



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00809

(22) Data de depozit: 10/11/2016

(41) Data publicării cererii:
30/05/2018 BOPI nr. 5/2018

(71) Solicitant:

- HOVANET MARILENA-VIORICA,
STR. CĂLINULUI NR. 13, BUCUREȘTI, B,
RO;
- OPREA ELIZA, STR. BREBU NR. 4,
BL. T11, SC. 1, ET. 1, AP. 9, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
- MOROȘAN ELENA,
STR. CONSTANTIN MARINESCU NR. 10,
BL. A 38, SC. 1, AP. 26, BUCUREȘTI, B,
RO;
- ȘEREMET OANA CRISTINA,
CALEA GIULEȘTI NR. 43, BL. 14A, SC. 1,
ET. 6, AP. 23, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
- ANCUCEANU VIOREL ROBERT,
STR. MOȚOC NR. 2, BL. P3, SC. 3, ET. 4,
AP. 72, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- BUDURA EMMA ADRIANA, BD. UNIRII
NR. 10, BL. 7B, SC. 1, AP. 4, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
- DINU MIHAELA, STR. ȘOIMĂREȘTIILOR
NR. 19, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- DUȚU LIGIA ELENA, STR. G. GARIBALDI
NR. 7, SC. B, ET. 2, AP. 11, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
- ANCU IRINA, VILA 1, ICDP, AP. 1,
STR. MĂRULUI 401, MĂRĂCINENI, AG, RO

(72) Inventatori:

- HOVANET MARILENA VIORICA,
STR. CĂLINULUI NR. 13, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
- OPREA ELIZA, STR. BREBU, NR. 4,
BL. T11, SC. 1, ET. 1, AP. 9, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
- MOROȘAN ELENA, STR. C. MARINESCU
NR. 10, BL. A 38, SC. 1, AP. 26,
BUCUREȘTI, B, RO;
- ȘEREMET OANA CRISTINA,
CALEA GIULEȘTI, NR. 43, BL. 14A, SC. 1,
ET. 6, AP. 23, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
- ANCUCEANU VIOREL ROBERT,
STR. MOȚOC NR. 2, BL. P3, SC. 3, ET. 4,
AP. 72, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- BUDURA EMMA ADRIANA, BD. UNIRII
NR. 10, BL. 7B, SC. 1, AP. 4, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
- DINU MIHAELA, STR. ȘOIMĂREȘTIILOR
NR. 19, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- DUȚU LIGIA ELENA, STR. G. GARIBALDI
NR. 7, SC. B, ET. 2, AP. 11, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
- ANCU IRINA, VILA 1, ICDP, AP. 1,
STR. MĂRULUI, NR. 401, MĂRĂCINENI, AG,
RO

(54) MEDICAȚIE DE UZ TOPIC CU EFECT CICATRIZANT
ȘI ANTIINFLAMATOR

(57) Rezumat:

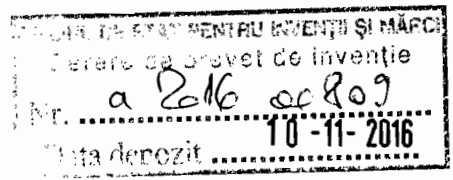
Invenția se referă la un produs pentru tratamentul leziunilor termice de severitate mică sau medie. Produsul conform invenției este sub formă de unguent, fiind constituit, în procente masice, din 10% extract uscat din frunze de *Ziziphus jujuba Mill*, 5% antioxidant

ulei de cocos, 0,3% antioxidant butilhidroxianisol și, în rest, bază de unguent uzuală.

Revendicări: 11
Figuri: 6

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art. 32 din Legea nr. 64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art. 23 alin. (1) - (3).





Descrierea invenției

Titlul invenției:

MEDICAȚIE DE UZ TOPIC CU EFECT CICATRIZANT ȘI ANTIINFLAMATOR.

Domeniul tehnic la care se referă invenția:

Prezenta invenție se referă la o medicație de uz topic cu efect cicatrizant și antiinflamator, obținută dintr-un extract din frunze de *Ziziphus* și excipienți adecvați, în cantități corespunzătoare.

Stadiul tehnicii

Procesul de cicatrizare reprezintă un ansamblu de transformări în urma cărora se reface țesutul cutanat lezat anterior (sub influența unor agenți fizici, chimici, termici sau patogeni etc.). Procesele de reparare a țesutului implică participarea trombocitelor activate, neutrofilelor și macrofagelor și conduce la formarea unui țesut nou (țesut de neoformație).

În prezent sunt utilizate în terapie câteva medicamente alopate cu efect cicatrizant care conțin în principal sulfadiazină de argint (10mg/g) cum ar fi: **Cicatrol** (Antibiotice Iași) sau **Dermazin** (Lek Pharmaceuticals Ljubljana, Slovenia). Acestea sunt indicate în principal pentru tratamentul și prevenirea infecțiilor arsurilor, pentru tratamentul și prevenirea infecțiilor leziunilor de decubit, ulcerelor varicoase, abraziunilor, leziunilor traumatice minore, inciziilor sau altor leziuni neinfectate și grefelor de piele. Reacțiile lor adverse cele mai frecvente sunt leucopenie, iritații cutanate, senzații de mâncărime, de arsuri, dureri la aplicare, erupții cutanate, colorarea pielii în gri. Alte posibile reacții adverse ar fi: fotosensibilitate, colorarea pielii în brun-roșcat (argirism)(1,2).

Un alt medicament recomandat în prezent este un gel silionic comercializat sub numele **Strataderm** (Stratapharma AG, Elveția) sau **Dermatix** (MEDA Pharmaceuticals, Elveția) și a fost conceput pentru diverse tipuri de cicatrici rezultate din intervenții chirurgicale, traume, mușcăături, arsuri, acnee etc. Dezavantajul acestor produse este că nu pot fi aplicate pe plăgi deschise (neepitelizate) sau pe arsuri de gradul III, în zona ochilor sau în contact cu membranele mucoase. În plus nu se recomandă aplicarea peste preparate care conțin antibiotice.

Prin tehnologia de recombinare a ADN-ului s-a obținut factorul de creștere uman recombinant derivat din trombocite-BB (rhPDGF-BB), fiind produs în ciuperca *Saccharomyces cerevisiae*. Acest medicament se numește **Regranex** (Janssen-Cilag International NV, Belgia) și este prescris în scopul vindecării ulcerelor profunde, diabetice, cronice, neuropatice cu o suprafață mai mică sau egală cu 5 cm². Cele mai frecvente reacții adverse raportate au fost ulcerul cutanat infectat (12,3%), celulita (10,3%) și osteomielite (7,2%), iar Agenția Europeană a Medicamentului a recomandat contraindicarea acestuia la pacienții cu orice formă preexistentă de cancer (Comunicat de presă A.N.M. din 18.02.2010)(3)

Există o serie de produse farmaceutice sau cosmetice cu acțiune cicatrizantă (neînregistrate ca medicamente la A.N.M.) care au în compoziție exclusiv extracte vegetale și altele care, pe lângă acestea, au diverse adaosuri de compuși de sinteză.

