuri cutanate naturale, joncțiuni cutaneomucoase, plăgi adânci, anfractuozitate).

35 Ingredientele utilizate își potențează reciproc acțiunile și conferă unguentului propus
37 proprietăți benefice și acțiuni terapeutice multiple. Acesta poate fi utilizat pentru tratarea diverselor leziuni ale pielii, ca adjuvant natural cu acțiune cicatrizantă, epitelizantă, antiseptică, antimicrobiană, antiinflamatoare, antialgică, imunomodulatoare, antiinflamatoare etc.

39 În cele ce urmează, se va face o succintă prezentare, spre comparație, a unor preparate
41 de origine naturală cu indicație în leziunile pielii, din brevetele SUA (<http://patft.uspto.gov/>):

43 **US 3943249** din 1976, inventator Max Shulman: metoda de tratament al arsurilor prin preparate ce conțin colofoniu. Autorul propune tratamentul arsurilor și al altor leziuni ale pielii printr-un preparat ce conține 25...60 părți în greutate colofoniu (acid abietic, rășină) și alfa tocoferol, dizolvate într-un mediu uleios (ulei vegetal, ulei de pește sau lanolină).

RO 128713 B1

US 4725438 din 1988, inventator Billie Leazer: unguent cu gel de aloe vera pentru tratamentul afecțiunilor pielii. Unguentul conține 5...20 părți în greutate gel de aloe vera și 80...95 părți în greutate bază (amestec în părți aproximativ egale din ulei mineral, vaselină, lanolină și parafină). 1
3

US 4857328 din 1989, inventator Theodore Trenzeluk: mixtura terapeutică cu extract de aloe vera, pentru tratamentul afecțiunilor pielii. Mixtura conține 3...50 părți în greutate extract apos din frunze de aloe vera ca agent terapeutic, 5...20 părți în greutate sulfatazol drept conservant, 5...16 părți în greutate oxid de zinc ca pigment inert alb și 14...87 părți în greutate vaselină (petrolatum) ca bază uleioasă solubilă. 5
7
9

US 5266318 din 1993, inventator Darlene Taylor-McCord: mixtura terapeutică cu 1...98% extract de aloe vera gel, 0,1...8% alantoină, 0,01...2% ulei esențial de lavandă, adițional baza topică, conservant și surfactant cosmetic. 11

US 5785972 din 1998, inventator Kathleen Tyler: compoziție antiseptică cu 500 ml argint coloidal (6...100 ppm), 0,94 ml ulei esențial de *Helichrysum angustifolium* sau *Helichrysum italicum*, 1,25 ml miere brută, emulsificate cu 0,35 ml lecitină hidrosolubilă. 13
15

US 5766614 din 1998, inventator Liu Yong: o compoziție pentru tratamentul arsurilor, preparată din rubarbă chinezească, hidroxid de calciu, rizom de *sanguisorba officinalis*, camfor, rizom de *coptis chinensis*, scoarță de *phellodendron amurense* și *oldenlandia diffusa*. 17

US 5997876 din 1999, inventatori Nino Shikhashvili, Zurab Darsavelidze (Tbilisi, Georgia): unguent cu *Chelidonium majus* 15...25 g, *Plantago major* 15...25 g, *Matricaria chamomilla* 15...25 g, *Achillea millefolium* 15...25 g, *Calendula officinalis* 15...25 g, *Hypericum perforatum* 15...25 g, *Eucalyptus globulus* 15...25 g, *Oleum olivarum* 1000 g și *Cera flava* 80...130 g. Principiile active din plante sunt extrase în ulei de măsline prin fierbere pe baia de apă, timp de 6 h, apoi filtratul obținut (700...900 g) se fierbe din nou pe baia de apă și se amestecă cu ceară mărunțită, timp de 30 min. 19
21
23
25

US 6099866 din 2000, inventator K. Slimak.: compoziție pentru aplicație topică din ceară proaspătă de albine și ulei, cu și fără apă, cu un raport în volum de la 1:1/10:0 până la 1:20:20 27

US 6200570 din 2001, inventatori Prakash Diwan și colab. (Hyderabad, India): compoziție pe bază de plante, utilă în aplicații terapeutice și cosmetice pentru tratamentul problemelor generale ale pielii. Compoziția cuprinde extracte din plante: *Gymnena sylvestrae* 3...6 părți în greutate, *Tridax procumbens* 3...6 părți în greutate, ulei de *Allium sativum* 1...3 părți în greutate, suc uscat de aloe vera 2...6 părți în greutate, *Gum Olibanum* pulbere în formă naturală 4...7 părți în greutate, *Gum Olibanum* extract rășinos în solvent organic 3...8 părți în greutate, *Gum Olibanum* masă fără rășini 5...10 părți în greutate, opțional, orice medicament cu proprietăți antiinflamatoare din grupul Diclofenac sodic 1...3 părți în greutate, acid salicilic 1...4 părți în greutate, Piroxicam 1...2 părți în greutate, pulbere de turmeric 0,1...1 părți în greutate, o bază conținând o cremă apoasă sau un gel care conține carbopol 1...4 părți în greutate, un unguent emulsificator 20...40 părți în greutate, conservanți 0,05...0,3 părți în greutate, umectant 1...4 părți în greutate și restul apă, pentru a face 100 părți în greutate. 29
31
33
35
37
39

US 6482442 din 2002, inventator Suleiman Dado din Austria: compoziție pentru aplicații topice în afecțiunile pielii, preparată din miere, ulei de măsline, propolis, salvie, facultativ ceară de albine, mușețel, cimbru sau lavandă. 41

US 6576269 din 2003, inventator Alexander Korneyev: tratamentul leziunilor deschise ale pielii folosind extract (uleios) de cătină. Compoziția este preparată din 5...95 părți în greutate extract uleios de fructe de cătină, 0...95 părți în greutate extracte uleioase din plante: măceșe, sunătoare (*Hypericum perforatum*), rocoină (*Stellaria media*), pătlagină (*Plantago major*), flori de gălbenele (*Calendula officinalis*), 0...10 părți în greutate un ulei esențial, 0...15 părți în greutate un antioxidant, 0...80 părți în greutate diluant (un ulei vegetal). 43
45
47

RO 128713 B1

1 **US 6699512** din 2004, inventator Quintanilla Almagro și colab., de la Compania de
Biotehnologia e Investigacion, Alicante, Spania: extract lipidic stabil din sunătoare (*Hypericum*
3 *perforatum*), care poate fi utilizat în preparate farmaceutice, precum geluri hidrosolubile, ca
agent cicatrizant.

5 **US 6956144** din 2005 și RE42,755 din 2011, inventator Peter Molan din Noua Zeelandă:
compoziții pe bază de miere pentru tratamentul plăgilor, precum unguente, geluri sau folii
7 pliabile și flexibile.

9 **US 7141252** din 2006, inventator Eliana Soubhie din Canada: o compoziție pentru
tratamentul arsurilor, preparată din ulei de măsline, ceară de albine, suc de lămâie și acid boric.

11 **US 2007/0141168 A1**, inventator Wafa Alkazemi din Kuwait: o compoziție pentru
tratamentul arsurilor preparată din ulei de migdale, miere purificată, ceară de albine, polen,
propolis, ulei de lavandă și apă.

13 **US 7985431** din 2011, inventator Rey-Yuh Wu din Taiwan: o compoziție farmaceutică
pentru tratamentul plăgilor, inclusiv la pacienți diabetici, conținând extracte din plante medicinale
15 chinezești (*Plectranthus amboinicus* și *Centella asiatica*).

17 Dintre brevetele înregistrate la OSIM, care se referă la preparate ce conțin unele
ingrediente de origine naturală, recomandate în afecțiunile pielii, se pot reține următoarele:

19 **RO 106503 B1** din 1992, inventator Gheorghe Neagoe: unguent pentru cicatrizarea
plăgilor și a altor leziuni cutanate, constituit din nitroglicerină, dermatol, mafenid, hidrocortizon
21 acetat, Balsam de Peru, vitamina E, vitamina F, vitamina A, încorporate într-o bază de unguent
simplu.

23 **RO 107087 B1** din 1992, inventator Ioan Mânzatu și colab.: unguent terapeutic pentru
tratamentul plăgilor și arsurilor (preparat comercial ARMON), constituit din rășină de conifere
prelucrată, ulei de cătină, propolis sau extract moale de muguri de plop, collagen solubil, extract
25 uleios de gălbenele, sunătoare și rădăcină de brusture, ulei de lavandă, încorporate într-o bază
de unguent compusă din ceară de albine, alcool cetilic, colesterol, anestezină.

27 **RO 108643 B1** din 1994, inventatori Stoica Felician Titus, Bratu Ion Tiberiu, Lupuliasa
Dumitru: unguent pentru tratamentul arsurilor, constituit din ceară albă de albine, colofoniu,
29 tămâie, pulbere de bismut subgalic și ulei de floarea-soarelui alimentară.

31 **RO 120530 B1** din 2002, inventatori Andrei Constantin și Andrei Diana Cristina: unguent
pe bază de extracte din plante, pentru tratarea psoriazisului, preparat din extracte din *Saponaria*
officinalis, *Glycyrrhiza glabra*, *Chelidonium majus*, *Hypericum perforatum*, radicali liberi cu viață
33 lungă și/sau precursori ai acestora (ca amine împiedicate steric), acid salicilic, vitamine A, E și
D și excipienți acceptabili farmaceutic.

35 **RO 121672 B1** din 2002, inventator Mititelu Magdalena: unguent pentru regenerarea și
cicatrizarea plăgilor și arsurilor, constituit din ceară galbenă de albine, propolis, stearină,
37 lanolină, ulei volatil de lămâie, ulei de ficat de rechin și soluție de hidroxid de calciu 0,15%.

39 **RO 122334 B1** din 2007, inventatori Văduva Constantin și colab.: compoziție de unguent
destinat refacerii tegumentelor traumatizate și procedeu de obținere, alcătuită din 5...12%
41 sacâz, 10...16% clei de arbore rășinos, 10...16% parafină, 10...20%, ceară de albine, 40...50%
ulei comestibil și 2...6% granule de propolis.

43 **RO 122475 B1** din 2006, inventator Miron Ghiorghe și colab.: unguent antiinflamator,
antireumatic și antiseptic, constituit din 22...47 părți extract de rășină de conifere în ulei de
45 floarea-soarelui alimentară, 42...65 părți ulei de floarea-soarelui alimentară, 12...26 părți ceară
galbenă de albine, 0,5...3 părți ulei de lavandă, 4,1...7,5 părți extract de propolis în ulei de
floarea-soarelui alimentară sau tinctură de propolis, și 10...18 părți apă distilată.

