



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00357**

(22) Data de depozit: **23/06/2021**

(41) Data publicării cererii:  
**30/12/2022** BOPI nr. **12/2022**

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

(72) Inventatori:  
• **SHA'AT FAWZIA, STR.LIVIU REBREANU,  
NR.5, BL.52, SC.2, ET.3, AP.58, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **PÎRVU LUCIA CAMELIA, STR.BĂCIA  
NR.11 A, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **PĂVĂLOIU RAMONA-DANIELA,  
ALEEA BARAJULUI BICAZ NR.11B,  
BL.M32B, SC.1, ET.7, AP.86, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **HLEVCA CRISTINA, STR. LIZEANU  
NR. 19, ET. II, AP. 4, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **STARAȘ ADELA,  
STR.PRELUNGIREA BUCUREȘTI, NR.5,  
BL.C19, SC.A, ET.2, AP.3, CĂLĂRAȘI, CL,  
RO;**  
• **ALBULESCU RADU,  
STR.ROȘIA MONTANĂ NR.6, BL.7, SC.C,  
ET.2, AP.125, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO;**  
• **NIȚĂ SULTANA, STR.BĂRBAT VOIEVOD  
NR.21, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PRODUS TOPIC MULTIFUNCȚIONAL CARE SE ADRESEAZĂ  
AFECȚIUNILOR PIELII ȘI ARTICULAȚIILOR ASOCIATE  
UNOR PROCES DE TIP INFLAMATOR PE BAZĂ  
DE INGREDIENTE NATURALE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un produs topic multifuncțional pentru tratamentul afecțiunilor pielii și articulațiilor asociate unor procese de tip inflamator. Produsul, conform invenției, este constituit în procente masice din 3% amestec de extract standardizat de frunze de brusture: inflorescență de tei, respectiv, petale de magnolie, în raport 1:1, 19% ulei de sămburi din struguri, respectiv,

ulei de migdale duci, 1,5% ulei esențial de scortșoară, respectiv, vitamina E, într-o bază grasă formată din 28% lanolină, 14% ceară albă, 5% unt de cacao și 9% unt de shea.

Revendicări: 2

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).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MARCI  
Cerere de brevet de invenție  
Nr. a 20 0357  
Data depozit 23-06-2021

RO 137146 A2

24

## DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția se referă la un produs topic multifuncțional care se adresează afecțiunilor pielii și articulațiilor asociate unor procese de tip inflamator pe bază de ingrediente naturale, și la procedeul de preparare al acesteia.

Artrita este un termen folosit pentru a descrie mai mult de 100 de condiții patologice diferite ale pielii și articulațiilor, fiind o boală sistemică inflamatorie cronică caracterizată prin persistența tumefierii și redorii articulare și a distrugerii articulațiilor sinoviale conducând astfel la dizabilitate severă cu mortalitate precoce. Printre cauzele cele mai frecvente se numără: traumatismele, afecțiunile metabolice, factorii genetici (HLA clasa II -DR1 și DR4), infecțiile, factorul imun (statusul imun și autoimunitatea au rol central în apariția și în întreținerea afecțiunii). Artrita se declanșează în momentul în care sistemul imunitar atacă membrana sinovială (țesutul care căptușește cavitatea articulară). În urma acestui proces inflamator, membrana se edematiază, eliberează anumite substanțe chimice care pot distruge cartilajul, tendoanele și ligamentele, ceea ce afectează articulațiile și buna lor funcționare, dacă boala nu este detectată din timp. De asemenea, este una dintre patogenele cronice cele mai frecvente și una dintre cele mai comune cauze de handicap ale populației din întreaga lume. Incidența bolii este apreciată la 95-150 de cazuri noi anual la 100000 de locuitori. Prevalența bolii este de aproximativ 1% din caucazieni, dar variază între 0,1 % la africanii din mediul rural și 5 % pentru indieni. Astfel, această condiție patologică afectează aproximativ 8% din adulții din lumea întreagă. În geneza unui astfel de proces inflamator care afectează pielea și articulațiile, un rol esențial îl prezintă endotoxinele și unele componente de origine bacteriană care produc citokine pro-inflamatorii (TNF- $\alpha$  – factorul de necroză tumorală, IL-1b – interleukina-1b, IL-23 – interleukina-23) prin fenomenul de activare a monocitelor și macrofagelor. De asemenea, inflamația este produsă și prin calea radicalilor liberi de oxigen (ROS), azot (NOS), sau prin proteina cromozomială HMGB-1 (High Mobility Group Box-1), ultima având o concentrație crescută în artrita reumatoidă.

