

ANTECEDENTES

5 Casi todas las lesiones en la piel y la mucosa, sean de origen bacteriano, viral, inmunológico o traumático, implican daño celular y su curación está relacionada directamente con la sustitución de las células dañadas. Para crecer, las células necesitan un ambiente hidratado y limpio, libre de patógenos,
10 libre de sustancias químicas y libre de proteínas residuales y de enzimas proteolíticas. En estas condiciones, las células madre secretan una matriz celular compuesta por partículas de colágeno, elastina, laminina, fibronectina y otras proteínas en libertad, que forman un cojín para la fijación de las células
15 hijas. En ausencia de esta matriz, las células hija no tienen soporte sobre el que fijarse y, por tanto, no pueden crecer; en consecuencia, la lesión no puede cicatrizar.

Las lesiones tópicas en la piel y en la mucosa que implican
20 daño celular son extremadamente difíciles de curar ya que, además de contener células muertas, residuos celulares y múltiples enzimas proteolíticas que impiden el crecimiento celular y la reparación de heridas, dichas lesiones permanecen abiertas al ambiente externo y a menudo se contaminan. Esta es
25 la razón por la cual la mayoría de las heridas crónicas, como las úlceras por presión, las úlceras diabéticas o las úlceras venosas en las piernas, no se curan nunca y casi el 40 % de los pacientes mueren antes de experimentar la resolución de las heridas.

30

En la actualidad no hay ninguna sustancia o producto que tenga todas las diversas propiedades esenciales necesarias y no se

dispone de ningún tratamiento completo para las lesiones de la piel y la mucosa. Por ejemplo, en la actualidad no hay ningún tratamiento para curar las heridas crónicas. Todos los fármacos disponibles actúan como antisépticos, antibióticos para reducir el crecimiento microbiano, como hidrogeles o alginatos para mantener la herida hidratada, como analgésicos o anestésicos para reducir el dolor, como preparaciones que contienen colágeno o ácido hialurónico para suministrar uno de los componentes de la matriz celular, o consisten en piel modificada por ingeniería o injertos de piel para sustituir a la piel, pero ninguno de estos tratamientos está dirigido a limpiar la lesión y a favorecer el proceso de reparación natural de la piel o la mucosa a través de la estimulación del crecimiento celular.

15

La misma falta de tratamiento eficaz se sostiene para las infecciones virales tópicas, tales como herpes labial, herpes genital, rinosinusitis y gripe, en las que hay presentes grandes cantidades de partículas de virus libres sobre la superficie biológica infectada y siguen atacando a las nuevas células sanas con la ayuda de proteasas disponibles tópicamente. Una infección vírica a menudo está mediada por múltiples proteasas presentes sobre la superficie de la lesión. En la actualidad, no existe ningún fármaco para reducir la cantidad de partículas víricas libres o de proteasas, los principales agentes de infección. Para tratar la infección viral de garganta, el agua salada o las gárgaras con agua salada sigue considerándose uno de los mejores remedios, ya que estas soluciones osmóticamente activas forman una película hipertónica sobre la mucosa de la garganta y la resultante exudación hacia fuera de líquido hipotónico reducen la carga contaminante sobre la superficie de la garganta. Por desgracia,

30

esta película de solución hipertónica se diluye en unos minutos por acción del líquido hipotónico que está saliendo, lo que limita la eficacia de dicho tratamiento. Incrementar la concentración de sal o de otros ingredientes osmóticos no se recomienda debido a la fuerte irritación, el daño celular y el ardor de la mucosa resultantes, o porque la presencia de una sustancia química tóxica en las proximidades de las células bloquearía el crecimiento celular.

10 Por tanto, es altamente importante encontrar una sustancia capaz de satisfacer los múltiples requisitos de limpiar la superficie infectada de todos los contaminantes, tales como bacterias en flotación libres, partículas virales, células muertas, residuos celulares, proteínas muertas, 15 metaloproteasas de la matriz, factores de crecimiento, citocinas, proteasas o partículas de polvo, para proporcionar un entorno esencial para el crecimiento celular y la reparación de tejidos, sin ningún efecto tóxico sobre las células o la matriz celular.

20

El glicerol, un poliol con múltiples grupos hidroxilo, es una solución hidrofílica viscosa, transparente, segura y osmóticamente activa de origen natural o sintético. El glicerol normalmente se usa como ingrediente alimentario, conservante y 25 humectante, y entra en la composición de muchos cosméticos y productos farmacéuticos. El glicerol se usa ampliamente para aplicación tópica sobre heridas y quemaduras, a menudo como excipiente en asociación con otros principios activos. En todas estas preparaciones, el glicerol se usa como vehículo, 30 diluyente, potenciador de la viscosidad, humidificador o modulador del sabor, pero no como principio activo para tratar una patología tópica de la piel o la mucosa.

Una piel o mucosa dañados actúa como membrana semipermeable y permite que se produzca la ósmosis. El flujo de disolventes a través de una membrana semipermeable constituye el flujo osmótico u ósmosis. La presión requerida para lograr el equilibrio osmótico se conoce como presión osmótica. Cuanto mayor sea la concentración de un disolvente, más presión osmótica se ejerce. El agua dulce se considera isotónica con una densidad de 1000 kg/m^3 . El agua de mar y el glicerol tienen densidades de 1.025 kg/m^3 y 1.259 kg/m^3 , respectivamente. La presión osmótica ejercida por el glicerol es casi 10 veces mayor en comparación con el agua de mar. La concentración de solutos del glicerol es también mucho mayor en comparación con el agua de mar. Es la concentración total de soluto en una solución lo que determina el flujo osmótico de líquido, ya que la ósmosis está impulsada por diferencias en las concentraciones de soluto/disolvente que existen a través de una membrana semipermeable. La concentración total de solutos se puede determinar a través de la osmolalidad de la solución. La osmolalidad del agua de mar, que contiene 3,4 % de NaCl, 0,581 moles / kg (solutos totales / mol en peso / kg), en comparación con 10,86 moles / kg de glicerol. Esto demuestra que el glicerol puro es casi 18 veces más osmóticamente activo que el agua de mar. Por lo tanto, glicerol podría haber sido un producto de elección para la aplicación en superficies infectadas con el fin de generar flujo de salida osmótico de líquido hipotónico y para limpiar la lesión. Desafortunadamente, el líquido hipotónico exudado diluye inmediatamente el glicerol y lo drena desde la superficie de la herida en unos minutos, lo que limita estos efectos de limpieza.

30

Por tanto, existe la necesidad de un tratamiento seguro y no irritante con las múltiples propiedades de ser hidratante,

5
limpiador, antiséptico, y que también tenga actividad antibacteriana, antiviral, y anti-proteasa.

El documento WO 00/74668 divulga el uso de soluciones hipertónicas osmóticamente activas para el tratamiento de lesiones tópicas concerniente al uso de glicerol como solución viscosa para aplicación tópica para el tratamiento de úlceras o heridas superficiales, que comprende glicerol como principio activo y un extracto hidroglicerinado de *Alchemilla vulgaris* como agente estimulante del crecimiento celular. Sin embargo, el glicerol usado en el documento WO 00/74668 no es filmógeno, y por lo tanto, no puede aportar las ventajas detalladas anteriormente. El uso de glicerol solo como un agente terapéutico para limpiar el tejido infectado o dañado no es habitual, ya que, debido a la ósmosis, el fenómeno de flujo de salida de líquido hipotónico de las partes internas del tejido, el glicerol se diluye en unos pocos minutos, pierde progresivamente sus propiedades osmóticas y su actividad, y no actúa satisfactoriamente como agente de limpieza total. La película de glicerol debe permanecer en la membrana del tejido vivo semipermeable durante al menos 30 minutos para generar suficiente ósmosis para limpiar la superficie del tejido biológico.

25 La presente invención aborda el problema de cómo mejorar el tiempo de retención de la película de glicerol por una superficie biológica viva con el fin de superar las desventajas mencionadas anteriormente.

30 En segundo lugar, la crioconservación es un proceso en el que las células, los tejidos enteros o cualquier otra sustancia susceptible de sufrir daños causados por la reactividad química

o el tiempo, se conservan mediante refrigeración a temperaturas bajo cero. A temperaturas lo suficientemente bajas, cualquier actividad enzimática o química, que pudiera provocar daños al material en cuestión, se detiene con eficacia. Los procedimientos de crioconservación tratan de alcanzar temperaturas bajas sin engendrar daños adicionales causados por la formación de cristales de hielo durante la congelación. Para el almacenamiento a largo plazo de las células vivas, el crioprotector debe ser no tóxico para las células y ser capaz de prevenir la formación de cristales. Esto es particularmente importante para el almacenamiento o conservación de las células vivas y el tejido (ejemplo: Injerto de piel), ya que las probabilidades de recuperar con éxito las células o de injertar tejidos disminuyen a medida que aumenta el número de células muertas o en proceso de morir.

Actualmente, se usan como medio crioprotector DMSO (dimetilsulfóxido), suero bovino humano fetal (FCS) o humano, y glicerol para proteger las células contra las temperaturas de congelación y los daños de los cristales de agua, y, por lo tanto, minimizan la mortalidad celular. Desafortunadamente, ninguno de estos crioconservantes es capaz de conservar las células durante un largo período de tiempo, es decir, de unos meses a algunos años. Normalmente, el 30-40 % de las células muere a los pocos días y más del 50 % a los pocos meses de la crioconservación de células vivas (Bravo et al. Burns 26(4), 367-78, 2000), debido, en particular, al daño celular causado por la formación de cristales de agua.

Por tanto, existe la urgente necesidad de encontrar un crioconservador que sea capaz de formar una película fina alrededor de las células o el tejido y protegerlos de las

agresiones externas, así como de la formación de cristales de agua, con el fin de mejorar la viabilidad celular.

SUMARIO

5

Para resolver los problemas detallados anteriormente, los inventores proporcionan una preparación de glicerol que contiene taninos vegetales específicos capaces de unirse a moléculas de glicerol y, de este modo, mejorar las propiedades filmogénicas y el periodo de tiempo de retención de la preparación de glicerol en las membranas biológicas semipermeables. Este glicerol filmógeno puede usarse como un tratamiento natural y seguro para la aplicación tópica, para tratar diversas infecciones de la piel y la mucosa, y para proteger los tejidos vivos durante la crioconservación.

La presente invención, por lo tanto, se refiere a una preparación para aplicación tópica que comprende glicerol y taninos vegetales. Los taninos vegetales tienen la capacidad de unirse a glicerol, de modo que el glicerol tiene cualidades filmógenas.

En una realización, los taninos vegetales se eligen entre proantocianidinas.

25

En una realización preferida, estas proantocianidinas se obtienen de partes de una planta, o de la planta entera, seleccionándose la planta de *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium macrocarpon*, *Vitis vinifera*, saúco negro, *Camellia sinensis*, *Glycine max*, *Acacia catechu*, *Fraxinus chinensis*, *Gingko biloba*, *Ribes nigrum*, *Tenacetum parthenium*, *Salix alba*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Opuntia sp.*, *Morus alba*,

30

Rubus sp., *Quercus sp.*, *Pinus sp.*, y combinaciones de las mismas.