RO 128713 B1

RO 122836 B1 din 2007, inventatori Butnariu Monica și colab.: unguent farmaceutic și procedeu de obținere pe bază de flori de galbenele crescute pe soluri îmbogățite cu zinc, preparat din 3...4 părți extract uscat și purificat de *Calendula officinalis*, împreună cu o formulă pe bază de unguent, alcătuită din 5...6 părți alcool cetilic, 5...6 părți unt de cacao, 1...2 părți lauril sulfat de sodiu, 25...30 părți vaselină, 1...2 părți cetaceu și 50...60 părți soluție conservată. 1
3
5

RO 122893 B1 din 2005, inventator Dumbrava Delia și colab.: unguent farmaceutic pe bază de extract carotenoidic din *Zea mays*, pentru tratarea unor afecțiuni cutanate, preparat din 0,7...1 părți compuși carotenoidici constituiți din beta-caroten, alfa-caroten, zeaxantină și luteină, împreună cu 8,6...10 părți lanolină, 88,8...90 părți vaselină și 0,2...0,7 părți nipagin. 7
9

RO 122952 B1 din 2007, inventatori Butnariu Monica și colab.: unguent farmaceutic și procedeu de obținere pe bază de inflorescențe de coada șoricelului, crescute pe soluri îmbogățite cu zinc, cu acțiune antiinflamatoare, cicatrizantă și antibiotică, preparat din 3...4 părți extract uscat și purificat de *Alchillea millefolium*, împreună cu o bază de unguent formată din 5...6 părți alcool cetilic, 5...6 părți unt de cacao, 1...2 părți lauril sulfat de sodiu, 25...30 părți vaselină, 1...2 părți cetaceu și 50...60 părți soluție conservată. 11
13
15

RO 123440 B1 din 2007, inventator Pârvuloiu Constantin: unguent destinat regenerării pielii traumatizate de arsuri, preparat din osânză de oaie, ceară de albine, ulei de floarea soarelui și albuș de ou. 17

De asemenea, pe piața românească există marca Carpicon - unguentul Carpicon, conceput de doamna doctor biolog Viorica Vintilă, din extract uleios din rășină de conifere și ceară de albine (firma SC Romdan SRL), precum și crema Carpicon Plant cu extracte vegetale și rășină de conifere (firma Elzin Plant), preparată din extracte uleioase de lavandă, busuioc și rășină de conifere, ulei esențial de pin, ulei de ricin și ceară de albine. 19
21
23

După cum se poate remarca în brevetele prezentate anterior, un mare număr de compoziții au fost propuse pentru tratamentul arsurilor, pornind de la substanțe de origine naturală, dar în general acestea conținând ingrediente și substanțe farmacologice care sunt scumpe și nu întotdeauna accesibile. În plus, aplicarea topică a unora dintre ele poate necesita tratament medical atent și neîntrerupt, și poate determina reacții adverse la unele ingrediente care nu sunt de origine naturală. Având în vedere aceste lucruri, precum și importanța crescândă acordată în prezent preparatelor de origine naturală în întreaga lume, prezenta invenție pune la dispoziție o compoziție topică pentru tratamentul arsurilor și al altor leziuni ale pielii care este relativ ieftină, ușor de obținut, aplicat și folosit, sigură, stabilă, și care se poate administra nu doar sub strictă supraveghere medicală. Aceasta elimină sau reduce problemele mai sus menționate, limitările sau dezavantajele asociate cu preparatele topice convenționale. În plus, are o acțiune terapeutică complexă, ce îmbină efectele terapeutice ale extractelor uleioase din o mare varietate de plante medicinale cu o bază de unguent lipofilă, formată din uleiuri vegetale (cu acțiune terapeutică intrinsecă), ceară de albine, rășină de conifere și ulei volatil de lavandă (care, printre altele, conferă un miros plăcut, reconfortant, înviorător fizic și psihic, mai ales pentru pacienții cu arsuri). De asemenea, unguentul prezentat este realizat exclusiv pornind de la plante medicinale care se regăsesc în flora României, ușor de obținut, cu o reală valoare și importanță terapeutică, care au fost confirmate de studii internaționale. 25
27
29
31
33
35
37
39
41

Analiza comparativă referitoare la îndeplinirea condițiilor de nouitate și de activitate inventivă în raport cu brevetul european **EP 0952 839 B1**, publicat în Buletinul 2002/03, referitor la unguentul care a fost denumit Green Ointment (Gruene Salbe, Baume Vert) și care conține: rostopască (*Chelidonium majus*) 15...25 g, pătlagină (*Plantago major*) 15...25 g, mușețel (*Matricaria chamomilla*) 15...25 g, coada șoricelului (*Achillea millefolium*) 15...25 g, gălbenele (*Calendula officinalis*) 15...25 g, sunătoare (*Hypericum perforatum*) 15...25 g, eucalipt (*Eucalyptus globulus*) 15...25 g, ulei de măsline (*Oleum olivarum*) 1000 g și ceară de albine (*Cera flava*) 80...130 g. 43
45
47
49

1 Atât produsul din această invenție, cât și Green Ointment conțin extracte din plante
medicinale în ulei de măsline, dar compoziția conform invenției este mai bogată cantitativ atât
3 în ceea ce privește plantele medicinale, cât și în suplimentarea cu ulei de cocos, ulei de cătină
și rășină de conifere (echivalentul eucaliptului ar fi, în acest caz, uleiul volatil de lavandă),
5 fiecare având compoziția biochimică și efectele sale specifice, care au fost menționate și în
bibliografia aferentă acestei lucrări, ceea ce conferă proprietăți suplimentare și caracterul
7 inovator al produsului.

Procedeul de preparare a unguentului conform invenției se desfășoară în modul următor:
9 într-un vas, uleiul de măsline se amestecă cu pulberile de plante medicinale, se încălzește la
temperatura de 70...90°C, timp de 4...6 h (pe baie de apă, sub temperatura de fierbere a apei,
11 în vederea extracției blânde, progresive a principiilor active din plante), și apoi se filtrează. Uleiul
fierbinte obținut (cu extractele din plante medicinale) se amestecă mai întâi cu ceara de albine
13 mărunțită și cu rășina de conifere, până la dizolvarea acestora, apoi cu uleiul de cocos și de
cătină (pe măsură ce scade temperatura preparatului) și, în final, se adaugă uleiul volatil de
15 lavandă, omogenizând continuu până se răcește complet la temperatura camerei. Vasul în care
se prepară unguentul poate să fie prevăzut, în mod opțional, cu element de agitare, temporizare
17 și măsurare a temperaturii.

Până în prezent, am efectuat două serii de determinări asupra produsului.

19 Primele cercetări au fost efectuate împreună cu un colectiv de la Facultatea de Chimie,
Universitatea București (Claudia-Valentina Popa), Institutul de Chimie Organică C. D. Nenițescu
21 (Liliana Lungu, Victorița Tecuceanu), Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Științe
Biologice, București (Valentina Alexandru, Rodica Tatia), care s-au concretizat prin publicarea
23 unui articol în revista **Romanian Biotechnological Letters**, vol. 21(2) din 2016, având titlul:
„An innovative ointment made of natural ingredients with increased wound healing
25 **activity”**, în care am examinat unguentul din multiple puncte de vedere: caracterizarea
biochimică prin analiza LC-MS a extractelor etanolice, determinări de fenoli totali și flavonoide,
27 activitatea de eliminare a radicalului liber DPPH, testul de citotoxicitate pe fibroblaste, testul de
stabilitate, precum și evidențierea eficacității unguentului prin prezentarea unor cazuri clinice
29 sugestive.

Următoarele cercetări au fost efectuate cu un colectiv de la Institutul Național de
31 Cercetare-Dezvoltare Chimico-Farmaceutică București, sub coordonarea Dr. biochim. Radu
Albulescu, Președinte al Consiliului științific al Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare
33 Chimico-Farmaceutică, Șef Departament Biotehnologiei Farmaceutice, și au făcut obiectul unui
proiect de cercetare câștigat prin competiție, derulat prin contractul de finanțare cu nr. 108CI
35 din 25/07/2017 (PN-III-P2-2.1-CI-2017-0487), încheiat cu Unitatea Executivă pentru Finanțarea
învățământului Superior, a Cercetării, Dezvoltării și Inovării (UEFISCDI).

Metodologia de testare și rezultatele publicate în revista “Romanian Biotechnological Letters”

Prepararea extractelor

41 Extractele alcoolice au fost obținute în etanol 70%, folosind următoarele metode: mace-
rare la temperatura camerei, cu agitare ocazională timp de 7 zile și cu agitare continuă timp de
43 3 h; reflux timp de 3 h și, respectiv, 30 min. Amestecul de plante a fost mărunțit, apoi fiecare
10 g de pulbere au fost supuse extracției, iar raportul material vegetal/solvent a fost 1:10 (g/v).
45 Extractele au fost filtrate prin hârtie de filtru.

Pentru a prepara extractul uleios, 30 g de amestec vegetal pulbere și 90 g de ulei de
47 măsline au fost menținute timp de 6 h la 60°C într-o baie termostatică de apă, au rămas peste
noapte la temperatura camerei și apoi au fost filtrate prin tifon steril. Proba de analiză a

RO 128713 B1

extractului uleios a fost preparată prin reextragere alcoolică într-o pâlnie de separare (20 ml extract de ulei și 60 ml etanol 70%, v/v). După agitarea viguroasă a pâlniei timp de 15 min, emulsia rezultată a fost centrifugată la 3500 rpm timp de 7 min. Supernatantele au fost colectate și filtrate prin hârtie de filtru.

Proba de analiză a unguentului a fost preparată astfel: o porțiune cântărită din cantitatea totală de unguent a fost extrasă cu etanol 70% (v/v) prin extracție asistată cu ultrasunete (15 min); raportul unguent/solvent a fost 1:20 (g/v). Extractul rezultat a fost centrifugat și filtrat în aceleași condiții ca mai sus. Toate extractele au fost păstrate la 4°C până la analize ulterioare.

1. Evaluarea acțiunii asupra fibroblastelor („fibroblast bioassay”)

Celulele din linia celulară de fibroblaste de șoarece NCTC clona 929 (Colecția europeană de culturi celulare, Sigma-Aldrich, USA) au fost însămânțate în plăci cu 24 de godeuri pentru a forma un monostrat subconfluent la o densitate de 2×10^4 celule per godeu în Mediul Esențial Minimal (MEM) Eagle, conținând 10% ser fetal de vițel (FCS) și 1% antibiotice (penicilină/neomicină/streptomycină), și menținut la 37°C într-un incubator cu umiditate de 5% CO₂. După 24 h, mediul de cultură a fost îndepărtat prin aspirație.

Diluțiile din două extracte vegetale testate au fost făcute în mediu MEM pentru a da o gamă de concentrații finale în godeuri de la 0,1 pg/ml la 50 pg/ml. Analiza a fost efectuată în triplicat pentru fiecare concentrație de probă. Culturile de control au primit mediu normal fără extract de plante medicinale. Celulele au fost incubate și testate pentru creșterea celulară la 24 h, 48 h și 72 h. Probele de testare au fost extractul etanolic și extractul uleios care a fost preparat pentru analiza *in vitro* prin reextracție etanolică. Aceste două extracte s-au concentrat inițial sub evaporator rotativ în vid la 40°C, s-au solubilizat în apă și s-au diluat în mediu MEM pentru a obține o concentrație de 50 pg/ml, și s-au filtrat prin filtrul steril Millipore 0,2 μm înainte de adăugarea la celule.

Efectul extractelor din plante asupra creșterii celulare a fibroblastelor a fost evaluat în conformitate cu metoda Roșu Neutru (RN) descrisă de Borenfreund și Purner (1984), cu unele modificări. Analiza RN este utilizată pentru măsurarea viabilității celulare, ca indicator al citotoxicității în culturile de fibroblaste și pe alte linii celulare. Această procedură simplă și sensibilă se bazează pe criterii morfologice și spectrofotometrice. Ambele teste au fost efectuate pe aceeași cultură celulară într-o placă de testare cu microtitrare cu 24 de godeuri. După intervalul de timp corespunzător, plăcile au fost transferate la un microscop inversat pentru orice semn vizibil al modificării morfologice (inhibarea creșterii, vacuolizare, rotunjire, detașare și liză). Procedura spectrofotometrică cantitativă se bazează pe încorporarea RN, un colorant supravital, în lizozomii celulelor viabile. Mediul a fost îndepărtat prin aspirație și celulele au fost spălate cu soluție salină tamponată cu fosfat, 0,5 ml de soluție roșu neutru (RN) proaspăt preparată, 5 μl NR (50 μl/ml) în 495 μl mediu MEM, și au fost adăugate în fiecare godeu și celulele au fost incubate la 37°C timp de 3 h. Soluția RN a fost îndepărtată și celulele au fost spălate rapid cu 1% CH₂O/1% CaCl₂ pentru a îndepărta RN neîncorporat. Pentru a extrage colorantul din lizozomi, în fiecare godeu s-a adăugat acid acetic 1% (v/v) și etanol 50% (v/v), iar plăcile s-au agitat timp de 10...15 min. Plăcile au fost transferate pe un cititor de microplăci și densitatea optică măsurată la 540 nm. Experimentele pentru culturi celulare au fost efectuate în triplicat pentru fiecare probă și datele au fost raportate ca medie ± SD, calculate cu Excel pentru Windows. Compararea perechilor dintre control și fiecare probă a fost efectuată prin t-test. S-au considerat diferențe statistice semnificative $p < 0,05$.

