



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2013 00541

(22) Data de depozit: 18/07/2013

(41) Data publicării cererii:
27/11/2015 BOPI nr. 11/2015

(71) Solicitant:

- POPESCU VIOLETA CARMEN,
STR. SOLDAT ENE MODORAN NR. 14,
BL. M185, SC. 1, AP. 11, ET. 2, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
- LUPULIASA DUMITRU,
STR. GEN. IOAN CULCER NR. 28A,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- POPESCU VIOLETA CARMEN,
STR. SOLDAT ENE MODORAN NR. 14,
BL. M185, SC. 1, AP. 11, ET. 2, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;

- LUPULIASA DUMITRU,
STR. GEN. IOAN CULCER NR. 28A,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- POPESCU CANDICE LUANA,
STR. SOLDAT ENE MODORAN NR. 14,
BL. M185, SC. 1, ET. 2, AP. 11, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
- POPESCU BOGDAN ANDREI,
ȘOS. OLTENIȚEI NR. 113, BL. 27, SC. 1,
AP. 21, ET. 5, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;
- TITA MONICA GABRIELA,
STR. DEALUL SPIREI NR. 24, BL. M24,
SC. 1, AP. 13, ET. 3, CRAIOVA, DJ, RO

(54) **PREPARAT FITOTERAPEUTIC CU PROPRIETĂȚI
ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIENE,
HEPATOPROTECTOARE ȘI DIURETICE, ȘI PROCEDEU DE
OBTINERE A ACESTUIA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un preparat fitoterapeutic cu proprietăți antioxidante, și la un procedeu pentru obținerea acestuia. Produsul conform invenției este constituit din 1...3 părți pulbere de *Xanthium spinosum*, respectiv, *Fraxinus excelsior* și *Origanum vulgare*, 0,1...0,9 părți extract hidroalcoolic de *Origanum vulgare* și excipienți acceptabili farmaceutic. Procedeul conform invenției constă în omogenizarea principiilor active

împreună cu excipienții într-un granulator, timp de 25...35 min, după care se adaugă extractul hidroalcoolic, la o temperatură de 42°C, din care rezultă un amestec granulat și uscat, care se încapsulează sub formă de capsule gelatinoase tari.

Revendicări: 4



**“PREPARAT FITOTERAPEUTIC CU PROPRIETĂȚI ANTIOXIDANTE,
ANTIMICROBIENE, HEPATOPROTECTOARE SI DIURETICE ȘI PROCEDEU DE
OBTINERE AL ACESTUIA”**

Prezenta invenție se referă la un preparat fitoterapeutic cu proprietăți antioxidante, antimicrobiene, hepatoprotectoare, fără efecte secundare și cu rol de detoxifiant general al organismului, de protejare a ficatului, antimicrobian, precum și la procedeul de obținere al acestuia.

Produsii de oxidare apar în corpul uman ca o consecință fiziologică a proceselor metabolice aerobe, dar cantitatea formată poate fi exagerat de mare în condiții anormale. Dezechilibrul dintre nivelul produsilor de oxidare și capacitatea antioxidantă a organismului poartă numele de stres oxidativ și stă la originea unei patologii diverse, cu mare prevalență în medicina modernă.

Prevenirea leziunilor oxidative constituie un obiectiv major al cercetării științifice actuale, în condițiile în care stresul oxidativ este responsabil de numeroase afecțiuni inflamatorii, degenerative și neoplazice ce afectează practic toate sistemele de organe. Există un mare interes pentru descoperirea unor modalități de depășire a stresului și de contracarare a efectelor sale.

Soluția terapeutică optimă pentru combaterea stresului oxidativ este administrarea unui complex antioxidant, conținând oligoelemente asociate unor enzime, vitamine naturale, fenoli, flavonoide, alături de complexul de minerale naturale și am identificat bogăția componentelor, atât din punct de vedere calitativ, dar și cantitativ, din produsele vegetale studiate:

1. Ononidis radix care provine de la specia *Ononis spinosa* L.- familia Fabaceae
2. Fraxini folium care provine de la specia *Fraxinus excelsior* L.- familia Oleaceae.
3. Origani herba care provine de la specia *Origanum vulgare* L. - familia Lamiaceae (Labiatae)
4. Eupatorii cannabini rhizoma cum radicibus care provine de la specia *Eupatorium Cannabinum* L. - familia Asteraceae (Compositae)
5. Eupatorii folium care provine de la specia *Eupatorium Cannabinum* L. - familia Asteraceae (Compositae)
6. Xanthii spinosi herba care provine de la specia *Xanthium spinosum* L. - familia Asteraceae (Compositae).