Contractubex (Merz Pharmaceuticals GmbH, Germania) este un preparat pe bază de extracte vegetale cu efect antiinflamator având în compoziție heparină sodică 5000 U.I., extract lichid de ceapă, alantoina, acid sorbic, p-hidroxibenzoat de metil. Este indicat în accidente, arsuri, acnee, intervenții chirurgicale. Printre reacțiile adverse se numără ar fi

pruritul, reacții alergice întârziate (din cauza p-hidroxibenzoatului de metil) și dermatita de contact (generată de acidul sorbic)(4).

Un exemplu de preparat care prezintă în compoziție numai principii biologice active naturale este **Epitelin - cremă de gălbenele** (Exhelios, România) care conține carotenoide, uleiuri volatile, flavonoide, saponozide triterpenice, vitamina C, acizi grași esențiali, toate substanțele fiind izolate din gălbenele (*Calendula officinalis*), mușetel (*Matricaria chamomilla*) și luminița nopții (*Oenothera biennis*). Se recomandă în tratamentul plăgilor greu vindecabile, a escarelor, a arsurilor termice, chimice sau solare, pentru înțepături de insecte, degerături, eczeme etc. Pentru că nu conține parabeni sau alte substanțe cu potențial nociv reacțiile adverse sunt relativ rare în cazul acestui produs.

În ultimii ani s-a înregistrat o serie de brevete care se referă la obținerea unor noi forme farmaceutice cu efect cicatrizant a căror acțiune vizează în principal activitatea antimicrobiană, antiinflamatorie, de stimulare a diviziunii celulare etc. Și implică o diversitate de patologii.

Hernandez et.al. a realizat o gamă de preparate (soluție, unguent, cremă) care conțin plante mexicane (*Montanoa grandiflora montanoa bipinnatitida*) destinate accelerării procesului de vindecare și de reparare a țesutului superficial la pacienții cu boli acute sau cronice, în special la diabetici cu ulcer neuropatic cu aspect vezicular (5).

A fost brevetat un remediu vegetal cu efect antiinflamator, analgezic, cicatrizant și mucoprotector care se bazează pe prepararea unui decoct (de concentrație 10% material vegetal în apă) din părțile aeriene ale *Cydonia oblonga* (gutui), fără conșevanți (6).

O altă invenție furnizează o metodă de preparare a unei forme farmaceutice cu efect cicatrizant care este reprezentată de un extract îmbogățit în aucubină din *Plantago major* și care include caracterizarea și încapsularea extractului în ZnO, urmată de evaluarea efectului respectiv (7).

Un extract vegetal obținut din frunze de *Verbascum speciosum* și-a dovedit efectul cicatrizant pe diverse linii celulare L929 (Rat Fibroblast Cell Line), HF (Human Dermal Fibroblast Cell Line) și HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), și face obiectul unui alt brevet publicat recent (8).

Un produs nou, regenerativ, din extracte de *Curcuma longa*, *Glycyrrhiza glabra*, *Hamiltonia suaveolens*, *Typha angustifolia* și *Azadirachta indica*, în ulei de *Sesamum indicum* dar și procedeul de preparare al acestui medicament sunt prezentate într-un alt brevet care vizează efectul cicatrizant și acțiunea sinergică a extractelor respective (9).

Un preparat topic complex recomandat pentru tratamentul plăgilor infectate, plăgilor cronice nevindecabile (ulcerul piciorului diabetic, gangrena uscată și umedă, ulcer venos, varice și arsuri) este descris în cadrul unui brevet din 2011. Compoziția preparatului se bazează pe un extract de *Azadirachta indica* în apă, ulei de ricin, ulei de muștar, ulei de cocos, ulei de susan negru cu extracte sau părți mărunțite din douăsprezece plante și excipienți (10).

Cele mai importante acțiuni (citate de literatură) ale compușilor bioactivi prin care plantele pot contribui la efectul cicatrizant și care sunt folosite în medicina tradițională sau clasică sunt:

1. activitatea antimicrobiană
2. antioxidanții sau captatorii de radicali liberi
3. activitate mitogenă (care contribuie la proliferarea celulară crescută), angiogeneza, producția de colagen îmbunătățită și sinteza crescută a ADN-ului (10).

Literatura de specialitate menționează următoarele principii active vegetale ca având proprietăți cicatrizante: unii alcaloizi, unele glicozide, terpeni, diterpeni, sesquiterpeni și fitosteroli, compuși fenolici, taninuri, compuși flavonoidici, saponozide, lignani și unele uleiuri esențiale.

(11-22).

Studiile din prezent vizează izolarea și caracterizarea principiilor active implicate prin anumite mecanisme în accelerarea procesului de cicatrizare cum ar fi compușii terpenici cu acțiune antimicrobiană de tipul gențiopicrozidei, swerozidei și swertiamarinei din *Gentiana lutea* (23,24) sau ulei volatile bogat în eucaliptol (25), flavone cum ar fi kaempferol și quercetin și derivații lor (26).

Ziziphus jujuba Mill. este un arbore din familia Rhamnaceae despre care literatura menționează un potențial cicatrizant considerabil. Conform medicinei tradiționale în regiunea Bastar se folosesc frunzele și scoarta pentru vindecarea rănilor (27). În plus speciile acestui gen sunt folosite tradițional în India, China și Japonia pentru proprietăți hipoglicemice, sedative, anticancerigene, hepatoprotectoare and și antiinflamatoare (28-32).

Expunerea detaliată a invenției.

Se obține un produs de uz topic cu o compoziție complexă pe bază de extract uscat obținut din frunzele de *Ziziphus jujuba* Mill. și excipienți adecvați. Medicația topică a prezentei invenții poate fi reprezentată de soluții, loțiuni, creme, unguente, geluri, plasturi transdermici sau spume. O modalitate preferată de realizare a prezentei invenții este reprezentată de un unguent, care a fost caracterizat reologic și testat in vivo (la șobolan) pentru efectul cicatrizant și antiinflamator. De asemenea a fost determinată tolerabilitate pe piele la iepuri urmărindu-se la aplicare locală o eventuală toxicitate dermică și sistemică.

Avantaje.

Invenția oferă o soluție terapeutică pentru tratamentul leziunilor dermice de severitate mică sau medie. Prezintă eficacitate moderată în modelele non-clinice de cicatrizare și inflamație.

Medicația topică propusă este simplă de preparat, nu prezintă toxicitate dermică sau sistemică, iar costurile sunt modeste. Materia primă vegetală poate fi obținută ușor, iar excipienții nu sunt toxici și nu au preț ridicat.