RO 128713 B1

1 Modificările morfologice ale culturii de fibroblaste tratate cu extract etanolic și reextract
uleios au fost examinate microscopic pentru toate concentrațiile și la toate intervalele de timp
3 selectate. Nu s-a observat niciun semn de modificare pentru niciuna dintre probe.

5 Rezultatele determinărilor spectrofotometrice sunt prezentate în figură. Absorbanta este
proporțională cu numărul celulelor cu membrană intactă. Figura 1a și 1b prezintă viabilitatea
fibroblastelor în prezența extractelor etanolic și uleios. Rezultatele testelor t-student asociate
7 au arătat că nu au existat diferențe semnificative ($p > 0,05$) între control și fiecare concentrație
de extracte, ceea ce arată că cele două extracte nu sunt citotoxice.

9 2. Caracterizarea biochimică a extractelor etanolice prin analiza LC-MS

11 Caracterizarea polifenolilor în extracte a fost efectuată prin cromatografie lichidă cuplată
cu spectrometrie de masă (LC-MS). Caracterizarea chimică s-a efectuat utilizând o coloană
Alltech C18 5U (100 x 3,2 mm, mărimea particulei de 5 μm). Faza mobilă a fost metanol:apă
13 bidistilată = 70:30 (v/v) și debit de 0,6 ml/min.

15 Ca standarde, au fost folosite acidul galic (AG), acidul cafeic (AC), acidul clorogenic
(ACh), acidul ferulic (AF), salicina (S), (+) -catechina (C), quercetina (Q) și rutina (R). 1 ml din
fiecare soluție metanolică de 0,1 mg/ml din standardele menționate au fost amestecate și aduse
17 la 25 ml cu metanol într-un balon volumetric. Astfel, concentrația pentru fiecare standard în
amestec a fost de 4 $\mu\text{g/ml}$.

19 Concentrația standardului în extract a fost calculată cu formula (1):

$$A_{\text{standard}}/C_{\text{standard}} = A_{\text{proba}}/C_{\text{proba}} \quad (1)$$

21 unde: A_{standard} este zona integrată a vârfului pentru fiecare standard; C_{standard} este concentrația
cunoscută de standard; A_{proba} este zona integrată a vârfului pentru fiecare extract; C_{proba} este
23 concentrația standard de probă determinată în extract. Fiecare probă a fost efectuată în triplicat
și s-au dat valori SD. Rezultatele au fost exprimate în mg standard/100 g s.u.

25 *Determinări totale ale fenolilor și flavonoidelor*

27 Conținutul total de fenoli (TF) a fost determinat prin metoda Folin-Ciocalteu. Absorbanta
(A) a fost măsurată la lungimea de undă de 761 nm. Ecuațiile r^2/n (coeficienții de
corelație/numărul de determinări) și domeniile de liniaritate pentru curbele de calibrare au fost:

$$A = 0,0037 \times \text{concentrație de acid cafeic} - 0,0626 \quad (2)$$

$$r^2/n = 0,9933/11 \text{ (domeniu de liniaritate = } 30 \dots 200 \text{ mg/l);}$$

$$A = 0,0018 \times \text{concentrație de acid clorogenic} - 0,0438 \quad (3)$$

$$r^2/n = 0,9956/10 \text{ (domeniu de liniaritate = } 40 \dots 200 \text{ mg/l).}$$

33 Conținutul total de flavonoide din extracte a fost măsurat colorimetric, utilizând metoda
clorurii de aluminiu, iar absorbanta a fost înregistrată la $\lambda = 425 \text{ nm}$. Ecuația, coeficientul de
35 corelație (r^2) și domeniul de liniaritate obținut pentru absorbția curbei de calibrare ca funcție a
concentrației de rutină a fost:

$$A = 0,0029 \times \text{concentrații de rutină} + 0,0103 \quad (4)$$

$$r^2/n = 0,9933/11 \text{ (domeniu de liniaritate = } 30 \dots 200 \text{ mg/l).}$$

39 Concentrațiile de probe au fost determinate din ecuațiile curbelor de etalonare față de
intervalul liniar, iar rezultatele finale s-au exprimat în mg echivalent standard/100 g greutate
41 uscată (su) pentru toate extractele. Toate determinările s-au făcut în triplicat și s-au dat valori
SD.

43 Metoda LC-MS a permis identificarea și cuantificarea principalilor compuși fenolici din
extractele de amestecuri de plante. Compușii din extracte au fost identificați prin studii detaliate
45 ale datelor spectrale MS-MS prin compararea spectrelor acestora cu cele ale standardelor și
cu datele din literatură. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1:

Analiza LC-MS cantitativă a extractelor și reextractelor alcoolice

| Proba | Compuși determinați mg/100 g s.u. | | | | | |
|--------------------------|-----------------------------------|---------------|---------------|-------------|-------------|-------------|
| | AG | AF | AC | ACh | Q | R |
| Macerat 7 zile | 0,339 ± 0,10 | 0,122 ± 0,006 | 0,347 ± 0,063 | 5,95 ± 0,31 | 1,20 ± 0,22 | 2,73 ± 0,11 |
| Macerat 3 h | 0,336 ± 0,041 | 0,161 ± 0,059 | 0,416 ± 0,089 | 11,9 ± 1,40 | 1,13 ± 0,15 | 3,57 ± 1,00 |
| Reflux 3 h | 0,252 ± 0,031 | 0,142 ± 0,010 | 0,412 ± 0,014 | 3,62 ± 0,43 | 3,56 ± 0,93 | 2,76 ± 0,31 |
| Reflux 30 min | 0,278 ± 0,042 | 0,118 ± 0,017 | 0,433 ± 0,20 | 5,26 ± 0,26 | 2,99 ± 0,26 | 2,55 ± 0,27 |
| Reextracte (μg/g) | | | | | | |
| Reextract uleios | 2,43 ± 0,44 | 0,561 ± 0,16 | 1,26 ± 0,11 | 12,2 ± 2,3 | 1,42 ± 0,59 | 8,23 ± 2,7 |
| Reextract uleios prin US | 6,98 ± 0,33 | 0,832 ± 0,047 | 1,76 ± 0,26 | 5,49 ± 0,11 | - | 7,29 ± 0,49 |

Dintre toate standardele utilizate, au fost identificate și cuantificate în extractele analizate: acidul galic (AG), acidul cafeic (AC), acidul clorogenic (ACh), acidul ferulic (AF), quercetina (Q) și rutina (R). Rezultatele analizei LC-MS sunt prezentate în tabelul 2. Din totalul compușilor măsurați, s-a găsit acid clorogenic în cantități mai mari, urmate de rutină și quercetină, și, în cantități mai mici, acid cafeic, acid galic și acid ferulic în extracte etanolice. În ceea ce privește reextractele, valorile pentru polifenoli și flavonoide sunt mai mici, deoarece cantități mai mici de substanțe sunt extrase în ulei. Valorile pentru unii compuși sunt mai mari pentru reextractul de cremă, iar acest lucru se întâmplă probabil datorită prezenței celorlalte ingrediente ale cremei.

Conținutul total de fenoli, flavonoide și activitatea antioxidantă a extractelor din amestecul de plante și din reextractele din extract uleios și din cremă

| Proba | TF | | FL | DPPH |
|--------------------------|------------------|------------------|-----------------|--------------|
| | EAC (g/100 g dw) | ECh (g/100 g dw) | ER (g/100 g dw) | ET (mM) |
| Macerat 7z | 1,77 ± 0,14 | 3,26 ± 0,28 | 1,54 ± 0,038 | 12,1 ± 1,3 |
| Macerat3h | 2,51 ± 0,027 | 4,76 ± 0,055 | 1,53 ± 0,14 | 12,4 ± 1,7 |
| Reflux 3h | 3,63 ± 0,32 | 6,65 ± 0,65 | 0,91 ± 0,088 | 10,9 ± 1,2 |
| Reflux 30 min | 4,55 ± 0,36 | 8,55 ± 0,74 | 50,92 ± 0,086 | 13,5 ± 0,90 |
| Reextracte TE (μM) | | | | |
| Reextract uleios | 0,728 ± 0,11 | 13,5 ± 0,23 | 4,90 ± 0,53 | 1,10 ± 0,059 |
| Reextract uleios prin US | 2,77 ± 1,7 | 52 ± 3,4 | 41,6 ± 4,7 | - |

CAE - caffeic acid equivalents, ChAE- chlorogenic acid equivalents, RE - rutin equivalents, TE - Trolox equivalents.

RO 128713 B1

1 Cantitatea de polifenoli este de două ori mai mare atunci când este exprimată ca
echivalenți acid clorogenic în comparație cu acidul cafeic. Rezultatele au arătat că extractele
3 conțin cantități semnificative de polifenoli, cum ar fi acizii cafeic, clorogenic, galic și ferulic,
precum și quercetină și rutină, compuși raportați în literatură ca având o activitate bună de
5 vindecare a plăgilor. Aceste cantități determină și confirmă capacitatea unguentului de
favorizare a epitelizării și vindecării plăgilor.

7 *Activitatea de eliminare a radicalului liber DPPH*

500 pl de etalon/probă au fost amestecate cu 500 pl de soluție DPPH (0,135 mM în
9 etanol 70% v/v) și amestecul a fost ținut în întuneric timp de 30 min. Absorbanta a fost măsurată
la lungimea de undă de 525 nm. S-a extras procentul de inhibare a curbei de calibrare (% I) față
11 de concentrația de Trolox. Curba ecuației, coeficienții de corelație (r^2) și domeniile de liniaritate
obținute au fost:

$$13 \quad \% I = 0,9455 \text{ Concentrația trolox} + 47,5 \quad (5)$$

$$r^2/n = 0,9902/7 \text{ (domeniu de liniaritate} = 2,5...25 \mu\text{moli/L trolox).}$$

15 Din ecuația curbei de calibrare a fost determinată capacitatea compușilor antioxidanți
din probe de eliminare a radicalului liber DPPH Capacitatea antioxidantă a probelor a fost
17 exprimată ca eșantion echivalent mmoli trolox (TE)/L. Toate determinările au fost făcute în
triplicat și s-au dat valori SD.

19 Activitatea antioxidantă a extractelor evaluate prin testul DPPH de eliminare a radicalului
liber DPPH este ilustrată în tabelul 2. Activitatea crescută de eliminare a radicalului DPPH
21 pentru extractele alcoolice indică o activitate antioxidantă ridicată a extractelor și confirmă, de
asemenea, potențialul unguentului de vindecare a plăgilor. Mai mult, capacitatea antioxidantă
23 a diferitelor ingrediente din unguent a fost evidențiată de numeroase date din literatura de
specialitate. Pentru reextractele de ulei, capacitatea de eliminare a radicalului liber DPPH are
25 valori foarte mici și nu poate fi detectată în cazul reextractului din cremă.