Multitudinea studiilor individuale și complexe pe care le-am efectuat pe diferite componente active din produsele vegetale menționate, ca atare și în amestec, asociate cu datele din

literatura m-au determinat sa aprofundez studiul pe acestea, mai ales in conditiile in care in tara noastra cresc culturi spontane de *Fraxinus excelsior* L., *Origanum vulgare* L. si *Xanthium spinosum* L.

Celor mentionate mai sus se adauga proprietatile antimicrobiene dovedite pe microorganisme bacterii Gram pozitive (*Staphylococcus aureus*) si Gram negative (*Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*), levuri (*Candida albicans*) si fungi filamentosi (*Aspergillus niger* si/sau *brasiliensis*).

Problema pe care o rezolvă invenția este realizarea unui preparat pe bază de materii prime de origine naturala vegetala cu proprietăți de detoxifiant general, antimicrobian si hepatoprotector, lipsit de toxicitate prin absenta totala a metalelor grele si fără efecte secundare.

Preparatul fitoterapeutic care face obiectul prezentei invenții este o asociere între pulbere de *Xanthii spinosi herba*, *Fraxini folium* si *Origanum herba* in proportii optime de 1:1:1:2; 1:3.5 ; extract hidroalcoolic de *Origanum herba* in unitati de masa/ capsula gelatinoasa tare, impreuna cu excipientii specifici acestei forme de prezentare .curent folositi in industria farmaceutica.

Din punct de chimic:

- *Xanthii spinosi herba* contine saponozide triterpenice tetraciclice (alfa- și beta-onocerina sau onokol), izoflavonozide (ononina sau 7-glucozida-formonetinei), steroli (beta-sitosterol), ulei volatil (trans-anetol, carvone, mentol), glicozida unei fenil-benzil-cetone (onospina cu agliconul ononetin), substanțe tanante, acizi organici, zaharuri și săruri minerale. Acest produs vegetal vine in formula cu un complex natural de substante cu proprietati antioxidante, diuretice si aport de minerale si substante nutritive.
- *Fraxini folium* conține: derivați cumarinici (fraxosiolă, fraxetol, isofraxetol), flavonozide (rutozidă), triterpene pentaciclice (acid ursolic), taninuri, manitol, inozitol, glucoză, acizi organici, ulei volatil, gume. Acest produs vegetal vine in formula cu un complex natural de substante cu proprietati antioxidante, dar si diuretice si antibacteriene.
- *Origanum herba* conține aproximativ 1% ulei volatil, 8% tanin, acizi polifenolcarboxilici (acid cafeic), flavonozide, acizi triterpenici pentaciclici, antocianidoli (peoniodol, malvidol). Uleiul volatil din *Origanum herba* are un conținut ridicat de fenoli (timol, carvacrol) care pot ajunge până la 90% din totalul componentelor. Acest produs vegetal vine in formula cu un complex natural de substante cu proprietati antioxidante marcante si antimicrobiene semnificative, atat la administrare, cat si pentru siguranta microbiana a produsului pe durata administrarii, precum si efecte stomahice.

- Extractul hidroalcoolic de Origan herba contine polifenoli totali exprimati in acid clorogenic. %, min.0.5; reziduu prin uscare. %, min.1.5; continut in etanol. %, m/m. min.35,0 si asigura atat material prima active antioxidanta si antimicrobiana standardizata, cat si stabilitatea produsului finit pe perioada de valabilitate. De asemenea asigura și o protecție a mucoasei prin creșterea pH-ului la 3,5-4,0, ceea ce permite asimilarea vitaminelor liposolubile din hrană și creșterea sistemului de apărare a organismului.

