



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00458**

(22) Data de depozit: **18/06/2014**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/03/2021** BOPI nr. **3/2021**

(41) Data publicării cererii:  
**29/01/2016** BOPI nr. **1/2016**

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

(72) Inventatori:  
• **PÎRVU LUCIA CAMELIA, STR.BĂCIA  
NR.11 A, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **HLEVCA CRISTINA, STR. LIZEANU  
NR. 19, ET. II, AP. 4, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **BUBUEANU ELENA-CORINA,  
STR. CERNIȘOARA NR.43, BL.012, SC.A,  
AP.19, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **NICU IOANA, STR. NICOLAE IORGA  
NR. 20, BL. 34C, SC. B, ET. 3, AP. 9,  
SFÂNTU GHEORGHE, CV, RO;**  
• **PANTELI MINERVA,  
STR.SPĂȚAR NICOLAE MILESCU  
NR.46-48, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **IUKSEL RASIT, BD.DINICU GOLESCU  
NR.37, BL.4, SC.B, AP.40, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**US 2008/0175934 A1; RO 117295 B**

(54) **EXTRACTE VEGETALE CU EFECT  
ANTIMICROBIAN-ANTIOXIDANT, PROCEDEU DE OBȚINERE  
PENTRU DOUĂ FORMULE ACTIVE**



# RO 130827 B1

1 Inventția se referă la un procedeu de obținere a unor produse vegetale, în fapt două  
2 formule active, fiecare combinând câte două extracte vegetale izolate din 4 materii prime  
3 vegetale cu activitate antimicrobiană - antioxidantă, utilizabile pentru obținerea de noi pro-  
4 duse naturale de igienă sau cosmetică: Formula 1 combină un extract antimicrobian din  
5 partea aeriană sau herba de pufuliță cu flori mid/*Epilobium hirsutum* L. cu un extract antioxi-  
6 dant din herba de răchitan/*Lithrum salicaria* L.; Formula 2 combină un extract antimicrobian  
7 din frunze de brusture/*Arctium lappa* L. cu un extract antioxidant din frunze de scoruș  
8 negru/*Aronia melanocarpa* L.

9 Este cunoscut faptul că principalii patogeni responsabili de apariția bolilor infecțioase  
10 la om sunt bacteriile gram-pozitive incluzând cocci (exemplu, *Staphylococcus aureus* și  
11 *Streptococcus hemolytic*) și bacilli (exemplu, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Listeria*,  
12 *Bacillus*), bacteriile gram-negative incluzând cocci (exemplu: *N. meningitides*, *N.*  
13 *gonorrhoeae*), coccobacilii (exemplu: *H. influenzae*, *B. pertussis*, *Brucella*) și bacilii (exemplu,  
14 *E. Coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *H. pylori*, *Y. pestis*, *Y.*  
15 *enterocolitica*), și fungii (exemplu: genurile *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*,  
16 *Pneumocystis* etc). Dintre aceștia, statisticile arată că, spre exemplu, în cazul  
17 *Staphylococcus aureus*, 90...95% dintre tulpini au căpătat rezistență la penicilină, 70...80%  
18 dintre acestea fiind metilicilin rezistente (MRSA).

19 Referitor la utilizarea extractelor vegetale ori compușilor vegetali separați drept agenți  
20 de combatere sau eradicare a infecțiilor, este admis că, deși compușii din plante au efecte  
21 antimicrobiene mult mai reduse față de agenții de sinteză (de câteva ordine de mărime mai  
22 mici față de antibioticele chimice), aceștia sunt de multe ori mai eficienți ca urmare a  
23 sinergismului care se stabilește între compușii vegetali (Shanmugam et al., 2008 [1]).