În momentul actual, pe piața românească, sunt prezente o gamă largă de produse topice cu rol adjuvant în tratamentul afecțiunilor de tip inflamator ale pielii și articulațiilor cum ar fi: creme, loțiuni, geluri, unguente în special pe bază de extracte vegetale.

Majoritatea acestor produse conțin substanțe chimice de sinteză, cu grad mare de agresivitate pentru piele (ex. acid salicilic, uree), agenți tensioactivi de sinteză (tween, borax,

lcool cetilic), agenți de conservare și/sau de stabilizare de tipul parabenilor, parfum. De asemenea, extractele vegetale folosite în majoritatea produselor de îngrijire a pielii nu sunt standardizate.

Din literatura de specialitate sunt prezentate următoarele brevete:

**RO130474 B1** menționează o cremă pentru tratamentul adjuvant al durerilor reumatice și refacerea mobilității musculo-articulare, conținând vitamina B1 0,200 %, apă purificată 52,147 %, alcool cetilic 3%, alcool cetostearilic 3 %, polioxietilenă de alcool cetilic 3,6 %, glicerină 3 %, ceară galbenă 3 %, vaselină albă 4,1 %, lanolină 4,9 g, ulei de măsline 2,250 %, fenoxietanol 1 %, butilhidroxianisol 0,003 %, extract apos de *Helleborus purpurascens* 1 %, tinctură de *Tamus communis* 5 %, *Symphytum officinale* 15 %.

**RO 110906 B1** descrie compoziția unui unguent cu acțiune antiinflamatoare și analgezică. Unguentul conform invenției este constituit din 20...72 părți extract ulei de Flos Arnica și Folium Betulae, 0,80...1,20 părți *Oleum Pini*, 26...50 părți bază de unguent, care este compusă din 38,50 părți ceară , 46 părți alcool cetilic, 13 părți ulei de cocos și 2,50 părți agent de emulsificare, la care se pot adăuga și 50 părți extract alcoolic de *Flos Arnicae* și *Folium Betulae*, părțile fiind exprimate în greutate.

**RO 126915 B1** se referă la o compoziție de cremă antireumatică, cu utilizare medicală și cosmetică. Produsul conține 3 % apă termală sapropelică, cu un conținut de 115416,6...118611,24 săruri totale și 76000,1...98000,5 reziduu mineral, exprimate în mg/L, având următoarele principii active: extract de *Arnica montana*, extract de scoarță de *Salix alba*, extract de rădăcină de *Harpagophytum procumbens* și ulei esențial de *Mentha piperita*, în raporturi de asociere de 10,00:2,00:0,10:0,50:0,10, înglobate în 87,30% bază de cremă.

Problema tehnică propusă spre rezolvare de către prezenta invenție constă în obținerea unui produs topic multifuncțional pe bază de ingrediente naturale 100% care se adresează afecțiunilor pielii și articulațiilor asociate unor procese de tip inflamator.

