



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00246

(22) Data de depozit: 12/05/2021

(41) Data publicării cererii:  
29/11/2022 BOPI nr. 11/2022

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE  
CHIMICO-FARMACEUTICĂ - ICCF  
BUCUREȘTI, CALEA VITAN NR.112,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• CASARICA ANGELA, STR. POPA STOICA  
FARCAS NR. 19, SECTOR 3, BUCUREȘTI,  
B, RO;

• BALAS CRISTINA,  
ALEEA SLT.ADRIAN CARSTEA NR.3,  
BL.33B, SC.1, ET.3, AP.22, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• MOSCOVICI MISU, STR. JEAN STERIADI  
NR. 7, BL. I 22, SC. B, ET. 2, AP. 16,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• POPESCU TRAIAN, STR.MOLDOVIȚEI,  
NR.58, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) COMPOZIȚIE COSMETICĂ CU EFECT HIDRATANT,  
NUTRITIV, REPARATOR ȘI CALMANT

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție de cremă cosmetică cu efect hidratant, nutritiv, reparator și calmant pentru revitalizarea pielii. Compoziția, conform invenției, cuprinde celuloză bacteriană, ulei de tamanu, acid boric, uree, ulei esențial de busuioc, ulei esențial de cuișoare, tocofenol natural, ulei esențial de semințe de morcov, coenzima Q, emulsionanți și conservanți uzuali

precum și apă pură ca solubilizant, crema având o activitate antibacteriană certă manifestată față de *Staphylococcus aureus* și o activitate antimicotică moderată, manifestată față de *Candida albicans*.

Revendicări: 1



## COMPOZITIE COSMETICA CU EFECT HIDRATANT, NUTRITIV, REPARATOR SI CALMANT

### Domeniul tehnic in care poate fi folosita inventia:

Inventia se refera la o compozitie de crema cosmetica cu efect hidratant, nutritiv, reparator si calmant pentru revitalizarea pielii, cu utilizare in domeniul medical si cosmetic.

### Descrierea stadiului actual:

Pe plan mondial exista o cerinta din ce in ce mai mare pentru produsele de ingrijire corporala. Cremele pentru piele sunt utilizate pentru a imbunatati sanatatea pielii si pentru a-i crea suplete, moliciune si flexibilitate. Cremele cosmetice sunt un sistem reologic integrat care combina comportarea solidelor si proprietatile lichidelor in acelasi material.

Pentru a imbunatati formularile cu aplicatii topice, cutanate, multi cercetatori folosesc substante bogate in proteine, vitamine, acestea fiind considerate ingrediente capabile sa lege apa si sa hidrateze pielea, fiind totodata biocompatibile cu tesutul cutanat.

Literatura de brevete in domeniul produselor medicale si dermato-cosmetice pe baza de **nanoceluloza** ca atare sau in asociere cu diverse alte substante acceptabile farmaceutic mentioneaza urmatoarele documente:

Brevetul intitulat "Masca cosmetica din bio-celuloza si metoda de prelucrare" (US 2013/0244977 A1) descrie un produs cosmetic, sub forma de masca din bio-celuloza, impregnata cu un amestec specific. Inventia prezinta modul de obtinere a suportului bio-celulozic, prin proces biotehologic fermentativ al bacteriei *Acetobacter xylinum* BRC21, in mediu clasic nutritiv HS, in prezenta extractului de ghimbir (extract etanolic: apa, 1:1), precum si metoda de impregnare/functionalizare a acestuia, prin cufundarea in emulsie cosmetica (de tipul ulei in apa). Este prezentata deasemenea si o varianta facila de ambalare, pentru mentinerea optima a compusilor biologic activi. Produsul este destinat aplicarii locale la nivelul tenului aducand beneficii si eficacitate la o aplicare usoara si nein vaziva.

Un hidrogel cu nanoceluloza, sub forma de masca este descris in brevetul cu titlul **“Formularea unei masti hidratate de nanoceluloza cu sau fara liant pentru utilizare ca tratament dermatologic” (US 9816230)**. Inventia descrie obtinerea si purificarea nanocelulozei, precum si procedeul de realizare a mastii in diferite forme. Forma mastii se obtine prin aplicarea unei presiuni inalte sau proces de filtrare la vacuum. Nanoceluloza este functionalizata, conform descrierii din brevet, cu ingrediente active dermatologice, precum si cu alti agenti, care confera stabilitate formei mastii, cum ar fi citrat de calciu, lactat sau stearat. Suportul de nanoceluloza functionalizat este apoi modelat in forme si dimensiuni variate, cum ar fi sub forma de masca faciala, pentru gat sau pentru zona ochilor.