Preparatul fitoterapeutic realizat conform invenției reprezintă o asociere complexă de principii bioactive naturale și elemente minerale sub formă de săruri ușor asimilabile în organism care acționează sinergic la anumite concentrații, având acțiune antioxidanta, antimicrobiana, diuretica, dar în același timp și de protejare a celulei hepatice.

Problema tehnică propusă spre rezolvare de prezenta invenție constă în obținerea unui preparat fitoterapeutic, condiționat fie sub formă de capsule gelatinoase tari, care se obțin printr-un proces tehnologic simplu, un produs care se administrează ușor, dar mai ales a rezolvat problema eliberării rapide la nivel gastric al conținutului activ prin ușoară dizolvare a capsulei gelatinoase sub acțiunea sucului gastric.

Produsul fitoterapeutic obținut conform invenției, constă în aceea că, este constituit din 1....3 părți pulbere de *Xanthium spinosum* L., 1....3 parti pulbere de *Origanum vulgare* L., 1....3 părți *Fraxinus excelsior* L., și 0,1-0,9 parti de extract hidroalcoolic de *Origanum vulgare* L., în greutate pe /capsula gelatinoasă tare, alături de excipienții acceptați de către prevederile industriei farmaceutice în vigoare.

Produsul realizat conform invenției prezintă următoarele avantaje: asigură aportul de substanțe antioxidante, hepatoprotectoare și minerale necesar organismului stresat, asigură aportul de substanțe diuretice și antimicrobiene necesare organismului, este ușor de administrat, ușor de fabricat, nu produce reacții adverse, nu prezintă contraindicații, nu interferează linia metabolică a altor medicamente.

Variatatea mare de substanțe bioactive din principiile active asociate în formula produsului și proporția dintre ele, fac din acesta un eficient și eficient preparat detoxifiant general, hepatoprotector, diuretic și antimicrobian.

Produsul farmaceutic fitoterapeutic cu compoziția calitativă și cantitativă revendicată nu este cunoscut în literatura de specialitate.

Mai mult, procesul de obținere al materiilor prime vegetale asigură păstrarea sistemelor naturale enzimatică, minerale și vitaminice.

Procedeul de obținere al produsului, conform invenției, constă în aceea că, într-un granulator în sine cunoscut, prevăzut cu sistem de încălzire – răcire și de amestecare,

granulare, se introduc materiile prime - principiile active naturale de origine vegetala și excipienții de granulare - se omogenizeaza și se granulează.

Granulatele umede obținute se usucă la temperaturi sub 42°C, se uniformizează, se lubrifiază cu excipienții de lubrifiere, se încapsulează în capsule gelatinoase tari.

Tehnologia de preparare a produsului fitoterapeutic realizat conform invenției permite păstrarea stabilității tuturor compușilor bioactivi din formulă, iar utilizarea excipienților de granulare și de acoperire larg uzitați în industria farmaceutică asigură atât proprietati mecanice la fabricarea produsului, cât și biodisponibilitatea substantelor active din produsul finit.

Se da mai jos procesul pentru realizarea produsului:

Formula pentru o capsulă gelatinoasă tare :

- Pulbere de Xanthii spinosi herba, Fraxini folium și Origani herba în proporție optimă 0,410 g
- Extract hidroalcoolic de Origani herba ad 0,550 g
- Excipienți până la 0,660-0,675 g

Principiile active împreună cu excipienții de lubrifiere, curgere și diluare se introduc în granulator și se omogenizează timp de 25-35 minute, urmează adaosul de extract hidroalcoolic urmat de o ușoară încălzire sub 42 °C, după care se introduce amestecul granulat și uscat în echipamentul de umplere capsule.

Masa de granulate lubrificate se încapsulează sub formă de capsule gelatinoase tari cu greutatea de 0,670 g ± 5%, obținându-se un produs vrac ce se ambalează ca produs finit în blistere de aluminiu/PVC de uz farmaceutic.

În susținerea activității antioxidante a preparatului farmaceutic realizat conform invenției, s-a urmărit determinarea conținutului în polifenoli totali exprimați în acid cafeic și acid clorogenic și flavonelor, atât la materiile prime sub formă de pulbere, ca atare, la extractele alcoolice cu alcool etilic 60%, amestecuri de plante ca atare, în anumite proporții și extractul hidroalcoolic de origani herba.

