



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00809**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/10/2022** BOPI nr. **10/2022**

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

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "CAROL DAVILA", STR. DIONISIE LUPU NR. 37, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **HOVANEȚ 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. MOȘOC 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. ȘOIMĂREȘTILOR 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
KR 20110096784

(54) **UNGUENT CU EFECT CICATRIZANT ȘI ANTIINFLAMATOR ȘI PROCEDEU DE OBTINERE**



RO 132540 B1

1 Pezenta invenție se referă la un unguent de uz topic cu efect cicatrizant și antiinfla-
mator, obținută dintr-un extract din frunze de *Ziziphus* și excipienți adecvați, în cantități
3 corespunzătoare.

5 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
7 patogeni etc). Procesele de reparare a țesutului implică participarea trombocitelor activate,
neutrofilelor și macrofagelor și conduce la formarea unui țesut nou (țesut de neoformație).

9 În prezent sunt utilizate în terapie câteva medicamente alopate cu efect cicatrizant
care conțin în principal sulfadiazină de argint (10 mg/g) cum ar fi: Cicatrol (Antibiotice Iași)
11 sau Dermazin (Lek Pharmaceuticals Ljubljana, Slovenia). Acestea sunt indicate în principal
pentru tratamentul și prevenirea infecțiilor arsurilor, pentru tratamentul și prevenirea infecțiilor
13 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
15 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
17 pielii în brun-roșcat (argirism) (1,2).

19 Un alt medicament recomandat în prezent este un gel siliconic comercializat sub
numele Strataderm (Stratpharma AG, Elveția) sau Dermatix (MEDA Pharmaceuticals,
21 Elveția) și a fost conceput pentru diverse tipuri de cicatrici rezultate din intervenții
chirurgicale, traume, mușcături, arsuri, acnee etc. Dezavantajul acestor produse este că nu
23 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.

25 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
27 *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 cm. Cele mai frecvente reacții
29 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
31 pacienții cu orice formă preexistentă de cancer (Comunicat de presă A.N.M. din 18.02.2010)
(3).

33 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
35 și altele care, pe lângă acestea, au diverse adaosuri de compuși de sinteză.

37 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
39 accidente, arsuri, acnee, intervenții chirurgicale. Printre reacțiile adverse ar fi pruritul, reacții
alergice întârziate (din cauza *p*-hidroxibenzoatului de metil) și dermatita de contact (generată
41 de acidul sorbic) (4).

43 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
45 substanțele fiind izolate din gălbenele (*Calendula officinalis*), mușetel (*Matricaria chamomilla*)
și luminița nopții (*Oenothera biennis*). Se recomandă în tratamentul plăgilor greu vindecabile,
47 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
49 adverse sunt relativ rare în cazul acestui produs.

RO 132540 B1

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.	1 3
Hernandez et. al. a realizat o gamă de preparate (soluție, unguent, cremă) care conțin plante mexicane (<i>Monlanao grandiflora montanoa bipinnatitida</i>) 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).	5 7
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 <i>Cydonia oblonga</i> (gutui), fără conservanți (6).	9 11
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 <i>Plantago major</i> și care include caracterizarea și încapsularea extractului în ZnO, urmată de evaluarea efectului respectiv (7).	13 15
Un extract vegetal obținut din frunze de <i>Verbascum speciosum</i> și-a dovedit efectul cicatrizant pe diverse linii celulare L929 (Rat Fibroblast Cell Line), HF (Pluman Dermal Fibroblast Cell Line) și HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), și face obiectul unui alt brevet publicat recent (8).	17 19
Un produs nou, regenerativ, din extracte de <i>Curcuma longa</i> , <i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Hamiltonia suaveolens</i> , <i>Typha angustifolia</i> și <i>Azadirachla indica</i> , în ulei de <i>Sesamum indicum</i> 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).	21 23
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 <i>Azadirachla indica</i> 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:	25 27 29 31
- activitatea antimicrobiană;	
- antioxidanții sau captatorii de radicali liberi;	33
- activitate mitogenă (care contribuie la proliferarea celulară crescută), angiogeneza, producția de collagen îmbunătățită și sinteza crescută a ADN-lui (10).	35
Literatura de specialitate menționează următoarele principii active vegetale ca având proprietăți cicatrizante: unii alcaloizi, unele glicozide, terpene, diterpene, sesquiterpene și fitosteroli, compuși fenolici, taninuri, compuși flavonoidici, saponozide, lignani și unele uleiuri esențiale (11-22).	37 39
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 <i>Genliana lutea</i> (23, 24) sau ulei volatile bogat în eucaliptol (25), flavone, cum ar fi kaempferol și quercetin și derivații lor (26).	41 43
<i>Ziziphus jujuba Mill.</i> este un arbore din familia <i>Rhamnaceae</i> despre care literatura menționează un potențial cicatrizant considerabil. Conform medicinei tradiționale în regiunea Bastar se folosesc frunzele și scoarța pentru vindecarea rănilor (27). În plus speciile acestui gen sunt folosite tradițional în India, China și Japonia pentru proprietăți hipoglicemice, sedative, anticancerigene, hepatoprotectoare și antiinflamatoare (28-32).	45 47 49