Brevetul **US20150216784 A1**, cu titlul **“Compozitie cosmetica care contine fragmente de celuloza bacteriana si metoda de obtinere”**, descrie o compozitie cosmetica pe baza de nanoceluloza bacteriana ce imbunatateste transmiterea transdermica a ingredientelor active continute in compozitia cosmetica, oferind functii de hidratare ale pielii, exfoliere si absorbtie de sebum.

Deoarece celuloza bacteriana (BC) are o mare capacitate de absorbtie a apei și o bună permeabilitate, este potrivita în formulările cosmetice pentru a produce emulsii stabile ulei-în-apă fără a irita pielea, dar si ca substrat pentru transportul ingredientelor active din punct de vedere cosmetic și pentru asigurarea unei absorbții transdermice sporite.

Prezenta inventie se refera la o compozitie noua, care prezinta avantajul ca are in compozitie **nanoceluloza, ulei de tamanu, acid boric, uree, ulei esential de busuioc, ulei esential de cuisoare, tocoferol natural (vit.E), ulei esential de seminte de morcov si coenzima Q**, in rapoarte bine stabilite, ceea ce confera cremei o buna stabilitate fizico-chimica si biologica si capacitatea de revitalizare (regenerare) prin refacerea elasticitatii pielii, **hidratarea** si aportul nutritiv de componentii specifici pielii: proteine, grasimi naturale si vitamine. Prin aplicarea constanta a prezentei compozitiei crema cosmetica cu efect hidratant, nutritiv, reparator si calmant, se atenuaza ridurile, si se obtine o buna actiune revitalizanta a pielii.

### **Problema tehnica**

Problema tehnica obiectiva propusa spre rezolvare de prezenta cerere de inventie consta in:

- stabilirea componentelor si a rapoartelor de asociere a acestora pentru prepararea unei creme bogata in vitamine pentru hidratare si revitalizarea pielii.

- inlocuirea unor componente de sinteza chimica in formulele de produse cosmetice U/A (Emulsii ulei în apă) sau A/U (Emulsii apă în ulei), prin ingrediente active majore de origine vegetala;

- realizarea unei compozitii cosmetice sub forma de cremă hidratanta, nutritiva, reparatoare, calmanta si revitalizanta de zi-noapte care, pe lângă efectul de curățare a pielii, furnizează și elemente nutritive pentru stimularea metabolismului matrixului celular al tenului, cu predilecție spre stratul subdermic.

Produsul cosmetic sub formă de cremă realizat reprezintă o asociere de principii bioactive de origine vegetală care acționează **specific si** benefic, dovedit în rapoartele utilizate în formula propusa, având acțiuni de hidratare, aport nutritiv, efect reparator, revitalizant, emolient, stoparea uscării și îmbătrânirii pielii și de reconstruire a filmului hidrolipidic, redând tenului prospețime și strălucire.

**Solutia tehnica** consta in faptul ca se asociaza **celuloza bacteriana (nanoceluloza)** cu un amestec bioactiv cu urmatoarele ingrediente: **ulei de tamanu, acid boric, uree, ulei esential de busuioc, ulei esential de cuisoare, tocoferol natural (vit.E), ulei esential de seminte de morcov si coenzima Q.**

### **Avantajele inventiei in raport cu stadiul tehnicii:**

- este un produs cosmetic (compozitie crema cosmetica cu efect hidratant, nutritiv, reparator si calmant) destinat pentru toate tipurile de piele, pentru ingrijirea permanenta a pielii atat pentru intretinere, avand capacitatea de a reface elasticitatea, fiind hidratanta, nutritiva si revitalizanta, cat si pentru a intarzia aparitia fenomenului de imbatranire a pielii;

- este o crema reparatoare intensiva de zi-noapte, formulata pentru toate tipurile de ten, chiar si pentru cele mai aride sau senescente;

- este hidratanta, hranitoare si eficace pentru intensificarea ciclului de reparare naturala a pielii, datorita prezentei nanocelulozei si a tocoferolului natural, prin componentele sale antioxidante, antiinflamatorii și nutritive.

- datorita componentelor active cu biodisponibilitate ridicata de origine naturala, actioneaza impotriva radicalilor liberi.