24 2.2 Literatura de specialitate mai arată că cele mai active specii fitochimice sunt com-  
25 pușii aromatici din categoria polifenolilor, cumarinelor, terpenoidelor și uleiurilor esențiale,  
26 la care se adaugă compuși din clasa alcaloizilor, lectinelor și polipeptidelor (Marjorie M.  
27 1999 [2]). În ceea ce privește mecanismul lor de acțiune, din studiile realizate de-a lungul  
28 timpului s-au tras următoarele concluzii: a) acizii fenolici în formă oxidată acționează cel mai  
29 probabil prin inhibiția unor enzime bacteriene, posibil prin reacția cu o serie de grupări  
30 specifice (de exemplu sulfhidril) ale unor proteine din învelișul microbial (Mason T. L. et al.  
31 1987 [3]); b) quinonele complexează ireversibil aminoacizii nucleofili din proteinele peretelui  
32 celular microbial ceea ce conduce la inactivarea și pierderea funcției specifice adezinelor  
33 de pe suprafața bacteriei, ori polipeptidelor din perete celular, ori enzimelor legate la mem-  
34 brana (Marjorie M. 1999 [2]); c) flavonoidele, similar quinonelor au capacitatea de a com-  
35 plexa proteinele extracelulare sau solubile astfel interferând cu activitatea de pe suprafața  
36 peretelui celular, flavonoidele lipofile având chiar capacitatea de a rupe membranele  
37 microbiene (Tsuchiya H. et al., 1996 [4]); de exemplu, dintre flavonoide; c.1) catechinele au  
38 dovedit abilitatea de a inhiba activitatea enzimei glucozil-transferaza izolată din *S. mutans*  
39 (Nakahara, K., et al 1993 [5]) pe când c.2) taninurile au dovedit capacitatea de a stimula  
40 fagocitele (Haslam, E., 1996 [6]); d) cumarinele au indicat capacitatea de a acționa indirect  
41 prin stimularea activității macrofagelor; e) terpenele, terpenoidele, ca și uleiurile esențiale  
42 (ultimele din ele dovedite deopotrivă active pe bacterii, fungi, virusuri, dar și protozoare) cel  
43 mai probabil utilizează proprietățile lor lipofile, respectiv capacitatea de a trece prin peretele  
44 celular echivalentă cu distrugerea microorganismului (Marjorie M. 1999 [2]); f) alcaloizii acțio-  
45 nează prin intercalarea în helixul DNA (Phillipson, J. D. et al, 1987 [7]) iar g) lectinele și  
46 polipeptidele acționează cel mai probabil prin formarea unor canale ionice sau inhibiția com-  
47 petitivă a adeziunii proteinelor microbiene la receptorii polizaharidici ai gazdei infectate  
(Zhang, Y., 1997 [8]).

# RO 130827 B1

În ceea ce privește eficiența antimicrobiană a polifenolilor vegetali, clasa cu utilizarea cea mai frecventă ca urmare a raportului beneficiu-risc favorabil, aceasta este în general sub cea a substanțelor de sinteză însă, în unele cazuri, s-au determinat și concentrații minime inhibitorii (CMI) apropiate (vezi tabelul 1).

## Comparație între CMI ale unor antibiotice chimice fata de compuși vegetali

Tabelul 1

Compuși sintetici	CMI (µg/mL)	Compuși vegetali	CMI (µg/mL)
Claritromicină	0,016-64	Ponciretin	10-20
Eritromicină	0,016-256	Ihgenin	12,5-25
Ciprofloxacina	0,016-32	Epigallocatechin-galat	100
Norfloxacina	0,064-32	Epicatechin-galat	100
Metronidazol	3,15	Acid galic	500
Lansoprazol	0,88	Epicatechina	800-1600

Datele de literatură (Tim Cushnie TP, Andrew J. Lamb., 2005 [9]) mai arată că în ceea ce privește relația dintre structura polifenolilor, în particular a flavonoidelor și efectul antimicrobian propriu-zis, a) hidroxilarea în pozițiile 2,4- sau 2,6- la nivelul inelului B (fenil) ca și hidroxilarea în pozițiile 5,7- ale nucleului A (flavan) este foarte importantă pentru activitatea lor anticobiană și antimeticilin - rezistență în cazul *Staphylococcus aureus* (MRSA); b) substituția în pozițiile 6 sau 8 cu o catenă lungă alifatică, lavandulil (5-metil-2-izopropenil-hex-4-enil) ori geranil (trans-3,7-dimetil-2,6-octadienil) crește activitatea antimicrobiană; c) substituția cu catene lungi de tip C8 și C10 crește activitatea flavan-3-olilor; d) 5-hidroxi-flavanonele și 5-hidroxiizoflavanonele cu grupări hidroxil în poziția 2 sunt foarte active; e) chalconele sunt mult mai active împotriva MRSA decât flavanonele sau flavonele, gruparea -OH din poziția 2 fiind foarte importantă pentru activitatea lor anti-stafilococcică; f) dimpotrivă, grupările metoxil induc o scădere drastică a activității antimicrobiene a flavonoidelor.

De asemenea, este cunoscut efectul antioxidant remarcabil al compușilor vegetali, în special al polifenolilor. Astfel, studii (Lucia P. et. al, 2007 [10]) asupra a 18 cei mai cunoscuți polifenoli din lumea vegetală (vezi diagrama 1) arată că dacă (-)-epicatechina, (+)-catechina (aparținând subclasei flavan-3-olilor), quercetinul și kaempferolul (aparținând subclasei flavonolilor) sunt cei mai potenți antioxidanți cu 90...97% activitate scavenger de radicali liberi în model chimic (sistem luminol - apă oxigenată, pH = 8,5; Iftimie N. et. al, 2003 [11]), naringina și naringenina (aparținând subclasei flavanonelelor) sunt cele mai slabe (AA% = 32% și 9%). Acizii fenolici, în speță acizii galic, clorogenic și rozmarinic s-au dovedit cu activitate antioxidantă bună, între 80 și 90%.