RO 132540 B1

1 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în asocierea componentelor și
a rapoartelor acestora într-o compoziție de tip unguent topic cu efect cicatrizant și
3 antiinflamator care valorifică potențialul terapeutic al *Ziziphus jujuba Mill.*

Unguentul pe bază de *Ziziphus jujuba Mill.* conform invenției înlătură dezavantajele
5 stadiului tehnic prin aceea că este constituit din 10 părți în greutate extract de frunze de
Ziziphus jujuba Mill. obținut în alcool etilic 70%, 2 părți în greutate alcool cetilic, 2 părți în
7 greutate colesterol, 80,70 părți în greutate vaselină, 5 părți în greutate ulei de cocos și 0,3
părți în greutate butilhidroxianisol.

9 Procedeele de obținere a unguentului pe bază de extract de frunze de *Ziziphus jujuba*
Mill., conform invenției, cuprinde etapele de: a) triturarea extractului uscat obținut din frunze
11 de *Ziziphus jujuba Mill* până la obținerea unei pulberi fine, adăugare de ulei de cocos și
triturare până la obținerea unei paste omogene; b) topirea excipienților grași: vaselină, apoi
13 colesterol și în final alcool cetilic la 50°C, triturarea amestecului rezultat până la răcire cu
obținerea unei mase albe cremoase și încorporarea butilhidroxianisolului cu triturare
15 energetică, timp de 2 min, până la omogenizare; c) adăugarea treptată a bazei de unguent de
la punctul b) peste masa omogenă de la punctul a) cu triturare până la omogenizare.

17 Unguentul conform invenției este utilizat ca agent antiinflamator și cicatrizant.

Se obține un produs de uz topic cu o compoziție complexă pe bază de extract uscat
19 obținut din frunzele de *Ziziphus jujuba Mill.* și excipienți adecvați. Compoziția topică a
prezentei invenții poate fi reprezentată de soluții, loțiuni, creme, unguente, geluri, plasturi
21 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)
23 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.

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

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

31 Figuri:

- fig. 1, dependenta tensiunii de deformație de viteza de forfecare a unguentului testat
33 la $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$;

- fig. 2, reprezentarea dublu logaritmică a vâscozității aparente în funcție de viteza
35 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* (Z1Z-L)
37 comparativ cu lotul martor (B-L-CAO);

- fig. 4, efectul antiinflamator al lotului tratat cu unguentul cu *Ziziphus* (ZIZ-E)
39 comparativ cu lotul de referință (IND-CAO);

- fig. 5, evoluția greutății corporale medii a animalelor din Lotul 1;

41 - fig. 6, evoluția greutății corporale medii a animalelor din Lotul 2.

În continuare se prezintă mai multe exemple nelimitative de realizare a invenției în
43 legătură cu figurile.

Exemplul 1. Prepararea unguentului bazat pe un extract uscat din frunzele de
45 *Ziziphus*

RO 132540 B1

Compoziția unguentului fost următoarea:

Ingrediente	Cantitatea (g)	Funcția în formulare
extract de <i>Ziziphus jujuba Mill.</i>	10,00	Ingredient activ
Alcool cetilic	2,00	Bază de unguent grasă, formatoare de matriță
Colesterol	2,00	Bază de unguent grasă, formatoare de matriță
Vaselină	80,70	Bază de unguent grasă, formatoare de matriță
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, triturând energic, timp de 2 min, 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 vâscozimetru rotațional (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.