- stimuleaza repararea celulara, oferind energie, tonus si textura epidermei.

- crema cu proteine, grasimi naturale si vitamine cu efect hidratant si calmant pentru revitalizarea pielii contine **tocoferolul natural, ulei esential de seminte de morcov si coenzima Q**, care au capacitatea de a reface pielea, de a hrani epiderma, de a atenua ridurile, cat si o buna actiune cicatrizanta si de protectie a pielii.

Astfel, **compozitia** crește densitatea dermului și fermitatea acestuia, are acțiune antirid, regenerantă și restructurantă, de protecție împotriva proceselor distructive declanșate de radicalii liberi superoxodici și de tonifiere a tenului si are o acceptabilitate cutanată foarte bună.

#### **Descrierea detaliata a inventiei:**

În ceea ce privește compoziția în substanțe bioactive a componentelor mentionate este prezentata pe scurt motivarea alegerii lor in vederea realizarii compozitiei de crema cosmetica cu efect hidratant, nutritiv, reparator si calmant, astfel:

**Uleiul de tamanu** (*Calophyllum Inophyllum seed oil*) este un ulei remarcabil pentru efectele sale asupra pielii si mucoaselor, mai ales in produsele cosmetice, dermatocosmetice sau cosmeceutice (Saechan si colab., 2021) destinate aplicarii topice. Acest ulei are efecte multiple benefice in tratarea ranilor sau unor leziuni, respectiv efect antibacterian (Raharivelomanana si colab., 2018), antimicotic (Saechan si colab., 2021), cicatrizant cutanat, antiinflamator, usor antalgic, care faciliteaza circulatia sangvina in zonele periferice. Cele mai multe proprietati bioactive ale uleiului de tamanu sunt datorate compozitiei foarte bogate calofilolide (Nguyen si colab., 2017), in acizi grasi (acid palmitic (16.5±1.59%), acid palmitoleic (0.26±0.11%), acid stearic (30.2±4.36%), acid oleic(23.6±4.77%), linoleic acid

( $25.5 \pm 3.87\%$ ), acid alpha-linoleic ( $0.26 \pm 0.05\%$ ), acid arachidonic ( $0.6 \pm 0.09\%$ ), acid gadoleic ( $0.3 \pm 0.1\%$ ), acid dihomogamma-linolenic ( $< 0.1\%$ ), acid behenic ( $0.1 \pm 0.15\%$ ), acid docosadienoic ( $1.4 \pm 5.08\%$ ), neoflavonoide, inclusiv piranocumarina si derivati ai sai (Raharivelomanana si colab., 2018), compusi fenolici ( $25.9 \pm 1.2$  mg) (Saechan si colab., 2021). Efectele recunoscute in tratatea ranilor sunt datorate in mare parte continutului majoritar in neoflavonoide, in special de calofilolide (Nguyen si colab., 2017). ce au actiune dovedita impotriva tulpinilor de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis* si *Staphylococcus haemolyticus* responsabile pentru multe infectii, impotriva *Corynebacterium minutissimum*, microorganism implicat in eritasma (infectie cutanata superficiala cronica a zonelor intertriginoase ale pielii) sau fata de *Propionibacterium acnes* si *Propionibacterium granulosum* implicate in infectiile acneice (Raharivelomanana si colab., 2018, Leguillier si colab., 2015).

**Acidul boric** este un complex cu biomolecule organice recunoscut in aplicatiile farmaceutice, dermatocosmetice si biomedicale. Acesta este absorbit foarte rapid la nivelul pielii, avand un timp de injumatatire de pana la o zi. Are un nivel foarte scazut de toxicitate la aplicariile topice si este utilizat cu traditie, ca antiseptic foarte eficient, antibacterian, antimicotic (Lopalco si colab., 2020), fiind inclus in tratamentul curent al ranilor sau leziunilor superficiale, respectiv in produse dezinfectante lichide sau sub forma de pudre (Zümrcöglu-Karan Si Köse, 2015).

**Ureea** este o molecula higroscopica ideala ca ingredient cu rol emolient in formularile farmaceutice si cosmetice. Acesta are proprietati similare cu cele ale umectantilor, respectiv de crestere a continutului de apa in piele, alaturi de alte ingrediente cum ar fi glicerina, sorbitolul sau alte polizaharide. Ureea este usor solubila si este preferata in formularile de produse cu aplicare topica, mai ales in cele dermatologice, cum ar fi creme sau lotiuni, geluri (Annunziata si colab., 2020). Este utilizata curent pentru tratarea unor afectiuni ale pielii cum ar fi eczema atopica, dermatita de contact, psoriazis, pentru diminuarea pruritului si a iritatiei locale (Voegeli, 2012) sau ca agent topic keratolitic (Annunziata si colab., 2020).