În continuare se prezintă mai multe exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. Prepararea unguentului bazat pe un extract uscat din frunzele de *Ziziphus*
Compoziția unguentului fost următoarea:

Ingrediente	Cantitatea (g)	Funcția în formulare
extract de <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	10,00	Ingredient activ
Alcool cetilic	2,00	Bază de unguent grasă, formatoare de matrice
Colesterol	2,00	Bază de unguent grasă, formatoare de matrice
Vaselină	80,70	Bază de unguent grasă, formatoare de matrice
Ulei de cocos	5,00	Antioxidant, agent de ajustare a consistenței unguentului, aromatizant
Butilhidroxianisol	0,30	Antioxidant, conservant antimicrobian
TOTAL	100,00	

Fazele procesului de fabricație parcurse sunt următoarele:

- *cântărirea materiilor prime:* ingredientul activ și excipienții se cântăresc conform formulei de fabricație, utilizând o balanță Mettler Toledo AT261 (cu sensibilitate 0,01 mg);
- *topirea excipienților grași:* vaselina, apoi colesterolul și în final alcoolul cetilic se topesc într-o patentulă pe baia de apă, la aproximativ 50°C;
- *obținerea bazei de unguent:* amestecul obținut se aduce într-un mojar uscat și răcit în prealabil și se triturează până la răcire când se obține o masă albă și cremoasă;
- *încorporarea butilhidroxianisolului:* peste baza de unguent anterior preparată se aduce butilhidroxianisolul, tritărând energic, timp de 2 minute, până la omogenizare;

Prepararea unguentului: într-un mojar uscat se triturează extractul uscat (solventul folosit la obținerea extractului este alcool etilic 70%) obținut din frunzele de Ziziphus până la obținerea unei pulberi fine. Peste acesta se adaugă uleiul de cocos și se triturează până la obținerea unei paste omogene. Peste amestecul format se aduce treptat o cantitate din baza de unguent și se triturează după fiecare adăugare pentru o omogenizare cât mai bună.

Exemplul 2. Controlul organoleptic și caracterizarea reologică a unguentului

Aspectul

Am obținut un unguent suspensie onctuos, omogen, de culoare verde închis, cu miros caracteristic de cocos.

Omogenitatea

Am efectuat-o conform FR X, prin întinderea unguentului în strat subțire pe o lamă de sticlă și examinare cu lupa (4,5x), acesta prezentând un aspect omogen, fără aglomerări de particule.

Determinarea vâscozității

Cu ajutorul unui viscozimetru rotational (Haake VT 550) cu cilindri coaxiali (cupa-rotor) s-au efectuat deformații de forfecare în intervalul 1.183 – 500.1 s⁻¹. Valorile corespunzătoare ale tensiunii de deformare de forfecare măsurate au permis reprezentarea grafică a curbelor tensiune – viteza de deformare de forfecare. Din măsurătorile efectuate în domeniul de viteze de deformare 2-500 s⁻¹, a rezultat dependența din fig. 2.

Dupa cum se observă, alura curbei din figura 1 este concordantă cu comportarea unui fluid de tip Bingham (dependența liniară $\tau - (dy/dt)$ și tensiune limită de curgere nenulă). A rezultat un exponent de curgere foarte aproape de unitate (0.9655), ceea ce arată o asemănare pronunțată a sistemului lipofil cu un fluid de tip Bingham. Din datele experimentale ilustrate în fig. 3, s-a obținut o valoare estimată a vâscozității la viteze de forfecare egale cu 1 s⁻¹ sau mai mici (când se considera ca sistemul are comportare newtoniană) de 15.8 Pa.s. Prin considerarea măsurătorilor efectuate în domeniul 0-20 s⁻¹ și reunirea lor cu cele din intervalul 20-500 s⁻¹ (fig. 2), s-a estimat o valoare a vâscozității la viteza de forfecare zero de 27 Pa.s.

Determinarea pH-ului

pH-ul a fost determinat prin metoda potențimetrică, astfel: se dizolvă o cantitate de 0,5 g unguent/gel în 10 ml apă prin agitare la rece, se filtrează și se înregistrează pH-ul filtratului la 19,2°C, cu ajutorul pH-metrului INOLAB level 1.

Unguentul are un pH ușor de tolerat, nefiind iritant la aplicarea pe piele.

Determinarea capacității de întindere

Acest parametru a fost determinat utilizând dispozitivul Ojeda – Arbussa, care este alcătuit din două plăci pătrate de sticlă cu latura de 11 cm. Pe partea externă a plăcii inferioare este lipită o hârtie milimetrică pe care sunt desenate cinci cercuri concentrice, ale căror diametre sunt gradate în mm. Pe placa inferioară în centrul primului cerc, se aduce 1 g de unguent peste care se așează a doua placă de sticlă, se notează diametrul cercului ocupat de unguent în urma presării cu placa de sticlă care cântărește 145 g. La intervale de un minut se

așează pe placa superioară a extensiometrului greutatea de: 50, 100, 200 și 500 g și se citesc diametrele cercurilor formate prin întinderea unguentului.

Se calculează suprafața conform formulei: $S = \pi r^2$, unde S este suprafața în mm^2 și r este raza în mm.

Rezultatele obținute:

Greutate aplicată (g)	Diametru (cm)	Raza (cm)	Suprafața (cm^2)
145	5,10	2,55	20,42
195	5,40	2,70	22,89
245	5,50	2,75	23,75
345	5,60	2,80	24,62
645	5,80	2,90	26,41

Se remarcă faptul că unguentul are o plasticitate corespunzătoare, acesta putând fi ușor etalat pe piele.

Exemplul 3. Dovezi experimentale. Experimentele pe animale efectuate în scopul evaluării eficacității unguentului în modele preclinice au respectat normele de bioetică în cercetarea pe animale de experiență în scop științific, conform Legii 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice și a Directivei 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010, privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice.

Pentru evaluarea activității cicatrizante s-a utilizat un model de cicatrizare la șobolani albi, masculi, sușa Wistar în greutate de 200 ± 10 g. Animalele aduse din crescătorie, au fost ținute în condițiile laboratorului nostru timp de 2 zile, pentru a se obișnui cu noul habitat (temperatura camerei experimentale $23 \pm 2^\circ\text{C}$, umiditatea de 40-50%, iluminarea artificială, alternativ 12 ore lumină/12 ore întuneric) și cu regimul de hrană. Regimul de hrană a constat în hrănirea animalelor la ora 8.00 a.m. și la ora 17.00 p.m. și apă „ad libitum” din biberoane.

Animalele au fost epilate în zona dorsală. După anestezie cu eter etilic, animalelor li s-au produs plăgi prin arsură cu ajutorul unui dispozitiv metalic format dintr-un disc cu diametrul de 1 cm care a fost încălzit în apă cu 5 % NaCl la 105°C . Discul încălzit s-a aplicat în zona dorsală epilată și s-a menținut 10 secunde.

Animalele au fost distribuite prin metoda randomizării în loturi de câte 10 animale iar ca produs de referință s-a luat unguentul cu extracte vegetale existent pe piață cu denumirea de Cicatrizin.

Tratamentul s-a făcut zilnic printr-o singură aplicație, timp de 12 zile. Evoluția plăgilor s-a urmărit din 2 în 2 zile prin măsurarea în mm^2 a suprafețelor tratate, în comparație cu martorii netratați și Cicatrizin folosit în studiu drept produs de referință. În timpul studiului s-a urmărit și starea clinică a animalelor.

Evaluarea statistică a datelor experimentale s-a realizat prin Anova și testul Student.