După cum se observă, alura curbei din fig. 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

RO 132540 B1

1 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 consideră că sistemul are comportare newtoniană) de 15,8 Pa.s.
3 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
5 de 27 Pa.s.

Determinarea pH-ului

7 pH-ul a fost determinat prin metoda potențiometrică, 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
9 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

11 Acest parametru a fost determinat utilizând dispozitivul Ojeda - Arbussa, care este
13 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
15 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
17 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
19 g și se citesc diametrele cercurilor formate prin întinderea unguentului.

21 Se calculează suprafața conform formulei: $S = \pi r^2$, unde S este suprafața în mm² 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

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

Exemplul 3. Dovezi experimentale

33 Experimentele pe animale efectuate în scopul evaluării eficacității unguentului în
35 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
37 științifice și a Directivei 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22
septembrie 2010, privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice.

39 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
41 ținute în condițiile laboratorului nostru timp de 2 zile, pentru a se obișnui cu noul habitat
(temperatura camerei experimentale 23 ± 2°C, umiditatea de 40-50%, iluminarea artificială,
43 alternativ 12 h lumină/12 h 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.

RO 132540 B1

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 sec.	1 3
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.	5 7
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 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.	9 11
Rezultate	13
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 mm ² , iar după un tratament de 12 zile a ajuns la 23 mm ² și o vindecare de 76,56% față de inițial. Vindecarea totală s-a produs după 26 zile.	15 17
După 12 zile de tratament, unguentul folosit în studiu ca produs de referință a prezentat o suprafață a arsurilor de 13,8 mm ² și o vindecare de 85,09% față de inițial.	19
Unguentul cu extract de <i>Ziziphus</i> 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 mm ² . Rezultatele sunt semnificative statistic (*p < 0,05) la 4 zile, 6 zile și 8 zile.	21 23
În concluzie, datele experimentale indică pentru unguentul testat un efect cicatrizant moderat comparabil cu al produsului de referință.	25
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.	27
Au fost folosiți 100 de șobolani masculi, sușa Wistar, cu greutatea 270 ± 32 g, 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 <i>ad libitum</i> . Apa a fost administrată <i>ad libitum</i> , din biberoane.	29 31 33
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.	35 37
Câte 0,2 g din flecare 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 h.	39 41
Ca produs de referință a fost folosit Indometacin HYPERION, unguent, 40 mg/g. Unguentul martor este reprezentat de baza lipofilă fără extractul de <i>Ziziphus</i> .	43
Calculul statistic s-a realizat utilizând programele Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp., SUA) și GraphPad Prism v. 5.0. (GraphPad Software, SUA).	45
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 h de la administrarea caolinului (test t, p < 0,05).	47 49

RO 132540 B1

1 Atunci când este comparat cu unguentul de referință, unguentul cu extrat de *Ziziphus*
prezintă efect antiinflamator doar la 3, respectiv 4 h de la administrarea afentului flogistic.

3
5 *Efectul antiinflamator al lotului tratat cu unguentul testat comparativ cu lotul martor
și lotul de referință precum și semnificația statistică*

Tabelul 1

Lot	Efect antiinflamator			
	1 h	1 h	1 h	1 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
A 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	- 0,2	4,77	2,09
Testul t Student (p)	ns 0,2583	ns 0,7708	ns 0,0864	0,2706
ns = ne semnificativ; ** = foarte semnificativ statistic; *** = extrem de semnificativ statistic				

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

21 **5.1. Determinarea iritației/coroziunii dermice acute (OECD 404)**

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

29 *Mod de lucru*

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

33 Cu aproximativ 24 h 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
35 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 h de lumină și 12 h de întuneric. Animalele au avut acces
nelimitat la apă și la hrana convențională de laborator.

37 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
39 animalului, pentru a preveni accesul acestuia la ele, după cum urmează:

- iepurele 1 - unguentul (ZIZ-L) și baza lipofilă (B-L).