Testele cantitative au fost efectuate pe trei situații hotărâte prin protocolul de studiu, dar tipul analizelor fizico-chimice, microbiologice și biologice au fost orientate pe baza datelor de screening și/sau a celor intermediare obținute la diferite stadii pe perioada studiului:

1. Studii fizico-chimice, microbiologice și biologice pe produsele vegetale uscate, ca atare.

2. Studii fizico-chimice, microbiologice si biologice pe produsele vegetale uscate, sub forma de extracte alcoolice cu etanol 60% în raport 1:5, cu macerare timp de 10 zile.
3. Studii fizico-chimice, microbiologice si biologice pe produsele vegetale uscate, ca atare, dar în amestecuri în proportii diferite.
4. Studii fizico-chimice si microbiologice pe extractul hidroalcoolic de 40% Origani herba.

Testele efectuate au fost:

- determinarea puritatii;
- continut în polifenoli totali exprimat în acid clorogenic, %;
- continut în polifenoli totali exprimat în acid cafeic, %;
- continut în flavone exprimate în rutin, %;
- continut în ulei volatil;
- continut în substanțe minerale si microelemente (Ca, Mg, Na, K, Mn, Fe, Zn, Cu, Pb,

Cd):

- activitate antioxidanta (grame TROLOX/ g proba)-metoda Cuprac;
- eficacitatea conservantilor antimicrobieni (pentru a pune în evidenta cu dovezi stiintifice eventualul potential antimicrobian al constituentilor activi din materiile prime standardizate sub forma de pulbere).

Determinarea cantitativă a polifenolilor, flavonelor și ioni metalici, trebuie corelată cu acțiunea antioxidantă a produsului si anume prin capacitatea de captare a radicalilor liberi oxid și peroxid care intervin în procesele infecțioase și de îmbătrânire (așa cum a fost identificat în literatura de specialitate pentru produsele vegetale folosite ca materii prime active în produsul finit) .

Determinarea cantitativă a substanțelor minerale se relaționează cu indicația de utilizare a materiilor prime vegetale în osteoporoză, cardiopatie, afecțiuni ale sistemului reproducător, sistemul imunitar.

Metodele de analiza sunt efectuate conform monografiilor din Farmacopeea Europeana editia a 7-a si/sau alte farmacopei de circulatie internationala(USP=Farmacopeea Statelor Unite; DAB= Farmacopeea Germana; BP= Farmacopeea Britanica) si literatura de specialitate.

Continut în polifenoli totali exprimat în acid cafeic si /sau acid clorogenic.

Comportamentul produsului sub aspectul continutului în polifenoli totali exprimat în acid cafeic, % si/sau acid clorogenic, este foarte important de determinat deoarece continutul în aceste active este direct proportional cu metoda de uscare a produselor, iar continutul în

polifenoli totali(raspunzatori in proprietatile antioxidante neenzimatic) creste prin aplicarea metodei de uscare controlata in trepte.

Concentrația în polifenoli totali a probei de analizat se calculează cu ajutorul unei curbe de calibrare, luând în lucru: 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5; 4.0; 4.5 mL soluție etalon de *acid clorogenic sau acid cafeic R 0,1 g/L*, la care se adauga 4.0; 3.5; 3.0; 2.5; 2.0; 1.5; 1.0 si 0.5 mL *apa R* si apoi cate 5.0 mL *soluție fosfowolframata de sodiu* pentru fiecare etalon in parte.

Din etaloanele astfel obtinute, se iau cate 2.5 mL si se aduc la semn într-un balon cotat de 25 mL cu *solutie de carbonat de sodiu R 200 g/L* proaspat preparata.

Se determina absorbanta soluției la 660 nm. folosind ca lichid de compensare o soluție preparată din 2.5 mL din fiecare etalon adusi cu *apă R* la semn într-un balon cotat de 25 mL.