Rezultate.

Animalele martor au prezentat inițial o suprafață a arsurilor de 99 mm^2 , după 4 zile de tratament a scăzut până la 73.6 mm^2 , după 8 zile a scăzut până la 49.2 mm^2 , după 10 zile a

ajuns la 33.8 mm², iar după un tratament de 12 zile a ajuns la 23 mm² și o vindecare de 76.56% față de inițial. Vindecarea totală s-a produs după 26 zile.

După 12 zile de tratament, unguentul folosit în studiu ca produs de referință a prezentat o suprafață a arsurilor de 13.8 mm² și o vindecare de 85.09% față de inițial.

Unguentul cu extract de Ziziphus a prezentat o vindecare de 30.33% după patru zile de tratament, de 64.01% după zece zile, pentru ca la sfârșitul experimentului să prezinte o vindecare de 79.07% în comparație cu prima zi a tratamentului și o suprafață a arsurilor de 20 mm². Rezultatele sunt semnificative statistic (*p<0.05) la 4 zile, 6 zile și 8 zile.

În concluzie, datele experimentale indică pentru unguentul testat un efect cicatrizant moderat comparabil cu al produsului de referință.

Exemplul 4. Dovezi experimentale.

Pentru evaluarea activității antiinflamatoare s-a utilizat un model de reducere a edemului labei de șobolan, indus prin administrarea intraplantară de caolin.

Au fost folosiți 100 de șobolani masculi, sușa Wistar, cu greutatea 270 ± 32g, achiziționate de la biobaza Institutului Cantacuzino, București. Acestea au fost lăsate timp de 3 zile să se obișnuiască în noul habitat. Hrana (grăunțe pentru șoareci și șobolani, Institutul Cantacuzino, București) a fost administrată ad libitum. Apa a fost administrată ad libitum, din biberoane.

Animalele au fost ținute în condiții de umiditate și temperatură, monitorizate cu un termohigrometru. Valorile înregistrate au fost cuprinse între 35-45% pentru umiditate și, respectiv, 20- 22°C pentru temperatură. Animalele au fost anesteziate cu uretan 130 mg/kg corp, soluție 13%, administrat i.p. După instalarea anesteziei generale, s-a determinat volumul inițial al labei drepte.

Câte 0,2 g din fiecare unguent a fost aplicat pe suprafața labei drepte și masat de 50 de ori. După administrarea agentului inflamator s-a urmărit evoluția edemului indus, la 1, 2, 3 și 4 ore.

Ca produs de referință a fost folosit Indometacin HYPERION, unguent, 40 mg/g.

Unguentul martor este reprezentat de baza lipofila fara extractul de Ziziphus.

Calculul statistic s-a realizat utilizând programele Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp., SUA) și GraphPad Prism v. 5.0. (GraphPad Software, SUA).

Rezultate.

- Lotul tratat cu unguentul testat prezintă un efect antiinflamator, atunci când este comparat cu lotul martor . Rezultatele sunt semnificative din punct de vedere statistic, la 3, respectiv 4 ore de la administrarea caolinului (test t, p<0.05).
- Atunci când este comparat cu unguentul de referință, unguentul cu extrat de Ziziphus prezintă efect antiinflamator doar la 3, respectiv 4 ore de la administrarea afentului flogistic.

Tabelul I. Efectul antiinflamator al lotului tratat cu unguentul testat comparativ cu lotul martor și lotul de referință precum și semnificația statistică

Lot	Efect antiinflamator			
	1 h	2 h	3 h	4 h
Unguent testat	28.8	38.56	40.56	42.24
Unguent martor	32.13	44.24	54.37	58.02
Unguent de referință	22.05	37.64	45.33	44.33
Δ față de lotul martor (%)	3.33	5.68	13.81	15.78
Testul t Student (p)	ns	ns	*	*

	0.7953	0.7925	0.0290	0.0238
Δ față de lotul de referință (%)	-6.75	-0.92	4.77	2.09
Testul t Student (p)	ns	ns	ns	ns
	0.2583	0.7708	0.0864	0.2706
ns = ne semnificativ; ** = foarte semnificativ statistic; *** = extrem de semnificativ statistic				

Exemplul 5. Tolerabilitatea și toxicitatea locală și sistemică pe iepuri.

5.1. Determinarea iritației/coroziunii dermice acute (OECD 404)

Pentru determinarea iritației dermice acute, substanța de testat se aplică într-o singură doză pe pielea animalului de experimentă. Zone netratate ale pielii animalului servesc drept control. Gradul de iritație/ corozione este determinat la intervale specificate și este descris amănunțit pentru a oferi o evaluare completă a efectelor. Durata studiului trebuie să fie suficientă pentru a evalua reversibilitatea, respectiv ireversibilitatea acțiunii iritante/corozive.

Mod de lucru

S-au luat în lucru 1 iepure albinos Noua Zeelandă masculi (4,55 kg) provenit de la Biobaza Institutului Cantacuzino (București).

Cu aproximativ 24 de ore înainte de test, blana de pe partea dorsală a fost îndepărtată cu ajutorul foarfecei și a unui aparat de ras electric. Îndepărtarea blanei s-a făcut cu mare atenție pentru a nu leza pielea. Animalele au fost adăpostite individual, Temperatura camerei pe parcursul tratamentului fiind de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ iar umiditatea relativă $58 \pm 2\%$. Iluminarea a fost artificială, cu o succesiune de 12 ore de lumină și 12 ore de întuneric. Animalele au avut acces nelimitat la apă și la hrana convențională de laborator.

Unguentul (0,5 g) a fost aplicat pe un plasture autoadeziv pe suport de material nețesut Cosmopore Advance 7,2 x 5 cm (Hartmann, Germania) și apoi lipite pe spatele animalului, pentru a preveni accesul acestuia la ele, după cum urmează:

- Iepurele 1 - unguentul (ZIZ-L) și baza lipofilă (B-L)

După 4 h de la aplicare, plasturele a fost îndepărtat și urmele de unguent au fost îndepărtate prin ștergerea ușoară cu o cârpă înmuiată în apă.

Animalele au fost examinate pentru a observa dacă există semne de eritem și/sau edem, imediat și la 1, 24, 48 și 72 h după îndepărtarea plasturelui. Reacțiile dermice observate au fost clasificate conform tabelului I.1.1:

Tabelul II. Clasificarea reacțiilor dermice

Reacțiile dermice la aplicarea substanței de cercetat	
Eritem sau formare de escare	
• Fără eritem	0
• Eritem ușor (greu de perceput)	1
• Eritem bine definit	2
• Eritem mediu spre sever	3
• Eritem sever până la formarea de escare	4
Apariția edemului	
• Fără edem	0
• Edem foarte ușor (greu de perceput)	1
• Edem ușor	2
• Edem mediu (cu înălțimea de aprox. 1 mm)	3
• Edem sever (cu înălțimea mai mare de 1 mm și care se	4

extinde în afara suprafeței expuse)	
Examenul histopatologic trebuie efectuat pentru a clarifica un răspuns echivoc	

Rezultate și discuții

Zonele expuse unguentelor nou formulate, precum și cele expuse bazelor de unguent au fost examinate la 4h după aplicare, imediat după îndepăratea plasturilor autoadeziv.