41 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.

43 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
45 observate au fost clasificate conform tabelului I.1.1:

RO 132540 B1

Clasificarea reacțiilor dermice

Tabelul 2

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 extinde în afara suprafeței expuse)	4
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 4 h după aplicare, imediat după îndepărtarea plasturilor autoadezivi.

În niciun 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.

Scorurile de răspuns iritație/coroziune pentru unguentul și baza lipofilă

Tabelul 3

Unguent	Scor eritem/edem				
	Imediat*	1 h*	24 h*	48 h*	72 h*
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 plasturelui					

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

RO 132540 B1

1 5.2. *Determinarea iritației dermice după administrări repetate (21/28 zile conform*
2 *OECD 410)*

3 *Principiul metodei*

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

10 *Mod de lucru*

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

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

- 20 - Lotul 1F: ZIZ-L-F: alcătuit din 4 femele, care au primit unguentul testat ZIZ-L;
- 21 - Lotul IM: ZIZ-L-M: alcătuit din 4 masculi, care au primit unguentul testat ZIZ-L;
- 22 - Lotul 2F: B-L-F: alcătuit din 4 femele, care au primit baza lipofilă B-L;
- 23 - Lotul 2M: B-L-M: alcătuit din 4 masculi, care au primit baza lipofilă B-L.

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

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

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

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

37 *Rezultate și discuții*

38 Rezultatele experimentale privind evoluția greutateii corporale pe parcursul celor 21 de
zile sub formă de grafice în fig. 5 și 6.

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

41 Rezultatele experimentale au evidențiat următoarele aspecte:

42 - nu s-au înregistrat modificări ale aspectului exterior (blană, tegumente, mucozități)
43 și nici ale comportamentului motor al animalelor din cele 4 loturi testate;

44 - nu s-au înregistrat modificări ale activității somato-motorii și nici de comportament;
45 pentru toate loturile luate în lucru greutatea corporală a crescut (semnificativ din punct de
46 vedere statistic) pe tot parcursul tratamentului, lucru care ne indică lipsa de toxicitate a
47 unguentului obținut din extractul uscat de frunze de *Ziziphns jujuba*.
48

RO 132540 B1

Deteminările 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.

Determinarea transaminazelor la șobolan

Tabelul 4

Produs 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

Determinarea compușilor azotați la șobolan

Tabelul 5

Produs testat	Uree serică mg/dL		Creatinină mg/dL	
	$\bar{x} \pm SD.$	Efect %/inițial	$\bar{x} \pm SD.$	Efect %/inițial
Martori	45,29 ± 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, nesemnificativă 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 nesemnificativă a ureei serice 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.

Bibliografie

1. Autorizație de pubere 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](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.enia.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](http://www.anm.ro/_/_PRO/PRO_7136_05.12.06.pdf?anmOrder=Sorter_cim&anmDir=ASC&anmPage=239&ID=7643)).