En una realización más preferida, la fracción de taninos rica
5 en proantocianidina se obtiene de partes de una planta, o de la planta entera, seleccionándose la planta de *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium macrocarpon*, *Vitis vinifera*, saúco negro, *Camellia sinensis*, *Ribes nigrum*, *Acacia catechu*, *Fraxinus chinensis*, *Gingko biloba*, *Glycine max*, y combinaciones de las
10 mismas.

En otra forma realización, las proantocianidinas se sintetizan en lugar de obtenerse de plantas.

15 En una forma de realización, el contenido de glicerol en la preparación está comprendido entre 30 % y 99,90 % (v / v).
En una forma realización, la preparación comprende un principio activo. El principio activo puede seleccionarse de un fármaco, un antibiótico, un antiséptico, un nutriente, un anticuerpo,
20 un factor de crecimiento o una proteína.

La presente invención trata, adicionalmente, del uso de la preparación descrita anteriormente para el tratamiento de infecciones de la piel y la mucosa.

25

La preparación descrita anteriormente puede usarse además para proteger, transportar, almacenar o congelar células, tejidos u órganos. En una forma de realización, la concentración de glicerol filmógeno en la solución final en comparación con
30 otros diluyentes presentes en la solución final, tales como, por ejemplo, FCS, medio de cultivo, y DMSO, varía entre 2 y 50 % (v / v), preferentemente entre 10 y 30 % (v / v) y más

9

preferentemente entre 15 y 20 % (v / v).

La presente invención se refiere también a un procedimiento para aumentar el tiempo de retención de una película de glicerol a través de una superficie biológica mediante la preparación de una solución de glicerol y de taninos vegetales que tienen la capacidad de unirse a moléculas de glicerol, y aplicar la solución sobre la superficie biológica.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para tratar infecciones de la piel y la mucosa, que comprende la etapa de aplicar una preparación como se ha descrito anteriormente sobre la zona afectada.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de preparación de glicerol filmógeno que comprende mezclar el glicerol o una solución de poliol con taninos vegetales que se unen al glicerol. En una forma de realización, los taninos vegetales pueden añadirse como un polvo o un líquido.

20

La mejora de las cualidades de filmógeno del glicerol con la adición de taninos y un aumento sustancial en la eficacia terapéutica de filmógeno en comparación con glicerol no filmógeno se muestra en los estudios tal como se describe en los ejemplos y en las siguientes figuras:

FIGURAS

Fig. 1: Medición de la solubilidad de glicerol solo en comparación con glicerol filmógeno mediante análisis termogravimétrico (TGA).

Fig. 2: Duración de la retención de la película del glicerol filmógeno en comparación con el glicerol normal sobre heridas por diabetes.

5 **Fig. 3:** Medición de la gravedad media de los síntomas globales de las manifestaciones de psoriasis, eccema y dermatitis (PED): Efectos del glicerol solo - Grupo control.

Fig. 4: Medición de la gravedad media de los síntomas globales
10 de las manifestaciones de psoriasis, eccema y dermatitis (PED): Efectos del glicerol filmógeno; grupo de tratamiento activo: Tratado con glicerol filmógeno VB-DERM como en las preparaciones nº 11 y 51 del ejemplo 5. Los resultados muestran que el glicerol filmógeno elimina totalmente todas las
15 partículas en libertad de citocinas estimulantes del crecimiento, interleucinas e interferones, y normaliza el crecimiento de las células de la piel"

Fig. 5: Mejora de la calidad de vida de los pacientes de PED
20 tratados con glicerol filmógeno en comparación con el glicerol normal.

Fig. 6: Efectos de los respectivos tratamientos (glicerol filmógeno en comparación con el glicerol normal) sobre la
25 gravedad global de PED.-{}-

Fig. 7: Afección de rinosinusitis global; grupo control tratado con aerosol de glicerol normal; grupo con glicerol filmógeno tratado con un aerosol de glicerol filmógeno como en el ejemplo
30 5, preparación nº 5.

Fig. 8: Antibioterapia; necesidad comparativa de usar

tratamiento antibiótico en el ¹¹ grupo control y el grupo de glicerol filmógeno.

Fig. 9: Efectos de Orosol (glicerol filmógeno) comparado con
5 el tratamiento control (glicerol solo) sobre la mucositis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere a una preparación de glicerol
10 filmógeno para aplicación tópica que comprende glicerol y taninos vegetales. Los taninos vegetales tienen la capacidad de unirse a glicerol, de modo que el glicerol tiene propiedades filmogénicas. Esta calidad filmogénica produce una mejora del tiempo de retención de la película de glicerol por una
15 superficie biológica viva. Como tal, la preparación está destinada para usar para el tratamiento de las infecciones de la piel y la mucosa.

El término glicerol filmógeno indica una solución de glicerol
20 que contiene taninos específicos, naturales o sintéticos, o fracciones de taninos, que, cuando se aplican sobre una membrana biológica viva semipermeable, forman una película que opone resistencia a las fuerzas mecánicas ejercidas sobre ella mucho mejor de lo que lo haría el glicerol normal. Cuando es
25 normal, el glicerol disponible comercialmente se aplica sobre una membrana biológica semipermeable, la naturaleza hipertónica del glicerol atrae al líquido hipotónico de las partes internas del tejido vivo, lo que hace que el glicerol se diluya rápidamente, pierda potencia osmótica y detenga su
30 actividad en 10-15 minutos después de su aplicación. Por otro lado, un glicerol filmógeno opone resistencia a la presión del flujo líquido que está saliendo ejercida sobre el mismo y se

diluye pero lentamente, por lo que conserva su potencia osmótica durante un periodo de tiempo mucho mayor que el glicerol normal, es decir de 30 minutos a unas horas en función del punto de aplicación y la presión del flujo líquido hacia fuera.

El glicerol, también conocido como glicerina, incluye, por definición, compuestos de alcohol de azúcar que contienen más de un grupo hidroxilo (OH) unido a átomos de carbono separados de un esqueleto alifático. Este grupo incluye glicoles, glicerol y pentaeritritol, y también productos tales como trimetiloletano, trimetilolpropano, 1,2,6-hexanotriol, sorbitol, inositol, xilitol y poli(alcohol vinílico). Los polioles se pueden obtener de fuentes naturales o se pueden sintetizar. Los inventores han seleccionado el poliol más usado, es decir glicerol. El glicerol es una solución de alcohol de azúcar viscoso, que atrae al líquido hipotónico presente en los tejidos más profundos subyacentes a la superficie biológica mediante ósmosis, de modo que hidrata la superficie. Por desgracia, el flujo de líquido hipotónico de salida generado de este modo diluye el glicerol y disminuye progresivamente este efecto en unos minutos. La exudación hacia fuera del líquido hipotónico y, en consecuencia, los efectos de limpieza del glicerol, solo duran un periodo de 5 a 20 minutos y se necesitan aplicaciones frecuentes, lo que no es práctico. Esta es la razón por la cual, a pesar de ser un buen agente osmótico, el glicerol solo se usa como humectante y no como fármaco adecuado para el tratamiento de lesiones tópicas. El glicerol filmógeno significa un glicerol líquido viscoso que forma una película fina no plastificante, flexible, semipermeable y osmóticamente activa capaz de atraer al líquido hipotónico de las superficies biológicas vivas sobre las que

se aplica y capaz de poner mejor resistencia a la disgregación o a la solubilidad en agua en comparación con el glicerol estándar.

- 5 Los taninos comprenden compuestos polifenólicos astringentes naturales que contienen suficiente hidroxilo y otros grupos adecuados, como carboxilos, para formar complejos fuertes con proteínas y otras diversas macromoléculas, tales como azúcares. Los taninos pueden ser de origen natural, tales como taninos
- 10 vegetales, o sintético. Siendo moléculas grandes y altamente ramificadas, los taninos monoméricos, diméricos y poliméricos tienen más probabilidades de unirse con azúcares adyacentes u otras moléculas en comparación con las flaconas pequeñas y simples. La presencia de grupos hidroxilo en los taninos
- 15 permite la formación de reticulaciones estables con macromoléculas, tales como polioles, y esta reticulación ayuda a mejorar la resistencia mecánica de la película de poliol (glicerol). Dados los múltiples efectos tóxicos de los polímeros sintéticos citados en la literatura, los inventores
- 20 han postulado que los taninos vegetales, que tienen una fuerte afinidad de unión a las proteínas pero también igual a otras macromoléculas, tales como polisacáridos, hidratos de carbono y azúcares, pueden, cuando se añaden a los polioles, mejorar las propiedades filmogénicas del poliol, por ejemplo glicerol.
- 25 Los taninos constituyen una solución excelente como: (1) los taninos son moléculas inertes y no tienen interacciones con estructuras celulares; (2) los taninos no son tóxicos y no irritantes cuando se aplican sobre un tejido vivo; (3) los taninos son moléculas muy grandes y no pueden entrar en las
- 30 células; y (4) los taninos se pueden incorporar en el glicerol para formar una solución homogénea.

En general, los taninos se clasifican en dos grupos amplios: taninos hidrolizables y condensados. Como el nombre indica, los taninos hidrolizables son hidrolizados rápidamente por ácidos o enzimas y los productos de esta hidrólisis son ácido gálico o ácido elágico. Tras la destilación en seco, el ácido gálico y otros componentes se convierten en pirogalol. Los taninos condensados son mucho más resistentes a la hidrólisis. Están formados por pigmentos flavonoides. En presencia de ácidos minerales o enzimas, se descomponen en flobafenos de color rojo que son insolubles en agua. Las proantocianidinas (PCD) son polímeros fenólicos condensados que contienen unidades de flavan-3-ol unidas entre sí a través de enlaces de C4-C6 o C4-C8. La variación estructural de las proantocianidinas oscila desde dímeros y trímeros a oligómeros y polímeros más complejos en función del número de enlaces de catequina, hidroxilación y estereoquímica en los tres centros quirales (carbonos 2, 3 y 4) del anillo C que no es susceptible a la escisión mediante hidrólisis. Los inventores han observado que las proantocianidinas (PCD) formadas a partir de 2 a 5 moléculas de catequina o epicatequina son especialmente adecuadas para la unión macromolecular.

En una forma de realización de la presente invención, los taninos vegetales se eligen de proantocianidinas o procianidinas (PCD).

En una realización preferida, estas proantocianidinas se obtienen de partes de una planta, o de la planta entera, seleccionándose la planta de *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium macrocarpon*, *Vitis vinifera*, saúco negro, *Camellia sinensis*, *Glycine max*, *Acacia catechu*, *Fraxinus chinensis*, *Gingko biloba*, *Ribes nigrum*, *Tenacetum parthenium*, *Salix alba*, *Salvia*

officinalis, *Rosmarinus officinalis*, *Opuntia sp.*, *Morus alba*, *Rubus sp.*, *Quercus sp.*, *Pinus sp.*, *Rheum emodi* y combinaciones de las mismas.