În nici un caz nu a fost observată apariția eritemului sau edemului. Examinarea s-a repetat la 1, 24, 48 și 72 h după îndepărtarea plasturilor și nici în aceste cazuri nu s-au observat semne de eritem sau edem.

Tabelul III. Scorurile de răspuns iritație/ corozione pentru unguentul și baza lipofila.

Unguent	Scor eritem/edem				
	Imediat*	1 h*	24h*	48h*	72h*
ZIZ-L	0	0	0	0	0
B-L	0	0	0	0	0
ZIZ-H	0	0	0	0	0
B-H	0	0	0	0	0

*după îndepărtarea plasurelui

În concluzie după testarea iritabilității dermice acute conform ghidului OECD 404, putem afirma că unguentul testat nu este iritant sau coroziv după aplicarea dermică.

5.2. Determinarea iritației dermice după administrări repetate (21/28 zile conform OECD 410)

Principiul metodei

Substanța de testat se aplică zilnic pe pielea animalelor de experiență, în doze gradate la mai multe grupuri de animale de laborator, o doză pentru fiecare grup, pe o perioadă de 21/28 zile. Pe parcursul perioadei de aplicare, animalele sunt observate zilnic pentru a detecta semnele de toxicitate. Animalele care mor în timpul testului sunt necropsiate, iar la sfârșitul testului sunt sacrificate animalele care au supraviețuit făcându-se totodată determinarea sanguină a ALT, AST, uree și creatinină.

Mod de lucru

S-a lucrat pe o colectivitate de 32 șobolani tineri, sușa Wistar, 16 femele (214±10 g) și 16 masculi (259±13g), achiziționați de la din biobaza Institutului Cantacuzino, București, care au fost aclimatizate la condițiile de laborator timp de 5 zile înainte de începerea experimentului. Temperatura camerei pe parcursul tratamentului a fost de 22 ± 1°C, iar umiditatea relativă 58 ± 2%. Iluminarea a fost artificială, cu o succesiune de 12 ore de lumină și 12 ore de întuneric. Animalele au avut acces nelimitat la apă și la hrana convențională de laborator.

Animalele au fost distribuite în 4 loturi, care la rândul lor au fost împărțite în 2 subgrupuri fiecare, după cum urmează:

- **Lotul 1F:** ZIZ-L-F: alcătuit din 4 femele, care au primit unguentul testat ZIZ-L
- **Lotul 1M:** ZIZ-L-M: alcătuit din 4 masculi, care au primit unguentul testat ZIZ-L
- **Lotul 2F:** B-L-F: alcătuit din 4 femele, care au primit baza lipofilă B-L
- **Lotul 2M:** B-L-M: alcătuit din 4 masculi, care au primit baza lipofilă B-L

Cu 24 h înainte de testare a fost îndepărtată blana din zona dorsală a trunchiului. Această operație s-a repetat la intervale de aproximativ o săptămână.

Unguentul (o cantitate de unguent care să corespundă dozei de 1000mg/kgc extract vegetal pentru loturile de testat, respectiv cantitatea corespunzătoare de bază de unguent, pentru loturile martor) au fost aplicate pe un plasture autoadeziv pe suport de material nețesut Cosmopore Advance 7,2 x 5 cm (Hartmann, Germania) și apoi lipite pe spatulele animalului, pentru a preveni accesul acestuia la ele. Animalele au fost urmărite, plasturele rămânând fixat cel puțin 6h după aplicare. Deoarece ghidul permite acest lucru, unguentele au fost aplicate 5 zile/săptămână timp de 21 zile.

Animalele au fost observate îndeaproape pe parcursul tratamentului. Au fost urmărite, în special, dacă apar modificări la nivelul pielii, blanei și mucoaselor, precum și activitatea somato-motorie și modificările comportamentale. Animalele au fost cântărite săptămânal.

La sfârșitul experimentului animalele au fost sacrificate, iar sângele a fost recoltat fără anticoagulant. Determinările biochimice (ALT, AST, uree, creatinină) s-au efectuat pe ser.

Rezultate și discuții

Rezultatele experimentale privind evoluția greutatei corporale pe parcursul celor 21 de zile sub formă de grafice în figurile 5 și 6.

Calculul statistic s-a realizat utilizând programele Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp., SUA) și GraphPad Prism v. 5.0. (GraphPad Software, SUA).

Rezultatele experimentale au evidențiat următoarele aspecte:

- nu s-au înregistrat modificări ale aspectului exterior (blană, tegumente, mucozități) și nici ale comportamentului motor al animalelor din cele 4 loturi testate;
- nu s-au înregistrat modificări ale activității somato-motorie și nici de comportament
- pentru toate loturile luate în lucru greutatea corporală a crescut (semnificativ din punct de vedere statistic) pe tot parcursul tratamentului, lucru care ne indică lipsa de toxicitate a unguentului obținut din extractul uscat de frunze de *Ziziphus jujuba*

Determinările biochimice (ALT, AST, uree, creatinină)

Determinarea activității transaminazelor serice, a uree și a creatininei s-a făcut prin metoda Cormay.

Pentru fiecare parametru s-au efectuat câte 10 determinări, iar evaluarea statistică s-a făcut cu ajutorul testului Student.

Tabel IV. Determinarea transaminazelor la șobolan

Produce testat	AST U/L		ALT U/L	
	$\bar{x} \pm SD.$	Efect %/ inițial	$\bar{x} \pm SD.$	Efect %/ inițial
Martori	41.27±3.78	-	38.23±2.46	-
Unguent testat	38.39±4.69*	-6.97	36.46±4.38*	-4.62

*p<0.05, **p<0.01 compared to control

Tabel V Determinarea compusilor azotați la șobolan

Produce testat	Uree serică mg/dL		Creatinină mg/dL	
	$\bar{x} \pm SD.$	Efect %/ inițial	$\bar{x} \pm SD.$	Efect %/ inițial
Martori	45.29±1.14	-	3.03±0.39	-
Unguent testat	42.56±0.89*	-6.02	2.91±0.17*	-3.96

*p<0.05, **p<0.01

Activitatea transaminazelor serice a prezentat o modificare foarte mică, ne semnificativă față de loturile martor, o scădere cu 1.48% și respectiv 4.62%. ceea ce demonstrează că unguentul nu prezintă toxicitate hepatică.

S-a înregistrat o scădere ne semnificativă de ureea serică de 6.02%. Creatinina serică nu se modifică semnificativ prezentând o scădere de 3.96% în raport cu lotul martor ceea ce indică o lipsă a toxicității la nivel renal.

Figuri.