**Uleiul esential de Busuioc** (*Ocimum basilicum oil*) a fost selectat datorita proprietatilor sale recunoscute antibacteriene si antiinflamatoare. Acest ulei contine  $\beta$ -caroten si un numar mare de terpene, aldehide, alcooli, esterii, fenoli, cetone biologice active, precum si bioelemente cum ar fi mangan, fier, calciu si zinc. Compusii predominanti in uleiul de busuioc sunt metil eugenol pana la 36%, linalol pana la 15%, eugenol pana la 14% si 1,8-cineol pana la 7.15%. Eugenolul este cunoscut pentru aroma sa, dar si pentru proprietatile antiseptice si usor anestezice locale, iar metil eugenolul pentru proprietatile antimicotice (Wojciech si colab., 2020). Pe langa acesta uleiul de busuioc mai contine si sesquiterpene hidrocarbinatate pana la maxim 39%, monoterpene oxigenate in cantitati mai mici. Datorita compozitiei bogate in compusi cu proprietati biologice importante, uleiul esential de busuioc este inclus in formulari cosmetice sau dermatocosmetice, pentru rolul sau antibacterian si antioxidant (Ilie si colab., 2019).

**Uleiul esential de Cuisoare** (*Eugenia caryophyllus leaf oil*) este cunoscut pentru efectele biologice si este inclus adesea in formularile de produse pentru tratarea tegumentului, in produse cu aplicare directa. Are efect antibacterian cu spectru larg, antimiotic, antiviral precum si antiseptic puternic. Efectele benefice a acestuia se datoreaza compozitiei chimice foarte bogate in eugenol intre 70-90% (Mahulette si colab., 2020, Selles si colab., 2020), beta cariofilen pana la 80% si acetat de eugenil pana la 8.8% (Selles si colab., 2020).

**Tocoferolul natural din** *Helianthus annuus seed oil*, recunoscut pentru rolul antioxidant si emolient este utilizat curent in produse cosmetice hidratante si reparatoare cutanate. Uleiul de seminte de *Helianthus annuus* este bogat in fitochimicale cum ar fi antioxidanti, flavonoli, proantociani, aminoacizi, acizi grasi nesaturati si saturati (acid linoleic, acid oleic) (Bartholomew si Olubukola, 2020), vitamine, niacina, acid folic, minerale cum ar fi calciu, magneziu, seleniu, fier, sodiu, potasiu, zinc (Ruchika si colab., 2014). Are efect semnificativ antibacterian (fata de *S. aureus*, *Candida albicans*, *E. coli*) si antiinflamator in tratamentele topice ale unor afectiuni ale dermului (Ruchika si colab., 2014).

**Uleiul esential de seminte de morcov** (*Daucus carota seed oil*) are actiune antioxidanta si cicatrizanta, fiind inclus in emulsii cosmetice ca protector al pielii si rejuvenant cutanat (Lohani, 2018). Acesta este bogat in acizi grasi pana la 59%, dintre care acid linoleic, stearic, caratol pana la 67% si minerale ca Al, Ca, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, P, Se, Sr, V si Zn (Ozcan si colab., 2007).

**Coenzima Q** are o actiune antioxidanta remarcabila, sub forma de sinergie de ubiquinona, vitamina E si squalan, conferind pielii protectie ca neutralizant al radicalilor liberi, protectie împotriva imbatranirii premature datorata stresului oxidativ. Are o afinitate deosebita fata de derm, ajutand la refacerea barierei hidrolipidice (Zmitrek si colab., 2016), stimuleaza sinteza de colagen, are rol antioxidant puternic, antiinflamator, de regenerator celular si revitalizant cutanat.