27 *Testul de stabilitate al unguentului. Testul de centrifugare*

1 g de unguent a fost centrifugat timp de 15 min la 3000 rpm la temperatura camerei la
24 h după preparare. Apoi unguentul a fost omogenizat prin turbionare timp de 30 s și
29 centrifugat din nou timp de alte 15 min. Etapa de separare a fost evaluată înainte ca unguentul
să fie omogenizat la vortex și după a doua centrifugare.

31 Nu a fost observată separarea fazelor după centrifugare de 30 (2 x 15) min.

33 Aspect. Probele au fost semisolide, verzi-pal, lăsând o urmă omogenă pe placa de sticlă.
Nu s-a observat nicio separare de fază în decurs de 3 luni de depozitare la temperaturi diferite
(5°C, 22°C).

35 *Determinarea pH-ului unguentului*

37 Valorile de pH ale unguentului au fost obținute prin metoda potențiomtrică directă și
conform cu Bucur. Astfel, 6 ml de apă distilată încălzită la 80°C a fost turnată peste 1 g de
unguent și agitată energic timp de 1 min, apoi a fost filtrată. Filtratul s-a adus la temperatura
39 camerei și s-a măsurat pH-ul.

41 Valoarea pH a unguentului, obținută prin metoda potențiomtrică directă pentru cremă
la temperaturi diferite (5°, 27°C și 45°C), a fost de 4,2. Când a fost aplicată metoda Bucur,
valoarea pH obținută pentru filtrat a fost de 4,3. Conform unor date din literatură, acidificarea
43 locală a plăgii (cu pH-ul unguentului în jurul valorii de 4, precum în cazul mierii, de exemplu)
promovează vindecarea țesuturilor prin prevenirea apariției formei histotoxice neionizate a
45 amoniacului, format sub acțiunea ureazei (de la microorganismele producătoare de urează)
asupra ureei în fluidul extracelular. Într-un mediu acid, amoniacul (NH₃) este convertit la ionul
47 netoxic de amoniu (NH₄⁺). În plus, acidificarea plăgii mărește aportul de oxigen și pO₂ la
suprafața plăgii prin creșterea disocierii de oxihemoglobină-hemoglobină, datorită unei deplasări
49 corespunzătoare a curbei de disociere a oxihemoglobinei-hemoglobinei (efect Bohr).

RO 128713 B1

| | |
|---|----|
| <i>Prezentări de cazuri</i> | 1 |
| Eficacitatea unguentului a fost evidențiată clinic printr-o serie de cazuri, atât cu plăgi acute (în principal arsuri), cât și plăgi cronice, după obținerea consimțământului informat de la pacienți. | 3 |
| Primul caz prezentat este o arsură prin lichid fierbinte gradul IIA-IIB pe fața dorsală a mâinii stângi. Caracteristicile plăgii au fost: leziuni umede, roz-albicioase, de profunzime intermediare, secreții moderate și seroase, porțiuni strălucitoare care indică plasmoragia (zone mai adânci). După tratamentul fără durere prin aplicarea de unguent, pacientul a obținut îmbunătățiri semnificative după numai 4 zile, implicând două schimbări de pansament, cu începutul procesului de epitelizare și estomparea zonelor lucioase. Plaga a fost aproape complet epitelizată după numai 10 zile. | 5 |
| Cel de-al doilea caz este o plagă cronică - un ulcer de gambă localizat în porțiunea distală a gambei drepte, cu etiologie arterio-venoasă, escară uscată și secreție în cantitate mică. Ulcerul de gambă avea vechimea de 1 an și era refractar la alte tratamente obișnuite. După numai 12 zile, cu schimbarea pansamentelor la interval de 1...2 zile, a fost constatată o evoluție remarcabilă, cu contracție clară a plăgii și epitelizare marginală progresivă. | 13 |
| Alte cazuri cu evoluție favorabilă și epitelizare accelerată sunt reprezentate de aplicarea unguentului pe zonele donatoare de grefe de piele, atât în cazul arsurilor, cât și în cazul altor intervenții chirurgicale reconstructive. | 17 |
| | 19 |
| <i>Metodologia de testare și rezultatele obținute prin proiectul de cercetare nr 108CI, încheiat cu UEFISCDI</i> | 21 |
| Proiectul de cercetare a urmărit să obțină date experimentale care să permită evaluarea farmacologică preclinică a produsului, testat atât ca extract, cât și ca produs condiționat (unguent), pentru a se stabili aspectele de bază privind siguranța și eficacitatea produsului. | 23 |
| Au fost abordate modele experimentale <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i> pentru estimarea activității: | 25 |
| - teste de siguranță a produsului: | 27 |
| - cultură de derm reconstituit, model experimental <i>in vitro</i> , pentru evaluarea activității iritante sau corozive asupra epidermei; | 29 |
| - test de pirogenitate <i>in vitro</i> : testarea prezenței endotoxinelor bacteriene (LAL); | 31 |
| - test de încărcătură microbiană. | 31 |
| - teste de eficacitate: | 33 |
| - testarea potențialului sensibilizant (<i>in vivo</i>); | 33 |
| - testul de reparare a plăgii <i>in vitro</i> ; | 35 |
| - vindecarea plăgilor termice (<i>in vivo</i>). | 35 |
| Testarea acestui produs se face pentru încadrarea în categoria dispozitivelor medicale neinvazive care vin în contact cu tegumente lezate, de clasa IIb, în conformitate cu Legea 176 din 2000 și cu Directiva 93/42/EEC din 1993 privind dispozitivele medicale. | 37 |
| <i>Metodologie de testare și rezultatele obținute</i> | 39 |
| 1. <i>Evaluarea toxicității dermale</i> | |
| Protocolul de testare | 41 |
| S-a lucrat în conformitate cu protocolul de testare pus la dispoziție de firma furnizoare a kitului, Mattek din Bratislava, distribuitor al kiturilor <i>in vitro</i> produse de compania americană Mattek (Protocol: <i>in vitro</i> EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT)). | 43 |
| Material și metode | 45 |
| Kit de testare (derm reconstituit uman), livrat sub formă de culturi viabile, 24 de bucăți inserturi de derm uman reconstituit, în placa de 24 godeuri, inserate în geluri de agaroză și suplimentate cu mediu de cultură. | 47 |

RO 128713 B1

- 1 Mediu de cultură - DMEM F12 cu 10% ser fetal.
Control pozitiv: dodecilsulfat de sodiu (SDS), 0,1 g; se recomandă dizolvarea acestuia
3 în tampon fosfat salin, în vederea administrării, realizând o concentrație de lucru de 1%.
Plăcuțe de cultură cu 6 godeuri, plăcuțe de cultură cu 24 de godeuri și cu 96 de godeuri,
5 pentru realizarea diverselor etape experimentale.
- a) Precultivarea țesuturilor
- 7 Țesuturile se recepționează în laborator în ziua sosirii (de regulă, a doua zi a săptămânii).
- 9 Ziua 1. După examinarea conținutului ambalajului, care trebuie să conțină plăcuța cu 24
de godeuri cu țesuturile, mediul de cultură (complet formulat), reactivul MTT, controlul pozitiv
11 (SDS), tampon fosfat salin (pentru dizolvarea reactivului MTT), și solvent pentru dizolvarea
formazanului rezultat din reacția de reducere a MTT, plăcile de cultură cu 6 și 24 de godeuri
13 necesare experimentelor), se stochează corespunzător reactivul MTT și SDS.
- Se examinează apoi fiecare din inserturile de țesut, pentru a se verifica integritatea
15 acestora. Se distribuie mediu de cultură, câte 1 ml în fiecare godeu al plăcilor cu 6 godeuri; se
vor pregăti 8 astfel de plăci cu 6 godeuri, care se preincubează la incubatorul cu CO₂, timp de
17 circa 30 min, pentru a se preîncălzi la temperatura camerei. Se procedează similar și cu plăcuța
ce conține piesele de țesut reconstituit. După aducerea și stabilizarea la 37°C, se scot plăcile
19 și țesutul din incubator. Se prelevează fiecare insert cu țesut, se procedează la o spălare în
TPS, pentru a îndepărta urmele de agaroză, și se plasează câte o piesă cu țesut în trei din cele
21 6 godeuri ale unei plăci. Se procedează similar cu toate cele 24 de godeuri.
- Se incubează peste noapte (12 h, 37°C, 5% CO₂).
- b) Pregătirea probelor de tratat
- 23 SDS (martorul pozitiv) se dizolvă în tampon fosfat salin, la concentrația recomandată
în protocol. Proba nu necesită cântărire, fiind livrată în cantitatea care reconstituie concentrația
25 aplicată la testare.
- Probele extract vegetal se administrează ca soluție apoasă, la o concentrație de 10%
27 după o filtrare sterilizantă, prin filtru de 0,2 μm. Concentrația de 10% depășește concentrațiile
29 uzuale ale produselor topice sau a celor de îngrijire a pielii (dermacosmetice). Proba de unguent
se administrează prin spatulare, întinzând uniform 0,2 g pe fiecare piesă de țesut.
- c) Administrarea probelor și incubarea.
- 31 Ziua 2. Se scoate mediul de cultură din frigider și se preîncălzește la temperatura de
33 37°C. Se scot de la incubator plăcile cu 6 godeuri necesare, care conțin inserturile de țesut.
Pentru toate replicatele independent, se vor utiliza câte 3 inserturi:
- 35 - pentru control pozitiv;
- control negativ;
37 - probe.
- Se transferă piesele de țesut din șirul superior de godeuri în șirul inferior de godeuri. Se
39 examinează din nou pentru integritate. Se absoarbe orice urmă de mediu de pe suprafața
insertului, și se șterge cu ajutorul unui tampon de bumbac steril.
- 41 Cu ajutorul unei pipete automate, se aplică cu exactitate un volum de 20 μl de probă
(SDS, mediu sau proba de extract) pe suprafața superioară a piesei de derm. Întrucât unele
43 operații vor necesita o manevrare de circa 1 min a pieselor, se vor aplica probele la intervale
de 1 min una de alta. Se va marca înainte de administrare tipul de probă aplicat în fiecare din
45 plăci.
- După ce s-au aplicat toate probele, se mută din nou piesele de țesut în incubator, unde
47 se mențin exact 35 min. După 35 min, piesele de țesut se scot în hota cu flux laminar, unde sunt
menținute încă 25 min.