Fig.1. Dependenta tensiunii de deformare de viteza de forfecare a unguentului testat la $25.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$

Fig. 2. Reprezentarea dublu logaritmică a viscozității aparente în funcție de viteza de forfecare pentru unguentul testat la $25.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$

Fig. 3. Efectul antiinflamator al lotului tratat cu unguentul cu Ziziphus (ZIZ-L) comparativ cu lotul martor (B-L-CAO)

Fig. 4. Efectul antiinflamator al lotului tratat cu unguentul cu Ziziphus (ZIZ-L) comparativ cu lotul de referință (IND-CAO)

Fig. 5. Evoluția greutatei corporale medii a animalelor din Lotul 1

Fig. 6. Evoluția greutatei corporale medii a animalelor din Lotul 2

Bibliografie

1. AUTORIZAȚIE DE PUNERE PE PIAȚĂ NR. 5988/2013/01-02 Anexa 1, Prospect Cicatrol
(http://www.anm.ro/_/PRO/PRO_5988_27.11.13.pdf?anmOrder=Sorter_firm_tar_d&anmDir=DESC&anmPage=1568&ID=5622)
2. AUTORIZAȚIE DE PUNERE PE PIAȚĂ NR. 3805/2003/01 Anexa 1, Prospect Dermazin
(http://www.anm.ro/_/PRO/pro_3805_07.10.03.pdf?anmPage=382&ID=7634)
3. http://www.ema.europa.eu/docs/ro_RO/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000212/WC500050144.pdf
4. AUTORIZAȚIE DE PUNERE PE PIAȚĂ NR. 7136/2006/01, Anexa 1, Prospect Contractubex
(http://www.anm.ro/_/PRO/PRO_7136_05.12.06.pdf?anmOrder=Sorter_cim&anmDir=ASC&anmPage=239&ID=7643)
5. [MX2013011150 (A), publicat la 26 martie 2015, G. R. Hernandez et.al.]
6. [MX2012002190 (A), publicat la 26 august 2013, M. G. GONZALEZ
7. [MX2014013022 (A), publicat la 26 aprilie 2016, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
8. [WO2015009260 (A2), publicat la 22 ianuarie 2015, Sahin Fikrettin (Turcia) et. al.
9. [US2013323337 (A1), publicat la 5 decembrie 2013, Patankar Suresh Balkrishna (India)
10. P. K. Ghosh, A. Gaba, Phyto-Extracts in Wound Healing, J. Pharm. Pharm Sci. 16(5) 760 - 820, 2013
11. Akkol E.K., Koca U., Pesin I., Yilmazer D., Evaluation of the Wound Healing Potential of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae) by In Vivo Excision and Incision Models, Evidence-Based Comp and Alt Med, 2011; 1-7

12. Ghosh P.K., Gupta V.B., Rathore M.S., Hussain I., Wound-healing potential of aqueous and ethanolic extracts of apamarga leaves, *Int J of Green Pharm*, 2011; 5, 12-15
13. Subhashini S. and Arunachalam K.D., Investigations on the phytochemical activities and wound healing properties of *Adhatoda vasica* leave in Swiss albino mice, *Afr J of Plant Sci*, 2011; 5,133-145
14. Barku VYA, Opoku-Boahen Y, Owusu-Ansah E, NTKD. Dayie, Mensah, In-Vitro Assessment of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanol Extracts of Six Wound Healing Medicinal Plants, *J of Nat Sci Res*, 2013; 3(1), 74- 80
15. Diallo D, Sogn C, Samaké FB, Paulsen BS, Michaelsen TE and Keita A, Wound Healing Plants in Mali, the Bamako Region. An Ethnobotanical Survey and Complement Fixation of Water Extracts from Selected Plants, *Pharmaceutical Biol*, 2002; 40(2), 117-128
16. Inngjerdingen KT, Coulibaly A, Diallo D, Michaelsen TE, Paulsen BS, A complement fixing polysaccharide from *Biophytum petersianum* *J Pharm Pharm Sci* (www.cspcCanada.org) 16(5) 760 - 820, 2013, Klotzsch, a medicinal plant from Mali, West Africa, *Biomacromolecules*, 2006; 7(1):48-53
17. Nayak B.S. and Pereira L.M.P., *Catharanthus roseus* flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats, *BMC Comp and Alt Med*, 2006; 6,1-6
18. Anyasor G.N., Aina D.A., Olushola M., Aniyikaye A.F., Phytochemical constituent, proximate analysis, antioxidant, antibacterial and wound healing properties of leaf extracts of *Chromolaena Odorata*, *Annals of Biol Res*, 2011; 2(2), 441-451
19. Marwah RG, Fatope MO, Mahrooqi RA, Varma GB, Hussain Al Abadi, Suad Khamis S. Al-Burtamani, Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman, *Food Chem*, 2007; 101(2), 465- 470
20. Singh M., Govindarajan R., Nath V., Rawat A.K., Mehrotra S., Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. et Lind, *J Ethnopharmacol*, 2006; 107,67-72
21. Chaudhari M and Mengi S., Evaluation of phytoconstituents of *Terminilla arjuna* for wound healing activity in rats, *Phytother Res*, 2006; 20(9), 799-805
22. Zambare MR, Bhosale UA, Somani RS, Yegnanarayan R, Talpate KA, *Achyranthes aspera* (Agadha): Herb That Improves Pancreatic function in Alloxan Induced Diabetic Rats, *Asian J Pharm Biol Res*, 2011; 1(2), 99-104
23. Inamdar PK, Yeole RD, Ghogare AB, de Souza NJ, Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*, *J of Chromatography*, 1996; 742, 127-130
24. Chung PY, Navaratnam P, Chung LY, Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains, *Annals Clin Microbiol and Antimicrobial*, 2011; 10(25), 1-6
25. Baris O, Gulluce M, Sahin F, Ozer H, Kilic H, Ozkan H, Sokmen M and Ozbek T, Biological Activities of the Essential Oil and Methanol Extract of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae), *Turk J Biol*, 2006; 30, 65-73

26. Adeloye, OA, Akinpelu AD, Ogundaini OAbiodun and Obafemi AC, Studies on antimicrobial, antioxidant and phytochemical analysis of *Urena lobata* Leave extract, *J Phy Nat Sci*, 2007; 1(2), 1-9
27. Nadkarni K.M., *Indian Materia Medica*, Popular Prakashan, Bombay, 1986, pp. 1315-1319.
28. Jiang J.G., Huang X.J., Chen J, Separation and purification of saponins from Semen *Ziziphus jujuba* and their sedative and hypnotic effects. *J. Pharm. Pharmacol.*, 59, 1175, 1180 (2007).
29. Shen X.C., Tang Y.P., Yang R.H., YU L., FANG T.H. DUAN, J.A, The protective effect of *Zizyphus jujube* fruit on carbon tetrachloride-induced hepatic injury in mice by anti-oxidative activities. *J. Ethnopharmacol.*, 122, 555, 560 (2009).
30. Vahedi F., NAJAFI M.F, BOZARI K., Evaluation of inhibitory effect and apoptosis induction of *Zyzyphus jujube* on tumor cell lines, an in vitro preliminary study, *Cytotechnology*, 56, 105, 111 (2008).
31. Selloum L., BOURICHE H, C. TIGRINE, C. BOUDOUKHA, Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation, *Exp. Toxicol. Pathol.*, 54, 313, 318 (2003).
32. Shirdel Z., MADANI H, MIRBADALZADEH R., Investigation into the hypoglycemic effect of hydroalcoholic extract of *ziziphus Jujuba* leaves on blood glucose and lipids in alloxan-induced diabetes in rats. *J. Diabetes Metab. Disord.*, 8(1), 2 (2009).