RO 132540 B1

- 1 5. MX 2013011150 (A), publicat la 26 martie 2015, G. R. Hernandez ș.a.
2 6. MX 2012002190 (A), publicat la 26 august 2013, M. G. Gonzalez.
- 3 7. MX 2014013022 (A), publicat la 26 aprilie 2016, Benemerita Universidad
Autonoma de Puebla.
- 5 8. WO 2015009260 (A2), publicat la 22 ianuarie 2015, Sahin Fikrettin (Turcia) ș.a.
6 9. US 2013323337 (A1), publicat la 5 decembrie 2013, Patankar Suresh Balkrishna
7 (India).
- 8 10. P. K. Ghosh, A. Gaba, "Phyto-Extracts in Wound Flealing", J. Pharm. Pharm Sci.
9 16(5), 760-820,2013.
- 10 11. Akkol E.K., Koca U., Peşin L, Yilmazer D., "Evaluation of the Wound Uealing
11 Potențial of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae) by In Vivo Excision and Incision
Models", Evidence-Based Comp and Alt Med, 2011; 1-7.
- 12 12. Ghosh P.K., Gupta V.B., Rathore M.S., Hussain 1., "Wound-healing potențial of
13 aqueous and ethanolic extracts of *apamarga* leaves", Int. J. of Green Pharm, 2011; 5, 12-15.
- 14 13. Subhashini S. and Arunachalam K.D., "Investigations onthe phytochemical
15 activities and wound healing properties of *Adhatoda vasica* leave in Swiss albino mice", Afr.
16 J. of Plant Sci., 2011; 5,133-145.
- 17 14. Barku V.Y.A., Opoku-Boahen Y., Owusu-Ansah E., NTKD. Dayie, Mensah, "In-itro
18 Assessment of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanol Extracts of Six Wound
19 Healing Medicinal Plants", J. of Nat. Sci. Res., 2013; 3(1), 74-80.
- 20 15. Diallo D., Sogn C., Samake F.B., Paulsen B.S., Michaelsen T.E. and Keita A.,
21 Wound Healing Plants in Mali, the Bamako Region. An Ethnobotanical Survey and
22 Complement Fixation of Water Extracts from Selected Plants, Pharmaceutical Biol, 2002;
23 40(2), 117-128.
- 24 16. Inngjerdingen K.T., Coulibaly A., Diallo D., Michaelsen T.E., Paulsen B.S., "A
25 complement fixing polysaccharide from *Biophytum petersianum*", J. Pharm Pharm Sci
26 (www.cspCanada.org), 16(5), 760-820, 2013, Klotzsch, a medicinal plant from Mali, West
27 Africa, Biomacromolecules, 2006; 7(1): 48-53.
- 28 17. Nayak B.S. and Pereira L.M.P., "Catharanthus roseus flower extract has wound-
29 healing activity in Sprague Dawley rats", BMC Comp and Alt Med, 2006; 6, 1-6.
- 30 18. Anyasor G.N., Aina D.A., Olushola M., Aniyikaye A.F., "Phytochemical
31 constituent, proximate analysis, antioxidant, antibacterial and wound healing properties of
32 leaf extracts of *Chromolaena Odorata*", Annals. of Biol. Res., 2011; 2(2), 441-451.
- 33 19. Marwah R.G., Fatope M.O., Mahrooqi R.A., Varma G.B., Hussain Al Abadi, Suad
34 Khamis S. Al-Burtamani, "Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in
35 Oman", Food Chem, 2007; 101(2), 465-470.
- 36 20. Singh M., Govindarajan R., Nath V., Rawat A.K., Mehrotra S., "Antimicrobial,
37 wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. et Lind", J.
38 Ethnopharmacol, 2006; 107, 67-72.
- 39 21. Chaudhari M. and Mengi S., "Evaluation of phytoconstituents of *Terminilaia arjuna*
40 for wound healing activity in rats", Phythother Res, 2006; 20(9), 799-805.
- 41 22. Zambare M.R., Bhosale U.A., Somani R.S., Yegnanarayan R., Talpate K.A.,
42 "Achyranthes aspera (Agadha): Herb That Improves Pancreatic function in Alloxan Induced
43 Diabetic Rats", Asian J. Pharm Biol. Res., 2011; 1(2), 99-104.
- 44 23. Inamdar P.K., Yeole R.D., Ghogare A.B., de Souza N.J., "Determination of
45 biologically active constituents in *Centella asiatica*", J of Chromatography, 1996; 742, 127-
46 130.

RO 132540 B1

24. Chung P.Y., Navaratnam P., Chung L.Y., “*Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against Staphylococcus aureus strains*”, *Annals Clin Microbiol and Antimicrobial*, 2011; 10(25), 1-6. 1
3
25. Baris O, Gulluce M, Sahin F, Ozer H, Kilic li, Ozkan H, Sokmen M and Ozbek T., “*Biological Activities of the Essential Oil and Methanol Extract of Achillea biebersteinii Afan. (Asteraceae)*”, *Turle J. Biol.*, 2006; 30, 65-73. 5
26. Adeloye O.A., Akinpelu A.D., 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. 7
9
27. Nadkarni K.M., *Indian Materia Medica*, Popular Prakashan, Bombay, 1986, pp. 1315-319. 11
28. Jiang J.G., Huang X.J., Chen J., “*Separation and purification of saponins from Semen Zizyphus jujuba and their sedative and hypnotic effects*”, *J. Pharm. Pharmacol.*, 59, 1175,1180, (2007). 13
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. Efharmacol.*, 122, 555, 560 (2009). 15
17
30. Vahedi F., Najafi M.F, Bozari K., “*Evaluation of inhibitory effect and apoptosis induction of Zyzyphbus jujube on tumor cell lines, an in vitro preliminary study*”, *Cytotechnology*, 56, 105, 111 (2008). 19
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). 21
23
32. Shirde J. Z., Madani H., Mirbadalzadeh R., “*Investigation into the hypoglycemic effect of hydroalcoholic extract of zizyphus Jujuba leaves on blood glucose and lipids in alloxan-induced diabetes in rats*”, *J. Diabetes Metab. Disord.*, 8(1), 2 (2009). 25