Date fiind acestea și multe alte efecte biologice benefice pentru om, polifenolii vegetali sunt de mare interes atât în industria chimico-farmaceutică, cât și în industria produselor de igienă ori cosmetică. Drept dovadă, industria cosmetică și/sau a produselor de igienă utilizează intens materii prime vegetale cunoscute pentru conținutul chimic bogat în polifenoli antioxidant -antiinflamatori, ori polizaharide, pectine, mucilagi și uleiuri protectoare și regeneratoare, plus uleiuri volatile cu proprietăți antimicrobiene bune, cel mai frecvent utilizate materii prime, respectiv extracte vegetale fiind din *Matricaria*

# RO 130827 B1

1 *chamomilla*/mușețel, *Calendula officinalis*/gălbenele, *Aloe vera*/aloe, *Helix hederai*/iedera,  
3 *Camellia sinensis*/ceai verde, *Avena sativa*/ovăz, *Lavandua angustifolia*/lavanda, *Ocinum*  
5 *basilicum*/busuiocul, *Rosmarinus officinalis*/rosmarin, *Centaurea cyanus*/albăstrele alături  
de uleiurile esențiale de *Eucalyptus*/eucalipt, *Citronella* ori *Rosa centifolia*/trandafir, unele  
dintre ele fiind și testate farmacologic ([www.makingcosmetics.com/.../04-herbal-ingre](http://www.makingcosmetics.com/.../04-herbal-ingre)).

În ceea ce privește prezenta invenție, este cunoscut efectul antimicrobian al pufuliței  
7 cu flori mici/*Epilobium hirsutum* (**Lucia Battinelli, 2000** [13]), ca și cel al brusturelui/*Arctium*  
9 *lappa* (**Juliana Vianna Pereira et al., 2005** [14]). De asemenea, există date privind efectul  
antioxidant, anti-inflamator bun al răchitanului/*Lythrum salicaria* (Pirvu Lucia et al., Patent  
11 **RO 128214 (A2)** 2013-03-29 - Produse ecologice cu efect antioxidant destinate stabilizării  
materialelor și procedeu de obținere [15]; **Zeinep Tumalier et al., 2007** [16]), ca și cel al  
aroniei/*Aronia melanocarpa* (**Jan Oszmianski et al., 2005** [17]).

13 Având în vedere toate acestea, problema pe care o rezolvă invenția de față constă  
în identificarea materiilor prime vegetale și stabilirea asocierii componentelor, astfel  
15 obținându-se două formule active finale (Formula 1 și Formula 2), fiecare combinând câte  
două extracte vegetale, un extract dominant cu efect antimicrobian și un extract secundar  
17 cu efect antioxidant, utilizabile pentru obținerea de noi produse de igienă ori cosmetice.

19 Extractele vegetale selectate combină două subclase de polifenoli vegetali, respectiv  
acizi fenolici și flavonozide, în diferite proporții sau concentrații. Ca urmare, aceste extracte  
vegetale au fost caracterizate calitativ printr-un screening HPTLC (în sistem specific pentru  
21 polifenoli vegetali, respectiv acetat de etil:acid formic:acid acetic:apă - 100:11:11:26),  
respectiv cantitativ (prin metoda clasică spectrofotometrică, respectiv reacția cu reactiv Folin-  
23 Ciocâlțeau) în vederea determinării conținutului specific în polifenoli. Rezultatele cantitative  
sunt exprimate în polifenoli totali exprimați în acid galic (GAE), procente de masă pe unitatea  
25 de volum (mg/mL extract).

Procedeu de obținere al formulelor active finale cu efect antimicrobian - antioxidant,  
27 respectiv Formula 1 pe bază de extract de herba de pufuliță/*Epilobium hirsutum* în  
combinație cu extract din herba de răchitan/*Lythrum salicaria* și Formula 2 pe bază de extract  
29 de frunze de brusture/*Arctium lappa* în combinație cu extract din frunze de scoruș  
negru/*Aronia melanocarpa*, raport între polifenolii celor două specii 4:1 (g/g) și un conținut  
31 total de compuși activi de 50 mg polifenoli totali exprimați în acid galic per 1 ml produs final  
condiționat, conform invenției, prevede următoarele faze:

- 33 a) extracția materiei prime vegetale cu alcool etilic 70% (v/v);  
35 b) filtrarea extractului;  
c) analiza și standardizarea extractului;  
d) amestecul componentelor în algorimul stabilit.

37 a. Extracția materiei prime se realizează astfel; materia primă vegetală constituită din  
39 partea aeriană sau herba de pufulița cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L., herba de  
răchitan/*Lithrum salicaria* L., frunze de brusture/*Arctiumm lappa* L. ori frunze de scoruș  
negru/*Aronia melanocarpa* L. se extrage, fiecare separat, cu alcool etilic 70% în rapoarte de  
41 volum (v), la temperatura de reflux a masei de extracție și cu agitare continuă în rapoarte  
specifice, masă materie primă uscată/volum solvent [alcool 70% (v)], pentru fiecare materie  
43 primă vegetala, respectiv:

- 45 - 1:20 (g/v) pentru herba de pufulița cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L.;
- 47 - 1:20 (g/v) pentru frunze de brusture/*Arctium lappa* L.;
- 1:10 (g/v) pentru herba de răchitan/*Lithrum salicaria* și
- 1:10 (g/v) pentru frunze de scoruș negru/*Aronia melanocarpa* L.