Revendicări

1. **MEDICAȚIE DE UZ TOPIC OBȚINUTĂ DIN CANTITĂȚI ADECVATE ALE UNUI EXTRACT OBȚINUT DIN FRUNZE DE ZIZIPHUS ȘI EXCIPIENȚI CORESPUNZĂTORI.**
2. **MEDICAȚIE DE UZ TOPIC CONFORM REVENDICĂRII 1, LA CARE FORMA FARMACEUTICĂ ESTE REPREZENTATĂ DE SOLUȚII, LOȚIUNI, CREME, UNGUENTE, GELURI, LINIMENT, PASTE, PLASTURI TRANSDERMICI, SPUME SAU AEROSOLI.**
3. **MEDICAȚIE DE UZ TOPIC CONFORM REVENDICĂRII 1, LA CARE PROPORȚIA DE EXTRACT DE FRUNZE DE ZIZIPHUS VARIAZĂ ÎNTRE 0,1% ȘI 30% (M/M).**
4. **MEDICAȚIE DE UZ TOPIC CONFORM REVENDICĂRII 1 LA CARE EXTRACTUL SE OBȚINE DIN FRUNZE DE ZIZIPHUS PRIN EXTRAȚIE CU UNUL SAU MAI MULȚI SOLVENȚI ADECVAȚI.**
5. **MEDICAȚIE DE UZ TOPIC CONFORM REVENDICĂRII 1, LA CARE SOLVENTUL POATE FI APĂ, ALCOOL METILIC, ETILIC, PROPILIC SAU IZOPROPILIC, BUTILIC, IZOBUTILIC, CHLOROFORM, ETER ETILIC, ACETAT DE ETIL SAU ALT SOLVENT ORGANIC, SIMPLU ORI ÎN AMESTEC CU ALȚI SOLVENȚI POLARI SAU APOLARI.**
6. **MEDICAȚIE DE UZ TOPIC CONFORM REVENDICĂRII 1, LA CARE FORMA PREFERATĂ ESTE UN UNGUENT.**
7. **MEDICAȚIE DE UZ TOPIC CONFORM REVENDICĂRII 1, LA CARE SPECIA DE ZIZIPHUS ESTE DE PREFERINȚĂ ZIZIPHUS JUJUBA L.**
8. **MEDICAȚIE DE UZ TOPIC CONFORM REVENDICĂRII 7, OBȚINUTĂ DIN UNUL SAU MAI MULȚI EXCIPIENȚI LIPOFILI ACCEPTABILI DIN PUNCT DE VEDERE FARMACEUTIC ȘI O CANTITATE CORESPUNZĂTOARE DE EXTRACT DE FRUNZE DE ZIZIPHUS.**
9. **MEDICAȚIE DE UZ TOPIC CONFORM REVENDICĂRII 7, LA CARE PROPORȚIA DE EXTRACT ESTE DE CCA. 10% (M/M).**
10. **MEDICAȚIE DE UZ TOPIC CONFORM REVENDICĂRII 7, LA CARE SE POT ADĂUGA UNUL SAU MAI MULȚI AGENȚI ANTIMICROBIENI.**
11. **MEDICAȚIE DE UZ TOPIC CONFORM REVENDICĂRII 7, LA CARE SE POT ADĂUGA UNUL SAU MAI MULȚI AGENȚI AROMATIZANȚI.**

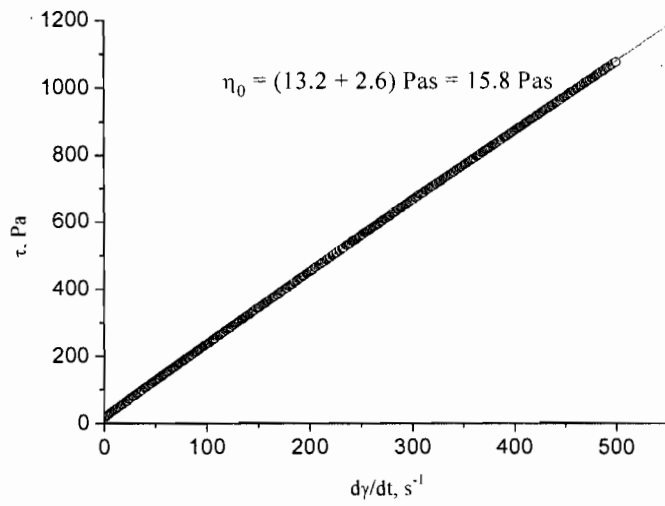


Fig.1. Dependenta tensiunii de deformatie de viteza de forfecare a unguentului testat la $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$

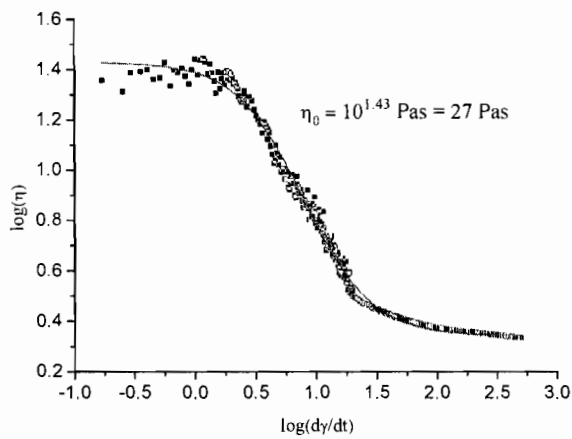


Fig. 2. Reprezentarea dublu logaritmica a viscozitatii aparente in functie de viteza de forfecare pentru unguentul testat la $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$

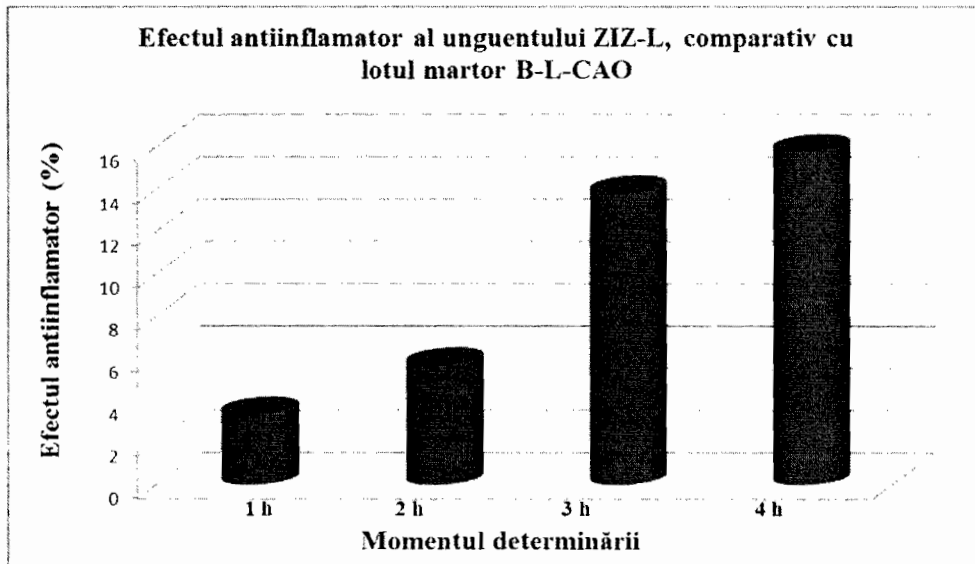


Fig. 3. Efectul antiinflamator al lotului tratat cu unguentul cu Ziziphus (ZIZ-L) comparativ cu lotul martor (B-L-CAO)