Soluția constă în asocierea principiilor active din extractul standardizat din frunze brusture:inflorescența de tei sau frunze de brusture:petale de magnolie, ulei din sâmburi de struguri, ulei de migdale dulci, și ulei esențial de scorțișoară cu o bază de cremă alcătuită din: lanolină (component majoritar), ceară albă, unt de cacao, unt de shea și vitamina E. Acest produs topic are o formula nouă, 100 % din ingrediente naturale și diferită față de alte produse similare din aceeași gamă existente pe piața românească.

Produsul topic multifuncțional cu efect adjuvant în tratamentul afecțiunilor pielii și articulațiilor asociate unor procese de tip inflamator conform invenției este constituită din: 28 % lanolină, 14 % ceară albă, 5 % unt de cacao, 9 % unt de shea, 3 % amestec de extract standardizat de frunze de brusture (*Arctium lappa*):inflorescența de tei (*Tiliae flos*) de 1:1 (m/m) sau 3 % amestec de extract standardizat de frunze de brusture (*Arctium lappa*):petale de magnolie (*Magnolia virginiana*) de 1:1 (m/m), 19 % ulei din sâmburi de struguri (*Vitis vinifera*), 19 % ulei de migdale dulci (*Prunus amygdalus dulcis*), 1,5 % ulei esențial de scorțișoară (*Cinnamomum zeylanicum*) și 1,5 % vitamina E, procentele fiind masice.

Produsul topic multifuncțional cu efect adjuvant în tratamentul afecțiunilor pielii și articulațiilor asociate unor procese de tip inflamator, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

- datorită asocierii și sinergismului de principii active produsul are efecte terapeutice complementare: reducerea inflamațiilor dureroase ale sistemului osteo/muscular;
- valorifică trei specii vegetale, ca extracte standardizate din: brusture (*Arctium lappa*), inflorescența de tei (*Tiliae sp.*) și petale de magnolie (*Magnolia virginiana*);
- extractele alese ca ingrediente active prezintă o compoziție chimică și proprietăți fitoterapeutice (efect calmant, antiedematos, decongestionant) care asigură și susțin calitatea și eficiența foarte bună a produsului;
- prezintă proprietăți citoprotectoare, hidratante și emoliente la nivelul celulelor epiteliale;
- nu conține coloranți, parfum, emulgatori;
- este ușor de aplicat, prezintă o bună stabilitate și aderență pe piele, este omogen și are un miros plăcut specific de plante.

Sunt prezentate în continuare două exemple de realizare a invenției.

Exemplu de realizare 1. Produsul topic multifuncțional cu efect adjuvant în tratamentul afecțiunilor pielii și articulațiilor asociate unor procese de tip inflamator conform invenției este constituit din următoarele componente: lanolină, ceară albă, unt de cacao, unt de shea, extract standardizat de frunze de brusture (*Arctium lappa*), extract standardizat de inflorescența de tei (*Tiliae flos*), ulei din sâmburi de struguri (*Vitis vinifera*), ulei de migdale dulci (*Prunus amygdalus dulcis*), ulei esențial de scorțișoară (*Cinnamomum zeylanicum*) și vitamina E. Procedeu de obținere: Se cântăresc 12 g lanolină, 6 g ceară albă, 2,2g unt de cacao, 3,8 g unt de shea pentru prepararea bazei grase. Ingredientele se încălzesc pe baie de apă la o temperatură de 60-70°C, amestecul se răcește până la temperatura de 30°C, după care se

adaugă sub agitare continuă uleiurile grase (8,1 g ulei din sâmburi de struguri, 8,1 g ulei de migdale dulci), și amestecul de extracte standardizate în raport masic de 1:1 de frunze de brusture și inflorescența de tei (0,6 g extract standardizat din frunze de brusture și 0,6 g extract standardizat din inflorescența de tei). În amestecul omogen rezultat se adaugă uleiul esențial (1,5 g ulei de scorțișoară) și 1,5 g vitamina E. Produsul final prezintă o textură semisolidă și culoare galben pai.