# RO 130827 B1

b. Filtrarea celor 4 extracte alcoolice brute obținute din cele 4 materii prime vegetale se realizează la cald (la 40...45°C), prin hârtie de filtru industrială prevăzută cu con de siguranță. 1  
3

c. Analiza și standardizarea extractelor se realizează prin c1) screeningul HPTLC al extractelor în sistem pentru polifenoli (acetat de etil:acid acetic glacial:acid formic:apă - 100:11:11:26) când se urmărește conținutul chimic calitativ al extractelor urmat de c2) dozarea conținutului extractelor brute în polifenoli totali exprimați în acid galic (FR X, metoda spectrofotometrică cu reactiv Folin-Ciocalteu). 5  
7

În mod practic, odată realizat acest screening analitic, fiecare extract alcoolic brut cu un conținut cunoscut de polifenoli totali exprimați în acid galic (GAE) se va concentra la reziduu/spiss, iar produsul obținut se va relua în etanol 70% (v) astfel încât să se asigure concentrația finală de 50 mg polifenoli totali (GAE) per 1 ml extract în cazul tuturor extractelor. Odată obținute aceste extracte vegetale standardizate în polifenoli totali (GAE) se vor amesteca 4 ml extract din herba de pufuliță cu flori mici/ *Epilobium hirsutum* L. cu 1 ml extract din herba de răchitan/*Lithrum salicaria* L. (Formula 1), respectiv 4 ml extract din frunze de brusture/*Arctium lappa* L. cu 1 ml extract din frunze de scoruș negru/*Aronia melanocarpa* L. (Formula 2), ceea ce înseamnă un raport de 4:1 între polifenolii celor două specii vegetale. Cei 5 ml extract standardizat combinat, corespunzător fiecărei formule, se vor adăuga într-o cantitate (volum) de 50 ml produs final de igienă ori cosmetic, aceasta conducând la un conținut de 5 mg polifenoli totali (GAE) per 1 ml produs final condiționat. 9  
11  
13  
15  
17  
19

De exemplu, în cazul de față, de la 100 g materie primă vegetală s-au obținut, în medie: 21

- 1100 ml extract din herba de pufuliță/*Epilobium hirsutum* L. cu un conținut de 4,45 mg polifenoli totali (GAE) per 1 ml extract alcoolic brut care, dacă se standardizează, conform invenției, conduce la  $1100 \times 4,45 = 4895 : 50 = 100$  ml extract standardizat; 23  
25

- 1300 ml extract din frunze de brusture/*Arctium lappa* L. cu un conținut de 1,05 mg polifenoli totali (GAE) per 1 ml extract alcoolic brut care dacă se standardizează, conform invenției, conduce la  $1300 \times 1,05 = 1365 : 50 \approx 27$  ml extract standardizat; 27

- 750 ml extract din herba de răchitan/*Lithrum salicaria* L. cu un conținut de 3,0 mg polifenoli totali (GAE) per 1 ml extract alcoolic brut care dacă se standardizează, conform invenției, conduce la  $750 \times 3 = 2250 : 50 = 45$  ml extract standardizat; 29  
31

- 850 ml extract din frunze de scoruș/*Aronia melanocarpa* L. cu un conținut de 3,26 mg polifenoli totali (GAE) per 1 ml extract alcoolic brut care dacă se standardizează, conform invenției, conduce la  $850 \times 3,26 = 2771 : 50 \approx 55$  ml extract standardizat. 33

Prin aplicarea procedurii, conform invenției, rezultă două avantaje: 35

- se obțin 4 extracte vegetale cu un conținut standardizat în polifenoli totali exprimați în acid galic (50 mg GAE per 1 ml extract) care pot fi combinate în diferite formule și produse finale condiționate de igienă ori de uz cosmetic; 37

- se obțin 4 extracte vegetale cu efect antioxidant marcat, două dintre ele, respectiv extractul din herba pufuliță/*Epilobium hirsutum* și extractul din frunze de brusture/*Arctium lappa*, în plus cu efect antimicrobian pe bacterii frecvent întâlnite (*S. aureus* și *E. coli*), care pot fi utilizate drept ingrediente sau bază pentru obținerea de produse de igienă ori cosmetice noi, cu efect antimicrobian-antioxidant. 39  
41  
43

Se dau mai jos cele 6 exemple de realizare a procedurii, conform invenției, pentru cele 4 extracte vegetale și cele două formule finale rezultate (Formula 1 și Formula 2): 45

**Exemplul 1:** Extract alcoolic din herba de pufuliță cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L. pentru obținerea de produse de igienă ori cosmetice cu efect antimicrobian: 47

