



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 282 101**

(51) Int. Cl.:

A61K 36/9066 (2006.01)

A61K 31/12 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00921582 .3**

(86) Fecha de presentación : **07.04.2000**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1171144**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2002**

(54) Título: **Uso de tetrahidrocurcuminoides para regular sucesos fisiológicos y patológicos en la piel y las mucosas.**

(30) Prioridad: **09.04.1999 US 128540 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

(73) Titular/es: **Sabinsa Corporation**
Unit 6, 121 Ethel Road West
Piscataway, New Jersey 08854, US
Sami Chemicals and Extracts (P) Ltd.

(72) Inventor/es: **Majeed, Muhammed y**
Badmaev, Vladimir

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de tetrahidrocurcuminoides para regular sucesos fisiológicos y patológicos en la piel y las mucosas.

5 Antecedentes de la invención

Una célula del cuerpo debe su funcionamiento en gran parte a su citoesqueleto, el entramado estructural de la célula. El citoesqueleto está formado por componentes del citoplasma que mantienen la forma de la célula, estabilizan las fijaciones de la célula a las células vecinas, y facilitan funciones especializadas de la célula tales como endocitosis, exocitosis y motilidad celular. El citoesqueleto incluye varias estructuras filamentosas como microtúbulos, microfilamentos, filamentos intermedios, y red microtrabecular. Las proteínas que participan en la formación de un citoesqueleto, especialmente las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPS) después de ser fabricadas por la célula, se adaptan ulteriormente a la función del citoesqueleto en un proceso denominado modificación post-traducciona, o reticulación. Este proceso de reticulación de proteínas es esencial para estabilizar el citoesqueleto, el suceso necesario para mantener la homeostasis de la célula, los procesos fisiológicos, y el desarrollo y la maduración celulares.

La modificación post-traducciona de las proteínas implica varias reacciones químicas. La fosforilación de las proteínas ilustra uno de los mecanismos más comunes de modificación posterior a la traducción de las proteínas celulares. Otros ejemplos incluyen metilesterificación de proteínas, ribosilación de ADP, glicosilación de proteínas, acetilación de histonas, formación de hipusina y reacciones catalizadas por transglutaminasas.

El potencial eléctrico de una célula es un aspecto de la fisiología celular importante para la comprensión del mecanismo de la invención. El potencial eléctrico de una célula se mantiene por un equilibrio complejo entre moléculas cargadas negativa y positivamente que da como resultado un potencial fisiológico en reposo en el interior de la célula de aproximadamente -70 mV. Este valor es indicativo del bienestar de la célula. Por el contrario, la incapacidad de la célula para mantener un potencial óptimo en reposo se produce en condiciones patológicas, v.g. agresiones físicas o químicas, un proceso de enfermedad, y el deterioro y desgarró debidos al envejecimiento. El potencial óptimo en reposo conduce a los procesos fisiológicos que incluyen modificación de proteínas post-traducciona y reticulación. Es cierto también que la reticulación fisiológica intacta de las proteínas es indicativa de la capacidad de una célula para mantener el potencial eléctrico óptimo en reposo.

Efectos positivos de la reticulación

La reticulación de las proteínas, como se ha mencionado previamente, es un resultado de la modificación post-traducciona de las proteínas. Algunas de las reticulaciones más comunes identificadas en las proteínas que forman el citoesqueleto son N-ε-(γ-glutamil)lisina y N,N-bis(γ-glutamil)poliamina. La formación de estos dos tipos de reticulaciones es facilitada por la actividad catalítica de un grupo de enzimas conocidas como transglutaminasas. Una de las transglutaminasas bien conocidas en el cuerpo es la proteína de la coagulación Factor XIII. Este Factor causa la reticulación de la fibrina, que actúa como agente estabilizador en la formación de los coágulos de sangre. Este tipo de modificación es un ejemplo de un mecanismo salvador de vidas basado en la reticulación de proteínas, que impide el desangrado en un corte o una herida.

Las transglutaminasas son responsables de facilitar un proceso fisiológico de reticulación de proteínas, que en condiciones normales conduce a la diferenciación celular, con lo cual la célula es capaz de desempeñar su función, v.g. como célula secretora de mucus, célula fagocítica, célula epitelial y célula tegumentaria que protege la estructura tisular. La actividad de las transglutaminasas, o su ausencia, juega un papel crítico en la diferenciación de las células del cáncer, especialmente en el cáncer de piel melanoma. El melanoma es un cáncer que se propaga rápidamente, constituido por células indiferenciadas de la piel, y el grado de deterioro de la diferenciación celular está correlacionado con la actividad suprimida de las transglutaminasas. Por otra parte, la inducción experimental de la actividad de transglutaminasas ha conducido a resultados prometedores en la ralentización o la inversión de la progresión del melanoma. Ejemplos de inductores de transglutaminasas son ácido retinoico y metilxantinas. Parece ser que el potencial terapéutico de los retinoides en el melanoma está relacionado con su capacidad para activar las transglutaminasas intracelulares.