Calcul:

Polifenoli totali exprimati in

$$\text{acid clorogenic/acid cafeic, \%} = \frac{C}{m_p \times 10^2} \times \frac{50}{5} \times 2,016$$

C = concentratia in acid cafeic sau acid clorogenic citita pe curba etalon, in $\mu\text{g} / \text{mL}$;

m_p = cantitatea de proba luata in lucru, g;

50/5 = dilutie

$1/10^2$ = factor de corelare

2.016 = factor de transformare a acidului cafeic in acid clorogenic.

Este posibil ca polifenolii să acționeze sinergic cu flavonele și să favorizeze metabolizarea glucozei și a colesterolului. cu creșterea eliminării biliare a colesterolului. Aceasta ar putea justifica utilizarea produsului finit si in diabet și hipercolesterolemie.

Continut in flavone exprimate in rutin, %

Cantitatea de flavone se calculează prin raportare la curba etalon a rutinului, stabilită astfel: în trei baloane cotate de cate 25 mL se pipetează 1; 2 și 3 mL *rutin (s.r.) soluție 0,01% in metanol R*. În fiecare balon cotat se adaugă câte 5 mL *acetat de sodiu R, solutie 100 g/L* și câte 3 mL *clorura de aluminiu R, solutie 25g/L*, agitând după fiecare adăugare de reactiv. Se completează baloanele la semn cu *metanol R* și se agită puternic. Soluțiile obținute se citesc la spectrofotometru la 430 nm, în cuva de 1 cm, față de *metanol R*.

Continutul in flavone, exprimate in rutin se calculeaza cu formula:

$$\text{Continut in flavonoide} \quad C$$

$$\text{exprimate in rutin, \%} = \frac{\text{-----}}{m_p \times 100} \times F$$

in care:

C = concentratia citita pe curba de etalonare, in µg/ml;

m_p = masa probei de analizat, in g;

F = factor de dilutie.

Continut in polifenoli totali exprimate in acid cafeic/ plantele ca atare sub forma de pulbere

Nr. Crt.	Denumire materie prima	Continut in polifenoli totali exprimate in acid cafeic %
1.	Xanthii spinosi –herba	2,24
2.	Fraxini –folium	5,47
3.	Eupatorii cannabini rhizoma cum radicibus	1,18
4.	Eupatorii cannabini folium	4,35
5.	Onanidis- radix	1,16
6.	Origani – herba	6,60

Rezultate obtinute pe amestecuri din plante sub forma de pulbere (Amestec plante: Xanthii spinosii herba: Fraxini folium: Origani herba)

Nr. Crt.	Denumire materie prima	Continut in polifenoli totali exprimate in acid cafeic si clorogenic, %
1.	<i>Amestec 1:1:1</i>	Cafeic: 2,51% Clorogenic: 4,05%
2.	<i>Amestec 1:2:1</i>	Cafeic: 3,13% Clorogenic: 5,3%
3.	<i>Amestec 1:1:2</i>	Cafeic: 1,98 % Clorogenic: 3,96%
4.	<i>Amestec 2:1:1</i>	Cafeic: 2,56% Clorogenic: 4,15%

Rezultate obtinute pe *extracte hidroalcoolice* cu etanol 60% in raport de 1:5

Nr. Crt.	Denumire materie prima	Densitate relativa	Reziduu prin uscare (evaporare)	Continut in etanol, % m/m	Metanol si 2-propanol, 0,05 % metanol (500ppm) 0,05%2-propanol (500ppm)	Continut in polifenoli totali exprimati in acid cafeic si clorogenic, %
1.	<i>Extract de Xanthii spinosi – herba</i>	0,913	1,69	52,3	Metanol: 182,919ppm 2-propanol: 3,358 ppm	0,07 cafeic 0,141 clorogenic
2.	<i>Extract de Fraxini – folium</i>	0,922	3,65	50,2	Metanol: 186,416 ppm 2-propanol: 3,559ppm	0,47 cafeic 0,95clorogenic
3.	<i>Extract de Eupatorii cannabini rhizoma cum radicibus</i>	0,923	1,85	52,0	Metanol: 189,262ppm 2-propanol: 3,504ppm	0,08 cafeic 0,161 clorogenic
4.	<i>Extract de Eupatorii folium</i>	0,924	2,30	52,0	Metanol: 184,762 ppm 2-propanol: 3,390ppm	0,13 cafeic 0,262 clorogenic
5.	<i>Extract de Ononidis- radix</i>	0,924	1,87	51,4	Metanol: 185,986ppm 2-propanol: 3,406 ppm	0,011cafeic 0,020 clorogenic
6.	<i>Extract de Origani – herba</i>	0,935	2,20	52,1	Metanol: 183,030ppm 2-propanol: 3,478ppm	0,42 cafeic 0,86 clorogenic