RO 128713 B1

- d) Îndepărtarea substanțelor de tratat și înlocuirea mediului 1
- Fiecare din piesele de țesut se spală în mod repetat (20 de spălări cu 0,3 ml fiecare) de tampon fosfat salin. În final, fiecare probă se imersează în TPS, pentru a asigura că și fața inferioară este curățată de eventualii contaminanți. Spălările repetate durează (inclusiv reinsertia piesei) aproximativ 1 min. Probele se reinseră în godeul superior. 3 5
- După ce tratamentul tuturor pieselor s-a încheiat, se reintroduc la incubator, la 37°C, 5% CO₂. Se incubează din nou pentru 18 h, în condiții standard. Se aduce la temperatura de lucru reactivul MTT. Se marchează o placă cu 24 de godeuri, în care se va proceda la incubarea cu reactiv MTT. Se scot culturile tratate de la incubator. Se procedează la aspirarea mediului de cultură din fiecare godeu cu piese; acest mediu se poate stoca pentru testarea secrețiilor de citokine proinflamatorii cum sunt IL-1 beta și TNF alfa. 7 9 11
- Fiecare din piese se șterge cu grijă de urmele de mediu, prin tamponare pe o hârtie de filtru sterilă, și se plasează într-un godeu al plăcii de 24. Se incubează piesele la 37°C, 5% CO₂, timp de 3 h. În acest timp, în funcție de existența de celule viabile, reactivul MTT va fi redus la un formazan insolubil, de culoare albastră. 13 15
- Se extrag piesele din incubator, și se adaugă peste mediul de cultură 1 ml de alcool izopropilic acidulat, se protejează placa față de lumină și se incubează 2 h pe agitator rotativ, la temperatura camerei, pentru solubilizarea formazanului colorat. În final, se permite evacuarea întregii cantități de lichid de pe insert, în acest scop procedându-se la perforarea cu un ac a fiecărei piese de țesut pentru drenarea completă a soluției de formazan. 17 19
- Din fiecare godeu se prelevează de 2 ori câte 200 μl de supernatant care se transferă într-o placă cu 96 de godeuri, în vederea citirii densității optice. 21
- Măsurarea densității optice se face la un cititor de microplăci, la o lungime de undă de 570 nm, față de un blanc reprezentat de alcoolul izopropilic acidulat. Pentru fiecare dintre probe, se calculează media celor 2 citiri. Se procedează de o manieră similară pentru celelate 2 replicare independente. 23 25
- Pentru fiecare din probe, se calculează % viabilitate, utilizând formula: 27
- Viabilitatea relativă a TS (%) = $[OD_{TS} / \text{Media } OD_{NC}] \times 100$
- Viabilitatea relativă a NC (%) = $[OD_{NC} / \text{Media } OD_{NC}] \times 100$ 29
- Viabilitatea relativă a PC (%) = $[OD_{PC} / \text{Media } OD_{NC}] \times 100$,
- unde: 31
- TS = substanța de testat;
- OD_{TS} = densitatea optică a substanței de testat; 33
- OD_{NC} = densitatea optică a controlului negativ;
- OD_{PC} = densitatea optică a controlului pozitiv. 35
- Pentru fiecare tip de substanță testată, proba de control pozitiv sau negativ, se calculează valorile medii ale viabilității relative pentru trei țesuturi individuale și se folosesc pentru clasificare conform Modelului Predictiv. 37
- Procedeu de interpretare a datelor (Model predictiv). 39
- Conform clasificării EU și GHS (categoria R38/Categoria 2 sau fără marcare), un iritant este prezis dacă media viabilității tisulare a trei țesuturi individuale expuse la substanța test este sub 50% față de viabilitatea relativă a controalelor negative. 41

| Rezultat <i>in vitro</i> | Predicția <i>in vivo</i> |
|-----------------------------------|--|
| Viabilitatea tisulară medie ≤ 50% | Iritant (I), (R38 sau categoria GHS 2) |
| Viabilitatea tisulară medie > 50% | Neiritant (NI) |

RO 128713 B1

1 Rezultatele obținute la testarea acțiunii iritante-corozive pe model de derm reconstituit.
2 S-au efectuat teste de viabilitate, prin aplicarea modelului EPI-SKIN, pe produsul
3 "Produs activ - Extract Dermaplant", "Produs terapeutic - unguent Dermaplant", în trei serii de
4 replicare independente, a câte 3 seturi de determinări în fiecare replicat independent.

5 Datele înregistrate în urma efectuării testului au fost:

| 7 | Produsul | Media DO | Stdev | p ⁽²⁾ | Viabilitate relativă |
|----|---------------------|----------|--------|------------------|----------------------|
| | PBS*,1 | 1,887 | 0,2703 | - | 100% |
| 9 | SDS** | 0,031 | 0,0175 | - | 0 |
| 11 | Extract Dermaplant* | 1,413 | 0,4634 | 0,035 | 69,88% |
| 13 | Unguent Dermaplant | 1,328 | 0,6436 | 0,035 | 74,46% |

*Media a trei replicare independente.

15 ** Martor pozitiv; 1: martor negativ; 2: testul t student, 2 cozi, distribuții homoscedatice, față de control pozitiv.

17 În conformitate cu criteriile de clasificare, se trage concluzia că produsele "Produs activ -
18 Extract Dermaplant" și "Produs terapeutic - unguent Dermaplant" sunt neiritante (NI), și, în
19 concluzie, pot fi utilizate în condiții de siguranță, în conformitate cu instrucțiunile de utilizare.

2. Evaluarea încărcării cu endotoxine - Metoda LAL - tehnica gel-clot.

21 Testul pentru endotoxine bacteriene (BET) este utilizat pentru a detecta endotoxinele
22 din bacteriile gram negative, utilizând lizatul de amoebocite de la *Limulus polyphemus* sau
23 *Tachypleus tridentatus*. Tehnica utilizată în laboratorul de microbiologie pentru detectarea
24 endotoxinelor bacteriene este LAL „gel-clot” LONZA. Metoda gel-clot se bazează pe reacția de
25 opacizare și gelificare a extractului LAL în prezența endotoxinelor bacteriene. Controlul
26 endotoxinelor bacteriene (test LAL - metoda gel-clot) oferă o alternativă *in vitro* la testul de
27 pirogenitate efectuat pe iepuri.

28 Reactivul LAL folosit în testare reprezintă un produs liofilizat obținut din lizat de
29 amoebocite de la *Limulus polyphemus*. Reactivul LAL se reconstituie extemporaneu cu apa
30 LAL, prin rotiri ușoare și blânde.

31 Apa LAL se folosește pentru reconstituirea Endotoxinei Standard de Control (CSE).
32 Endotoxina Standard de Referință (RSE) este un preparat de referință cu un conținut pre-
33 determinat de endotoxină, specificat în Certificatul de Analiză. În cazul utilizării endotoxinei
34 RSE, înainte de începerea testării, trebuie accesat și verificat certificatul de pe site-ul pro-
35 ducătorului, pentru data de expirare, întrucât aceasta nu este menționată în certificatul de
36 analiză.

37 Endotoxina Standard de Control (CSE) reprezintă un înlocuitor al endotoxinei standard
38 de referință (RSE) și are un conținut de endotoxină exprimat în EU/ng. Potențialul endotoxinelor
39 bacteriene de a induce un efect pirogen este exprimat în EU/ng (ml). Potențialul CSE este
40 determinat prin raportul dintre RSE/CSE, testat la o anumită sensibilitate a reactivului LAL.

41 Atât Endotoxina Standard de Referință (RSE), cât și Endotoxina Standard de Control
42 (CSE), se reconstituie cu apă LAL, conform instrucțiunilor specificate de către producător în
43 certificat: în testarea de rutină se utilizează RSE sau CSE; după reconstituire, seria standard
este valabilă o perioadă de timp determinată, dacă se păstrează la 2...8°C.

RO 128713 B1

Bufferul de pH se folosește numai atunci când valoarea pH-ului soluției test se află în afara valorilor normale de admisibilitate cuprinse între 6...8. Acesta se folosește conform specificației producătorului și trebuie să fie lipsit de endotoxine detectabile și factori de interferență. 1 3

Confirmarea sensibilității reactivului LAL 5

Endotoxina Standard de Referință (RSE) sau Endotoxina Standard de Control (CSE) reprezintă un preparat de referință cu un conținut de endotoxină predeterminat și care se reconstituie cu o cantitate de apă LAL specificată în procedeul de lucru specificat de producătorul kit-ului LAL. Soluția rezultată în urma reconstituirii endotoxinei cu apa LAL reprezintă soluția stoc și are o concentrație de endotoxină determinată și exprimată în IU/ml sau EU/ml. Se fac diluții seriale, astfel încât, de la conținutul predeterminat de endotoxină din soluția stoc, să se ajungă la concentrații de 1 de 1 EU/ml, respectiv 2λ , λ , $\lambda/2$, $\lambda/4$, unde λ = sensibilitatea reactivului LAL utilizat. 7 9 11 13

Confirmarea sensibilității reactivului LAL și seriei standard (RSE/CSE):

- se realizează în minim 4 replicare; 15
- se efectuează înaintea începerii ciclului de testare;
- se efectuează când se reconstituie o nouă soluție stoc; 17
- se efectuează când folosește un nou lot de reactiv.

Fiecare replicat se constituie din 0,1 ml de reactiv LAL, reconstituit extemporaneu conform procedeului de lucru specificat de producătorul kit-ului, adăugat peste 0,1 ml din concentrațiile 2λ , λ , $\lambda/2$, $\lambda/4$ de RSE/CSE. 19 21

Amestecul va fi incubat conform specificației producătorului la temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ timp de $60 + 2$ min. 23

Rezultatul seriei standard nu este valid dacă:

- unul dintre replicare la cea mai mică concentrație a seriei standard $\lambda/4$ induce un rezultat pozitiv reprezentat de un gel ferm care rămâne stabil la întoarcerea tubului la 180° ; 25
- unul dintre replicare la concentrația $2 X$ induce un rezultat negativ. 27

Testarea limitei de endotoxină (L) pentru o probă presupune:

- diluția probei (dacă este nevoie); 29
- control pozitiv serie standard (C+);
- control negativ (C-); 31
- control pozitiv probă (PPC).

Concentrația de endotoxină din produsul de analizat trebuie să fie mai mică decât limita de endotoxină admisă. Pentru testarea limitei de endotoxină este necesar să se prepare diluții prin dizolvarea sau diluarea în apă LAL a substanțelor active sau a produselor medicamentoase. 33 35

Testele de control: 37

- testul de control negativ (C-) constituit din 0,1 ml apă LAL, peste care se adaugă 0,1 ml reactiv LAL; 39

- testul de control pozitiv (C+) constituit din 0,1 ml diluție CSE la concentrația de două ori sensibilitatea, peste care se adaugă 0,1 ml reactiv LAL; 41

- testul de control pozitiv proba (PPC) se realizează prin combinarea a 0,05 ml diluție proba PPC, la care se adaugă 0,05 ml endotoxină, cu 0,1 ml reactiv LAL; 43

- testarea probei constă în adăugarea peste 0,1 ml din diluția probei a 0,1 ml reactiv LAL. 45

RO 128713 B1

1 Repartizarea reactivului în toate eprubetele se face în maximum 2 min. După ce s-a
efectuat repartizarea reactivului, eprubetele se agită ușor pentru a omogeniza conținutul, apoi
3 stativul cu eprubete se incubează în baia termostată la $37 \pm 1^\circ\text{C}$ timp de $60 + 2$ min. După
expirarea perioadei de incubare se citesc rezultatele.

5 *Conformitatea rezultatului*

Rezultatul testării este conform dacă:

7 - în ambele replicare cu proba (sau diluția) de analizat, rezultatul este negativ (concentrația de endotoxină din proba analizată se află sub nivelul maxim admis), adică produsul de reacție nu este un gel sau se formează o substanță vâscoasă care nu se menține în interiorul eprubetei după rotirea acesteia la 180° .

11 Produsul se consideră conform dacă, în ambele replicare ale probei de analizat se constată un rezultat negativ.

13 Produsul se consideră neconform, dacă în ambele replicare rezultatul este pozitiv (concentrația de endotoxină din produsul de analizat este mai mare sau egală cu limita maximă admisă).

15 *Rezultatele obținute la evaluarea încărcării cu endotoxine*

17 A fost estimată încărcătura cu endotoxine prin testul LAL pentru preparatul Extract Dermaplant, datorită faptului că produsul sub formă de unguent poate eventual fi contaminat cu endotoxine ce provin din plantele utilizate în procesul de fabricație. Unguentul are caracteristici ce fac imposibilă aplicarea testului pentru endotoxine.

21 În conformitate cu datele raportate, produsul Dermaplant - Extract a fost găsit ca încadrându-se în limitele de conținut de endotoxine recomandate pentru produse topice și dispozitive medicale de tip II, respectiv sub 0,5 EU/ml.

25 3. Metoda de testare a contaminării microbiene

27 Aparatură și sticlărie: plăci Petri cu diametrul de 90 mm, sterile, de unică folosință; pipete gradate sterile de volum 10 ml; eprubete sterile; pahare Erlenmayer sterile; pipetor automat; balanța analitică; cabinet biologic cu flux de aer laminar (LAF); termostate setate la 25, 35 și 44°C .