55 *Reticulación perjudicial*

Sin embargo, la reticulación de las proteínas intracelulares no siempre es un suceso positivo. Cuando una reticulación aleatoria y masiva es precipitada por un estímulo brusco, no fisiológico, se produce un envejecimiento acelerado de la célula. Debido a la naturaleza de la reticulación aleatoria, que desafía el propósito de la organización y diferenciación celular, esto puede conducir no sólo a envejecimiento y muerte prematuras de la célula, sino que puede conducir también a una patología, con inclusión de enfermedades malignas. Por ejemplo, los radicales libres generados por los rayos UVA en las células de la piel pueden causar una reticulación prematura de proteínas y liberación de enzimas proteolíticas. Este último suceso conduce a la destrucción del citoesqueleto, y el deterioro rápido de la organización celular que pone en compromiso el funcionamiento de la célula.

Es especialmente interesante mencionar aquí el término lipofusina, apodado “el pigmento de envejecimiento” o “manchas hepáticas”, que ocurre en la epidermis y las membranas mucosas probablemente como resultado del metabolismo celular y sistémico alterado. Se ha demostrado que la lipofusina es resultado de la degeneración por oxidación

de la mitocondria y/o los lisosomas en las células. Se postula que la lipofuscina es resultado de un error metabólico que conduce a hipoanabolismo combinado con hipercatabolismo. Se postula aquí que la formación de lipofuscina es en parte una manifestación del proceso alterado de modificación post-traducciona de las proteínas, y que este proceso se intensifica con cualquier proceso de enfermedad sistémica, con inclusión del proceso del envejecimiento.

Técnica afín

Como se ha mencionado previamente, las transglutaminasas son responsables de facilitar el proceso fisiológico de reticulación de las proteínas, que en condiciones normales conduce a la diferenciación, maduración y envejecimiento oportuno de las células. Existen pruebas considerables de que la actividad intracelular de las transglutaminasas puede ser inhibida en ciertas patologías, por ejemplo patologías malignas, v.g. el melanoma. Parece ser que el potencial terapéutico de los inductores de transglutaminasas como retinoides y metilxantinas en el melanoma está relacionado con su capacidad para activar las transglutaminasas intracelulares. Esto podría conducir a su vez a la diferenciación de las células, lo cual en la práctica clínica conduciría a una ralentización del proceso de enfermedad debido a una disminución en el número de células malignas indiferenciadas.

Los derivados de curcumina, con inclusión de tetrahidrocurcumina y curcuminoides están bien reconocidos en la bibliografía como un grupo de antioxidantes fenólicos (Majeed *et al.* Curcuminoid Book). Majeed *et al.*, Patente U.S. No. 5.861.415 establecieron que la combinación de curcuminoides existentes naturalmente aislados de la raíz de cúrcuma, es decir curcumina, desmetoxi-curcumina y bisdesmetoxi-curcumina producen una extensa gama de protección antioxidante descrita como acción bioprotectora. La acción bioprotectora, caracterizada por la prevención de la formación de radicales libres y la intervención en la eliminación de los radicales libres, es ejercida por los tetrahidrocurcumin(o)ides (THC) así como curcumin(o)ides (Majeed *et al.*, *Tumeric and the Healing Curcuminoids*, Keats Publications, 1996 y Majeed *et al.*, *Curcuminoids Antioxidant Phytonutrients*, NutriScience Publishers 1995). Sin embargo, los tetrahidrocurcumin(o)ides exhiben propiedades superiores de eliminación de los radicales libres, en comparación con la curcumina o los curcuminoides (Majeed *et al.*, Curcuminoid Book). Otra ventaja de los tetrahidrocurcuminoides es que los mismos no son curcuminoides tan fuertemente coloreados y por consiguiente pueden aplicarse tópicamente sin manchar sensiblemente.

Recientemente, se ha encontrado que la curcumina, pero no la tetrahidrocurcumina, tiene un efecto preventivo sobre la reticulación del colágeno en las ratas diabéticas. (Sajithlal GB, Chithra P, Chandrakasan G., Biochem Pharmacol 1998 Dec 15; 56(12): 1607-14). Sin embargo, el efecto anti-reticulación de la curcumina se alcanzaba con una dosis oral muy alta del compuesto (200 mg/kg de peso corporal). Se observó también que el efecto preventivo de la curcumina sobre la reticulación avanzada del colágeno era más acusado que su efecto terapéutico. Los autores de este estudio explicaron que el mecanismo anti-reticulación de la curcumina es debido a la extinción de los radicales libres, lo cual a su vez impediría la reticulación acelerada del colágeno en la diabetes. Este estudio soporta el uso de la curcumina para prevenir y en cierto grado tratar la reticulación excesiva de las proteínas en afecciones caracterizadas por una reticulación acelerada tales como la diabetes.