Concluzii de test:

Determinarea cantitativă a polifenolilor totali (exprimați în acid cafeic, prin extracție la cald, în etanol) a evidențiat valori cuprinse între:

- 1.16- 6.60 %, pe materiile prime ca atare sub forma de pulbere(oregano: 5.60; fraxini folium:4.47);
 - 1.98- 3.13 %,pe materiile prime sub forma de amestec de pulberi/Amestec plante:
Xanthii spinosii herba: Fraxini folium: Origani herba (amestecul 1:2:1 avand valoarea cea mai mare, 3.13)
- 0.011- 0.47 %, pe extractele hidroalcoolice.

Extractele obtinute din produsele vegetale sunt forma cea mai saraca in polifenoli, nereprezentativa pentru a fi folosite sub forma de materii prime active pentru produsul finit.

Continut in substanțe minerale si microelemente (Ca, Mg, Na, K, Mn, Fe, Zn, Cu, Pb, Cd)

Determinarea cantitativă a substanțelor minerale (Ca,Mg,Mn,Na,K,Fe,Zn,Cu,Pb,Cd) s-a efectuat prin spectrometria de absorbtie atomica cuplata cu MS (=mass spectrometry), conform Farmacopeei Europene, editia a 7-a, capitolul 2.4.27. cu echipamentul GBC AVANTA (in colaborare cu laborator acreditat).

Tehnica de lucru: Se determina absorbantele solutiilor de referinta si solutiei test. Valoarea absorbantei solutiei blanc este automat scazuta din valoarea obtinuta la solutia test.Se inregistreaza valorile obtinute pentru concentratia fiecarui element, exprimata in ppm.

Calcul:

Continutul de plumb se calculeaza dupa formula :

$$\text{XXX, ppm} = \frac{C \times V}{m_p} \times F$$

in care :

XXX= elementul care se determina

C = concentratia de metal citita la aparat, ppm

V = volumul balonului cotat utilizat, mililitri

m_p = masa probei de analizat, grame

F= factor de dilutie

Din punct de chimic, Xanthii spinosi herba contine saponozide triterpenice tetraciclice (alfa- și beta-onocerina sau onokol), izoflavonozide (ononina sau 7-glucozida-formonetinei), steroli (beta-sitosterol), ulei volatil (trans-anetol, carvone, mentol), glicozida unei fenil-benzil-cetone (onospina cu agliconul ononetin), Fraxini folium conține: derivați cumarinici (fraxosiolă, fraxetol, isofraxetol), flavonozide (rutozidă), triterpene pentaciclice (acid ursolic), ulei volatil, Origani herba conține aproximativ 1% ulei volatil, 8% tanin, acizi polifenolcarboxilici (acid cafeic), flavonozide, acizi triterpenici pentaciclici, antocianidoli (peoniodol, malvidol); uleiul volatil din Origani herba are un conținut ridicat de fenoli (timol, carvacrol) care pot ajunge până la 80-90% din totalul componentelor.

Aceste produse vegetale vin in formula cu un complex natural de substante cu proprietati antimicrobiene si diuretice semnificative.

Eficacitatea conservantilor antimicrobieni

Studiul a avut ca scop sa demonstreze posibila eficacitate antimicrobiana a unor componente active Din materiile prime standardizate sub forma de pulbere ca atare sau in amestecuri in vederea argumentarii calitatii si sigurantei produsului finit sub forma de capsule gelatinoase tari-forma solida dozata cu administrare orala.

Studiul s-a efectuat in conformitate cu cerintele din Farmacopeea Europeana editia in vigoare.