- 5 En otra forma realización, las proantocianidinas se sintetizan en lugar de obtenerse de plantas.

Los inventores han descubierto a través de sus estudios (véase el ejemplo 3. Estudios farmacológicos) que determinadas PCD o
 10 sus combinaciones) son muy filmogénicas, lo que significa que aumentan la duración de la retención de la película de glicerol entre 200 y 300 % en comparación con el glicerol solo. Estas combinaciones consisten preferentemente en: *Vaccinium myrtillus* (extracto del fruto) + *Vaccinium macrocarpon*
 15 (extracto del fruto); *Vitis vinifera* (extracto de la semilla) + *Saúco negro* (extracto del fruto); *Camellia sinensis* (extracto de la hoja) + *V. myrtillus*; *V. myrtillus* + *s. negro*; *C. sinensis* + *V. vinifera* + *s. negro*; *V. Vinifera* + *s. negro* + *Glycine max* (extracto de la semilla); *V. macrocarpon* + *C. sinensis* + *V.*
 20 *vinifera*; y *V. macrocarpon* + *C. sinensis* + *V. myrtillus* + *V. vinifera*.

En comparación, se ha encontrado que las siguientes combinaciones de extractos de plantas ricos en taninos tienen
 25 altas cualidades filmogénicas, lo que significa que aumentan la duración de la retención de la película entre 100 y 200 % en comparación con el glicerol solo. *Acacia catechu* + *Fraxinus chinensis* (corteza y la planta entera); *F. chinensis* + *Salvia officinalis* + *G. biloba*; *Rosmarinus officinalis* + *Ribes nigrum*;
 30 *Gingko biloba* (raíces) + polímeros sintéticos.

Además, se ha especificado que otro grupo tiene cualidades

moderadamente filmogénicas, lo que significa que aumentan la duración de la retención de la película entre 20 y 99 % en comparación con el glicerol solo: *Morus alba* (frutos) + *Rubus sp.* (frutos); *Quercus sp.* (frutos, corteza)+ *Pinus sp.* (corteza, fruto). *Tenacetum parthenium* (flores y hojas) + *Salix alba* (la planta entera); *Rheum emodi*+ *Opuntia Sp.* (frutos) + *Pinus sp* (corteza).

Estas combinaciones son intercambiables.

10

Es bien sabido que los polioles y los polímeros contienen suficientes moléculas de oxígeno libre para formar fuertes enlaces de hidrógeno con el grupo hidroxilo de los compuestos fenólicos. Se han realizado muchos estudios con polímeros sintéticos o naturales, hidrosolubles o insolubles en agua, purificados o brutos, para investigar la biodisponibilidad y digestibilidad de los taninos vegetales, para preparar polímeros y plásticos sintéticos, para mejorar la viscosidad o rigidez de los materiales o para cuantificar los taninos, pero el uso de taninos o polímeros para mejorar las propiedades filmogénicas del glicerol para aplicación tópica para tratar las lesiones en la piel o la mucosa nunca se ha estudiado.

Debe entenderse que la presente invención no se refiere al uso de glicerol como plastificante o al uso de glicerol como humectante en la piel. La adición de taninos en el glicerol no cambia la viscosidad del glicerol o la película del glicerol en la membrana biológica, pero potencia la adherencia del glicerol a la membrana biológica viva.

30

El objetivo de la investigación realizada por los inventores era identificar taninos vegetales, en particular la fracción

de procianidina (PCD) de los taninos vegetales, que se puede unir a las moléculas de glicerol para formar una película de glicerol resistente mecánicamente capaz de permanecer intacta sobre la membrana biológica durante la exudación del líquido hipotónico. Siendo la finalidad implementar esta película hipertónica, óptimamente bioadhesiva, osmóticamente activa y segura como tratamiento eficaz para limpiar lesiones, eliminar contaminantes de la lesión, mantener la lesión hidratada, proteger la matriz celular y preparar un terreno favorable para el crecimiento celular en un ambiente no tóxico y libre de sustancias químicas.

Los inventores han identificado taninos vegetales específicos de unión a glicerol capaces de mejorar la resistencia mecánica de la película de glicerol y, de este modo, mantener la película intacta sobre células vivas durante un período de tiempo mucho más largo en comparación con el glicerol solo. Esta mayor duración de la retención del glicerol filmógeno sobre una superficie de o mucosa dañada hidrata de manera eficaz y limpia la superficie biológica, además de eliminar todos los contaminantes que flotan libremente presentes en la superficie. La ausencia de contaminantes y un medio ambiente limpio y húmedo aceleran la curación del tejido dañado. La película de glicerol protege igualmente la superficie dañada de las agresiones externas.

El glicerol también se usa como crioprotector, mientras congela las células y los tejidos a bajas temperaturas (de -70 a -196 °C). Los grupos hidroxilo de glicerol interaccionan con H₂O y bloquean las propiedades de formación de cristales de agua. La organización molecular del H₂O se modifica, lo que conduce a una menor formación de cristales de agua durante la

congelación y a pocos daños celulares. Generalmente, el glicerol se usa hasta una concentración entre 5 y 20 % junto con DMSO (1-5 %), suero (10-20 %) y medio de cultivo para congelar las células y los tejidos vivos. El DMSO convierte en porosa a la membrana celular, que protege a las células de los daños durante la descongelación mientras que el glicerol protege a las estructuras de membrana y mantiene la naturaleza de las proteínas internas. A una concentración superior al 20 %, el glicerol se convierte en demasiado hipertónico y daña a las células debido a sus efectos osmóticos. Desafortunadamente, la supervivencia celular con estos crioprotectores rara vez supera el 60 %, lo que lleva a un mal injerto de los tejidos almacenados. No se ha observado que concentraciones más altas de cualquiera de estos ingredientes mejoren la supervivencia celular. La mala tasa de supervivencia celular se debe al hecho de que a pesar de las altas concentraciones de moléculas de glicerol presentes alrededor de las membranas de las células vivas, la deshidratación celular durante la congelación libera un gran número de moléculas de H_2O en la superficie de la membrana. Esta agua queda atrapada por el glicerol, pero como el glicerol no está presente como película, algunas moléculas de agua cristalizan. Cristales de agua aumentan aún más la distancia entre las moléculas de glicerol libres y la membrana celular, lo que fomenta aún más la formación de cristales de agua y el consiguiente daño celular. Incluso después de considerables esfuerzos para encontrar un crioprotector filmógeno capaz de proteger la superficie de la célula completa y atrapar todas las moléculas de agua que se difunden desde el interior de la célula, todavía no se ha descubierto un crioprotector filmógeno seguro.

Los inventores han descubierto que un glicerol filmógeno que

queda en estrecho contacto con las membranas celulares puede conservar mejor las células vivas en comparación con el glicerol solo. Por tanto, la preparación descrita anteriormente puede usarse además para proteger, transportar, almacenar o
5 congelar células, tejidos u órganos. En una forma de realización, la concentración neta del glicerol filmógeno en la muestra varía entre 2 y 50 % (v / v), preferentemente entre 10 y 30 % (v / v) y en particular entre 15 y 20 % (v/v). Por lo tanto, el glicerol filmógeno constituye una excelente
10 solución para superar esta dificultad y para evitar los daños por los cristales de agua a las células.

En una forma de realización de la presente invención, el contenido de glicerol en la preparación está comprendido entre
15 30 % y 99,90 % (v / v). El % de glicerol en la preparación para la aplicación tópica puede variar de acuerdo con la parte del cuerpo en la que se aplica el producto, por ejemplo un producto más espeso para su aplicación en las heridas crónicas abiertas, un producto menos espeso para su aplicación en la cavidad
20 vaginal o una preparación mucho más fina para su aplicación en la cavidad oral o nasal. El porcentaje de glicerol en la preparación puede variar entre 30 y 99,90 % (v / v), por ejemplo entre 90 y 99 % (v / v) para la aplicación vaginal, entre 70 y 99,9 % (v / v) para la aplicación sobre heridas de la piel,
25 entre 30 y 60 % (v / v) para la aplicación sobre la mucosa sensible tal como la mucosa nasal.

En otra forma realización, la preparación comprende adicionalmente un principio activo. El principio activo puede
30 seleccionarse de un fármaco, un antibiótico, un antiséptico, un nutriente, un anticuerpo, una proteína, un factor de crecimiento, o cualquier otra sustancia que requiera estar en

contacto con la superficie dañada sobre la que se aplica la película de glicerol.

La preparación puede cargarse en tubos, recipientes de
5 plástico, jeringas, ampollas, aerosoles, recipientes
metálicos, en volúmenes de entre 1 y 500 ml, dependiendo del
tipo de recipientes. El glicerol filmógeno también puede
incorporarse en algodón, polímero, plástico, celulosa u otro
tipo de apósito usado habitualmente para la aplicación sobre
10 las heridas y lesiones.

La presente invención se refiere también a un procedimiento
para aumentar el tiempo de retención de una película de
glicerol a través de una superficie biológica mediante la
15 preparación de una solución de glicerol y de taninos vegetales
que tienen la capacidad de unirse a moléculas de glicerol, y
aplicar la solución sobre la superficie biológica.

La concentración de extractos de plantas ricos en taninos en
20 el glicerol puede variar dependiendo de la concentración
inicial y de la composición de los taninos usados para obtener
el efecto filmógeno.

Los inventores han postulado la siguiente hipótesis sobre el
25 mecanismo de funcionamiento de la preparación. Se puede aplicar
una solución osmóticamente activa sobre superficies biológicas
en las que las membranas plasmáticas de las células están
expuestas al ambiente externo (lesiones en la piel en las que
los queratinocitos de la piel están dañados y las células
30 subyacentes están expuestas, membranas mucosas tales como la
garganta, y las cavidades orales, nasales y vaginales) a fin
de formar una película osmóticamente activa en la membrana

biológica y crear un flujo de salida de líquido hipotónico. El flujo de salida del líquido debe separar y drenar las impurezas, tales como células muertas, membranas celulares, partículas de polvo, bacterias, partículas de virus, moléculas de proteínas que flotan libremente, tales como proteasas, etc ..., que tienen como resultado la limpieza de la lesión y la membrana mucosa. Este modo de acción mecánico produce efectos antibacterianos, antivirales, antisépticos, de limpieza e hidratantes, que son esenciales para estimular el crecimiento celular y la cicatrización. El agua de mar, que contiene 3-3,4 % de NaCl (sal), se usa habitualmente para limpiar lesiones o para hacer gárgaras, pero no es muy eficaz debido a que el flujo de salida del líquido hipotónico lo diluye instantáneamente y elimina la película osmótica, lo que limita la duración de acción de la solución salina a solo unos pocos minutos. Cuanto más corta sea la duración de la retención de la película hipertónica por la superficie biológica, menor será su eficacia de limpieza.