29 Medii de cultură folosite (conform FE în vigoare): mediu A (Casein soya bean digest broth); mediu B (Casein soya bean digest agar); mediu C (Sabouraud-glucose agar cu cloramfenicol); soluție tampon apă peptonată cu clorură de sodiu, $\text{pH} = 7$; mediu E (Enterobacteria enrichment broth-Mossel); mediu D (Lactose monohydrate broth); mediu F (Crystal violet neutral red, bile agar with glucose); mediu N (Cetrimid agar); mediu O (Baird-Parker agar); mediu I (Tetratratat bile brilliant green broth); mediu K (XLD agar).

35 *Metodologia de testare număr total microorganisme aerobe viabile - metoda inoculării în profunzime*

37 Probele se prelucrează în condiții aseptice, în punctul de lucru de clasa A. Se prepară diluția 1/10: 10 g sau 10 ml de produs se dizolvă în 90 ml soluție tampon și se omogenizează. Ulterior, se prepară diluții seriale (1/100, 1/1000), folosind același solvent. Câte 1 ml din diluția probei se repartizează în 2 plăci Petri sterile și se adaugă în fiecare placă câte 15...20 ml mediu de cultură mediu B, topit și răcit până la o temperatură de 45°C .

43 Se acoperă fiecare placă Petri cu capacul, se rotește ușor pe o suprafață plană și se lasă să se solidifice la temperatura camerei. Se termostatează plăcile cu mediul de cultură B la o temperatură de $30...35^\circ\text{C}$, timp de 5 zile.

45 *Rezultate*

47 După expirarea perioadei de incubare, se selectează plăcile Petri care prezintă creștere microbiană, dar se numără coloniile microbiene doar de pe plăcile care prezintă maximum 250 unități formatoare de colonii (ufc). Numărul total de microorganisme aerobe viabile este

RO 128713 B1

egal cu media aritmetică a numărului de ufc recuperate de pe mediul de cultură B. Dacă nu se obține nicio recuperare microbiană, rezultatul se exprimă ca fiind mai mic decât limita de detecție (adică cea mai mică diluție testată) și anume < 10 ufc/g sau ml.

Metodologia de testare număr total drojdii și mucegaiuri - metoda inoculării în profunzime

Prelucrarea probelor se efectuează la fel ca pentru număr total microorganisme aerobe viabile: se prepară diluții seriale (1/10, 1/100), folosind ca solvent soluție tampon și câte 1 ml din diluția probei se repartizează în câte 2 plăci Petri sterile. În fiecare placă se adaugă câte 15...20 ml mediu de cultură mediu C (Sabouraud glucoza agar cu cloramfenicol), topit și răcit până la o temperatură de 45°C.

Se acoperă fiecare placă Petri cu capacul, se rotește ușor pe o suprafață plană și se lasă să se solidifice la temperatura camerei. Se termostatează plăcile cu mediul de cultură C la o temperatură de 20...25°C, timp de 5 zile.

Rezultate

După expirarea perioadei de incubare, se selectează plăcile Petri care prezintă creștere microbiană, dar se numără coloniile microbiene doar de pe plăcile care prezintă maximum 50 ufc. Numărul total de drojdii și mucegaiuri este egal cu media aritmetică a numărului de ufc recuperate de pe mediul de cultură C. Dacă nu se obține nicio recuperare microbiană, rezultatul se exprimă ca fiind mai mic decât limita de detecție (adică cea mai mică diluție testată), și anume < 10 ufc/g sau ml.

Metodologia de testare Enterobacterii și alte bacterii Gram negative

În 100 ml mediu de cultură D se adaugă 10 g/ml produs (diluția 1/10), se omogenizează și se incubează la 20...25°C timp de 2 h. După incubare se transferă 1 ml (din diluția 1/10) în 100 ml mediu de cultură E care se termostatează la 30...35°C timp de 18...48 h. Din mediul E se realizează subculturi prin inocularea la suprafață a câte două plăci de mediu de cultură F (câte 1 ml în fiecare placă) și se incubează la 30...35°C timp de 18...24 h.

Rezultate

După expirarea perioadei de incubare, se selectează plăcile Petri care prezintă creșterii microbiene. Apariția pe mediu de cultură F a unor colonii bacteriene roșii, cu o zonă de roșeață în jur poate constitui indiciul prezentei enterobacteriilor.

Metodologia de testare Pseudomonas aeruginosa

În 100 ml mediu de cultură A se adaugă 10 ml (echivalentul a 1 g/ml produs) din diluția 1:10 a probei preparate ca la număr total microorganisme aerobe viabile, se omogenizează și se incubează la 30...35°C timp de 18...48 h. Se realizează subculturi prin inocularea la suprafață a câte două plăci de mediu de cultură N (câte 1 ml în fiecare placă) și se incubează la 30...35°C timp de 18...72 h.

Rezultate

După expirarea perioadei de incubare, se selectează plăcile Petri care prezintă creșteri microbiene. Apariția pe mediu de cultura N a unor colonii bacteriene galben-verzui poate constitui indiciul prezentei *P. aeruginosa*.

Metodologia de testare Staphylococcus aureus

În 100 ml mediu de cultură A se adaugă 10 ml (echivalentul a 1 g/ml produs) din diluția 1:10 a probei preparate ca la număr total microorganisme aerobe viabile, se omogenizează și se incubează la 30...35°C timp de 18...48 h. Se realizează apoi subculturi prin inocularea la suprafață a câte două plăci de mediu de cultură O (câte 1 ml în fiecare placă) și se incubează la 30...35°C timp de 18...72 h.

RO 128713 B1

1 Rezultate

2 După expirarea perioadei de incubare, se selectează plăcile Petri care prezintă creșteri
3 microbiene. Apariția pe mediu de cultură O a unor colonii bacteriene galbene sau albe și
inconjurate de o zonă galbenă poate constitui indiciul prezenței *S. aureus*.

5 Metodologia de testare evidențiere microorganisme patogene din genul *Salmonella*

6 În 100 ml mediu de cultură A se adaugă 10 g/ml probă, se omogenizează și se
7 incubează la 30...35°C timp de 18...48 h. După incubare se transferă 0,1 ml (din diluția 1/10)
8 în 10 ml mediu de cultură I care se termostatează la 43...45°C timp de 18...48 h. Se realizează
9 apoi subculturi prin inocularea la suprafață a câte două plăci de mediu de cultură K (câte 1 ml
10 în fiecare placă) și se incubează la 30...35°C timp de 18...72 h.

11 Rezultate

12 După expirarea perioadei de incubare, se selectează plăcile Petri care prezintă creșteri
13 microbiene. Apariția pe mediu de cultură K a unor colonii bacteriene roșiatice poate constitui
indiciul prezentei *Salmonella sp.*

15 Evidențierea microorganismului *Escherichia coli*

16 În 100 ml mediu de cultură A se adaugă 10 ml (echivalentul a 1 g/ml produs) din diluția
17 1:10 a probei preparate ca la număr total microorganisme aerobe viabile, se omogenizează și
18 se incubează la 30...35°C timp de 18...24 h. După incubare se transferă 1 ml în 100 ml mediu
19 de cultură G care se termostatează la 43...45°C timp de 24...48 h. Se realizează subculturi prin
20 inocularea la suprafață a câte 1 ml pe două plăci de mediu de cultură H și se incubează la
21 30...35°C timp de 18...72 h.

23 Rezultate

24 După expirarea perioadei de incubare, se selectează plăcile Petri care prezintă creșteri
25 microbiene. Apariția pe mediu de cultură H a unor colonii bacteriene poate constitui indiciul
prezentei *E. coli*.

27 Rezultatele obținute la evaluarea contaminării microbiene

28 La evaluare s-a utilizat Extractul Dermaplant și Produsul Unguent Dermaplant pentru
29 testare, în condiile determinării contaminanților bacterieni, fungici și levuri, conform protocolului
descriș.

30 În urma evaluării, nu au fost descoperiți contaminanți din categoria microorganismelor
31 patogene.

32 În același timp, deși a prezentat o încărcătură microbiană reprezentată de specii
33 nepatogene, produsul în forma actuală nu este recomandabil încă pentru dispozitive medicale
34 ce vin în contact cu țesuturile lezate, pentru care este recomandabilă o nouă operațiune de
35 sterilizare, cel mai probabil prin iradiere, ceea ce ar asigura nivelul de sterilitate recomandat
pentru produse destinate tratamentului arsurilor.

37 4. Teste pentru repararea arsurilor termice

39 Modelul pe șoarece

40 Modelul utilizează șoareci tineri (în vârstă de 6...8 săptămâni) care sunt anesteziați cu
41 ketamină și xilazină sau alte anestezice administrate intraperitoneal. În unele cazuri, se
42 administrează 1 ml de soluție salină subcutanată de-a lungul coloanei vertebrale pentru a
43 proteja măduva spinării de orice leziune. Ulterior, părul de pe partea dorsală este îndepărtat.
44 Regiunea dorsală este zona de elecție, deoarece animalul nu are acces și nu apar suplimentar
45 leziuni de grataj în aria leziunii termice provocate. Șoarecele este apoi fixat cu regiunea epilată
46 într-un șablon cu o fereastră care asigură o expunere predeterminată a pielii. Suprafața expusă
47 a șoarecelui din șablon este apoi imersată într-o baie de apă la 60...100°C timp de 8...12 s
pentru a provoca o arsură totală. Animalele sunt apoi observate frecvent pentru semne de
durere sau disconfort și li se administrează analgezice.

RO 128713 B1

La șoareci, leziunea termică este limitată de dimensiunea animalelor, deoarece acestea pot tolera doar o arsură de 30% din suprafața totală corporală. Unii autori menționează că faza de hipermetabolism nu este complet activată decât de leziuni termice mai mari de 40% din suprafața totală corporală. Astfel, deși modelul de arsură a șoarecelui este simplu de realizat, acesta pierde din relevanță când se studiază statusul hipermetabolic post arsură.

Modelul pe șobolan

Modelul de arsură la șobolan se realizează în același mod ca și cel al modelului pe șoarece, cu unele diferențe minore, cum ar fi temperatura și durata expunerii la apă încălzită. Șobolanii, fiind animale cu dimensiuni mai mari, pot suporta o arsură de până la 60% din suprafața totală corporală, prin utilizarea modelului menționat anterior pentru regiunea dorsală și suplimentar o altă leziune termică în regiunea abdominală. Provocarea unei plăgi prin arsură termică cu peste 60% din suprafața totală corporală la șobolani este urmată de un grad de supraviețuire redus și nu este sustenabilă pentru experimentare. Există necesitatea unui model de leziune termică suficient de extinsă pentru a provoca hipermetabolismul observat în cazul arsurilor umane pe suprafețe mari. Deoarece în faze inițiale post-arsura la om, se produce extracția glucozei din țesutul afectat, aceasta induce hiperglicemie și hiperlactatemie.

Prin urmare, modelul de arsură la șobolan este superior modelului pe șoarece prin capacitatea crescută de a recupera hipermetabolismul, acesta devine deficitar atunci când se încearcă includerea riscului de infecție pentru a realiza sepsisul post-arsură observat la pacienții umani cu arsuri extinse peste 60%.

Rezultatele obținute la testarea capacității de favorizare a reparării plăgilor arse

Testarea s-a efectuat utilizând modelul care utilizează șobolani. S-a lucrat pe șobolani albi Wistar, masculi, de 180...200 g, furnizați de biobaza institutului Cantacuzino. Au fost aplicate două variante ale modelului de testare, respectiv modelul convențional, în care se realizează leziunea pe ambele flancuri ale animalului, și un model modificat, în care se realizează leziunea termică pe un singur flanc, și se utilizează un lot de animale „martor” (în care leziunea nu este tratată) și un lot „tratată”, în care se administrează preparatul de testat.