S-a dorit obtinerea de dovezi stiintifice pentru eventualul potential antimicrobian al constituentilor activi din materiile prime ca atare, standardizate, sub forma de pulbere si sub forma de amestec de pulberi).

Produse testate:

a) Produsele vegetale ca atare care vor intra in amestecul de umplere capsule al produsului finit:

- XANTHII SPINOSI HERBA
- FRAXINI FOLIUM
- ORIGANI HERBA

b) variante de amestecuri din produsele vegetale care vor intra in formula produsului finit:

- P₁ = Amestec 1:1:1
- P₃ = Amestec 1:2:1
- P₄ = Amestec 1:1:2

c) Medii de cultura folosite, conform Farmacopeei Europene:

Pentru cultivarea microorganismelor test și a testului de eficacitate antimicrobiană au fost utilizate următoarele medii de cultura:

- *pentru bacterii*: mediul de cultura agar B (Casein soya bean digest agar) seria 007.04.2012 / B.A. 33/05.04.2012

- *pentru fungi*: mediul de cultura agar Sabouraud cu dextroza (Sabouraud dextrose agar) seria 007.04.2012 / B.A. 34/07.04.2012

d) Microorganisme test, tulpini de referință internațională:

Bacterii :

- Staphylococcus aureus ATCC 6538 (Gram pozitiv)
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 (Gram negativ)
- Escherichia coli ATCC 35218 (Gram negativ)

Levuri și fungi filamentosi :

- Candida albicans ATCC 10231 (levură)
- Aspergillus ATCC 16404 (fung)

d.1) *Pasajul tulpinilor de microorganisme test* :

- S-au efectuat 3 pasaje din tulpinile de Staphylococcus aureus ATCC 6538, Escherichia coli ATCC 35218 și Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 la intervale de 24-48 ore. S-a folosit mediu de cultura agar nutritiv B (Casein Soya Bean Digest Agar) repartizat înclinat în tuburi mari. Culturile bacteriene au fost incubate la 30-35 °C.

- Din culturile de Candida albicans ATCC 10231 și Aspergillus niger ATCC 16404, s-au efectuat 3 pasaje pe tuburi cu mediu de cultura agar Sabouraud cu dextroza (Sabouraud Dextrose Agar) repartizat înclinat. Pasajele s-au efectuat la intervale de 48 de ore, respectiv 7 zile.

Tuburile cu mediu de cultura au fost incubate la 20-25 °C, timp de 48 ore pentru Candida albicans și 7 zile pentru Aspergillus niger.

d.2.) *Prepararea inoculului*

Pentru obținerea inoculului, suprafața culturilor bacteriene și fungice a fost spălată cu soluție izotonică de NaCl, pH = 7.0. Folosindu-se scară nefelometrică, din fiecare cultura

bacteriana si fungica si s-au obtinut suspensii mama cu o concentratie de aproximativ 1×10^8 /ml microorganisme test .

e) Tenica de lucru:

e.1) *Proba de analizat* : In 6 flacoane de 250 ml s-au repartizat 20 g sau 20 ml din produsul de analizat si cate 0,1 ml fiecare suspensie bacteriana sau suspensie fungica (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* , *Escherichia coli* , *Aspergillus niger* si *Candida albicans*) . S-au obtinut suspensii cu o concentratie de aproximativ de 1×10^5 microorganisme / ml .

Proba martor : In 5 flacoane de 250 ml s-au repartizat 20 ml solutie izotonica de NaCl cu pH= 7,00 si cate 0,1 ml fiecare suspensie bacteriana sau fungica (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* , *Escherichia coli* , *Aspergillus niger* si *Candida albicans*) pentru a obtine o concentratie de aproximativ de 1×10^5 microorganisme / ml .

Din aceste flacoane s-a prelevat cate 1 ml din suspensiile bacteriene sau fungice la timpul 0 (T 0), la 14 zile (T 1) si la 28 zile (T 2) pentru a determina numarul de Unitati Formatoare de Colonii /ml/g (UFC) prin tehnica de contaminare microbiana.