El glicerol es mucho más viscoso que el agua de mar o una solución salina al 3 % y se mantiene sobre la membrana biológica durante un período relativamente más largo que el agua de mar. Dado que el glicerol es un producto no tóxico, no irritante, totalmente seguro y barato para la aplicación tópica como agente antiséptico, antiviral, de limpieza e hidratante, debería haberse usado ampliamente para tratar infecciones tópicas, heridas limpias y estimular la cicatrización de heridas. Pero este no es el caso porque el glicerol también es diluido por el flujo de salida de líquido hipotónico que genera a través de su actividad muy osmótica, y, en consecuencia, se elimina de la superficie solo unos pocos minutos después de su aplicación, lo que acorta considerablemente la duración de la

acción del glicerol, y no permite el tiempo suficiente para limpiar bien la superficie. Esto explica por qué el uso de glicerol solo para la limpieza de superficies mucosas o heridas no es satisfactorio.

5

Los tres grupos hidroxilo del glicerol hacen que sea fácilmente soluble en agua mediante la formación de enlaces de hidrógeno con el agua. El glicerol diluido se elimina inmediatamente con el flujo de líquido hipotónico, que disminuye de forma progresiva pero rápidamente (en 5-10 minutos) el efecto osmótico del glicerol. La única solución para superar este problema sería seguir aplicando el producto varias veces, cada 10-15 minutos, para reconstituir la película osmóticamente activa, algo que no es práctico.

15

Por lo tanto, la mejor solución implica mejorar la duración de la retención de la película de glicerol sin alterar las propiedades osmóticas o el perfil de seguridad del producto, a fin de proporcionar un procedimiento efectivo, seguro y barato para la limpieza de superficies biológicas.

Dado que el glicerol actúa sobre la superficie biológica exclusivamente a través de sus propiedades mecánicas, sin ninguna interacción biológica, farmacológica, metabólica o inmunológica con las membranas biológicas o células vivas subyacentes, es importante que la sustancia que se elige por su capacidad para mejorar las propiedades filmogénicas del glicerol sea similar o inerte.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para tratar infecciones de la piel y la mucosa, que comprende la etapa de aplicar una preparación como se ha descrito

anteriormente sobre la zona afectada. En presente solicitud, el término piel se refiere a la piel de todas las áreas del cuerpo, incluyendo también, por ejemplo, la piel muy sensible de los labios. La presente preparación puede igualmente aplicarse sobre la piel y las membranas mucosas, tales como la cavidad oral, la garganta, las fosas nasales, los senos nasales, la piel y los tejidos dañados en la superficie del cuerpo, la cavidad vaginal y otras aberturas naturales del cuerpo. Las infecciones de la piel y la mucosa significan la presencia de cualquier patógeno o material indeseable sobre la superficie de la piel o la mucosa, de forma que interfiere con las funciones celulares normales o con el proceso de curación. La presente invención se refiere también a un procedimiento de preparación de glicerol filmógeno que comprende mezclar el glicerol o una solución de poliol con taninos vegetales que se unen al glicerol. En una forma de realización, los taninos vegetales pueden añadirse como un polvo o un líquido.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes aunque sin limitarse al contenido de los mismos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de extractos de plantas ricos en tanino

Inicialmente se seleccionaron 186 sustancias vegetales ricas en taninos para la preparación de extractos de plantas secas ricos en proantocianidina (PCD).

Los extractos de plantas ricos en PCD se prepararon a partir de diferentes materiales vegetales ricos en taninos, tales como frutas, semillas, pieles, pulpa de hortalizas, frutos secos, cortezas de árbol, y cualquier otro material vegetal rico en

tanino. Se usó la materia prima como tal (húmeda), pero también podría haberse clasificado previamente mediante secado, separación y eliminación de los componentes con poco tanino.

Los extractos de plantas ricos en tanino se prepararon usando
5 procedimientos estándar descritos en la literatura (Ajila CM. Crit Rev Biotechno, 31 (3) 227-249, 2011) y conocidos por el experto en la materia. En resumen, durante la fase inicial, se preparó una mezcla acuosa de material vegetal sólido que contiene proantocianidinas calentando aproximadamente 4 kg de
10 material vegetal sólido con 24-40 litros de agua desionizada (siendo la relación entre el material sólido y el agua de 1: 6 a 1:10), opcionalmente con mayor presión (presión de 60-100 psi) y a una temperatura entre 180 y 250 °C, durante un período que oscila entre 30 minutos y 5 horas, dependiendo de la rigidez
15 del material vegetal procesado. Después de calentar, el extracto líquido se separó de los residuos más grandes haciendo pasar la mezcla a través de un paño de algodón. Los sólidos separados se desecharon y se recogió el líquido rico en PCD. A continuación, el extracto se secó mediante calentamiento (de
20 180-200 °C) o por atomización y se usó como extracto rico en PCD para diversos experimentos, así como para la incorporación en glicerol.

El contenido de proantocianidina en el extracto se determinó
25 mediante el ensayo del butanol ácido de acuerdo con el procedimiento de Porter *et al.* (Porter *et al.* Phytochemistry, 1986). En resumen, 200 µg de extracto vegetal seco se diluyeron con 300 µl de 70 % de acetona y la solución se pipeteó en un tubo de ensayo de 100 x 12 mm. Se añadieron 3,0 ml de reactivo
30 de butanol-HCl (95: 5) y 0,1 ml de ácido férrico al 2 % preparado en HCl 2N. El tubo se agitó con vórtex y después se tapó la boca del tubo con una canica de vidrio y se puso en el

bloque de calentamiento a de 97 a 100 °C durante 60 minutos. Después, el tubo se dejó enfriar y la absorbancia se registró a 550 nm. La fórmula para calcular el porcentaje de taninos condensados como leucoantocianina equivalente es: (absorbancia

5 550 nm x 78,26 x factor de dilución) / (% de materia seca).

Sólo los extractos de plantas (42 de los 186 analizados) que tienen un valor de Porter superior a 200 y que indican una concentración alta de PCD se usaron análisis adicionales. Los

10 extractos no se purificaron para concentrar un tipo específico de tanino, ya que se obtuvieron mejores resultados con una mezcla de PCD y no con un tipo particular de tanino. Los extractos de plantas secas contienen principalmente bloques componentes de catequinas en dímeros, trímeros y pentámeros.

15

Ejemplo 2: Preparación de glicerol filmógeno

De acuerdo con el tipo de película de glicerol requerida para la aplicación tópica, se incorporó polvo seco que contiene de

20 0,1 a 8,0 % de PCD en el glicerol y se mezcló a fondo durante 6 horas a 37 °C en agitación para obtener una solución homogénea. El glicerol de origen vegetal se puede adquirir de proveedores tales como Interchimie en Francia. La preparación se cargó en tubos, recipientes de plástico, jeringas, ampollas,

25 aerosoles, recipientes metálicos, en volúmenes de entre 1 y 500 ml, dependiendo del tipo de recipientes y el uso deseado.

Ejemplo 3 (a): Estudios farmacológicos: Medición de la capacidad de retención de la película de glicerol solo comparado con glicerol que contiene taninos vegetales diferentes

30

Se realizaron experimentos para estudiar los efectos de una

nueva película de glicerol que contiene extractos de plantas ricos en PCD (glicerol filmógeno) en comparación con una película de glicerol sin PCD (glicerol normal) en condiciones idénticas. El objetivo de este estudio era seleccionar las PCD
5 individuales, o sus asociaciones, que mejoran la retención de la película de glicerol por la membrana biológica.

Modelo de ensayo:

10 En ausencia de cualquier modelo específico para estudiar la duración de la retención de la película por una superficie biológica, se usó un modelo *in vitro* de epidermis humana de varias capas para evaluar los efectos de la adición de concentraciones no citotóxicas de diferentes extractos de
15 plantas ricos en PCD, ya sea individualmente o en diferentes asociaciones, en la retención de la película de glicerol. La epidermis humana se cultivó en un filtro de policarbonato permeable (1 cm de diámetro) y se mantuvo en una esponja empapada con medio de cultivo, quedando su superficie externa
20 en contacto con el aire, como es el caso . A través de la acción capilar, el medio de cultivo se difunde a través del filtro de policarbonato y suministra nutrición a las células de la epidermis para mantener vivas esas células.

25 La inserción de uno o dos filtros de policarbonato adicionales aumenta la distancia entre el medio de cultivo y las células; después, la cantidad de medio disponible que llega a las células disminuye y, en ausencia, de nutrientes e hidratación, las células mueren. La muerte celular puede medirse mediante
30 tinción con MTT vital (Ferrari MJ. J Immunol methods 13 (2), 165-172, 1990). El porcentaje de células vivas es proporcional a la duración de la retención de la película de glicerol por

la superficie epidérmica.

Procedimiento de ensayo:

5 Varias preparaciones de glicerol que contienen productos de ensayo (principalmente extractos de plantas ricos en PDC), A concentraciones que varían entre 0,1 y 5,0 %. Se añadieron extractos de plantas a la sustancia de la película para estudiar su efecto sobre las propiedades de adherencia a la
10 célula de la película.

Cantidad de producto de ensayo aplicada por epidermis: 20 µl

Procedimiento de exposición:

15 Las preparaciones de glicerol se aplicaron directamente sobre la epidermis como capa fina con la ayuda de una pipeta (n = 6 por concentración): La epidermis se colocó sobre dos filtros y el producto de ensayo se aplicó en la superficie de la epidermis. Los filtros se mantuvieron en una esponja, que se
20 insertó en una placa Petri que contenía una cantidad apropiada de medio para nutrir las células. Durante el período experimental, el filtro de cultivo celular se retiró suavemente a las 6 horas, 24 horas y 48 horas, y se agitó en un medio libre de suero durante un período de 20 segundos para permitir
25 el desprendimiento de la película producto (cuando la película o los ingredientes de la película no estaban bien adheridos a la superficie epidérmica). La ausencia de película osmótica sobre la epidermis minimiza el suministro de medio de cultivo líquido a las células y causa la muerte celular. Según los
30 resultados iniciales obtenidos para cada concentración de producto de ensayo en glicerol, la concentración de taninos vegetales aumentó o disminuyó para obtener efectos filmógenos

máximos.

Condiciones de la exposición: 37 °C, 5 % de CO₂ durante 72 horas.

5

Mediciones de la viabilidad celular:

Coloración MTT y análisis histológicos. La viabilidad celular se calculó del siguiente modo:

Puntuación

10 4: 100 % de las células (en comparación con los controles) con intenso color azul.

3: Aproximadamente el 75 % de las células vivas con color azul oscuro.

15 2: Aproximadamente el 50 % de las células vivas con color azul medio.

1: Aproximadamente el 25 % de las células vivas con color azul claro.

0: Ninguna célula viva, color blanquecino de la epidermis.

20 Durante cada experimento, los resultados obtenidos para 6 epidermis en cada punto de tiempo se promediaron para determinar la supervivencia celular. Las puntuaciones medias de 3 experimentos individuales se promediaron para calcular el porcentaje de supervivencia celular media en comparación con
25 las células tratadas con glicerol solo.

Controles:

Controles positivos: Ningún producto de ensayo, pero las mismas condiciones de ensayo que para los productos de ensayo. En
30 estas condiciones casi el 95 - 100 % de las células mueren en un plazo de 72 horas.