Exemplu de realizare 2. Se înlocuiește amestecul de extracte standardizate cu un alt amestec format din extract standardizat de frunze de brusture (0,6 g) și extract standardizat de petale de magnolie (0,6 g) în raport masic de 1:1.

Invenția este prezentată pe larg în continuare.

Extractul din frunzele de brusture (*Arctium lappa*, fam. Asteraceae) prezintă un conținut mare de acizi scafeol-chinici, derivați de quercetină și luteolină, și principii amare sesquiterpenice cu structură germacranică (arctiopicrina), complexul natural asigurând proprietăți antioxidante, antiinflamatoare, antiseptice, puternic emoliente, regeneratoare și hidratante. Extractul din frunzele de brusture este foarte bine cunoscut pentru activitatea antioxidantă datorită compoziției bogate în polifenoli (derivați de acid cafeol-quinic, quercetin, kaempferol), care conduc la efecte antiinflamatoare, anti-edematoase și regeneratoare la nivelul pielii, fiind utilizat ca adjuvant în medicina naturistă în scheme de tratament pentru artrită. Combinația existentă în extractul din frunze de brusture dintre polifenoli și anumiți compuși din clasa lignanilor, precum arctigenin, arctiin stimulează procesul de regenerare a celulelor și a țesuturilor, oferă proprietăți antimicrobiene împotriva unor tulpini bacteriene (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*). De asemenea, studiile din literatura de specialitate au demonstrat eficacitatea extractului din frunze de brusture și asupra virusului influenza A (A/NWS/33, H1N1) (IFV), virusului herpetic (HSV-1, HSV-2), adenovirusului (ADV-3, ADV-11), și virusului imunodeficienței umane (HIV-1). În contextul fiziopatologiei afecțiunilor inflamatorii de tip artrită, studiile efectuate *in vitro* pe linii celulare umane și de șoarece a extractelor din brusture au relevat că acestea au potențial de a modula exprimarea, transportul membranal și respectiv de a inhiba activitatea proteinei pro-inflamatoare HMGB.

Extractul de brusture (extractul standardizat în glicerină 50% din frunze de brusture de o concentrație de 5 mg GAE/mL) a fost obținut și caracterizat în cadrul INCDCF-ICCF București.

Extractul din petale de magnolie (*Magnolia virginiana*) conține o serie de compuși chimici cu o structură complexă, dintre lignani, neolignani, terpenoide, alcaloizi, acizi polifenolici (acid siringic), cei mai studiați fiind neolignanii, precum magnolol, honokiol și obovatol, cu efect antiinflamator și antinociceptiv. Studiile științifice au demonstrat că acidul siringic și derivații săi pot avea rol de imunomodulatori în procesele alergice și un moderat efect antiinflamator. Se cunoaște faptul că macrofagele joacă un rol crucial în răspunsul imun non-specific, iar activarea acestora de către o lipopolizaharidă specifică (LPS) conduce la sinteza citokinelor pro-inflamatorii (IL-1, TNF- $\alpha$  și IL-6), prostaglandine și oxid nitric (NO). Siringina și derivații săi din extractul de magnolie inhibă producerea NO, prostaglandinei PGE<sub>2</sub> mediate de către LPS, conform unor studii *in vivo* efectuate pe șoareci de tip ICR și Sprague-Dowley. De asemenea, extractul de magnolie conține și: linalool, alfa-terpineol, beta-pinen, geraniol, 1,8-cineol care conferă preparatului proprietăți antioxidante, stimulând în același timp producerea de proteine care asigură elasticitatea pielii (colagen, decorina și fibrina).

Extractul de magnolie (extractul standardizat în glicerină 50% din petale de magnolie de concentrație de 2,5 mg GAE/mL) a fost obținut și caracterizat în cadrul INCDCF-ICCF București.