Descripción de la invención

La invención es adecuada para un método de tratamiento de un estado premaligno o una enfermedad maligna en un paciente que comprende administrar una cantidad eficaz de una mezcla de tetrahidrocurcuminoides a un paciente que presenta un estado premaligno o una enfermedad maligna, en particular para un método en el cual dicha enfermedad maligna es melanoma.

Por consiguiente, un aspecto de la invención es el uso de una cantidad eficaz de una mezcla de tetrahidrocurcuminoides para la fabricación de un medicamento para tratar el melanoma.

La invención es adecuada también en un método para reducir las "manchas de la edad" debidas a la formación de lipofuscina en un paciente que precisa dicho tratamiento, que comprende administrar una cantidad eficaz de una mezcla que comprende 75-85% de tetrahidrocurcumina, 10-20% de tetrahidrodesmetoxi-curcumina, 2,0-4,5% de tetrahidrobisdesmetoxi-curcumina a dicho paciente,

en particular para un método en el cual dicha composición se administra tópicamente.

Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención es el uso de una cantidad eficaz de una mezcla de tetrahidrocurcuminoides para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las manchas de la edad debidas a la formación de lipofuscina.

El mecanismo de la invención estriba en preservar la homeostasis y el funcionamiento de las células basado en su efecto regulador, tanto inhibidor como estimulante, de la reticulación de las proteínas intracelulares. Este mecanismo regulador, desconocido previamente para curcumina y sus derivados, no está relacionado tampoco con las bien investigadas y descritas propiedades antioxidantes de la curcumina o los curcuminoides y tetrahidrocurcumina o tetrahidrocurcuminoides. Dicho mecanismo es una nueva vía de realización de un efecto regulador amplio en procesos biológicos. Un efecto regulador comparable sobre la reticulación de las proteínas en el organismo no había sido descrito previamente con ningún compuesto simple o con productos compuestos. En esencia, la invención difiere de otros compuestos que afectan al proceso de la reticulación en el sentido de que los compuestos descritos previamente es-

timularían o inhibirían la reticulación intracelular, mientras que la invención podría actuar como un modificador de la reticulación (CLM) o “cros-regulina”. Estos términos se utilizan aquí por primera vez con objeto de describir el mecanismo de la invención. Los términos CLM o cros-regulina indican que una composición de la presente invención ejerce una influencia positiva sobre el proceso de modificación y reticulación post-traducciona

5 tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas. El efecto CLM de la invención se consigue por utilización de una composición específica del producto como se describe en la sección “Process of Obtaining THC”. El mecanismo ocurre también con modificaciones de la molécula THC, por ejemplo éter-THC, trimetil-éter-THC, dimetil-éter-THC, bencil-éter-THC y sales de potasio, magnesio y cobre de THC. El mecanismo de la invención se ha demostrado en condiciones experimentales *in vivo* tales como la prevención del eritema solar por UV y la reticulación

10 (porcentaje de células dímeras de timina) en las células de la piel expuestas a radiación UV. Las propiedades biológicas de la invención se compararon con las de los curcuminoides, y a pesar del hecho de que la presente composición está desprovista de color amarillo, produce todavía efectos protectores comparables contra la radiación UV a los de los curcuminoides amarillos. Esta actividad parece ser diferente de los efectos antioxidantes característicos de THC y curcuminoides.

15 *Lo que sigue describe el mecanismo de la invención en forma detallada:*

1. Se propone que en estados fisiológicos caracterizados por una modificación post-traducciona

20 las proteínas, la reticulación de las proteínas, así como el potencial eléctrico óptimo de la célula, THC no interferiría con los estados de bienestar celular ilustrados anteriormente.

2. Sin embargo, en los estados caracterizados por una diferenciación morfológica y funcional deficiente de las células, v.g. estados pre-malignos o de malignidad, THC podría contribuir a la modificación y reticulación post-traducciona

25 las proteínas, y a la optimización del potencial eléctrico celular. Esto ocurriría por interacción entre los anillos fenólicos y los enlaces olefínicos de THC y NH₂ así como grupos COO de los aminoácidos de las proteínas. Los enlaces resultantes actuarían como un “ancla” que iniciaría la reticulación con otras proteínas.
- 3. En los estados de envejecimiento celular y en los estados en que la reticulación aleatoria es precipitada por una lesión térmica debida a la acción de rayos UV, por ejemplo, el proceso indeseado podría ser evitado por la invención. THC impediría la reticulación indeseada por fijarse a los grupos amino y carboxi de los aminoácidos de las proteínas. Esto daría como resultado una interferencia con la reticulación aleatoria, un mecanismo comparable a una acción de “tamponamiento”. Esta acción de “tamponamiento” podría detener eficazmente la reacción en cadena que conduciría en caso contrario al deterioro de la homeostasis celular,

30 el envejecimiento prematuro y la muerte prematura de la célula.