**Nanoceluloza** sau celuloza bacteiana este produsa de multe bacterii cum ar fi *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Dickeya* si *Rhodobacter*. Tulpina *Acetobacter xylinum* este cea mai inalt productoare, fiind capabila de a metaboliza surse bogate in carbon si azot. Mediul de cultura nutritiv utilizat pentru fermentatia bacteriana este bogat in glucoza, peptona, extract de drojdie, si alti nutrienti, in acord cu mediul Hestrin Schramm. Dezvoltarea bacteriana se efectueaza etapizat, inoculului continand extract de porumb, iar mediul de bioproces fiind bogat in saruri si minerale, sursa de carbon si azot (Azeredo si colab., 2019). Cultivarea se realizeaza in conditii statice, pentru 14 zile, la temperatura constanta de 30°C. Nanoceluloza se dezvolta la suprafata mediului ca o membrana flotanta de grosime de pana la 0.5mm.

Purificarea acesteia se face etapizat cu solutii bazice, neutralizare cu solutie slab acida si sterilizare umeda timp de 45 de minute.

Acest biomaterial se utilizeaza atat in **produse farmaceutice cat si cosmetice**, ajutand la realizarea stabilitatii emulsiei, fara adaus de surfactanti sau alti compusi chimici sau sintetici. Adesea se utilizeaza sub forma de pulbere in produse atat emulsii cat si pudre cu aplicare cutanata topica, sau in produse cosmetice de tipul mastilor (Norhasliza si colab., 2012)



In acest sens, a fost realizat produsul cu aplicare topica drept compozitie crema cosmetica cu efect hidratant, nutritiv, reparator si calmant, unde scopul principal a fost reprezentat de **valorificarea nanocelulozei bacteriene** generata de unele procedee biotehnologice, prin includerea acesteia ca ingredient activ sau componenta de faza de emulsie.

Inventia va fi explicata mai in detaliu prin urmatoarul exemplu:

**Exemplu.** Pentru a obtine 100 g crema cosmetica cu efect hidratant, nutritiv, reparator si calmant pe baza de **nanoceluloza** se folosesc: 69.3 apa pura solubilizant, 17 g ulei de *Calophyllum Inophyllum seed oil* (faza A), 1.5 g Cetearyl glucoside (faza B), 3 g Glyceryl stearate (faza A), 3 g acid boric (faza B), 2 g uree (faza B), 1g pulbere de nanoceluloza (faza B) 0.5 g *Ocimum basilicum oil* (faza C), 0,5 g *Eugenia caryophyllus leaf oil* (faza C), 0.2g *Daucus carota seed oil* (faza C), 0.4 g Tocopherol (*Helianthus annuus seed oil*) (faza C), 0.6 g conservant ecocertificat de tip non-paraben, non-formaldehidă, non-isothiazolone (faza C), 1g Coenzina Q (faza C);  
(Faza A – faza lipofila, Faza B – faza hidrofila, Faza C - substanta activa)

**Compozitie crema cosmetica cu efect hidratant, nutritiv, reparator si calmant: formula calitativa si cantitativa - INCI-CAS - pentru 100 g compozitie**

Denumire INCI ingredient	%	FUNCTIILE ingredientului	CAS
Aqua	69.3	Solubilizant, umectant	7732-18-5
<i>Calophyllum Inophyllum seed oil</i>	17	Antiinflamator, antibacterian, cicatrizant, antalgic, calmant cutana	607-323-1
Cetearyl glucoside	1.5	Emulsificator ecocertificat	246159-33-1
Glyceryl stearate	3	Co-emulsificator ecocertificat, emolient	31566-31-1
Acid boric	3	Antiseptic, antibacterian	10043-35-3
Uree	2	Emolient	57-13-6
<i>Ocimum basilicum oil</i>	0.5	Antiinflamator, antalgic	8015-73-4
<i>Eugenia caryophyllus leaf oil</i>	0.5	Antibacterian cu spectru larg, antiinflamator, antimicotic, antiseptic cutanat	8015-97-2
<i>Daucus carota seed oil</i>	0.2	Cicatrizant, reparator, revitalizant, tonifiant cutanat	8015-88-1
Tocopherol ( <i>Helianthus annuus seed oil</i> )	0.4	Antiinflamator, antioxidant, regeneretor, emolient cutanat	8001-21-6
Benzyl alcohol, salicylic acid, glycerin, sorbic acid	0.6	Antibacterian si antifungic de spectru larg, stabilizator, ecocertificat	100-51-6/ 69-72-7/ 56-81-5/ 110-44-1
Coenzima Q	1	Antioxidant, regeneretor și reparator al barierei naturale de protecție a pielii	303-98-0
Pubere de nanoceluloza	1	Stabilizator, agent de ingrosare, emolient	-