Extractul din inflorescența de tei (*Tilia sp.*, fam. Malvaceae) prezintă o serie de polifenoli și flavonozide derivând de la cvercetol și kaempferol: cvercetol-3-gluco-7-ramnozidă, cvercetol-3-glucozidă, numită și izocvercetrozidă, cvercetol-3-ramnozidă, numită și cvercetrozidă, cvercetol-ramnoxilozidă, kaempferol-3-gluco-7-ramnozidă, kaempferol-3,7-diramnozidă (kaemferitrozidă), kaempferol-3-glucozidă (astragalină), kaempferol-3-ramnozidă, tilirozidă (un derivat de p-coumaric și astragalină). De asemenea, inflorescența de tei conține taninuri galice și catehice (acid protocatehic și elagic), cantități reduse de fraxozidă și esculozidă, o saponină nehemolitică care este un corp triterpenic identic cu taraxerolul, denumit tiliadina. Complexul de principii vegetale conferă preparatului proprietăți antioxidante, datorită prezenței în structurile compușilor a grupărilor hidroxil care neutralizează speciile reactive de oxigen (ROS), implicate în procesele oxidative inflamatorii.

Extractul de tei (extractul standardizat în glicerină 50% din inflorescența de tei de concentrație de 5 mg GAE/mL) a fost obținut și caracterizat în cadrul INCDCF-ICCF București.

Uleiul din sâmburi de struguri (*Vitis vinifera*, fam. Vitaceae), presat la rece, prezintă un conținut mare de acizi grași nesaturați: linoleic, linolenic, oleic și acizi grași saturați: palmitic, stearic, substanțe minerale, precum seleniu, cupru, zinc, vitamina E, vitamina F, protianidine cu efect antioxidant, revigorant, tonic și hidratant la nivelul pielii, menținând elasticitatea celulelor epiteliale în parametri optimi.

Uleiul de migdale dulci (*Prunus amygdalusdulcis*, fam. Rosaceae), prin compoziția bogată în acizi grași saturați, mononesaturați și polinesaturați contribuie la limitarea deshidratării pielii, pe care o hrănește până în profunzime, ajungând în derm. Conținutul de vitamine C, D, E, minerale esențiale: magneziu și calciu asigură protecție pielii împotriva agenților toxici și contribuie la regenerarea lipidelor din epidermă, facilitând astfel coeziunea celulelor epiteliale și stopând procesul de îmbătrânire a pielii, prezentând acțiune antiinflamatoare, antioxidantă, cicatrizantă, hidratantă și hrănitore pentru pielea uscată și fragilă.

Ulei de scorțișoară (*Cinnamomum zeylanicum*, fam. Lauraceae) conține compuși de natură terpenică:  $\alpha$  și  $\beta$ -pinen, felandren, p-cimen, linalol, terpineol, camfor (în unele cazuri ajunge la 14%) și cariofilen; compuși cu nucleu benzeic: aldehida cinamică (65-75%), eugenol (4-10%), acetat de eugenil, acetat de cinamil (aprox. 3% în uleiul de Ceylon), alcool cinamic, benzaldehidă, benzoat de benzil, aldehidă hidroxicinamică și aldehidă cuminică; compuși de altă natură: metil-n-amil, cetonă, acizi: benzoic, cinamic, salilic și cumarină. Prin conținutul său de compuși organici, uleiul de scorțișoară are un efect revulsiv la nivelul pielii, precum și un efect antimicrobian pe diferite tulpini de microorganisme, precum *Vibrio cholerae*, *Shigella*, bacterii gram-negative (*Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa*), bacterii gram-pozitive (*Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* și *Staphylococcus aureus*). De asemenea, studiile din literatura de specialitate au arătat faptul că uleiul esențial de scorțișoară prezintă activitate fungicidă pe *Aspergillus niger* și *Rhizopus oligosporous*.