Control de glicerol: Idéntico a los controles positivos, con la excepción de que el glicerol, libre de cualquier extracto de PCD, se aplicó sobre la superficie del cultivo. En estas condiciones, casi el 60-70 % de las células mueren en un plazo de 72 horas debido al pobre suministro de nutrientes.

Resultados:

El % de supervivencia celular después de 72 horas fue el siguiente:

10 Controles positivos: 6.32 ($\pm$ 2.4) %

Glicerol solo: 23,85 ($\pm$ 4,8) %, indicando el 17,53 % una mayor supervivencia celular en comparación con los controles positivos. Esto demuestra que el glicerol ejerce efectos osmóticos para continuar nutriendo e hidratando las células.

15 Glicerol filmógeno: Cuando se añadieron extractos de plantas ricos en PCD o polímeros sintéticos al glicerol a concentraciones entre 0,1 y 5,0 %, la supervivencia celular se vio afectada de la siguiente manera:

20 Capacidad de retención de la película de glicerol muy alta ((+ 200 to + 300 % de células vivas en comparación con glicerol solo):

PCD de: (1) *Vaccinium myrtillus* solo y (2) asociación con taninos vegetales ricos en PCD de *Vaccinium myrtillus* (extracto del fruto) + *Vaccinium macrocarpon* (extracto del fruto); *Vitis vinifera* (extracto de la semilla) + *Saúco negro* (extracto del fruto); *Camellia sinensis* (extracto de la hoja) + *V. myrtillus*; *V. myrtillus* + *s. negro*; *C. sinensis* + *V. vinifera* + *s. negro*; *V. Vinifera* + *s. negro* + *Glycine max* (extracto de la semilla); *V. macrocarpon* + *C. sinensis* + *V. vinifera*; y *V. macrocarpon* + *C. sinensis* + *V. myrtillus* + *V. vinifera*.

Capacidad de retención de la película de glicerol alta (+ 100

to + 199 % de células vivas en comparación con glicerol solo):

PCD de: (1) *Acacia catechu* (corteza y la planta entera),
Tenacetum parthenium (flores y hojas); *Salix alba* (planta
 entera); *Salvia officinalis*; *Rosmarinus officinalis*; *V.*
 5 *macrocarpon*; *V. vinifera*; *C. sinensis*; *s. negro*; *Opuntia* Sp.
 (frutos), *individualmente*, y (2) *asociaciones de Fraxinus*
chinensis + *Gingko biloba*; *Fraxinus chinensis* + *Gingko biloba*
 + *Camellia sinensis*; *V. vinifera* + *Ribes nigrum*.

10 Capacidad de retención de la película de glicerol moderada (+
10 to + 99 % de células vivas en comparación con glicerol
solo):

Morus alba (frutos); *Rubus sp.* (frutos); *Quercus sp.* (frutos,
 corteza), *Pinus sp.* (corteza, fruto).

15 También se obtuvo una actividad filmogénica moderada con
 polímeros sintéticos tales como polímeros que contienen sintano
 (ejemplo Blancotan SH2 y Ledosol CRP que se pueden adquirir en
 Silvateam s.p.a., Italia) o resinas poliméricas (tales como
 Aritan A7, una resina polimérica que contiene nitrógeno
 20 aniónico, que se puede adquirir en Arihant Dyechem empresa de
 India).

Conclusión:

25 Estos resultados demuestran que muchos taninos diferentes, pero
 especialmente las catequinas diméricas a pentaméricas,
 naturales o sintéticas, son capaces de producir glicerol
 filmógeno mediante la unión con las moléculas de glicerol y
 son capaces de mejorar las propiedades mecánicas de la película
 30 de glicerol sobre la superficie biológica.

Con el fin de medir la calidad filmogénica de las preparaciones

tal como se preparan en el ejemplo 2, se llevaron a cabo ensayos en los que se demostró de una manera indirecta que la calidad filmógeno de glicerol había aumentado.

5 Ejemplo 3(b): Estudios farmacológicos: Medición de la solubilidad del glicerol solo comparado con el glicerol filmógeno *in vitro*

Para verificar el efecto de la adición de taninos sobre la resistencia mecánica de glicerol a la solubilidad en el agua
10 atraído a través de su propia actividad osmótica, se procedió a realizar un análisis termogravimétrico (TGA) de glicerol solo frente al glicerol filmógeno (que contiene 1 % de extracto vegetal rico en tanino). Una película de las sustancias de ensayo respectivas se expuso a una temperatura (30 °C) y
15 humedad relativa (20 %) constantes y se midió el aumento de la masa relacionada con el tiempo. Por tanto, se podía cuantificar la solubilidad en agua (Fig. 1).

Los resultados preliminares muestran que el tanino disminuye
20 la solubilidad en agua del glicerol. Supuestamente, la solubilidad reducida se puede imputar a que el tanino ocupa algunos de los grupos hidroxilo del glicerol, que, por lo tanto, no están disponibles para unirse a las moléculas de agua.

25

Ejemplo 3(c): Estudios farmacológicos: Medición de la duración de la retención de la película de glicerol solo comparado con glicerol en filmógeno en úlceras diabéticas

Capacidad filmogénica del glicerol : Los experimentos se
30 llevaron a cabo en pacientes con úlceras diabéticas que cubren una superficie aproximada de 4 ($\pm$ 1,5) cm². Se aplicaron 2 ml de glicerol (grupo 1, n = 6 úlceras) o 2 ml de glicerol

filmógeno (grupo 2, n = 6 úlceras) sobre la superficie de la herida y las heridas se mantuvieron en una posición vertical después de la aplicación. Se recogieron muestras de fluido de la herida (100 µl) a intervalos de una hora durante un período de 6 horas y se midió la cantidad de glicerol.

Se obtuvieron los siguientes resultados (véase la Fig. 2).

Los resultados mostraron que en las condiciones experimentales de este estudio, casi el 92 % del glicerol normal se eliminó en 1 hora y el 100 % en 2 horas, en comparación con la reducción de solo el 34 % y el 56 % para el glicerol filmógeno. La actividad de la glicerol filmógeno duró 6 horas.

Ejemplo 4: Resultados de las mediciones de la unión tanino - glicerol y la producción de glicerol filmógeno

Como se muestra en el estudio farmacológico en el ejemplo 3, entre 42 extractos de plantas ricos en tanino mezclados con glicerol en diferentes concentraciones, ya sea individualmente o en diversas asociaciones, los siguientes taninos vegetales (PCD) mostraron diferentes grados de cualidades filmogénicas:

Cualidad filmogénica muy alta: 6 extractos de plantas se clasificaron como muy altamente activas: *V. myrtillus*, *V. macrocarpon*, *V. vinifera*, *s. negro*, *C. sinensis* y *G. max* ya que aumentaban la duración de la retención de la película entre 200 y 300 % en comparación con el glicerol solo. Se obtuvo una calidad muy alta de la película de glicerol con: (1) Las PCD de *Vaccinium myrtillus* solo, así como en asociaciones con taninos vegetales ricos en PCD de (2) *Vaccinium myrtillus* (extracto del fruto) + *Vaccinium macrocarpon* (extracto del fruto); (3) *Vitis vinifera* (extracto de la semilla) + *Saúco negro* (extracto del fruto); (4) *Camellia sinensis* (extracto de la hoja) + *V. myrtillus*; (5) *V. myrtillus* + *s. negro*; (6) *C.*

sinensis + (7) *V. vinifera* + *s. negro*; *V. Vinifera* + *s. negro* + *Glycine max* (extracto de la semilla); (8) *V. macrocarpon* + *C. sinensis* + *V. vinifera*; y (9) *V. macrocarpon* + *C. sinensis* + *V. myrtillus* + *V. vinifera*.

5

Cualidad filmogénica alta: 9 extractos de plantas se clasificaron como altamente activos ya que aumentaban la duración de la retención de la película entre 100 y 200 % en comparación con glicerol solo: (1) *Acacia catechu* (corteza y la planta entera), *Tenacetum parthenium* (flores y hojas); *Salix alba* (planta entera); *Salvia officinalis*; *Rosmarinus officinalis*; *Fraxinus chinensis*, *Gingko biloba*; *Ribes nigrum* (fruto), y *Opuntia Sp.* (frutos) así como polímeros sintéticos, tales como Aritan-A7, Ledosol CRP, y Blancotan SH2

10

15

Cualidad filmogénica moderada: 4 extractos de plantas se clasificaron como moderadamente activos ya que aumentaban la duración de la retención de la película entre 10 y 99 % en comparación con glicerol solo: *Morus alba* (frutos); *Rubus sp.* (frutos); *Quercus sp* (frutos, corteza), *Pinus sp* (corteza, frutos).

20

Estos resultados indican que: 1. Los taninos se unen a glicerol; 2. Algunos taninos vegetales se unen muy fuertemente con la molécula de glicerol, mientras que otros se unen con una fuerza menor. Esto demuestra que la unión del glicerol a los taninos es específica; 3. La unión de taninos a glicerol comienza tan pronto como los taninos se añaden al glicerol; 4. Los dímeros, trímeros y pentámeros de tanino muestran una unión y un efecto filmógeno más fuertes, en comparación con los polímeros o taninos condensados grandes. Esto puede estar relacionado con el hecho de que las moléculas de tanino más pequeñas tienen múltiples posibilidades de unirse al glicerol.

25

30

Casi el 50 % de la unión PCD -glicerol se produce cuando ambos ingredientes se mezclan y se almacenan, y el 50 % restante cuando la solución se aplica como una película fina sobre la superficie de la piel o de la mucosa. Los polímeros sintéticos también pueden unirse a las moléculas de glicerol y mejorar la duración de la retención de la película de la película de glicerol.

Según estos hallazgos, el glicerol filmógeno se puede preparar mediante la mezcla de glicerol o cualquier otra solución de poliol con las PCD de plantas de unión a glicerol.

Ejemplo 5: Ejemplos de preparaciones para el tratamiento de las infecciones de la piel y la mucosa

Se prepararon diferentes preparaciones de glicerol filmógeno como se detalla en el Ejemplo 2. Los porcentajes indican el peso / peso del extracto vegetal rico en PCD seco.

1. Glicerol - 69,22 %, extracto de *V. macrocarpon* - 0,18 %, extracto de *V. myrtillus* - 0,18 %; Excipientes: Miel - 29,0 %, Aqua - 1,42 % cargado en tubos de 10 ml para tratar úlceras orales traumáticas.

2. Glicerol - 72,92 %, extracto de *V. macrocarpon* - 0,30 %, extracto de *V. myrtillus* - 0,36 %; Excipientes: Miel - 12,0 %, Aqua - 14,42 % cargado en aerosol de 20ml para el tratamiento de la mucositis oral.

3. Glicerol - 74,265 %, extracto de semillas de *V. vinifera* - 0,48 %, extracto de fruto de *S. nigra* (saúco negro) - 0,32 %; Excipientes: Miel - 12,0 %, Aqua - 12,935 % cargado en aerosoles de 30 ml para aplicar en la garganta.