RO 132540 B1

Revendicări

1

3

1. Unguent pe bază de *Ziziphus jujuba Mill.*, caracterizat prin aceea că, este constituit din 10 părți în greutate extract de frunze de *Ziziphus jujuba Mill.* obținut în alcool etilic 70%, 2 părți în greutate alcool cetilic, 2 părți în greutate colesterol, 80,7 părți în greutate vaselină, 5 părți în greutate ulei de cocos și 0,3 părți în greutate butilhidroxianisol.

7

2. Procedeu de obținere a unguentului definit în revendicarea 1 care cuprinde etapele de:

9

a) triturarea extractului uscat obținut din frunze de *Ziziphus jujuba Mill* până la obținerea unei pulberi fine, adăugare de ulei de cocos și triturare până la obținerea unei paste omogene;

11

13

b) topirea excipienților grași: vaselină, colesterol și în final alcool cetilic la 50°C, triturarea amestecului rezultat până la răcire cu obținerea unei mase albe cremoase și încorporarea butilhidroxianisolului cu triturare energetică, timp de 2 min, până la omogenizare;

15

c) adăugarea treptată a bazei de unguent de la punctul b) peste masa omogenă de la punctul a) cu triturare până la omogenizare.

17

3. Unguent conform revendicării 1 pentru utilizare ca agent antiinflamator și cicatrizant.

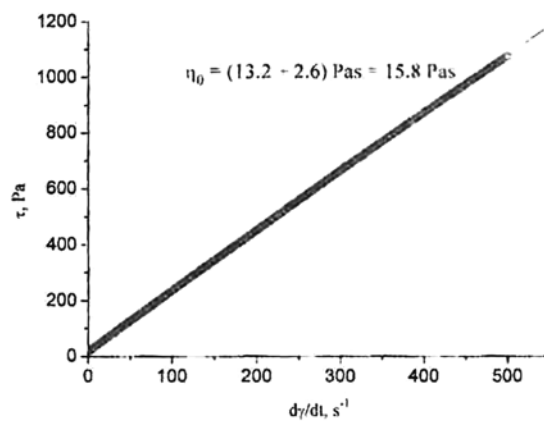


Fig. 1

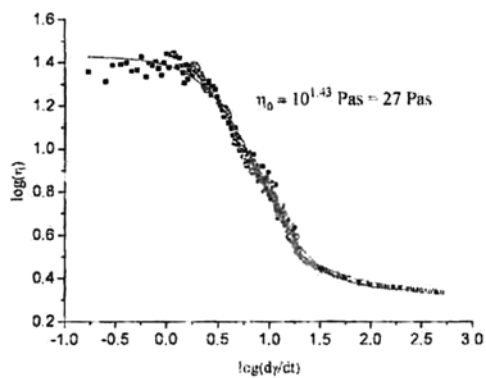


Fig. 2

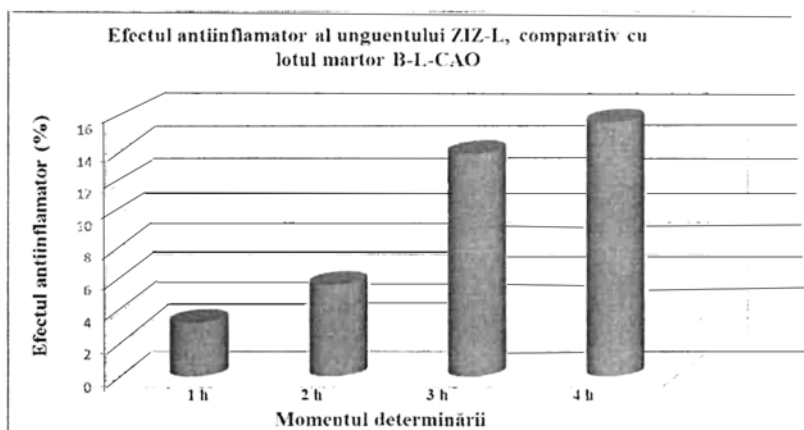


Fig. 3

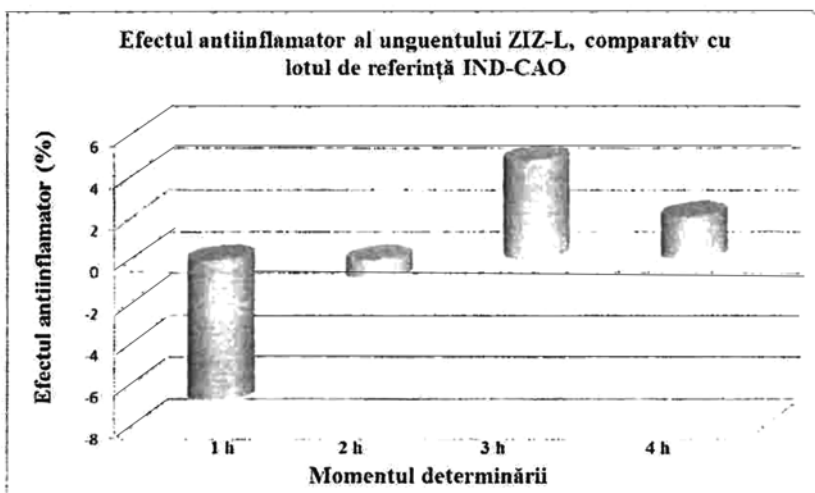


Fig. 4

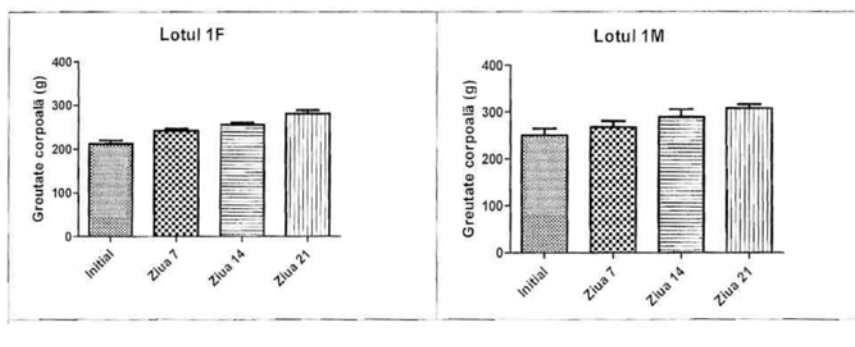


Fig. 5

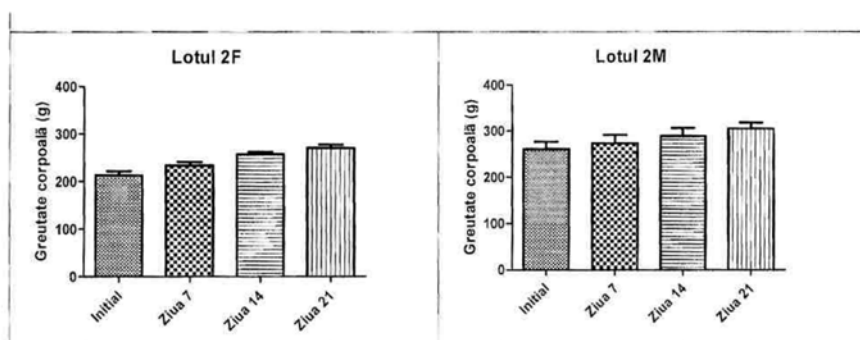


Fig. 6