Mediile de cultura insamantate pentru detectarea bacteriilor s- au incubat la $30-35^{\circ}\text{C}$, iar mediile de cultura insamantate pentru levuri si fungi filamentosi s- au incubat la $20-25^{\circ}\text{C}$. Pentru calculul final al Unitatilor Formatoare de Colonii (UFC) / g /ml produs , s-a facut media aritmetica a coloniilor obtinute pentru dilutiile de lucru.

La 14 zile (T 1) si la 28 zile (T 2), s-a urmarit reducerea numarului initial de microorganisme viabile si s-a calculat reductia logaritmica fata de timpul 0 (T 0) .

f) Prezentarea datelor, prelucrarea si interpretarea lor

Criteriul de evaluare al activitatii antimicrobiene a produselor testate a fost reprezentat de calculul reductiei logaritmice (log) a numarului de microorganisme viabile din proba, raportat la valorile obtinute pentru martor, la timpul zero.

Testarea eficacitatii antimicrobiene a preparatelor a fost evaluata la timpul 0 (T0), la 14 zile (T1) si la 28 zile (T2), de la inocularea acestora cu urmatoarele microorganisme test: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 35218 , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231 si *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Produsele vegetale ca atare, in amestec 1:1:1, 1:2:1 si finitul au proprietati antimicrobiene pe bacterii Gram pozitive si Gram negative si anume activitate bactericida.

Pe levuri si fungi produsele ca atare , in amestec in proportie optima si produsul finit au activitate bacteriostatica.

Concluzii:

- Produsul are un continut foarte important in polifenoli si flavone, vitamine, complex cu proprietati antioxidante, hepatoprotectoare, de detoxifiere generala a organismului.
- Produsul finit prin continutul in saponozide triterpenice tetraciclice, izoflavonozide ,ulei volatil (trans-anetol, carvone, mentol), glicozida unei fenil-benzil-cetone, derivați cumarinici (fraxosiolă, fraxetol, isofraxetol), flavonozide (rutozidă), triterpene pentaciclice (acid ursolic), ulei volatil, acizi polifenolcarboxilici (acid cafeic), flavonozide, acizi triterpenici pentaciclici, antocianidoli , conținut ridicat de fenoli (timol, carvacrol) care pot ajunge până la 80-90% din totalul componentelor are proprietati antimicrobiene si diuretice semnificative.
- Produsul finit reprezinta o sursa naturala foarte bogata de micro si macroelemente necesare bunei functionari a organismului.

REVENDICĂRI

1. Preparat fitoterapeutic cu proprietăți antioxidante, detoxifiant general, hepatoprotector, diuretic și antimicrobian caracterizat prin aceea că, este o asociere între pulbere de Xanthii spinosi herba, Fraxini folium și Origani herba în proporții optime de 1:1:1:2: 1:3.5 ; și extract hidroalcoolic de Origani herba în unități de masă/ capsula gelatinoasă tare.
2. Produsul fitoterapeutic obținut conform revendicării 1., caracterizat prin aceea că, este constituit din 1....3 părți pulbere de Xanthium spinosum L; 1....3 părți pulbere de Origanum vulgare L; 1....3 părți Fraxinus excelsior L..și 0.1-0.9 părți de extract hidroalcoolic de Origanum vulgare L. în greutate pe /capsula gelatinoasă tare împreună cu excipienți acceptați din punct de vedere farmaceutic. Produs cu principiu activ atât sub formă de pulbere cât și ca extract hidroalcoolic prins pe produsul ca atare sub formă de pulbere.
3. Produs fitoterapeutic obținut conform revendicării 1. și 2., cu proprietăți nutritive și energetice naturale, caracterizat prin aceea că asigură aportul de energie, minerale și oligoelemente necesare organismului aflat în stare de stres oxidativ, protejează celula hepatică, nu produce reacții adverse.
4. Procedeu de preparare a produsului conform revendicării 1.2 și 3, caracterizat prin aceea că, permite păstrarea stabilității tuturor compușilor bioactivi din formulă, asigură biodisponibilitatea acestora și folosește ca materii prime active, atât produsele vegetale naturale sub formă de pulbere, cât și sub formă de extract prins pe acest suport solid, cu obținerea unui complex activ standardizat în polifenoli și conținut în minerale și oligoelemente.