4. Glicerol - 73,94 %, extracto de semillas de *V. vinifera* - 0,48 %, extracto de fruto de *S. nigra* (saúco negro) - 0,32 %;

extracto de semillas de *Glycine max* 0,07; Excipientes: Miel - 12,0 %, Aqua - 13,19 % cargado en aerosoles de 20ml para aplicar en la garganta en niños.

5. Glicerol - 32,488 %, extracto de *V. macrocarpon* - 0,12 %, extracto de *V. myrtillus* - 0,12 %, extracto de *C. sinensis* - 0,22 %, extracto de frutos de *S. nigra* (saúco negro) - 0,10 %; Excipientes: Aqua - 66,952 %, cargados en 15 ml de aerosoles de plástico para el tratamiento de la rinosinusitis.

6. Glicerol - 68,66 %, extracto de *V. myrtillus* - 0,18 %, extracto de *C. sinensis* - 0,30 %; Excipientes: Miel - 29,0 %, Aqua - 1,76 %, Goma xantana 0,1 %, cargados en tubos de 50 ml para aplicación tópica en úlceras producidas por presión.

7. Glicerol - 99,16 %, extracto de *V. myrtillus* - 0,18 %, ácido cítrico c.s.p. pH 4,5; Excipientes: Aqua - 0,66 %, cargado en tubos de 10 ml con una cánula para el tratamiento de la sequedad vaginal y la infección.

8. Glicerol - 72,06 %, extracto de semillas de *V. vinifera* - 0,18 %. Excipientes: Miel 27,0 %, Aqua - 0,66 %. Goma xantana 0,10 %, cargada en tubos de 100 ml para aplicación tópica sobre lesiones de la piel.

9. Glicerol - 76,166 %, extracto de *C. sinensis* - 0,24 %, extracto de semillas de *V. vinifera* 0,36 %, extracto de frutos de *S. nigra* (saúco negro) - 0,20 %. Excipientes: Miel - 20,0 %, Aqua - 2,934 %, goma xantana 0,10 %, cargada en tubos PET de 6ml para aplicación tópica en las lesiones de herpes labial.

10. Glicerol - 97,48 %, extracto de *V. macrocarpon* - 0,18 %, extracto de fruto de *S. nigra* (saúco negro) - 0,36 %; ácido cítrico c.s.p. pH 4,5; Excipientes: Aqua - 1,98 %, cargado en tubos de 10 ml con una cánula para aplicación vaginal para tratar el herpes genital y la vaginosis bacteriana.

11. Glicerol - 76,42 %, extracto de *V. macrocarpon* - 0,12 %, extracto de *C. sinensis* - 0,48 %, extracto de semillas de *V.*

vinifera - 0,36 %; Excipientes: Miel - 19,0 %, Aqua - 3,52 %, cargados en tubos de 50 ml para aplicación tópica sobre las lesiones de psoriasis, eccema y dermatitis.

12. Sorbitol - 94,7 %, extracto de *V. macrocarpon* - 2,1 %, *Acacia catechu* 3,2 %, cargado en tubos de 20 ml para aplicación tópica sobre úlceras venosas de las piernas.

13. Glicerol - 90,60 %, extracto de *V. macrocarpon* - 1,30 %, *Salix alba* - 5,0 %; Excipientes: Aqua - 3,1 0 %, cargado en tubos de 50 ml para la aplicación tópica sobre úlceras diabéticas.

14. Sorbitol - 74,265 %, extracto de semillas de *V. vinifera* - 0,48 %, extracto de fruto de *S. nigra* (saúco negro) - 0,32 %; Excipientes: Miel - 12,0 %, Aqua - 12,935 %, cargados en recipientes de plástico de 100 ml para aplicación tópica sobre quemaduras en la piel.

15. Sorbitol - 73,94 %, extracto de semillas de *V. vinifera* - 0,48 %, extracto de fruto de *S. nigra* (saúco negro) - 0,32 %; extracto de semillas de *Glycine max* 0,07; Excipientes: Miel - 12,0 %, Aqua - 13,19 %, cargados en jeringas de de 10 ml para aplicación tópica sobre heridas crónicas.

16. Sorbitol - 32,488 %, extracto de *V. macrocarpon* - 0,12 %, extracto de *V. myrtillus* - 0,12 %, extracto de *C. sinensis* - 0,22 %, extracto de frutos de *S. nigra* (saúco negro) - 0,10 %; Excipientes: Aqua - 66,952 %, cargado en aerosoles de 50 ml para aplicación en la garganta para tratar la gripe.

17. Xilitol - 68,66 %, extracto de *V. myrtillus* - 0,18 %, extracto de *C. sinensis* - 0,30 %; Excipientes: Miel - 29,0 %, Aqua - 1,76 %, Goma xantana 0,1 %, cargados en tubos de 100 ml para el tratamiento de úlceras secas crónicas.

18. Glicerol - 95 %, extracto de *V. myrtillus* - 5,0 %, ácido cítrico c.s.p. pH 4,5, cargados en óvulos de 4 ml para su introducción en la vagina para tratar la vaginosis bacteriana.

19. Glicerol - 50 %, Xilitol - 20 %, extracto de semillas de *V. vinifera* - 1,0 %. Excipientes: Miel 28,8 %, goma xantana 0,20 %, usado para mojar apósitos de poliéster para la aplicación sobre heridas crónicas.

5 20. 1 g de preparación de tanino vegetal que contiene 400 mg de extracto de *V. vinifera*, 350 mg de *V. macrocarpon*, 100 mg de *V. myrtillus* y 150 mg de almidón de arroz en polvo rociado sobre una gasa de algodón de 4 x 5 cm. Primero se aplica glicerol puro sobre la superficie dañada (6 ml sobre una
10 superficie de 10 cm² de una úlcera crónica) y la superficie de la herida se ~~cierra~~ cubre con el apósito, dirigiéndose la parte de tanino rociada hacia la superficie de la herida.-{}-

21. Apósitos de tipo gasa no adhesivos de algodón de 5 x 5 cm empapados en una solución que contiene glicerol (82 %), 0,5 %
15 de extracto de planta de *S. nigra* (saúco negro) y 17,5 % de miel y empaquetados en bolsas de aluminio. La gasa se aplica directamente tópicamente sobre la superficie dañada.

22. Glicerol - 76,0 %, extracto de *C. sinensis* - 0,5 %, extracto de semillas de *V. vinifera* 0,5 %, extracto de frutos
20 de *S. nigra* (saúco negro) - 0,5 %. Excipientes: Miel - 22,5 % mezclada en un hidrogel y fijada en una superficie de polímero reticulado (10 g por 10 cm² de superficie polimérica) para aplicación tópica sobre úlceras por presión, úlceras diabéticas y úlceras venosas de piernas.

23. Glicerol - 97,48 %, extracto de *V. macrocarpon* - 2,10 %, extracto de frutos de *S. nigra* (saúco negro) - 0,42 %, adsorbido sobre un apósito de nanocompuesto de óxido de cinc flexible como un vendaje para curación de heridas para úlceras por presión y úlceras diabéticas crónicas.

30 24. Glicerol - 68,66 %, Aritan-A7 - 0,18 %, *Fraxinus chinensis* - 0,30 %, Excipientes: Miel - 29,0 %, Aqua - 1,76 %, Goma xantana 0,1 %, cargados en tubos de 50 ml para aplicación

tópica en úlceras producidas por presión.

25. Glicerol - 99,16 %, extracto de *R. nigrum* - 0,18 %, ácido cítrico c.s.p. pH 4,5; Excipientes: Aqua - 0,66 %, cargado en tubos de 10 ml con una cánula para el tratamiento de la sequedad vaginal y la infección.

26. Glicerol - 72,06 %, extracto de raíz de *G. biloba* - 0,18 %, Blancotan SH2 0,20 %, Excipientes: Miel 27,0 %, Aqua - 0,46 %. Goma xantana 0,10 %, cargada en tubos de 100 ml para aplicación tópica sobre lesiones de la piel.

27. Glicerol 99,5 %, Ledosol CRP polvo al 0,5 %, cargados en botes de 50 ml para aplicación tópica sobre lesiones en la piel producidas por psoriasis, eccema y dermatitis.

28. Glicerol 30 %, Miel 69,5 %, extracto seco de *Fraxinus chinensis* 0,50 %, cargado en recipientes de 50 ml para aplicación tópica en la superficie de la garganta para tratar infecciones virales de la garganta y de los senos.

Ejemplo 6: Experimentos de crioconservación; estudio comparativo sobre glicerol frente a glicerol filmógeno

El objetivo de este estudio fue comparar los efectos protectores de glicerol solo o en asociación con taninos o polímeros capaces de formar una película de glicerol sobre la superficie del tejido vivo y evaluar los efectos obtenidos sobre la supervivencia celular.

Células vivas y tejidos usados:

Los cultivos primarios de células de músculo liso vascular humanas (CML), fibroblastos de la piel, células epiteliales de riñón de rata, se cultivaron líneas celulares MDBK y MDCK en matraces de cultivo tisular de plástico de 25 cm². Las células se dispersaron con solución de tripsina - EDTA, se lavaron con medio y se preparó una suspensión de células que contiene

1x10⁷células / ml. También se prepararon suspensiones de linfocitos de sangre humana como muestras de células no adherentes. Del mismo modo, las muestras frescas de piel humana viva recogidas para hospitales se cortaron en piezas de 1 cm² y dos piezas de cada muestra de piel se crioconservaron en diferentes medios como se indica a continuación.

Se prepararon cuatro medios de congelación en DMEM (Medio Mínimo Esencial de Dulbecco) que contenía: (1) 5 % de DMSO, 10 % de FCS y medio de cultivo c.s.p. 100ml; (2) 2 % de DMSO + 10 % de suero y medio de cultivo c.s.p. 100 ml; (3) glicerol 20 %, FCS 10 %, 2 % de DMSO y medio de cultivo c.s.p. 100 ml; o (4) glicerol 20 %, PCD de plantas 1 %, FCS 10 %, DMSO 2 % y medio de cultivo c.s.p. 100 ml del denominado glicerol filmógeno. Los medios se almacenaron a DE 2 a 8 °C hasta su uso. Obsérvese que el medio de congelación adecuado depende de la línea celular específica.

Las suspensiones celulares se centrifugaron a aproximadamente de 100-200 x g durante 5 a 10 minutos y el sobrenadante se decantó sin perturbar los sedimentos celulares. Los sedimentos celulares se resuspendieron en medio de congelación frío a densidades de 1 x 10⁸ células por ml. Las alícuotas de la suspensión celular se dispensaron en viales de almacenamiento criogénico y se congelaron en un aparato de congelación a velocidad controlada, lo que disminuye la temperatura aproximadamente 1 °C por minuto hasta -70 °C. Después, los viales de cultivo de tejido y de células se transfirieron a recipientes de nitrógeno líquido (-196 °C) y se mantuvieron durante un período de 6 meses. La misma técnica se siguió para los injertos de piel.