- 100 g materie prima constituită din herba de pufuliță cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L. uscată și măcinată grosier se extrage, o singură dată, cu 2000 mL etanol 70% (v), 1 h, cu agitare continuă, la temperatura de reflux. Extractul hidroalcoolic brut rezultat se separă cald 49

# RO 130827 B1

1 (40...45°C) de masa de materie primă prin filtrare pe hârtie de filtru industrial prevăzut cu con  
de siguranță, la presiune atmosferică. Se obțin circa 1100 mL soluție extractivă  
3 mucilaginoasă de culoare brun deschis; raport mediu de imbibiție 1:4,5 - g/v. Soluția extrac-  
tivă alcoolică rezultată se analizează în ceea ce privește calitatea și conținutul în polifenoli  
5 totali exprimați în acid galic (GAE) după care se concentrază la reziduu/spiss. Produsul  
rezultat se reia în etanol 70% (v) la o concentrație standard de 50 mg polifenoli totali (GAE)  
7 per 1 ml extract final standardizat.

**Exemplul 2:** Extract alcoolic din herba de răchitan/*Lythrum salicaria* L. pentru  
9 obținerea de produse de igienă ori cosmetice cu efect antioxidant:

- 100 g materie primă constituită din herba de răchitan/*Lythrum salicaria* L. uscată și  
11 măcinată grosier se extrage, o singură dată, cu 1000 mL etanol 70% (v), 1 h, cu agitare  
continuuă, la temperatura de reflux. Extractul hidroalcoolic brut rezultat se separă cald  
13 (40...45°C) de masa de materie primă prin filtrare pe hârtie de filtru industrială prevăzut cu  
con de siguranță, la presiune atmosferică. Se obțin circa 750 mL soluție extractivă de culoare  
15 brun-verzui; raport mediu de imbibiție 1:2,5 - g/v. Soluția extractivă alcoolică rezultată se  
analizează în ceea ce privește conținutul calitativ și cantitativ în polifenoli totali exprimați în  
17 acid galic (GAE) după care se concentrază la reziduu/spiss. Produsul rezultat se reia în  
etanol 70% (v) la o concentrație standard de 50 mg polifenoli totali (GAE) per 1 ml extract  
19 final standardizat.

**Exemplul 3.** Formula 1 - Extract standardizat combinat pe bază de herba de pufulița  
21 cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L. și herba de răchitan/*Lythrum salicaria* L. pentru obținerea  
de produse de igienă ori cosmetice cu efect antimicrobian - antioxidant:

- 4 ml extract alcoolic standardizat din herba de pufulița cu flori mici/*Epilobium*  
23 *hirsutum* L. cu o concentrație de 50 mg polifenoli totali (GAE) per 1 ml extract, în total  
25  $4 \times 50 = 200$  mg polifenoli, se vor amesteca cu 1 ml extract alcoolic standardizat din herba  
de răchitan/*Lythrum salicaria* L. cu o concentrație de 50 mg polifenoli totali (GAE) per 1 ml  
27 extract, în total  $1 \times 50 = 50$  mg polifenoli, astfel rezultând 5 ml extract standardizat combinat  
cu un conținut total de 250 mg polifenoli totali, raport între polifenolii speciilor/extractele  
29 vegetale 4:1 (g/g - v/v). Acești 5 ml extract standardizat combinat, respectiv Formula 1, se  
vor adăuga într-o cantitate (volum) de 50 ml produs final de igiena ori cosmetic, însemnând  
31 un conținut de 5 mg polifenoli totali (GAE) per ml produs final condiționat.

**Exemplul 4:** Extract alcoolic din frunze de brusture/*Arctium lappa* L. pentru obținerea  
33 de produse de igienă ori cosmetice cu efect antimicrobian:

- 100 g materie primă constituită din frunze de brusture/*Arctium lappa* L. uscate și  
35 măcinate grosier se extrag, o dată, cu 2000 mL etanol 70% (v), 1 h, cu agitare continuă, la  
temperatura de reflux. Extractul hidroalcoolic brut rezultat se separă cald (40...45°C) de  
37 masa de materie primă prin filtrare pe hârtie de filtru industrială prevăzut cu con de siguranță,  
la presiune atmosferică. Se obțin circa 1300 mL soluție extractivă de culoare brună; raport  
39 mediu de imbibiție 1:3,5 - g/v. Soluția extractivă alcoolică rezultată se analizează privind  
conținutul calitativ și cantitativ în polifenoli totali exprimați în acid galic (GAE) după care se  
41 concentrază la reziduu/spiss. Produsul rezultat se reia în etanol 70% (v) la o concentrație de  
50 mg polifenoli totali (GAE) per ml extract final standardizat.