Procedeul de preparare a compozitiei **crema cosmetica cu efect hidratant, nutritiv, reparator si calmant** conform inventiei se desfasoara in modul urmatoar: ingredientele fazei A si fazei B, se cantaresc la balanta analitica, in pahare separate termorezistente, se incalzesc la temperatura 70°C, pe baie de apa, pana la topire completa. Cand cele doua faze sunt lichefiate total si au aceeasi temperatura se prepara emulsia, prin adaugarea in picatura a fazei B peste Faza A, cu omogenizare 3-7 minute, cu mixerul de mana, pana la racirea completa, faza C se adauga la final, dupa racirea completa a emulsiei formate, apoi se omogenizeaza pentru inca 5 minute. Nanoceluloza in faza B se hidrateaza in amestecul apos circa 5-30 minute.

## TESTE RELEVANTE PENTRU ACTIVITATEA BIOLOGICA SPECIFICA SI DIRECTIONAREA APLICABILITATII DERMATO-COSMETICE

### Evaluarea eficientei biologice. Determinarea Încărcăturii Microbiene

Determinarea incarcaturii microbiene pentru compozitia de **crema cosmetica cu efect hidratant, nutritiv, reparator si calmant**, s-a realizat prin metoda inocularii in profunzime - metoda de testare/evaluare a numarului total de microorganisme aerobe viabile, in conditiile prevazute de *Pharmacopeia europeana* IX, Volumul I, Capitolul. 2.6.12.; metoda se aplica in procesul de control al calitatii produselor de cosmetice/dermatocosmetice.

Materiale si echipamente necesare: placi Petri steriele 90 mm, pipete gradate sterile de capacitate 10 mL, eprubete 18/180 mm sterile, pahare Erlenmayer sterile; pipetor automat; balanta analitica; boxa microbiologica cu flux de aer laminar (LAF), incubator cu temperatura reglabila, 30-35°C, pentru cresterea optima a bacteriilor, incubator cu temperatura reglabila, 20-25°C, pentru cresterea optima a fungilor.

Conform *Pharmacopeia europeana* IX in vigoare, se utilizeaza urmatoarele medii de cultura si solutii: Mediu Casein Soya-Bean Digest Agar (CaSoA) in forma deshidratata (Merck Romania), Mediu Sabouraud cu Chloramphenicol (SDA) in forma deshidratata (Merck Romania), Solutie Tampon Apa Peptonata - Clorura de Sodiu, pH=7.

Metodologia de testare a numarului total microorganisme aerobe viabile, prin metoda inocularii in profunzime, s-a desfasurat dupa cum urmeaza: **compozitia de crema cosmetica cu efect hidratant, nutritiv, reparator si calmant**, se prelucreaza in conditii aseptice, in punctul de lucru de clasa A. Pentru testarea numărului total de microorganisme aerobe viabile se iau în lucru 10 ml probă; se prepară diluția 1/10 astfel: 10 g produs sau 10 ml de produs se adaugă în 90 ml soluție tampon apă peptonată cu clorură de sodiu, pH=7 și se omogenizează; ulterior, se prepară diluții seriale (1/100, 1/1000), folosind ca solvent soluție tampon apă peptonată cu clorură de sodiu, pH=7. Câte 1 ml din diluția probei se repartizează în 2 plăci Petri sterile cu

diametrul de 90 mm și se adaugă în fiecare placă câte 15-20 ml mediu de cultură CaSoA, topit și răcit până la o temperatură de 43°C. Se acoperă fiecare placă Petri cu capacul, se rotește ușor pe o suprafață plană (în vederea omogenizării produsului cu mediul de cultură) și se lasă să se solidifice la temperatura camerei. Se termostatează plăcile (așezate cu capacul în jos) la o temperatură de 30-35°C, timp de 5 zile.

Interpretarea rezultatelor se realizează după cum urmează:

după expirarea perioadei de incubare (5 zile), se selectează (pentru fiecare diluție testată) plăcile Petri care prezintă creștere microbiană, se evaluează prin numărare coloniile microbiene, numărarea se efectuează doar pentru plăcile care prezintă creșteri microbiene de maxim 250, pentru numărul total microorganisme aerobe viabile (unități formatoare de colonii – UFC) și respectiv de maxim 50, pentru numărul total drojdii și mușcăiuri, plăcile ce nu prezintă creștere microbiană sunt eliminate.