- 4. La invención tiene también un mecanismo de soporte en la prevención de la reticulación aleatoria de las proteínas intracelulares que está basado en las propiedades antioxidantes de THC, específicamente en la capacidad de la invención para eliminar los radicales libres. Se sugiere que debido a esta acción antioxidante, la invención podría facilitar la alteración de las cargas eléctricas de las moléculas de proteína “sobrecargadas”, que es una de las razones por las cuales se acelera la reticulación aleatoria. Este mecanismo combinado de cros-regulina y acción antioxidante es particularmente aplicable en la prevención de las “manchas de la edad” debidas a la formación de lipofuscina y afecciones inflamatorias tales como la psoriasis.

40

- 5. La fuente de restos oxígeno en THC para fijación a grupos NH₂ o COO procedería del grupo para-hidroxilo que ya no está en conjugación con el enlace olefínico, y de los grupos hidroxilo de los anillos fenólicos.
- 6. Al contrario que la curcumina o el o los compuestos curcuminoides, la o las moléculas de THC puede (n) rotar más libremente, proporcionando así un mejor acceso a los grupos reactivos para reacciones de “anclaje” y/o “tamponamiento”.

50

- 7. Mientras que, como se ha mencionado previamente, la invención es relativamente inactiva en estados de fisiología celular, su mecanismo de cros-regulina se expresaría gradualmente de modo proporcional al grado de estrés que actúa sobre la célula. Así, el mecanismo de cros-regulina de THC en el sistema biológico dependería de la clase de acción agresiva experimentada por el sistema biológico.

55

Proceso de obtención de THC:

60 Los tetrahidro-curcuminoides de la invención son productos de la reducción química de los curcuminoides, obtenidos a partir de los rizomas de *Curcuma longa*, conocida comúnmente como cúrcuma, o cualquier otra planta adecuada de la familia botánica Zingiberáceas.

La técnica anterior enseña que cuando los curcuminoides obtenidos de *Curcuma longa* se reducen catalíticamente y se aíslan luego en el proceso de cristalización, se recupera la tetrahidrocurcumina (THC) sin pérdida, pero con pérdidas sustanciales de tetrahidrobisdesmetoxi-curcumina (THBDC) y tetrahidrodesmetoxi-curcumina (THDC). Como resultado, la relación entre los tetrahidrocurcuminoides se modifica significativamente en comparación con la relación original de los compuestos de procedencia, los curcuminoides. Se prefiere la relación de curcuminoides, dado que

ES 2 282 101 T3

la misma está correlacionada con la actividad biológica óptima de los curcuminoides. La Patente U.S. No. 5.861.415 describe curcuminoides en una relación específica y óptima como bioprotectores, que proporcionan un efecto protector máximo de la célula viva.

- 5 La presente invención proporciona un método nuevo y más eficiente de recuperación de THC's. Este proceso evita la pérdida de TBDMC y TDMC, y proporciona una composición bioprotectora de THC's.

10	THCCurcuminoides	Contenido, % en la técnica anterior	Contenido, % en la invención
	Tetrahidro-curcuminoides	90	75-85
	Tetrahidro-desmetoxi-curcumina	9	10-20
15	Tetrahidro-bisdesmetoxi-curcumina	1	2-4,5

Breve reseña del proceso de la técnica anterior para producir THC's

20	Curcuminoides naturales (95%)	- 100 g
	Acetona	- 1 litro
	Pd-C (catalizador) 5%	- 2,5 g

- 25 La solución de curcuminoides naturales se cargó a un hidrogenador. Se añadió cuidadosamente el catalizador y se mantuvo la presión de hidrógeno a aproximadamente 2 kg/cm². Esta reacción se completa en 3 a 4 horas. El catalizador se filtra luego y se separa. La solución acetónica se concentra a vacío. El residuo se cristaliza en toluenos. Los tetrahidro-compuestos se separan cristalizados como un polvo blanco de color crema que tiene un punto de fusión de 92-94°C.

Proceso de la presente invención

- 35 Este proceso utiliza un nuevo método de saturación de dos enlaces olefínicos en los curcuminoides por la reacción catalítica de transferencia de hidrógeno conocida como reacción de transferencia de hidruro. Lo que sigue es un ejemplo de un método de transferencia de hidruro.