**Exemplul 5:** Extract alcoolic din frunze de scorus negru/*Aronia melanocarpa* L.  
43 pentru obținerea de produse de igienă ori cosmetice cu efect antioxidant:

- 100 g materie primă constituită din frunze de scoruș/*Aronia melanocarpa* L. uscate  
45 și măcinate grosier se extrag, o dată, cu 1000 mL etanol 70% (v), 1 h, cu agitare continuă,  
47 la temperatura de reflux. Extractul hidroalcoolic brut rezultat se separă cald (40...45°C) de  
masa de materie primă prin filtrare pe hârtie de filtru industrială prevăzut cu con de siguranță,  
49 la presiune atmosferică. Se obțin circa 750 mL soluție extractivă de culoare verde-brun;  
raport mediu de imbibiție 1:2,5 - g/v. Soluția extractivă alcoolică rezultată se analizează

# RO 130827 B1

privind conținutul calitativ și cantitativ în polifenoli totali exprimați în acid galic (GAE) după care se concentrează la reziduu/spiss. Produsul rezultat se reia în etanol 70% (v) la o concentrație de 50 mg polifenoli totali (GAE) per ml extract final standardizat.

**Exemplul 6:** Formula 2 - Extract standardizat combinat pe bază de frunze de brusture/*Arctium lappa* L. și frunze de scoruș negru/*Aronia melanocarpa* L. pentru obținerea de produse de igienă ori cosmetice cu efect antimicrobian-antioxidant:

- 4 ml extract alcoolic standardizat din frunze de brusture/*Arctium lappa* L. cu o concentrație de 50 mg polifenoli totali (GAE) per 1 ml extract, în total 4 x 50 = 200 mg polifenoli, se vor amesteca cu 1 ml extract alcoolic standardizat din frunze de scoruș negru/*Aronia melanocarpa* L. cu o concentrație de 50 mg polifenoli totali (GAE) per 1 ml extract, în total 1 x 50 = 50 mg polifenoli, astfel rezultând 5 ml extract standardizat combinat cu un conținut total de 250 mg polifenoli totali, raport între polifenolii speciilor/extractele vegetale 4:1 (g/g - v/v). Acești 5 ml extract standardizat combinat, respectiv Formula 2, se vor adăuga într-o cantitate de 50 ml volum final produs de igienă ori cosmetic, aceasta însemnând un conținut de 5 mg polifenoli totali (GAE) per 1 ml produs final condiționat.

Dovada efectului antimicrobian, respectiv antioxidant a celor 4 extracte vegetale este adusă de experimentarea microbiologică (metoda cilindrilor pe trei tulpini microbiene rezistente - vezi tabelul 1) și de studiile privind activitatea antioxidantă (metoda cu DPPH - vezi diagrama 2), cele două experimente demonstrând clar activitatea antioxidantă (AA), scavenging de radicali liberi a celor 4 extracte, mai accentuate în cazul extractelor de răchitan și aronia, ca și efectul antimicrobian cert al extractelor de pufuliță cu flori mici și brusture, obținute conform invenției (vezi punctul 7).

Punctual, s-au obținut următoarele rezultate:

În cazul extractelor care alcătuiesc Formula 1 (fig. 1, cromatogramele A și S), extractul din herba de pufuliță cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L. a demonstrat atât un efect antimicrobian, pe ambele tulpini bacteriene, respectiv *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 și *Escherichia coli* ATCC 8739, cât și un efect antioxidant bun (AA = 75% pentru diluția 0,5 mg/mL), în timp ce extractul din herba de rachitan/*Lythrum salicaria* L. a demonstrat un efect antioxidant puternic (AA = 88%, de asemenea pentru diluția 0,5 mg/mL).

În cazul extractelor care alcătuiesc Formula 2 (fig. 1, cromatogramele C și D), extractul din frunze de brusture/*Arctium lappa* L. a demonstrat un efect antimicrobian cert pe *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 și un efect antioxidant bun (AA = 71% pentru diluția 0,5 mg/mL) în timp ce extractul din frunze de scoruș negru/*Aronia melanocarpa* L. a demonstrat un efect antioxidant puternic (AA = 87%, de asemenea pentru diluția 0,5 mg/mL).

## Diametrul zonelor de inhibiție asupra unor tulpini standardizate (ATCC)

Tabelul 1

Proba test	Tulpini test	Diametru zona inhibiție (mm)	Rezultate
Extract din herba de <i>Epilobium hirsutum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	15.5	±±
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	17	++
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	< 10	-
Extract din frunze de <i>Arctium lappa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	20	+++
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	< 10	-
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	< 10	-

1 Unde:  
diametrul < 10 mm înseamnă lipsa de activitate și este notată cu semnul '-';  
3 diametrul de 11-15 mm înseamnă activitate slabă și este notată cu semnul '+';  
diametrul de 16-20 mm înseamnă activitate moderată și este notată cu semnul '++';  
5 diametrul > 20 mm înseamnă activitate certă sau bună și este notată cu semnul '+++'.  
Astfel, s-a demonstrat că cele 4 extracte vegetale, obținute conform invenției (vezi

7 punctul 7), au atât efect antioxidant, cât și efect antimicrobian (cazul particular al extractelor  
de pufuliță cu flori mici și brusture) pe tulpini bacteriene rezistente, ceea ce susține utilizarea  
9 acestora drept materie primă ori bază a unor produse de igienă ori cosmetice cu efect  
antimicrobian - antioxidant.