Lanolina este o substanță ceroasă, anhidră, obținută prin extracție după prelucrarea lânii de oaie, folosită într-o gamă vastă de produse cosmetice, în special pentru îngrijirea pielii, și farmaceutice. Aceasta este ușor absorbită în piele, reduce pierderea transepidermică a apei și are un rol emolient, protector și reparator asupra pielii. Obținerea cremei include utilizarea unei lanoline purificate, de uz farmaceutic obținute în cadrul INCDCF-ICCF București.

Ceara albă este un ingredient natural foarte utilizat la prepararea produselor cosmetice și dermatocosmetice deoarece conferă consistență și stabilitate compozițiilor, are rol emolient, calmant și ajută la menținerea unui nivel optim de hidratare a pielii.

Untul de cacao are efect hidratant, calmant, stimulează producția de collagen, fapt ce duce la estomparea ridurilor, cât și la prevenirea lor și ajută la tratarea și estomparea cicatricilor.

Untul de shea este antiinflamator, antibacterian, regenerat cutanat, epitelizant, facilitează cicatrizarea și calmează iritațiile, protejează pielea de factorii externi, are rol hranitor și menține nivelul optim de hidratare al pielii.

Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) are efect antioxidant, conducând la o mare stabilitate a produselor topice. De asemenea, crește gradul de hidratare și elasticitate a pielii, motiv pentru care este inclusă în foarte multe creme și produse cosmetice.

Asocierea și sinergismul de principii active din extractele de brusture, magnolie, tei, uleiuri esențiale și uleiuri grase, precum și ingredientele constituente bazei de cremă conferă produsului final efecte terapeutice complementare: revulsiv, antiinflamator, hidratant, emolient și regenerat asupra afecțiunilor pielii și articulațiilor asociate unor procese de tip inflamator .

### TESTĂRI FIZICO-CHIMICE

Produsul topic multifuncțional a fost caracterizat din punct de vedere organoleptic și fizico-chimic. Proprietățile produsului topic multifuncțional sunt prezentate în Tabelul 1.

**Tabelul 1. Proprietățile produsului topic multifuncțional**

Nr. crt.	Caracteristici	Rezultate și observații
1.	Aspect	Cremă omogenă fără separare de faze
2.	Culoare	Galben pai
3.	Miros	Caracteristic aromat de plante, plăcut
4.	pH (la 25 <sup>0</sup> C )	5-5,5
5.	Stabilitatea produsului topic multifuncțional la 35 <sup>0</sup> C, minim 8h	Stabil



## TESTĂRI FARMACOLOGICE

### A. TESTAREA IRITABILITĂȚII/ COROZIVITĂȚII DERMALE A COMPONENTULUI MAJORITAR AL PRODUSULUI TOPIC MULTIFUNCȚIONAL (LANOLINĂ)

Testarea s-a efectuat pentru lanolina anhidră farmaceutică. S-a lucrat în conformitate cu protocolul de testare al kiturilor *in vitro* produse de compania Mattek (Protocol: In Vitro EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT)). Toate materialele, respectiv piesele de derm reconstituit, mediile de cultură și consumabilele de lucru au fost furnizate de Mattek (Bratislava, Slovacia). Probele de lanolină (lanolina control și lanolina-INCD CF-ICCF) au fost solubilizate în etanol absolut, după care s-au realizat diluții 1/10 în mediu DMEM-F12. Piesele de țesut reconstituit au fost plasate în plăci cu 6 godeuri și, după o precultivare de 24 de ore în mediu DMEM-F12 cu 10% ser fetal, în incubator umidificat 5% dioxid de carbon, s-a procedat la transferul lor în plăci noi, s-a adăugat mediu proaspăt. S-a procedat la adăugarea soluției de probă, pe suprafața liberă a implanturilor. S-au plasat plăcile în incubator, iar după o incubare de 2 ore, s-a procedat la spălarea pieselor cu TPS, apoi s-a aplicat reactivul MTT, iar după 3 ore s-au extras formazanii formați, s-au transferat pe o placă cu 96 de godeuri și efectuat citirea viabilității probelor de țesut expuse utilizând un cititor de microplăci Chameleon II ( LabLogic, UK). Rezultatele sunt redată în tabelul 2.