- 40 1. Un matraz de 3 litros con fondo redondo, provisto de agitador y condensador de reflujo, se cargó con 1 litro de acetato de etilo.
2. La solución se cargó con 250 g de curcuminoides naturales en una composición de Bioprotector descrita previamente, es decir curcumina (C) 70-80%, desmetoxi-curcumina (DMC) 15-20% y bisdesmetoxi-curcumina (BDMC) 2,5-6,5% y se agitó hasta uniformidad a la temperatura ambiente.
- 45 3. Se cargó esta mezcla con 1 litro de trietilamina seguido por 12 g de paladio-carbono y 80 ml de ácido fórmico.
4. La mezcla se agitó y se calentó a reflujo subsiguientemente a 80 grados Celsius durante 12 horas.
- 50 5. Se cargó periódicamente ácido fórmico en partes alícuotas de 5 ml con intervalos de 2 horas mientras se efectuaba un calentamiento a reflujo.
6. Se realizó una TLC para monitorizar la terminación de la reacción. (Sistema: placas de sílice pre-recubiertas de 0,25 mm de espesor/cloroformo: metanol = 9:1).
- 55 7. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se enfrió a la temperatura ambiente. Se filtró para separar el catalizador de paladio y se lavó con 50 ml de acetato de etilo.
8. Se separaron por destilación acetato de etilo y trietilamina (se recogieron dos litros de destilado).
- 60 9. La masa bruta se extrajo luego con tolueno (3 x 500 ml).
10. El extracto toluénico se lavó con 200 ml de HCl al 5% y 3 x 500 ml de agua, y se secó sobre sulfato de sodio.
- 65 11. Se separó el disolvente a vacío para obtener una pasta de color amarillo pálido en una cantidad aproximada de 200 g.

10

15

20

25

30

25

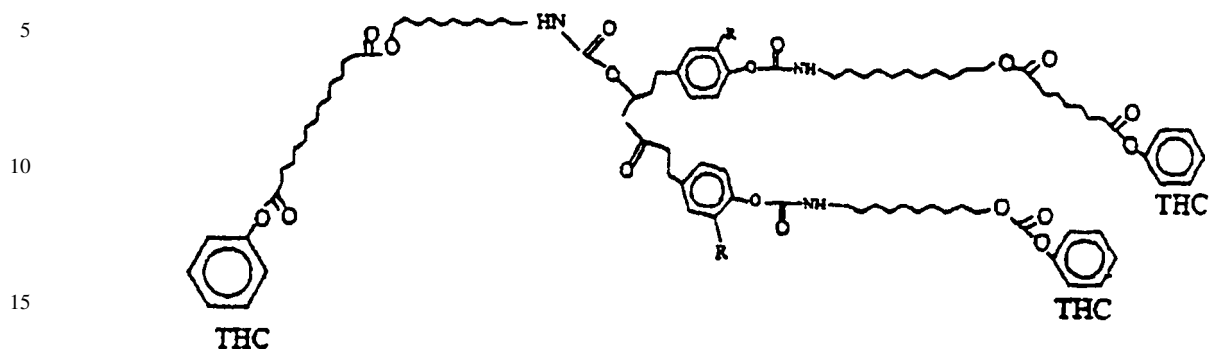
40

45

50



Molécula de THC que actúa como tampón para la prevención de las reticulaciones aleatorias en las reticulaciones precipitadas por UV. Este mecanismo podría contribuir a la prevención de las reticulaciones patológicas:



Leyenda:

~~~~~ : aminoácido/proteína

## INTRODUCCIÓN

El estudio se diseñó para determinar la toxicidad oral aguda de la **Curcumina Descolorida** para ratas Sprague Dawley. Las directrices fueron como ha sido prescrito en The Gaitonde Committee Guidelines, CIB, Nueva Delhi.

PROYECTO NO. 4952

## MATERIALES Y MÉTODOS

### SUSTANCIA DE ENSAYO:

Patrocinador : Sami Chemicals and Extracts Ltd., Bangalore  
Etiqueta de la muestra : Curcumina Descolorida  
Lote No.- CRC/65  
A R No.- BL8C 0445

Descripción : Polvo cristalino blanco cremoso  
Identificación : Espectro IR: Cumple  
Solubilidad : Soluble en metanol  
Pureza por HPLC : 99,0%

PROYECTO NO. 4952

## SUMARIO

## ES 2 282 101 T3

El estudio aquí consignado se diseñó para determinar la toxicidad oral aguda de la *Curcumina Descolorida* en las ratas Sprague Dawley. La sustancia de ensayo suspendida en aceite de maíz se administró por vía oral a las ratas. Se observaron las ratas durante 14 días después del tratamiento en lo referente a los síntomas relacionados con el producto. La sustancia de ensayo causó producción de saliva en todos los animales y poliurea en dos animales con comienzo a las 2 horas del tratamiento. Todos los animales sobrevivieron a lo largo del periodo de estudio de 14 días y estaban exentos de indicios de intoxicación 24 horas después del tratamiento.

Se encontró que el valor  $DL_{50}$  de la *Curcumina Descolorida* en las ratas por vía oral era mayor que 5.000 mg/kg.

PROYECTO NO. 4952

### SISTEMA DE ENSAYO

|                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Especie                        | : rata                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Variedad                       | : Sprague Dawley                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Procedencia                    | : Casa de animales I.I.T.                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Sexo                           | : Machos y Hembras                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Edad                           | : 6 a 8 semanas                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Intervalo de peso              | : 120,5 a 141,9 gramos                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| No. de animales por dosis      | : 5 por sexo                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Aleatorización                 | : Se seleccionaron aleatoriamente en grupos de cinco del mismo sexo en el momento de iniciación del estudio                                                                                                                                                                              |
| Aclimatación                   | : No se realizó, dado que los animales se criaron y reprodujeron en el mismo Instituto.                                                                                                                                                                                                  |
| Identificación de los animales | : Por número de jaula y marcación individual en la piel.                                                                                                                                                                                                                                 |
| Dieta                          | : Pienso en pélets suministrado por Nav Maharashtra Chakan Oil Mills Ltd., Pune.                                                                                                                                                                                                         |
| Agua                           | : Agua pura Aquaguard en botellas de vidrio, <i>ad libitum</i> .                                                                                                                                                                                                                         |
| Gestión                        | : Las ratas se alojaron en jaulas de polipropileno provistas con camas de bagazo, distribuidas en 5 individuos del mismo sexo en cada jaula. La temperatura se mantuvo entre 20 y 24°C y la humedad relativa entre 50 y 60%; se mantuvieron ciclos de 12 horas de oscuridad y 12 de luz. |
| Ruta                           | : Sonda esofágica oral                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Vehículo utilizado             | : Aceite de maíz                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Volumen de dosis               | : 10 ml/kg                                                                                                                                                                                                                                                                               |

---

### PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

---

La sustancia de ensayo, suspendida en aceite de maíz, se administró una sola vez en cada caso por sonda esofágica oral a ratas de ambos sexos. Las ratas se mantuvieron en ayunas durante 16 horas antes y 2 horas después de la administración de la sustancia de ensayo. Los animales se observaron durante 14 días después de la dosificación en cuanto a síntomas tóxicos relacionados con el producto, y mortalidad. Se realizó necropsia en los animales que murieron durante el periodo de observación. Al final del periodo de observación, se sacrificaron los animales de ensayo supervivientes, se disecaron y se examinaron respecto a anomalía patológica importante, en su caso.

## ES 2 282 101 T3

DL<sub>50</sub> en las ratas

Se asignaron 10 ratas (5 machos y 5 hembras) para el tratamiento como sigue:

| Grupo No. | No. de ratas por sexo | Dosis (mg/kg) |
|-----------|-----------------------|---------------|
| 1         | 5                     | 5000          |

PROYECTO No. 4952

### RESULTADOS

DL<sub>50</sub> en las ratas

| Grupo No. | Dosis (mg/kg) | No. de animales muertos<br>No. de animales tratados | Mortalidad |
|-----------|---------------|-----------------------------------------------------|------------|
| 1         | 5000          | 0/10                                                | 0          |