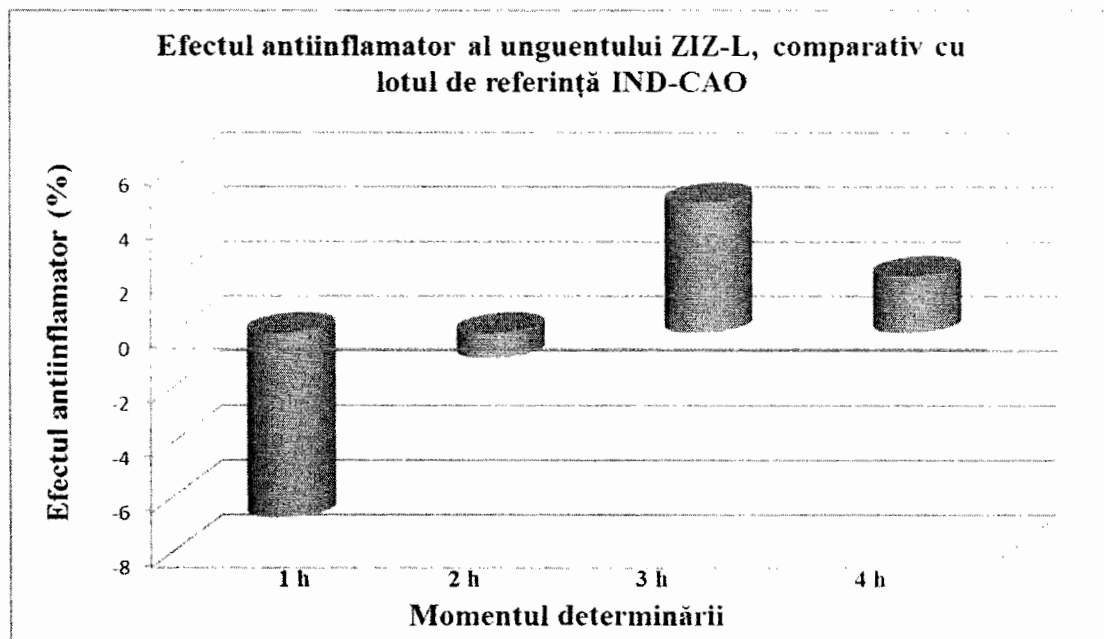


Fig. 4. Efectul antiinflamator al lotului tratat cu unguentul cu Ziziphus (ZIZ-L) comparativ cu lotul de referință (IND-CAO)

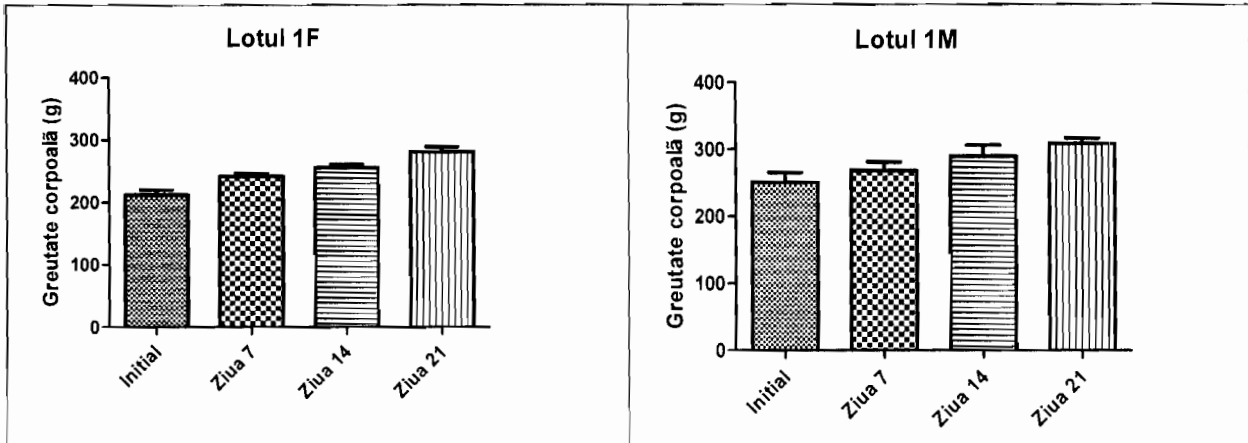


Fig. 5. Evoluția greutății corporale medii a animalelor din Lotul 1

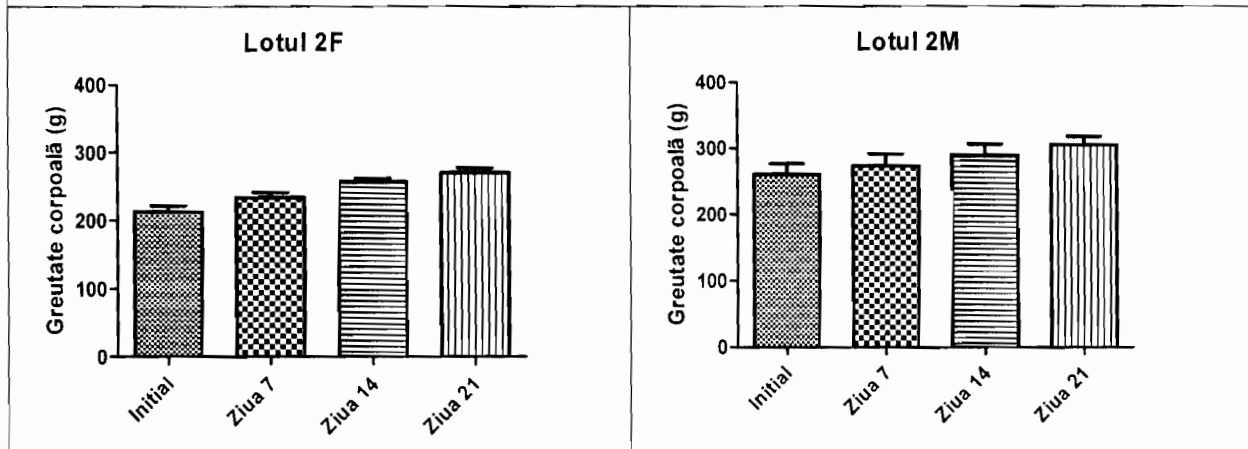


Fig. 6. Evoluția greutății corporale medii a animalelor din Lotul 2