**Tabelul 2. Rezultatele testului de iritabilitate/corozivitate dermală**

Produsul	Media DO	STDEV	p <sup>3</sup>	Viabilitate relativă
PBS* <sup>1</sup>	1,898	0,2896	-	100%
SDS <sup>2</sup>	0,033	0,0166	-	0
Lanolina - control*	1,652	0,3782	0,042	87,03%
Lanolina ICCF*	1,546	0,416	0,039	81,45%

\*Media a trei replicare independente

<sup>1</sup> martor negativ; <sup>2</sup> martor pozitiv; <sup>3</sup> s-a utilizat testul t student.

În conformitate cu criteriile de clasificare, se trage concluzia că produsele “Lanolina farmaceutică” și “Lanolina - INCD CF-ICCF” sunt neiritante (NI), și, în concluzie, pot fi utilizate în condiții de siguranță, în formulări destinate domeniului medical și cosmetic.

## B. STABILIREA VIABILITĂȚII/PROLIFERĂRII CELULARE ȘI A POTENȚIALULUI CITOTOXIC A COMPONENTELOR PRODUSULUI TOPIC MULTIFUNCȚIONAL (EXTRACTE VEGETALE)

Experimentele au fost derulate pe linia celulară L929 (ATCC CRL-6364), linia de fibroblaste murine. Realizarea culturilor celulare a avut loc în mediu complet de cultură Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) ajustat cu 10% ser fetal cabalin, 1% ser fetal bovin, soluție penicilină/streptomycină/neomicină în 0,9% NaCl (10.000 μg/mL/10.000 U/mL). La atingerea unei confluente de 75% (aproximativ 48 de ore de cultivare), culturile au fost recoltate prin tratament cu tripsină – EDTA (2 mL/flacon) pentru desprinderea monostratului de celule, după care s-a neutralizat tripsina cu ser fetal bovin (2 mL/flacon), iar celulele au fost omogenizate prin pipetare ușoară. Suspensia de celule a fost apoi recoltată în tuburi de centrifugă de 15 mL și s-au sedimentat celulele prin centrifugare la 1200 rpm timp de 10 minute. Celulele au fost apoi resuspendate în mediu de cultură și au fost ajustate la 106 celule/mL. S-au inoculat plăci cu 96 de godeuri, la o densitate de 8.000 celule / godeu. După 24 de ore, s-a înlocuit mediul de cultură cu mediu proaspăt (180 μL/godeu). În continuare celulele au fost incubate în prezența probelor prezentate mai sus, timp de 24 de ore la 37°C în atmosferă cu 5% CO<sub>2</sub>, la concentrații de 100μg/mL, 50μg/mL, 25 μg/mL, 10 μg/mL și 5 μg/mL mediu, după care a fost determinată viabilitatea celulară printr-o metodă colorimetrică cu ajutorul kitului CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, USA).

După cele 24 de ore de expunere la concentrațiile de substanțe de mai sus, s-a procedat la înlocuirea mediului cu câte 100 microL reactiv MTS, diluat 1:10 cu mediu proaspăt. Celulele s-au incubat timp de 3 ore la întuneric în incubator cu 5% CO<sub>2</sub>, apoi s-au măsurat densitățile optice la 490 nm, cu ajutorul unui Microplate Reader (Chameleon V Plate Reader, LKB Instruments).

Densitățile optice s-au înregistrat și s-au raportat la valorile probelor de control, considerate a fi valorile maxime ale viabilităților celulare.

Toate probele/controalele au fost lucrate în triplicat.