### Síntomas

Grupo 1 - Se observaron salivación en todos los animales y poliurea en dos animales que comenzaron a las dos horas del tratamiento. Todos los animales sobrevivieron a lo largo del periodo de estudio de 14 días y estaban exentos de indicios de intoxicación 24 horas después del tratamiento.

Hallazgos en la necropsia: no pudo apreciarse cambio significativo alguno a simple vista.

DL<sub>50</sub>: Mayor que 5000 mg/kg

### Tabla de Mortalidad

| Gr.<br>No. | Dosis<br>mg/kg | Mortalidad |   |   |    |     |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | No. de animales muertos<br>No. de animales tratados |  |
|------------|----------------|------------|---|---|----|-----|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|-----------------------------------------------------|--|
|            |                | Horas      |   |   |    | Día |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |                                                     |  |
|            |                | 2          | 4 | 6 | 24 | 2   | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |                                                     |  |
| 1          | 5000           | 0          | 0 | 0 | 0  | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0/10                                                |  |

PROYECTO No. 4953

### SUMARIO

El estudio se diseñó para determinar el potencial de irritación primaria de la piel de la *Curcumina Descolorida* suministrada por *Sami Chemicals and Extracts, Ltd., Bangalore*. La sustancia de ensayo se aplicó en la cantidad de 500 mg a la piel esquilada del lomo en sitios tanto intactos como raspados de tres conejos por sexo. Cada sitio de aplicación se observó cuidadosamente y se evaluó la reacción de acuerdo con el método de Draize a las 24 y 72 horas.

La *Curcumina Descolorida* no causaba irritación a la piel de los conejos.

Registro de irritación primaria de la piel = 0,00

**MATERIALES Y MÉTODOS****SUSTANCIA DE ENSAYO:**

Patrocinador : Sami Chemicals and Extracts, Ltd., Bangalore.

Marca sobre la Muestra : Curcumina descolorida

Lote No. – CRC/65

A R No. – BL8C 0445

Descripción : Polvo cristalino blanco cremoso

Identificación : Espectro IR: Cumple

Solubilidad : Soluble en metanol

Pureza por HPLC : 99,0%

PROYECTO No. 4953

**SISTEMA DE ENSAYO**

Especie : Conejo

Variedad : Blanco de Nueva Zelanda

Procedencia : Serum Institute of India Ltd., Pune.

Sexo : Machos y Hembras

Edad: : Adulto sano

Intervalo de peso : 2,00 a 2,40 kg

No. de animales por dosis : 3 por sexo

Aleatorización : Seleccionados aleatoriamente en grupos de tres del mismo sexo en el momento de iniciación del estudio.

Aclimatación : Periodo de 7 días antes del tratamiento

Identificación de los animales : Por número de jaula y marcación individual en la oreja

Dieta : Pienso en pélets suministrado por Nav Maharashtra Chakan Oil Mills Ltd., Pune.

Agua: : Agua pura Aquaguard en botellas de vidrio *ad libitum*

Gestión: Los conejos se alojaron individualmente cada uno, en jaulas de acero inoxidable provistas de fondo de malla de acero inoxidable. La temperatura se mantuvo entre 20 y 23°C y la humedad relativa entre 50 y 60%; se mantuvo un ciclo de 12 horas de oscuridad y 12 de luz.

Ruta : Dérmica

Volumen de dosis : 500 mg/sitio.

PROYECTO NO. 4953

**PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

Se utilizaron para este estudio tres conejos por sexo. Se cortó el pelo de ambos francos por medio de tijeras de esquila eléctrica un día antes del tratamiento. Se aplicó la sustancia de ensayo en la cantidad de 500 mg a los sitios de la piel intactos y raspados de cada animal de ensayo. Se tuvo cuidado a fin de comprobar que los raspados atravesaban el *Stratum corneum* pero no la dermis. Se fijó un parche de gasa sobre cada área tratada por medio de cinta adhesiva. Los animales se alojaron individualmente provistos de collares de plástico alrededor de sus cuellos durante 24 horas, a fin de evitar la ingestión de la sustancia de ensayo. El parche y la sustancia de ensayo no absorbida se retiraron al cabo de 24 horas. Cada sitio de aplicación se observó cuidadosamente y se evaluó la reacción de acuerdo con el método de Draize a las 24 y 72 horas.

## **Evaluación de Draize de las Reacciones de la Piel - Clasificación de la reacción de la piel**

|    |                                                                                                          |   |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| 1. | Eritema y Formación de Escaras                                                                           |   |
|    | Ausencia de eritema .....                                                                                | 0 |
|    | Eritema muy ligero (apenas perceptible) .....                                                            | 1 |
|    | Eritema bien definido .....                                                                              | 2 |
|    | Eritema moderado a severo .....                                                                          | 3 |
|    | Eritema severo (rojez de remolacha) hasta formación<br>ligera de escaras (lesiones en profundidad) ..... | 4 |
|    | Registro total máximo posible de eritema: 4                                                              |   |

|    |                                                                                               |   |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| 2. | Formación de edema                                                                            |   |
|    | Ausencia de edema .....                                                                       | 0 |
|    | Edema muy ligero (apenas perceptible) .....                                                   | 1 |
|    | Edema ligero (bordes del área bien definidos por<br>levantamiento definido .....              | 2 |
|    | Edema moderado (levantado aproximadamente 1 mm)....                                           | 3 |
|    | Edema severo (elevado más de 1 mm y que se extendía<br>más allá del área de exposición) ..... | 4 |
|    | Registro total de edema máximo posible: 4                                                     |   |

PROYECTO NO. 4953

---

## **RESULTADOS**

---

## ES 2 282 101 T3

*Sumario del registro de irritación dérmica individual después de la aplicación de la Curcumina Descolorida en conejos*