În ambele cazuri, plăgile au fost obținute prin aplicarea unei expuneri a tegumentului dorsal epilat la o temperatură de 90°C timp de 10 s, pe animale anesteziate cu ketamină (50 mg/kg, i.p.) După această expunere, animalele au fost lăsate în repaos pentru 24 h, după care li s-a aplicat tratamentul.

Au fost următoarele loturi, care au fost tratate la fiecare 48 h, timp de 6 zile:

| Nr. lot | Denumire lot | Observații |
|---------|--------------|-----------------------------|
| 1 | Lot tratat | Leziune termică bilaterală |
| 2 | Lot martor | Leziune termică unilaterală |
| 3 | Lot 2 tratat | Leziune termică unilaterală |

Rezultatele experimentelor - observații vizuale ale regenerării tisulare:

| Nr. lot | Denumire lot | Observații | Rezultat (% arie lezională) |
|---------|--------------|---|-----------------------------|
| 1 | Lot tratat | Leziune termică bilaterală - zonă control | 52% |
| | | Leziune termică bilaterală - zonă tratată | 41% |
| 2 | Lot martor | Leziune termică unilaterală | 31% |
| 3 | Lot 2 tratat | Leziune termică unilaterală | 56% |

RO 128713 B1

1 Din analiza rezultatelor, se poate deduce că în cazul animalelor lezate bilateral, există
2 probabil o influență (mediată probabil de producția de citokine și limfocine) care generează o
3 reparație îmbunătățită și pe flancul netratat. Pe modelul „unilateral” se observă o stimulare mai
netă a procesului reparator la animalele tratate, comparativ cu animalele din lotul martor.

5 Pentru a aprofunda aceste aspecte, se propune o continuare a investigațiilor, prin
6 utilizarea unor kituri de analiză multiplex pentru a monitoriza efectul produsului asupra
7 producției de citokine și limfocine implicate în procesul inflamator și apoi în repararea plăgii.

5. Determinarea nivelurilor de citokine

9 S-au determinat nivelurile de citokine - IL1beta, TNFalfa și IL6 în supernatantii de cultură
10 colectați în urma experimentului pe Kitul ToxDerm, folosind kituri comerciale ELISA, în
11 conformitate cu instrucțiunile producătorului (ab214025, ab46087, respectiv ab46042), în
triplicat. S-a constatat o semnificativă reducere a nivelului de citokine pro-inflamatoare IL1 beta
13 și TNF alfa, precum și o menținere la un nivel comparabil cu martorul pentru IL6.

15 S-a observat o reepitelizare mai avansată a animalelor tratate față de lotul martor.
16 Tratamentul a constat din aplicarea zilnică a preparatului sub formă de unguent pe suprafața
17 plăgii. Plăgile au fost realizate prin aplicarea, în ziua 1 a experimentului, a unui dispozitiv încălzit
la temperatura de 80°C, și menținerea acestuia în contact cu dermul pentru 10 s, pe suprafața
19 în prealabil epilată a animalelor. După producerea leziunilor, s-a procedat la aplicarea
tratamentului. Nu s-a folosit pansament ocluziv.

21 Tratamentul s-a aplicat în continuare pe o perioadă de 14 zile, în zilele 2...4, 7...10, 13,
14. Pe durata experimentului, animalele au fost hrănite și au primit apă *ad libitum*. Nu s-au
23 observat efecte adverse determinate de aplicarea tratamentului. Deși recuperarea lotului martor
a fost mai lentă, nu s-au semnalat nici în acest caz efecte adverse severe sau mortalități.

Concluzii și propuneri

25 Având în vedere interesul crescând pentru preparatele de origine naturală, unguentul
26 oferă o compoziție pentru tratamentul arsurilor și plăgilor, care este eficientă, stabilă, plăcută,
27 relativ ieftină, ușor de administrat, aplicată și utilizată în condiții de siguranță.

29 Proprietățile terapeutice favorabile rezultă prin adăugarea efectelor terapeutice ale
30 extractelor uleioase dintr-o varietate de plante medicinale la cele ale unei baze lipofilice de
31 unguent, constând din uleiuri vegetale, ceară de albine, rășină de conifere și ulei esențial de
lavandă, toate prezentând o certă valoare și importanță terapeutică, care au fost confirmate de
o multitudine de date din literatura de specialitate.

33 Lucrările efectuate asupra produselor Produs activ - Extract Dermaplant și Produs
terapeutic - unguent Dermaplant au demonstrat următoarele:

35 - preparatele nu prezintă toxicitate dermală, după cum s-a demonstrat prin utilizarea
modelului de testare *in vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT);

37 - preparatul Extract Dermaplant, testat *in vitro* pe fibroblaste 3T3, a demonstrat o
capacitate remarcabilă de stimulare a proliferației (+18% creștere a vitezei de proliferare);

39 - testele de securitate au evidențiat că produsul este liber de contaminanți de tipul
endotoxinelor, fiind prin urmare sigur pentru aplicare pe tegument deteriorat;

41 - nu s-a evidențiat prezența de germeni patogeni, iar încărcătura microbiană a fost în
limitele impuse de Farmacopee pentru preparate topice;

43 - evaluarea efectului reparator *in vivo* a evidențiat o stimulare a reparației țesutului
dermal lezionat, pe un model de leziune termică unilaterală la șobolan, procesul reparator la 6
45 zile fiind accelerat cu 69%;

47 - studiul privind efectul asupra producției de molecule de semnalizare, prin aplicarea
unui model de evaluare a nivelului de citokine, chemokine și limfocine pro- și antiinflamatorii în
49 serul animalelor tratate, a evidențiat o diminuare semnificativă a nivelului de citokine pro-
inflamatoare IL1 beta și TNF alfa, precum și o menținere la un nivel comparabil cu martorul
pentru IL6.

Bibliografie

1. Majewska I., Gendaszewska-Darmach E., *Proangiogenic activity of plant extracts in accelerating wound healing - a new face of old phytomedicines*. Acta Biochim Pol. 2011; 58(4):449-60. 1 3 5
2. Serarslan G., *Pustular psoriasis-like tinea incognito due to Tricophyton rubrum*. Mycoses. 2007; 50(6):523-24. 7
3. Song HS, Park TW, Sohn UD, Shin YK, Choi BK, Sim SS. *The effect of caffeic acid on wound healing in skin-incised mice*. Korean J Physiol Pharmacol. 2008; 12(6): 343-47. 9
4. Aziz Z., Abu S.F., Chong N.J. *A systematic review of silver-containing dressings and topical silver agents for burn wounds*. Burns. 2012; 38(3):307-18. 11
5. Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek S.N., Dibo S.A., *Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature*. Burns. 2007; 33(2):139-48. 13
6. Upadhyay N.K., Kumar R., Mandotra S.K., Meena R.N., Siddiqui M.S., Sawhny R.C., Gupta A., *Safety and wound healing efficacy of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) seed oil in experimental rats*. Food Chem Toxicol. 2009; 47(6): 1146-53. 15
7. Nevin KG, Rajamohan T., *Effect of topical application of virgin coconut oil on skin components and antioxidant status during dermal wound healing in young rats*. Skin Pharmacol Physiol. 2010; 23(6):290-7. 17 19
8. Ghelardini C., Galeotti N., Salvatore G., Mazzanti G., *Local anaesthetic activity of the essential oil of Lavandula angustifolia*. Planta Med. 1999; 65(8):700-3. 21
9. Preethi K.C., Kuttan R., *Wound healing activity of flower extract of Calendula officinalis*. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2009; 20(1):73-9. 23
10. Jarrahi M., Vafaei A.A., Taherian A.A., Miladi H., Rashidi Pour A., *Evaluation of topical Matricaria chamomilla extract activity on linear incisional wound healing in albino rats*. Nat Prod Res. 2010; 24(8):697-702. 25
11. Saddige Z., Naeem I., Maimoona A., *A review of the antibacterial activity of Hypericum perforatum L.* J Ethnopharmacol. 2010; 131(3):511-21. 27
12. Deters A., Zippel J., Hellenbrand N., Pappai D., Possemeyer C., Hensel A., *Aqueous extracts and polysaccharides from Marshmallow roots (Althea officinalis L.): cellular internalisation and stimulation of cell physiology of human epithelial cells in vitro*. J Ethnopharmacol. 2010; 127(1):62-9. 29 31
13. Amini M., Kherad M., Mehrabani D., Azarpira N., Panjehshahin M.R., Tanideh N., *Effect of Plantago major on burn wound healing in rat*. J Appl Animal Res. 2010; 37(1): 53-6. 33
14. Karamac M., Kocinka A., Pegg R.B., *Content of gallic acid in selected plant extracts*. Pol J Food Nutr Sci. 2006; 15/56(1):55-8. 35
15. Kalita D., Saikia J.C., Sindagi A.S., Anmol G.K., *Antimicrobial activity of leaf extracts of two medicinal plants of Boghoral Hill (Morigaon) against human pathogens*. The Bioscan. 2012; 7(2):271-4. 37 39
16. Cos P., Hermans N., De B.T., Apers S., Sindambiwe J.B., Witvrouw M., De C.E., Vanden B.D., Pieters L., Vlietinck A.J., *Antiviral activity of Rwandan medicinal plants against human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1)*. Phytomedicine. 2001; 9(1): 62-8. 41
17. Ghaisas M.M., Kshirsagar S.B., Sahane R.S. *Evaluation of wound healing activity of ferulic acid in diabetic rats*. Int Wound J. 2014; 11(5):523-32. 43
18. Xiyun Y., Yijuan L., Lianxi L., Cheng Y., Mingyao L., inventors; East China Normal University, applicant. *Application of ferulic acid in preparation of medicine used for promoting skin wound healing*. State Intellectual Property Office of the P.R.C. patent CN 102342926 A, 2012. 45 47