Para la descongelación, se retiraron las ampollas y se dejaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 minuto y después se transfirieron a un baño de agua a 37 °C durante 2-3 minutos hasta que estén completamente descongelados. Las ampollas se limpiaron con alcohol al 70 % antes de abrir en un ambiente estéril. Las células se diluyeron en 10 ml de DMEM que contiene 5 % de FCS, se centrifugaron, se sedimentaron, se volvieron a diluir en medio de cultivo y el número de células vivas se determinó usando tinciones con azul tripán y MTT.

10

Los injertos de piel procesados de una manera similar, excepto que los injertos se cortaron en láminas de 5, se introdujeron en matraces de cultivo tisular de 25 cm² que contienen 15 ml de medio de crecimiento celular con 10 % de FCS y se cultivaron durante un período de 10 días. Después de 10 días de cultivo, las células del injerto en crecimiento se dispersaron con una solución de tripsina - EDTA, se preparó una suspensión de células y se contó el número de células vivas.

20 Resultados:

Número medio de células de cultivo celular viva: (1) 5 % de DMSO, 10 % de FCS en medio de cultivo = 65,2 %; (2) 2 % de DMSO + 10 % de suero en medio de cultivo = 62,6 %; (3) glicerol 20 %, FCS 10 %, 2 % de DMSO en medio de cultivo = 68,4 %; y (4) glicerol 20 % que contiene 1 % de PCD vegetales, FCS 10 %, DMSO 2 % en medio de cultivo denominado glicerol filmógeno= 91 %.

Número medio de células de injerto de piel viva: (1) 5 % de DMSO, 10 % de FCS en medio de cultivo = 51,1 %; (2) 2 % de DMSO + 10 % de suero en medio de cultivo = 54,9 %; (3) glicerol 20 %, FCS 10 %, 2 % de DMSO en medio de cultivo = 63,3 %; y (4) glicerol 20 % que contiene 1 % de PCD vegetales de *V. macrocarpon* (0,5 %) y *R. Nigrum* (0,5 %), FCS 10 %, DMSO 2 % en

15

25

30

medio de cultivo denominado glicerol filmógeno= 83,8 %.

Conclusión: El glicerol filmógeno es mucho más eficiente, en comparación con glicerol solo, para la crioconservación de células dispersas individuales e injertos de tejido.

Ejemplo 7: Ejemplos de glicerol filmógeno crioconservante

Se prepararon diferentes preparaciones como se detalla en el Ejemplo 2. Los porcentajes indican el peso / peso del extracto vegetal rico en PCD seco.

1. 20 % de Glicerol, 0,5 % de PCD vegetal de *V. myrtillus*, 0,4 % de *A. catachu* y 0,1 % de *S. alba*; 5,0 % de DMSO, 20 % de suero bovino fetal, medio de cultivo c.s.p. 100 ml usado para almacenar las células vivas dispersas.

2. 20 % de Glicerol, 1 % de PCD vegetal (0,5 % de *V. macrocarpon* y 0,5 % de *R. nigrum*), 10 % de FCS, 2,0 % de DMSO en medio de cultivo c.s.p. 100 %.

3. 10 % de glicerol, 1,0 % de PCD vegetales de semillas de *V. vinifera* y 0,5 % de s. negro, 2,0 % de DMSO, 10 % de suero bovino fetal, medio de cultivo c.s.p. 100ml, usado para almacenar los injertos de piel antes de injertar y transportar.

Ejemplo 8: Propiedades osmóticas *in vitro* de glicerol solo en comparación con glicerol que contiene 1 % en asociación de PCD vegetales como en la preparación nº 2 en el ejemplo 5 (código - Orosol)

En la ausencia de modelos para imitar la exudación osmótica de líquido hipotónico de la mucosa oral o vaginal, se usó un modelo de cultivo celular de epidermis humana que contiene células epiteliales humanas normales cultivadas en un filtro de policarbonato en una fase de aire/líquido. En condiciones óptimas se obtiene un cultivo de células de múltiples capas,

equivalente a la superficie de la mucosa sobre un soporte de policarbonato. Este soporte coloca sobre una esponja en contacto con una cantidad definida de medio de cultivo. El medio se difunde en la esponja y el filtro, y suministra
5 nutrientes, así como hidratación, a las células. En estas condiciones, el cultivo celular se puede mantener vivo durante al menos una semana.

Para crear un modelo experimental de sequedad de mucosa, los
10 inventores insertaron uno o dos filtros adicionales entre las células y la esponja, de modo que redujeron la cantidad de medio líquido disponible para las células. En ausencia de hidratación, las células mueren y la mortalidad celular se puede medir con un colorante vital MTT. La mortalidad celular
15 es proporcional a la sequedad de la superficie de cultivo.

Si se aplica una solución hipertónica osmóticamente activa sobre la superficie epidérmica expuesta a sequedad, el medio de cultivo es atraído hacia a la epidermis debido a la ósmosis
20 y aumenta la cantidad de medio disponible para las células..i Por tanto, la supervivencia celular es proporcional a la extensión de la ósmosis y a la hidratación celular.

El objetivo de este estudio era evaluar las propiedades
25 hidratantes de glicerol filmógeno en comparación con glicerol regular. El producto se aplicó sobre la superficie de la epidermis normal (sin filtro), ligeramente deshidratada (1 filtro) o intensamente deshidratada (2 filtros adicionales) (20 µl), y las células se incubaron a 37 °C-5 % de CO₂ durante
30 una semana. Cada epidermis se lavó mediante agitación del cultivo en medio de cultivo durante 20 segundos los días 1, 3 y 5, y la viabilidad celular se midió el día 7 usando tinción

con MTT.

Puntuación media de la supervivencia celular después de 1 semana de cultivo fue la siguiente:

1. Cultivos normalmente humidificados (sin filtro): 100 %
- 5 2. Controles parcialmente deshidratados sin producto: 43,11 %
3. Cultivos intensamente hidratados sin producto: 11,57 %
4. Cultivos parcialmente deshidratados con glicerol: 62,3 %
5. Cultivos intensamente deshidratados con glicerol: 43,15
- 10 %
6. Cultivos parcialmente deshidratados con glicerol filmógeno: 89,46 %
7. Cultivos intensamente deshidratados con glicerol filmógeno: 77,89 %

15 Conclusión: El glicerol filmógeno permanece en la superficie de la epidermis durante un período de tiempo más largo en comparación con el glicerol normal, con mayores efectos osmóticos, y protege las células contra la deshidratación.

20 Ejemplo 9: Propiedades de cicatrización de heridas en rata de glicerol filmógeno en comparación con glicerol normal

Procedimientos de inducción de lesión experimental:

La piel dorsal de la rata se afeitó y se realizaron 3 lesiones circulares de 0,8 mm de diámetro y profundidad en la hipodermis
 25 con un dermatoma. En cada lesión se aplicaron 0,2 ml de cada producto de ensayo durante 7 días consecutivos. El diámetro de la lesión se midió todos los días y se compararon los valores medios.

30 Producto de ensayo:

Grupo 1: agua destilada; Grupo 2: glicerol solo; Grupo 3: glicerol filmógeno como en el ejemplo N ° 6. (10 ratas en cada

grupo).

Resultados:

Tamaño de la lesión (diámetro / día / lesión durante 7 días)
en el grupo de agua destilada media = 3,32 cm²; en el grupo de
5 glicerol = 2,95 cm² y en el grupo de glicerol filmógeno = 2,03
cm².

Conclusión:

Aunque el glicerol solo sí acelera la curación, la tasa de
curación fue mucho más rápida con la aplicación de glicerol
10 filmógeno.

Estabilidad de las preparaciones de glicerol y tanino:

Se realizaron estudios para evaluar la estabilidad de las
preparaciones citadas en los ejemplos durante 36 meses de
almacenamiento a 30 °C ± 2 °C y A 40 °C ± 2 °C. Las
15 preparaciones fueron estables durante un periodo mínimo de 36
meses.

Interacciones contenido-recipiente:

Las preparaciones citadas en los ejemplos se cargaron en tubos
de plástico (PE, PET) y recipientes de aluminio y los
20 contenidos se analizaron a intervalos regulares para evaluar
cualquier interacción entre los contenidos y los recipientes.
Los análisis de espectrofotometría de infrarrojos de las
muestras justo después de la preparación y después de 12 meses
de almacenamiento a 37 °C indicaron la ausencia de cualquier
25 interacción entre los contenidos y los recipientes.

Estabilidad durante el uso:

Las muestras de las composiciones citadas en los ejemplos se
estudiaron para determinar la descomposición o la contaminación
durante el período de uso. Los resultados obtenidos validaron
30 la estabilidad del producto durante el uso durante un periodo
de 1-3 meses.

Citotoxicidad:

La citotoxicidad de glicerol filmógeno, evaluada de acuerdo con las normas NF-ISO 10993 mostró que el producto no es citotóxico hasta una concentración de 5 % en el medio de cultivo de células L929.

5 Hipersensibilidad:

Este estudio se realizó de conformidad con los requisitos de las normas para las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) de la FDA (21 CFR, Parte 58, 1 de abril de 2005) y las Buenas Prácticas de Laboratorio de la OCDE, referencia ENV / MC / CHEM
10 (98) 17 adoptadas por la decisión del Consejo de 26 de noviembre de 1997 usando los ejemplos de las preparaciones N ° 2, 3 y 5.

El producto se inyectó por vía intradérmica, y se aplicó tópicamente directamente sobre la piel de cerdo G. afeitado
15 con un parche, para evaluar la reacción local y la hipersensibilidad retardada. Para comparación se realizó un ensayo idéntico de control negativo con una solución de NaCl al 0,9 % mediante la inyección de la solución por vía intradérmica y por aplicación tópica. Los productos
20 sensibilizaron la piel mediante inyección intradérmica, pero la aplicación tópica no indujo sensibilización.

Toxicidad oral *in vivo*:

Las muestras de glicerol filmógeno como en los ejemplos N° 2,
25 7, 8 y 20 se administraron a ratas a una dosis de 5 g / kg de peso corporal. El estudio se realizó de acuerdo con las normas de la BPL. En ausencia de cualquier anomalía, se estimó que la dosis letal aguda era superior a 5 g / kg para todos los productos analizados.

30

Irritación tópica:

Los estudios se realizaron con ejemplos de la composición del

producto de ensayo N ° 2, 7, 9, 10 y 12 de acuerdo con las pruebas de irritación en la piel y ocular BCOP *in vitro* publicados en el diario oficial de la República Francesa, de 21 de febrero de 1982. El principal índice de irritación cutánea fue inferior a 0,50 y los productos se clasificaron como no irritante para la piel. El índice medio de opacidad corneal bovina fue entre 10 y 25 para todos los productos y, por lo tanto, los productos se clasificaron como ligeramente irritantes para los ojos.

10

Ejemplo 11: Eficacia clínica

Se prepararon diferentes preparaciones de acuerdo con los ejemplos de las composiciones dadas en el texto y la eficacia clínica de las composiciones se evaluó en pacientes que sufren patologías de la piel o la mucosa. Los resúmenes de los estudios se proporcionan a continuación.