Numărul total de microorganisme aerobe viabile este egal cu media aritmetică a numărului de UFC recuperate de pe mediul de cultură Casein Soya-Bean Digest Agar (CaSoA).

Numărul total de drojdii și mușcăiuri este egal cu media aritmetică a numărului de UFC recuperate de pe mediul de cultură Sabouraud cu Chloramphenicol (SDA); dacă sunt prezente și alte colonii de fungi, acestea sunt numărate ca parte din număr total microorganisme aerobe viabile sau drojdii și mușcăiuri.

Pentru compoziție **crema cosmetică cu efect hidratant, nutritiv, reparator și calmant**, evaluarea încărcăturii microbiene a fost următoarea: **Număr total bacterii aerobe viabile <10 UFC/g și Număr total drojdii și mușcăiuri < 10 UFC/g.**

Compoziție **crema cosmetică cu efect hidratant, nutritiv, reparator și calmant** analizată este conformă din punct de vedere al încărcăturii microbiene, prezentând valori sub cele maxime impuse de către *Pharmacopoeia europeana IX*.

### **Evaluarea eficienței biologice. Determinarea activității antimicrobiene**

Determinarea activității antimicrobiene pentru compoziție **crema cosmetică cu efect** hidratant, nutritiv, reparator și calmant, s-a realizat prin metoda difuziometrică, adaptată pentru extracte vegetale naturale, în condițiile prevăzute de *Pharmacopeia europeana X*.

Materiale și echipamente necesare: eprubete 18/180 mm sterile, plăci Petri 90 mm sterile, pahare Erlenmayer sterile, incubator cu temperatură reglabilă, 30-35°C, pentru creșterea optimă a bacteriilor, incubator cu temperatură reglabilă, 20-25°C, pentru creșterea optimă a fungilor, etalon Mc Farland, baie de apă termostată, agitator tip Vortex, monopost, cabinet biologic cu flux de aer laminar. Tulpini microbiene-test standardizate utilizate: microorganism standardizat Gram-pozitiv *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; microorganism standardizat Gram-negativ: *Escherichia coli* ATCC 8739; o specie de fungi *Candida albicans* ATCC 10231.

Conform *Pharmacopeia europeana IX* în vigoare, se utilizează următoarele medii de cultură: Mediu Casein Soya-Bean Digest Agar (CaSoA) în formă deshidratată (Merck România), Mediu Sabouraud cu Chloramphenicol (SDA) în formă deshidratată (Merck România).

Pentru activarea tulpinilor bacteriene standardizate-test, în formă sporulată sau vegetativă, se procedează astfel: activarea tulpinilor bacteriene se realizează pe mediu de cultură adecvat, mediu Casein Soya-Bean Digest Agar (CaSoA) sau pentru fungi mediu Sabouraud cu Chloramphenicol (SDA), se incubează timp de 18-24 ore, la temperatura 30-35°C și 20-25°C pentru fungi. Din culturile tinere obținute se execută suspensii stoc, 10<sup>8</sup> UFC/mL (apreciat prin comparație cu o soluție standard 0,5 Mc Farland)

Metodologia de testare a activității antimicrobiene pentru compoziție **crema cosmetică cu efect** hidratant, nutritiv, reparator și calmant, s-a desfășurat după cum urmează: mediile de cultură Casein Soya-Bean Digest Agar (CaSoA) și Sabouraud cu Chloramphenicol (SDA) se lichefiază complet la 45°C, se inoculează fiecare mediu de cultură, cu un volum de 1 mL cultură stoc din fiecare

microorganism-test standardizat ( $10^5$  UFC/mL), se pentru omogenizeaza, se repartizeaza in placi Petri sterile, un volum de 15-18 mL de mediu de cultura inoculat, se lasa in repaos pe o suprafata perfect plana, la temperatura camerei pentru solidificare completa. se utilizeaza tehnica cilindrilor de otel sterili, pentru aplicarea probelor de evaluat, se incubeaza la temperatura de 30-35°C sau 20-25°C pentru fungi, pentru 18-24 ore.

Interpretarea rezultatelor se realizeaza dupa cum urmeaza: prin masurarea exacta, cu o precizie de  $\pm 0,1$  mm, a diametrului fiecarei zone de inhibitie a cresterii microorganismelor – test se evalueaza rezultatele - zona de inhibitie:

- 0-10 mm. inactiv – notat “-”;
- 10-14 mm, activitate slabă – notat “+”;
- 15-19 mm. activitate moderată – notat “++”;
- $\geq 20$  mm, activitate certă – notat “+++”.