11

## 13 Bibliografie

15 1. Shanmugam Hemaiswarya, Anii Kumar Kruthiventi, Mukesh Doble. Synergism  
between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 2008;  
17 15: 639-652;

19 2. Marjorie Murphy Cowan. Plant products as Antimicrobial agents. *Clin Microbiol  
Rev.*, 1999, 12(4): 564-582;

21 3. Mason T.L., Wasserman B.P., Inactivation of red beet beta-glucan synthase by  
native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry*, 1987; 26: 2197-2202;

23 4. Tsuchiya H., Sato M., Miyazaki T., Fujiwara S., Tanigaki S., Ohyama M., Tanaka  
T., Iinuma M., Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones  
against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.*, 1996; 50(1): 27-34;

25 5. K. Nakahara, S. Kawabata, H. Ono, K. Ogura, T. Tanaka, T. Ooshima, S. Hamada.  
Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glycosyltransferases of mutants streptococci.  
27 *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; 59: 968-973;

29 6. Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of  
action. *J Nat Prod.*, 1996; 59(2): 205-15;

31 7. Phillipson J.D., O'Neil MJ. New leads to the treatment of protozoal infections based  
on natural product molecules. *Acta Pharm Nord.*, 1987; 1: 131-144;

33 8. Zhang Y., Lewis K. Fabatins: new antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiol  
Lett.* 1997; 1; 149(1): 59-64;

35 9. T.P. Tim Cushnie, Andrew J. Lamb. Antimicrobial activity of flavonoids.  
*International Journal of Antimicrobial Agents*, 2005; 26: 343-356;

37 10. Pîrvu Lucia, Cornelia Nichita, Maria Giuginca, Aurelia Meghea. Structure -  
antioxidant activity relationship between some natural vegetal polyphenols compounds. *Rev  
Chim-Bucharest*, 2007; 58(9): 914-917;

39 11. N. Iftimie, M. Giurginca, A. Meghea. *Rev Chim-Bucharest*, 2003; 55: 1025-1028;

12. [www.makingcosmetics.com/.../04-herbal-ingre](http://www.makingcosmetics.com/.../04-herbal-ingre).

41 13. Lucia Battinelli, Beatrice Tita, Maria Grazia Evandri, Gabriela Mazzanti.  
Antimicrobial activity of *Epilobium* spp. Extracts. *Il Farmaco* 2001; 56: 345-348;

43 14. Juliana Vianna Pereira, Debora Cristina Baldoqui Bergamo, Jose Odair Pereira,  
Suzelei de Castra Franca, Rosemeire Cristina Linhares Rodrigues Pietro Yara T. Correa  
45 Silva-Sousa. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms  
commonly found in endodontic infections. *Braz. Dent. J.*, 2005; 16(3).



## RO 130827 B1

15. Pîrvu Lucia, Colceru Svetlana Mihul, Nita Sultana, Paraschiv Ileana. Patent RO128214 (A2) 2013-03-29; 1
16. Zeynep Tunalier, Muberra Kosar, Esra Kupeli, Ihsan Calis, K. Husnu Can Baser. Antioxidant, anti-inflammatory, anti-nociceptive activities and composition of *Lythrum salicaria* L. extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007; 110: 539-547; 3  
5
17. Jan Oszmianski, Aneta Wojdylo. *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol.*, 2005, 221: 809-813. 7

# RO 130827 B1

## Revendicări

1

3

1. Procedeu de obținere a formulelor active cu efect antimicrobian-antioxidant pe bază de extracte vegetale standardizate de *Epilobium hirsutum* L. - herba pufuliță cu flori mici, *Lithrum salicaria* L. - herba răchitan, *Arctium lappa* L. - folium brustur și *Aronia melanocarpa* L. - folium scoruș negru, care cuprinde următoarele etape:

5

7

- extracție a materiei prime vegetale cu etanol 70% (v/v), la temperatura de reflux, timp de 1 h, în rapoarte de 1:20 g/v pentru pentru *Epilobium hirsutum* și *Arctium lappa*, și 1:10 g/v pentru *Lithrum salicaria* și *Aronia melanocarpa* (conform revendicare 2); filtrare a extractului;

9

11

- analiză și standardizare a extractului în polifenoli totali exprimați în acid galic (50 mg GAE per 1mL extract) (conform revendicare 3), urmată de amestecarea componentelor/extractelor în raport 4:1, adică 4 părți de extract standardizat de herba de pufuliță cu flori mici/*Epilobium hirsutum* și 1 parte extract standardizat de herba de răchitan/*Lithrum salicaria*, respectiv 4 părți de extract standardizat de frunze de brustur/*Arctium lappa* și 1 parte extract standardizat de frunze de scoruș negru/*Aronia melanocarpa*, pentru a obține cele două formule active (conform revendicare 4).