15

Estudio 1: Eficacia terapéutica de glicerol solo frente a filmógeno (Preparación N° 11 del Ejemplo 5 llamado VB-DERM) para el tratamiento de la psoriasis, el eccema y la dermatitis.

20

Se realizó un ensayo de enmascaramiento sencillo de 6 semanas de duración en 107 pacientes que sufren lesiones cutáneas de psoriasis, eccema y dermatitis (PED) en el que se comparó la eficacia clínica de la composición según la preparación N° 11 conforme al ejemplo 5 con glicerol solo para el tratamiento de lesiones cutáneas producidas por psoriasis, eccema y dermatitis (PED). Se trató a 56 pacientes con la preparación de glicerol filmógeno VB-DERM (grupo de glicerol filmógeno) y a 51 con glicerol solo (grupo control). El producto se aplicó por vía tópica, dos veces al día durante un periodo de 6 semanas. Las lesiones se clasificaron en una escala de 0 a 4 las semanas 0, 1, 2, 4 y 6.

25

30

Durante todo el estudio se observaron resultados muy positivos de la eficacia de la preparación de glicerol filmógeno (VB-DERM) sobre la psoriasis, el eccema y la dermatitis.

5 El análisis de las puntuaciones registradas a intervalos de tiempo regulares durante un período de 6 semanas demostró claramente que el glicerol filmógeno es mucho más eficaz para el tratamiento de lesiones PED en comparación con glicerol solo (Figs. 3. 4 y 6). La eficacia en la limpieza y cicatrización
10 de la herida del glicerol filmógeno fue estadísticamente significativa ($p < 0,005$) en el tratamiento de todos los síntomas asociados con esas enfermedades: eritema y prurito, edema, sequedad, supuración, formación de escamas y costras, y picor. La calidad de vida según lo evaluado por los
15 investigadores y los pacientes, justo desde la segunda semana después del inicio del tratamiento, también mejoró significativamente (Fig.5).

Estos resultados indican que el glicerol filmógeno permanece
20 sobre la superficie de las lesiones de PED durante un período de tiempo mucho más largo manteniendo así la lesión limpia de todos los contaminantes libres (células muertas, residuos celulares, enzimas proteolíticas, MMP, citocinas, interleucinas, interferones, virus, bacterias, partículas de
25 polvo) y la restauración de la producción de células de piel normales. Por tanto, el glicerol filmógeno es mucho más altamente activo en comparación con el glicerol no filmógeno para el tratamiento de enfermedades de la piel que implican un crecimiento excesivo de la piel, la presencia de contaminantes
30 en las lesiones, la participación de múltiples impurezas que flotan libremente, tales como células muertas, citocinas, MMP, y otras moléculas de proteína en el sitio de la lesión. Estos

contaminantes se eliminan de forma permanente de la lesión, de forma que crean un terreno favorable para el crecimiento normal de la piel.

5 Estudio 2: Eficacia terapéutica del glicerol solo y glicerol filmógeno (composición como en la preparación nº 10 del ejemplo 5 (HG-VB)) para el tratamiento del herpes genital

Se realizó un estudio piloto abierto, de una sola rama, prospectivo, multicéntrico, para evaluar la eficacia del
10 glicerol filmógeno (HG-VB), en comparación con el glicerol normal estándar, en las mujeres que sufren herpes genital e infección.

Se trató a 60 mujeres con lesiones visibles de herpes genital
15 con HG-VB (10 ml al día) durante 14 días consecutivos. El producto se administró diariamente en la cavidad vaginal y los síntomas de herpes genital se evaluaron antes del tratamiento y los días 1 (2 h), 4, 7, y 14. También se obtuvieron frotis de lesiones genitales para evaluar el número de células
20 gigantes multinucleadas cargadas con virus usando la prueba de Tzanck. Se trató a 20 mujeres solo con glicerol en condiciones clínicas idénticas.

Resultados: Se observó una reducción estadísticamente
25 significativa del picor vaginal, el enrojecimiento, el dolor, la sequedad, la secreción, la presencia de ampollas, y la normalización del pH vaginal después de transcurridas 2 horas desde la primera aplicación de HG-VB en comparación con el tratamiento con glicerol solo. Los resultados de este estudio
30 demostraron claramente que un glicerol filmógeno continúa drenando el líquido hipotónico procedente de las partes internas de la cavidad vaginal durante un período de 6-8 horas

y limpia todos los contaminantes, en comparación con el glicerol solo con una duración más corta (0,5 a 1 h) de acción.

Estudio 3: Eficacia del glicerol solo y el glicerol filmógeno (glicerol asociado con extractos de plantas ricos en PCD como en la preparación nº 9 del ejemplo 5 (HL-VB)) en la eliminación de partículas de virus libres presentes sobre la superficie de las lesiones de herpes labial

Se realizó un estudio piloto abierto, de una sola rama, prospectivo, multicéntrico en 60 pacientes con lesiones de herpes labial abiertas. Se trató a 30 pacientes con glicerol normal y a 30 con HL-VB aplicando unas gotas de los productos, en cada grupo de forma idéntica, dos veces al día durante un periodo máximo de 14 días consecutivos. Los frotis de lesiones labiales se recogieron y se midió la concentración media de virus mediante la cuantificación del número de células gigantes multinucleadas infectadas por virus en cada lesión usando la prueba Tzank, y se determinó la cantidad media de partículas de virus libres en ambos grupos.

La cantidad media de partículas de virus libres fue > 750 , $635 (\pm 17,51)$, $542 (\pm 22,35.)$, Y $522 (\pm 13,50)$ en el grupo tratado con glicerol en comparación con $465 (\pm 10,8)$, $359 (\pm 6,35)$, $226 (\pm 10,22)$ y $0,0$ los días 1, 4, 7 y 14, respectivamente. Estos resultados indican que HL-VB, es decir, glicerol que contiene PCD o glicerol filmógeno, ejerce sus efectos durante un período de tiempo más largo que el glicerol solo.

Estudio 4: Eficacia del glicerol solo y glicerol asociado con extractos de plantas ricos en PCD, denominado glicerol filmógeno (composición como en la preparación nº 5 del ejemplo

5 (G-PCD)), para abrir la membrana biológica bacteriana que bloquea los orificios de los senos en pacientes que sufren rinosinusitis

- 5 Se realizó un ensayo clínico controlado de 21 días de G-PCD de comparación con glicerol solo en pacientes que sufren síntomas agudos de infección en los senos nasales.

El objetivo de este estudio era evaluar la eficacia de la
10 abertura del seno de la solución de G-PCD (32 % de glicerol, 1 % de PCD vegetales en agua) como en el ejemplo N ° 5, en comparación con glicerol solo (32 % de glicerol en agua). Entre 127 pacientes que sufren sinusitis aguda y crónica se seleccionó a 109 fueron para el estudio. Se trató a 58 pacientes
15 con G-PCD y a 51 con glicerol. Los productos se administraron en forma de aerosoles (3 en cada aplicación del tratamiento), 2-3 veces al día durante un período máximo de 21 días.

Los parámetros estudiados fueron: 1. El efecto sobre la
20 congestión nasal y la rinorrea; 2. El efecto sobre el dolor producido por la presión alrededor de la superficie del seno nasal; 3. El estado general del paciente con respecto a la infección en los senos; y 4. La influencia en la terapia con antibióticos. Los resultados registrados después de 30 minutos,
25 3 días y 7 días, mostraron una reducción significativamente mayor de los síntomas en el grupo de G-PCD en comparación con el grupo de glicerol para la congestión nasal (-31,02 %, -57,23 % y -73,79 % en comparación con -20,40 %, -19,09 % y -30,25 %), dolor sinusal (-6,91 %, -79,02 % y -85,18 % en comparación
30 con -1,69 %, -8,36 % y -53,36 %), y el estado general de la rinosinusitis (-4,15 %, -69,84 % y -79,89 % en comparación con -22,56 %, +3,52 % y -17,62 %) (Fig.7). La intensidad de la

secreción nasal se incrementó en hasta en un 164,79 % en el grupo de G-PCD comparación con sólo el 31,71 % en el grupo de glicerol en los 30 minutos posteriores a la primera administración del producto. Estos resultados indican que G-PCD ejerce una presión osmótica muy alta en comparación con glicerol en condiciones idénticas, lo que lleva a la ruptura de la biopelícula y a la abertura de los senos. Solo el 21 % pacientes en el grupo de G-PCD requirió tratamiento antibiótico durante un promedio de 7,41 días en comparación con el 40 % en el grupo de glicerol durante un período de 10,5 días (Fig. 8). Estos resultados indican claramente que el glicerol filmógeno permanece sobre la superficie de la mucosa nasal durante un periodo de tiempo más largo en comparación con la solución de glicerol estándar.

Estudio 5: Comparativa de las propiedades de formación de película y osmóticas de glicerol solo en comparación con glicerol que contiene 1 % de PCD vegetales (composición de glicerol filmógeno como en la preparación nº 2 del ejemplo 5 (Orosol)) sobre lesiones de mucositis oral

Las lesiones de mucositis oral inducida por quimioterapia y radioterapia muestran una mucosa oral muy dañada, con infección y la presencia de sustancias químicas tóxicas en la lesión. Esto causa dolor intenso, sensación de ardor y dificultad para comer. Entre un total de 69 pacientes incluidos en el estudio, 48 fueron tratados con la solución Orosol y 21 con un aerosol de glicerol. El producto se aplicó 4-5 veces al día durante un período de 28 días. El grado de la mucositis en general, la intensidad del dolor y la sensación de ardor, la formación de nuevas úlceras y el efecto sobre el deterioro para comer se evaluaron evaluados antes del tratamiento, 30 minutos después de la primera aplicación del producto y a los 1, 2, 3, 4, 7,

14, 21 y 28 días. se observó una diferencia estadísticamente significativa en la cicatrización de la mucositis en el grupo de Orosol en comparación con el grupo de glicerol (Fig. 9). La duración de la actividad de Orosol fue casi 3 veces mayor en comparación con el glicerol solo en el grupo de control, con un incremento proporcional de los efectos curativos. El glicerol filmógeno atrae líquido hipotónico durante un período de tiempo mucho más largo, limpia la lesión, y ayuda a estimular la recuperación.

10

Los resultados de estos 5 estudios clínicos demuestran que:

1. El glicerol que contiene PCD vegetal forma una película altamente osmótica y duradera sobre las superficies dañadas y la mucosa en comparación con el glicerol solo.

15

2. Los efectos de limpieza sobre la superficie dañada son directamente proporcionales a la duración de la retención de la película de glicerol osmótico sobre la lesión.

3. La exudación osmótica de líquido hipotónico elimina todos los contaminantes que flotan libremente, independientemente de la naturaleza del contaminante, debido a las propiedades no farmacológicas pero mecánicas de la película osmóticamente activa.

20

4. El glicerol filmógeno que contiene PCD es seguro y no irritante.

25