- 1 19. Skaper S.D., Fabris M., Ferrari V., Dalie Carbonare M., Leon A., *Quercetin protects*
cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced
3 *by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid*. Free Radic. Biol Med. 1997;
22(4):669-78.
- 5 20. Almeida J.S., Benvegno D.M., Bouffleur N., Reckziegel P., Barcelos R.C., Coradini
K., De Carvalho L.M., Burger M.E., Beck R.C., *Hydrogels containing rutin intended for*
7 *cutaneous administration: efficacy in wound healing in rats*. Drug Dev Ind Pharm. 2012;
38(7):792-99.
- 9 21. Amini M., Kherad M., Mehrabani D., Azarpira N., Panjehshahin M.R., Tanideh N.,
Effect of Plantago major on burn wound healing in rat. J. Appl. Anim. Res. 2010; 37(1): 53-6.
- 11 22. Barbakadze V., Mulkijanyan K., Gogilashvili L., Amiranashvili L., Merlani M.,
Novikova Z., Sulakvelidze M., *Allantoin- and Pyrrolizidine Alkaloids-Free Wound Healing*
13 *Compositions from Symphytum asperum*. Bull. Georg. Natl. Acad. Sci. 2009; 3(1): 159-64.
- 15 23. Deters A., Zippel J., Hellenbrand N., Pappai D., Possemeyer C., Hensel A., *Aqueous*
extracts and polysaccharides from Marshmallow roots (Althea officinalis L.): cellular
17 *internalisation and stimulation of cell physiology of human epithelial cells in vitro*. J
Ethnopharmacol. 2010; 127(1):62-9.
- 19 24. Jarrahi M., *An experimental study of the effects of Matricaria chamomilla extract on*
cutaneous burn wound healing in albino rats. Nat Prod Res. 2008; 22(5):422-7.
- 21 25. Jarrahi M., Vafaei A.A., Taherian A.A., Miladi H., Rashidi Pour A., *Evaluation of*
topical Matricaria chamomilla extract activity on linear incisional wound healing in albino rats.
Nat Prod Res. 2010; 24(8): 697-702.
- 23 26. Lavagna S.M., Secci D., Chimenti P., Bonsignore L., Ottaviani A., Bizzarri B.,
Efficacy of Hypericum and Calendula oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in
25 *childbirth with caesarean section*. Farmaco. 2001; 56(5-7):451-3.
- 27 27. Mulkijanyan K., Barbakadze V., Novikova Z., Sulakvelidze M., Gogilashvili L.,
Amiranashvili L., Merlani M., *Burn healing compositions from caucasian species of comfrey*
(Symphytum L.). Bull. Georg. Natl. Acad. Sci. 3009; 3(3):114-7.
- 29 28. Naeem I., Maimoona A., *A review of the antibacterial activity of Hypericum*
perforatum L. Journal of Ethnopharmacology. 2010; 131(3):511-21.
- 31 29. Preethi K.C., Kuttan R., *Wound healing activity of flower extract of Calendula*
officinalis. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2009; 20(1):73-9.
- 33 30. Preethi K.C., Kuttan R., *Effect of Calendula officinalis flower extract on acute phase*
proteins, antioxidant defense mechanism and granuloma formation during thermal burns. J Clin
35 BiochemNutr. 2008; 43(2):58-64.
- 37 31. Beauchamp G.K., Keast R., Morel D., Lin J., Pika J., Han Q., Lee C., Smith A., Paul
A., Breslin P., *Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil*. Nature. 2005; 437(7055):45-6.
- 39 32. De la Puerta R., Martinez-Dominguez E., Valentina Ruiz-Gutierrez V., *Effect of minor*
components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. Z. Naturforsch. 2000;
55c:814-9.
- 41 33. Mârquez Martin A., de la Puerta Vâzquez R., FernândeZ-Arche A., Ruiz-Gutierrez
V., *Supressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine*
43 *production in stimulated murine macrophages*. Free Radic Res. 2006;40(3):295-302.
- 45 34. Nevin K.G., Rajamohan T., *Effect of topical application of virgin coconut oii on skin*
components and antioxidant status during dermal wound healing in young rats. Skin Pharmacol
Physiol. 2010; 23(6):290-7.
- 47 35. Sachs M., von Eichel J., Asskali F., [*Wound management with coconut oil in*
Indonesian folk medicine"], Chirurg. 2002;73(4):387-92 [Article in German].

RO 128713 B1

36. Gupta A., Kumar R., Pal K., Banerjee P.K., Sawhney R.C., *A preclinical study of the effects of seabuckthorn (Hippophae rhamnoides L.) leaf extract on cutaneous wound healing in albino rats.* Int J Low Extrem Wounds. 2005;4(2):88-92. 1 3
37. Upadhyay N.K., Kumar R., Mandotra S.K., Meena R.N., Siddiqui M.S., Sawhney R.C., Gupta A., *Safety and healing efficacy of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) seed oil on burn wounds in rats.* Food Chem Toxicol. 2009; 47(6):1146-53. 5
38. Upadhyay N.K., Kumar R., Siddiqui M.S., Gupta A., *Mechanism of wound-healing activity of Hippophae rhamnoides L. leaf extract in experimental burns.* Evid Based Complement Alternat Med. 2011; 2011:659705. 7 9
39. Simbirtsev A.S., Konusova V.G., Mchedlidze G.Sh., Fidarov E.Z., Paramonov B.A., Chebotarev V.Y., *Effect of pine resin and Biopin ointment on T and B cell immunity.* Bull Exp Biol Med. 2002; 133(2):144-7. 11
40. Simbirtsev A.S., Konusova V.G., Mchedlidze G.Sh., Fidarov E.Z., Paramonov B.A., Chebotarev V.Y., *Pine resin and biopin ointment: effects on free radical processes.* Bull Exp Biol Med. 2002; 133(3):265-7. 13 15
41. Simbirtsev A.S., Konusova V.G., Mchedlidze G.Sh., Markovskaya O.V., Fidarov E.Z., Paramonov B.A., Chebotarev V.Y., *Pine resin and Biopin ointment: effects on nonspecific resistance of organisms.* Bull Exp Biol Med. 2002; 133(2):141-3. 17
42. Anilakumar K.R., Krishna K.R., Chandramohan G., Khanum F., Bawa A.S., *Bees wax polyphenols as suppressor of CCl₄-induced oxidative stress in rats.* Indian J Physiol Pharmacol. 2007; 51(4):361-7. 19 21
43. Ravelo Y., Molina V., Carbajal D., Fernández L., Fernández J.C., Arruzazabala M.L., Mas R., *Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive effects of D-002 (beeswax alcohols).* J Nat Med. 2011; 65(2):330-5. 23
44. Edwards-Jones V., Buck R., Shawcross S.G., Dawson M.M., Dunn K., *The effect of essential oils on methicillin-resistant Staphylococcus aureus using a dressing model.* Burns. 2004; 30(8):772-7 25 27
45. Ghelardini C., Galeotti N., Salvatore G., Mazzanti G., *Local anaesthetic activity of the essential oil of Lavandula angustifolia.* Planta Med. 1999; 65(8):700-3. 29
46. Hajhashemi V., Ghannadi A., Sharif B., *Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of Lavandula angustifolia Mill.* J Ethnopharmacol. 2003; 89(1):67-71. 31
47. Kim H.M., Cho S.H., *Lavender oil inhibits immediate-type allergic reaction in mice and rats.* J Pharm Pharmacol. 1999; 51(2):221-6. 33
48. Roller S., Ernest N., Buckle J., *The antimicrobial activity of high-necrodane and other lavender oils on methicillin-sensitive and -resistant Staphylococcus aureus (MS SA and MRSA).* J Altern Complement Med. 2009; 15(3):275-9. 35 37
49. Woollard A.C., Tatham K.C., Barker S., *The influence of essential oils on the process of wound healing: a review of the current evidence.* J Wound Care. 2007; 16(6): 255-7. 39
50. Alvarez O.M., Mertz P.M., Eaglstein W.H., *The effect of occlusive dressings on collagen synthesis and re-epithelialization in superficial wounds.* J Surg Res. 1983; 35(2):142-8. 41
51. Field C.K., Kerstein M.D., *Overview of wound healing in a moist environment.* Am J Surg. 1994; 167(1A):2S-6S. 43
52. Hirsch T., Ashkar W., Schumacher O., Steinstraesser L., Ingianni G., Cedidi C.C., *Moist exposed burn ointment (MEBO) in partial thickness burns - a randomized, comparative open mono-center study on the efficacy of dermaheal (MEBO) ointment on thermal 2nd degree burns compared to conventional therapy.* Eur J Med Res. 2008; 13(11):505-10. 45 47

RO 128713 B1

- 1 53. Lohsiriwat V., Chuangsuwanich A., *Comparison of the ionic silver-containing*
2 *hydroliber and paraffin gauze dressing on split-thickness skin graft donor sites.* *Annals of Plastic*
3 *Surgery.* 2009; 62(4):421-42.
- 4 54. Wasiak J., Cleland H., Campbell F., Spinks A., *Dressings for superficial and partial*
5 *thickness burns.* *Cochrane Database Syst Rev.* 2013; Issue 3:CD002106.

RO 128713 B1

Revendicare

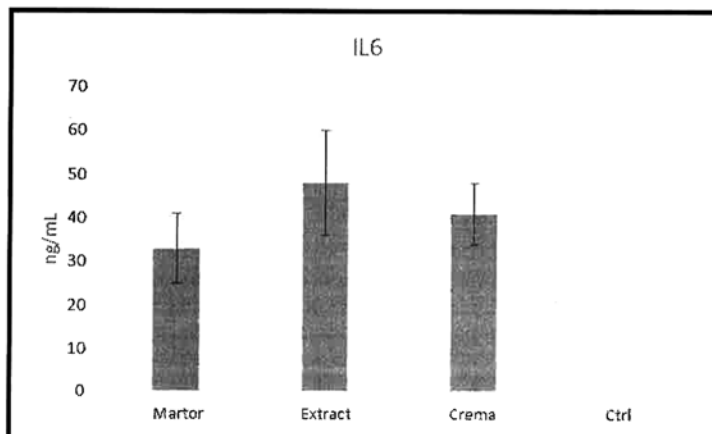
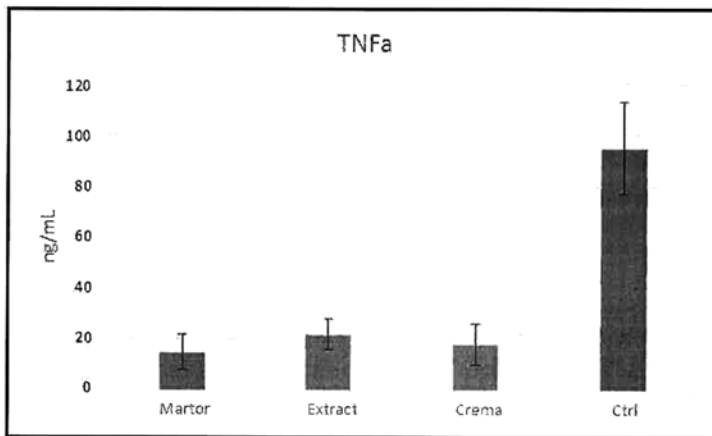
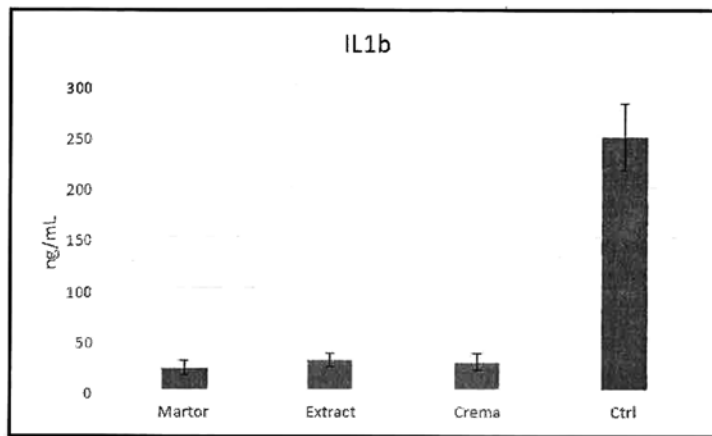
1

Compoziție de unguent pentru tratamentul arsurilor și plăgilor, **caracterizată prin aceea** 3
că este constituită din extracte uleioase din pulberi de gălbenele *Calendula officinalis* 15...25 3
părți în greutate, sunătoare *Hypericum perforatum* 15...25 părți în greutate, tătăneasă 5
Symphylum officinale 15...25 părți în greutate, brusture *Arctium lappa* 15...25 părți în greutate, 5
rădăcină de nalbă *Althea officinalis* 15...25 părți în greutate, mușețel *Matricaria chamomilla* 7
20...40 părți în greutate, pătlagină *Plantago major* 20...40 părți în greutate, coada șoricelului 7
Achillea millefolium 10...20 părți în greutate, scoarță de stejar *Quercus coertex* 10...20 părți în 9
greutate, din uleiuri vegetale: ulei de măsline *Helianthi oleum* 800 părți în greutate, ulei de cocos 9
Cocos oleum 100 părți în greutate și ulei de cătină *Hippophae oleum* 100 părți în greutate, din 11
ceară de albine *Cera flava* 50...150 părți în greutate, din rășină de conifere *Resina albies, pini* 11
50...150 părți în greutate, și din ulei volatil de lavandă *Lavandulae aetheroleum* 5...10 părți în 13
greutate.

(51) Int.Cl.

A61K 36/00 (2006.01);

A61P 17/02 (2006.01)



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 256/2019