Pentru compozitie **crema cosmetica cu efect hidratant, nutritiv, reparator si calmant**, evaluarea activitatii antimicrobiene a fost urmatoarea: activitate antimicrobiana fata de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538: zona de inhibitie  $>20$  mm, activitate antimicrobiana **certa** (“+++”); activitate antimicrobiana fata de *Escherichia coli* ATCC 6538: zona de inhibitie **11,6** mm, activitate antimicrobiana **slaba** (“+”); activitate antimicrobiana fata de *Candida albicans* ATCC 10231: zona de inhibitie  $>17$  mm, activitate antimicrobiana **moderata** (“++”).

### Concluzii si propuneri

Avand in vedere interesul actual in plina expansiune pentru preparatele cu continut cat mai ridicat in elemente si combinatii naturale, **compozitia crema cosmetica realizata** ofera **efect hidratant, emolient, nutritiv, reparator, calmant si antimicrobian** pentru revitalizarea pielii, fiind eficienta, stabila, placuta, relativ ieftina, usor de administrat, aplicata si utilizata in conditii de siguranta.

Proprietatile terapeutice favorabile rezulta si se cumuleaza, prin adaugarea efectelor terapeutice ale uleiului de tamanu, acidului boric, urecii, impreuna cu vitamine naturale, constand in Tocopherol (*Helianthus annuus seed oil*) si coenzima Q, si a extractelor uleioase, dintr-o varietate de plante traditionale si neconventionale, constand in ulei esential de busuioc, ulei esential de cuisoare si ulei esential de seminte de morecov, stabilizate cu agent de ingrosare/emolient nanoceluloza, toate prezentand o certa eficienta si valoare, precum si importanta terapeutica, ce au fost confirmate de o multitudine de date din literatura de specialitate in domeniu.

Lucrarile efectuate asupra produsului compozitie crema cosmetica **cu efect hidratant, nutritiv, reparator si calmant**, au demonstrat urmatoarele:

- nu s-a evidentiat prezenta de germeni patogeni la analiza produsului;
- incarcatura microbiana este in limitele impuse de *Pharmac. Europeana* pentru preparate topice;
- s-a evidentiat o actiune antibacteriana certa, manifestata fata de *Staphylococcus aureus*;
- s-a evidentiat o actiune antimicotica moderata, manifestata fata de *Candida albicans*.

Crema conform inventiei, pe baza de **celuloza bacteriana, ulei de tamanu, acid boric, uree, ulei esential de busuioc, ulei esential de cuisoare, tocoferol natural (vit.E), ulei esential de seminte de morcov si coenzima Q**, prin componentele active cu biodisponibilitate ridicata de origine naturala (vegetala), in urma cercetarilor efectuate s-a constatat ca, prezinta o actiune antibacteriana evidenta, cu efect hidratant, fiind totodata emolienta si nutritiva, pentru revitalizarea pielii, cu adevarat unica; aceasta pastreaza elasticitatea si integritatea pielii, avand si actiune antirid, ce impiedica formarea micilor riduri cutanate si restabilind integritatea epidermica (fiind o crema reparatorie/regeneratoare intensiva de zi-noapte, pentru toate tipurile de piele), cu hidratarea zonelor pe care este aplicata, cu efect sinergic.

## REVENDICARE

Compozitie crema cosmetica cu efect hidratant, nutritiv, reparator si calmant, **caracterizata prin aceea** ca este constituita pe baza de nanoceluloza si unele resurse naturale ecologice si ecocertificate, aceasta continand: 17 g ulei de tamanu *Calophyllum Inophyllum seed oil*, 1.5 g Emulsificator ecocertificat Cetearyl glucoside, 3 g Co-emulsificator ecocertificat Glyceryl stearate, 3 g acid boric, 2 g uree, 1 g pulbere de nanoceluloza, 0.5 g ulei esential de busuioc *Ocimum basilicum oil*, 0.5 g ulei esential de cuisoare *Eugenia caryophyllus leaf oil*, 0.2 g ulei esential de seminte de morcov *Daucus carota seed oil*, 0.4 g Tocopherol (*Helianthus annuus seed oil*), 0.6 g conservant ecocertificat de tip non-paraben, non-formaldehidă, non-isothiazolone, 1g Coenzina Q si 69.3 apa pura.