| CONEJO<br>No. | SEXO   | RASPADA  |       |          |       | INTACTA  |       |          |       |
|---------------|--------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|
|               |        | 24 Horas |       | 72 Horas |       | 24 Horas |       | 72 Horas |       |
|               |        | Eritema  | Edema | Eritema  | Edema | Eritema  | Edema | Eritema  | Edema |
| 1             | Macho  | 0        | 0     | 0        | 0     | 0        | 0     | 0        | 0     |
| 2             | Macho  | 0        | 0     | 0        | 0     | 0        | 0     | 0        | 0     |
| 3             | Macho  | 0        | 0     | 0        | 0     | 0        | 0     | 0        | 0     |
| 4             | Hembra | 0        | 0     | 0        | 0     | 0        | 0     | 0        | 0     |
| 5             | Hembra | 0        | 0     | 0        | 0     | 0        | 0     | 0        | 0     |
| 6             | Hembra | 0        | 0     | 0        | 0     | 0        | 0     | 0        | 0     |
| Total         |        | 0        | 0     | 0        | 0     | 0        | 0     | 0        | 0     |
| Valor medio   |        | 0        | 0     | 0        | 0     | 0        | 0     | 0        | 0     |
| Gran total    |        | 0        |       |          |       |          |       |          |       |

Registro de irritación primaria de la piel  $0,00/4 = 0,00$

PROYECTO No. 4953

### **CONCLUSION**

Basándose en el presente estudio, se llega a la conclusión que la sustancia de ensayo **Curcumina Descolorida** suministrada por **Sami Chemicals and Extracts Ltd., Bangalore**, no causaba irritación a la piel en los conejos.

Registro de irritación primaria de la piel: 0,00

(Rubricado)

DR. R.M. BHIDE

DIRECTOR DEL ESTUDIO

## ES 2 282 101 T3

*Efecto de eliminación (%) de la curcumina y sus derivados sobre el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo*

| Compuesto                 | Concentración (µg/ml) |             |             |
|---------------------------|-----------------------|-------------|-------------|
|                           | 32,8                  | 16,4        | 8,2         |
| Curcuminoides, muestra 1  | 88,09 ± 0,4           | 83,04 ± 1,5 | 51,20 ± 0,9 |
| Curcuminoides, muestra 2  | 88,71 ± 0,4           | 81,51 ± 0,1 | 53,60 ± 1,6 |
| Tetrahidrocurcumina       | 88,17 ± 0,9           | 83,00 ± 0,7 | 65,76 ± 0,9 |
| Tetrahidrocurcumina (NTC) | 87,39 ± 0,4           | 82,30 ± 1,4 | 68,61 ± 0,8 |
| Tetrahidrocurcumina (STC) | 84,07 ± 2,0           | 77,13 ± 0,8 | 56,53 ± 0,7 |

\* NTC: natural; STC: sintética.

*Efecto de la aplicación tópica de curcumina y tetrahidrocurcumina sobre la formación de dímeros de timina inducida por luz ultravioleta B en la epidermis de los ratones*

| Tratamiento                  | Número<br>por grupo | Porcentaje de células con<br>dímeros de timina | Porcentaje de<br>protección |
|------------------------------|---------------------|------------------------------------------------|-----------------------------|
| 1. Sin UVB                   | 3                   | 0                                              | –                           |
| 2. Acetona + UVB             | 7                   | 8,9 ± 0,02                                     | 0                           |
| 3. THC (10 µmol) + UVB       | 6                   | 7,3 ± 0,03                                     | 24,7                        |
| 4. THC (20 µmol) + UVB       | 6                   | 1,6 ± 1,30                                     | 82,0                        |
| 5. Curcumina (10 µmol) + UVB | 5                   | 1,6 ± 0,01                                     | 82,0                        |
| 6. Curcumina (20 µmol) + UVB | 5                   | 1,2 ± 1,69                                     | 86,5                        |

Ratones hembra SKH-1 (de 8 a 9 semanas de edad) se trataron tópicamente con 100 µl de acetona, o compuesto de ensayo en 100 µl de acetona. Cinco minutos después, se irradiaron los ratones con una sola dosis de UVB (30 mJ/cm<sup>2</sup>). Los ratones se sacrificaron una hora después, y las muestras de piel se guardaron en un tampón de formalina-fosfato al 10% para el ensayo de los dímeros de timina.

## ES 2 282 101 T3

*Efecto de la formación de células de eritema solar de la piel inducido por UVB en la epidermis de los ratones*

| Tratamiento                            | Número<br>por grupo | Porcentaje de células<br>con eritema solar | Porcentaje de<br>inhibición |
|----------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------|-----------------------------|
| Sin UVB                                | 5                   | 0,1                                        | –                           |
| Acetona + UVB (60 mJ/cm <sup>2</sup> ) | 5                   | 3                                          | –                           |
| DBM + (10 µmol)                        | 5                   | 1,2                                        | 60                          |
| DBM + (20 µmol)                        | 5                   | 0,9                                        | 70                          |
| Tetrahidrocurcumina (10 µmol) + UVB    | 5                   | 1,6                                        | 47                          |
| Tetrahidrocurcumina (20 µmol) + UVB    | 5                   | 1,4                                        | 53                          |

Se irradiaron ratones hembra Sencar con UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>). Los ratones se trataron tópicamente con 100 µl de acetona o inhibidor en 100 µl de acetona 5 minutos antes de la irradiación con UVB. Ocho Horas después, se sacrificaron los ratones, se tomaron muestras de la piel y se guardaron en tampón de formalina-fosfato al 10% para el ensayo de las células con eritema solar.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una cantidad eficaz de una mezcla de tetrahidrocurcuminoides para la fabricación de un medicamento para tratar el melanoma.

2. Uso de una cantidad eficaz de una mezcla de tetrahidrocurcuminoides para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las manchas de la edad debidas a la formación de lipofuscina.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65