În urma experimentelor desfășurate pe linia de fibroblaste murine L929, având în vedere nivelele dozelor utilizate, extractele vegetale (*Tilia sp.* și *Arctium lappa*) sunt practic lipsite de citotoxicitate. S-au observat efecte citotoxice doar în cazul extractului vegetal de *Magnolia virginiana*, la concentrații mai mari de 25 microG EAG/mL. Valoarea IC<sub>50</sub> pentru

extractul vegetal de *Magnolia virginiana* de 61,26 microG/mL GAE, doză dificil de realizat *in vivo*, indică faptul că poate fi utilizat în deplină siguranță doze terapeutice.

Rezultatele conduc la concluzia că toate extractele testate, conform invenției, sunt fie lipsite de toxicitate, fie au o citototoxicitate foarte slabă și se pot utiliza fără riscuri ca ingrediente pentru produsele dermatocosmetice.

### C. DETERMINAREA ÎNCĂRCĂTURII MICROBIENE A PRODUSULUI TOPIC MULTIFUNCȚIONAL

În scopul evaluării încărcăturii microbiene pe care o pot avea produsele, s-a utilizat metoda de testare număr total microorganisme aerobe viabile a probelor: produsul topic multifuncțional cu amestec de extracte standardizate din frunze de brusture și inflorescență de tei (1:1 m/m), produsul topic multifuncțional cu amestec de extracte standardizate din frunze de brusture și petale de magnolie (1:1 m/m), în condițiile prevăzute de Farmacopeea Europeană 5.

**Tabelul 3. Rezultatele determinării încărcăturii microbiene**

Proba	Caracteristici	Condiții de admisibilitate	Rezultate
Produsul topic multifuncțional cu amestec de extracte standardizate din frunze de brusture și inflorescență de tei (1:1 m/m)	Număr total microorganisme viabile: bacterii aerobe, drojdii și mucegaiuri (UFC/g)	Maxim $10^2$ UFC/g	< 10 UFC/g
Produsul topic multifuncțional cu amestec de extracte standardizate din frunze de brusture și petale de magnolie (1:1 m/m)	Număr total microorganisme viabile: bacterii aerobe, drojdii și mucegaiuri (UFC/g)	Maxim $10^2$ UFC/g	< 10 UFC/g

Produsul topic multifuncțional cu amestec de extracte standardizate din frunze de brusture și inflorescență de tei (1:1 m/m) și produsul topic multifuncțional cu amestec de extracte standardizate din frunze de brusture și petale de magnolie (1:1 m/m) sunt conforme din punct de vedere al încărcăturii microbiene, prezentând valori sub cele maximale impuse de către Farmacopeea Europeană 5.

## REVENDICĂRI

1. Produsul topic multifuncțional care se adresează afecțiunilor pielii și articulațiilor asociate unor procese de tip inflamator, caracterizat prin aceea că are în compoziție: 28 % lanolină, 14 % ceară albă, 5 % unt de cacao, 9 % unt de shea, 3 % amestec de extract standardizat de frunze de brusture (*Arctium lappa*):inflorescența de tei (*Tiliae sp.*) în raport de 1:1 (m/m) sau 3 % amestec de extract standardizat de frunze de brusture (*Arctium lappa*):petale de magnolie (*Magnolia virginiana*) în raport de 1:1 (m/m), 19 % ulei din sămburi de struguri (*Vitis vinifera*), 19 % ulei de migdale dulci (*Prunus amygdalus dulcis*), 1,5 % ulei esențial de scorțișoară (*Cinnamomum zeylanicum*) și 1,5 % vitamina E, procentele fiind masice.
2. Procedeul de obținere a produsului topic multifuncțional conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că în baza grasă de cremă preparată pe baie de apă la o temperatură de 60-70<sup>0</sup>C, și ulterior răcită până la temperatura de 30<sup>0</sup>C, se adaugă uleiurile grase și extractul sub agitare continuă, până la obținerea unui amestec omogen în care se adaugă uleiul esențial și vitamina E, produsul final având o culoare galben pai și o textură semisolidă.