13

15

17

19

2. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, materia primă constituită din herba de pufuliță cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L., ori herba de răchitan/*Lithrum salicaria* L., ori frunze de brustur/*Arctium lappa* L. ori frunze de scoruș negru/*Aronia melanocarpa* L., uscată, măcinată și omogenizată se extrage, fiecare separat, la temperatura de reflux cu etanol 70% (v), timp de 1 h, în rapoarte de extracție specifice, după cum urmează; 1:20 (g/v) pentru herba de pufuliță cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L., 1:20 (g/v) pentru frunze de brustur/*Arctium lappa* L., 1:10 (g/v) pentru herba de răchitan/*Lithrum salicaria* L. și 1:10 (g/v) pentru frunze de scoruș negru/*Aronia melanocarpa* L.

21

23

25

27

3. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, soluțiile alcoolice filtrate rezultate se concentrează la reziduu/sicc, iar produsele rezultate se reiau în etanol 70% (v), la concentrația standard de 50 mg polifenoli totali exprimați în acid galic (GAE) per 1 mL extract vegetal astfel rezultând 4 extracte vegetale standardizate.

29

31

4. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, extractele standardizate obținute se combină în raport 4:1 rezultând cele două formule de amestecuri de extracte astfel: Formula 1 - la 4 părți de extract standardizat din herba de pufuliță cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L. se adaugă 1 parte de extract standardizat din herba de răchitan/*Lithrum salicaria* L.; Formula 2 - la 4 părți de extract standardizat din frunze de brustur/*Arctium lappa* L. se adaugă 1 parte extract standardizat din frunze de scoruș negru/*Aronia melanocarpa* L.

33

35

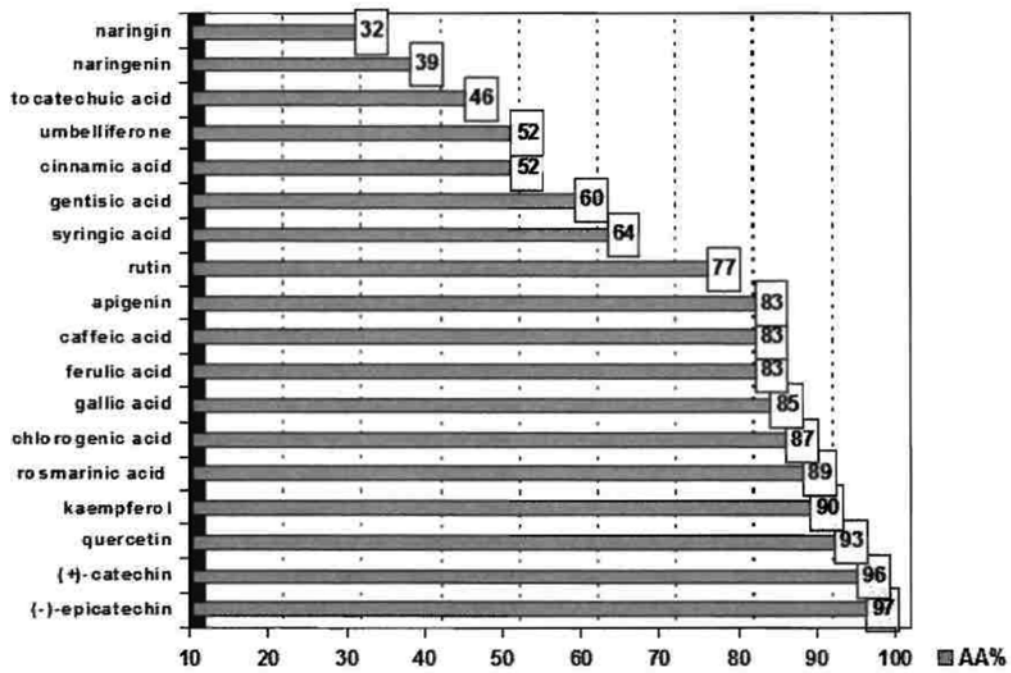


Fig. 1

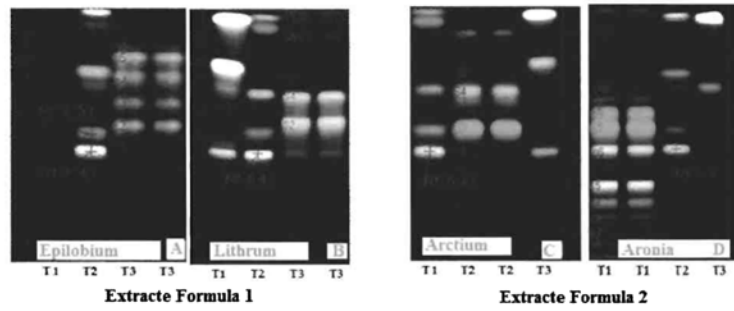


Fig. 1

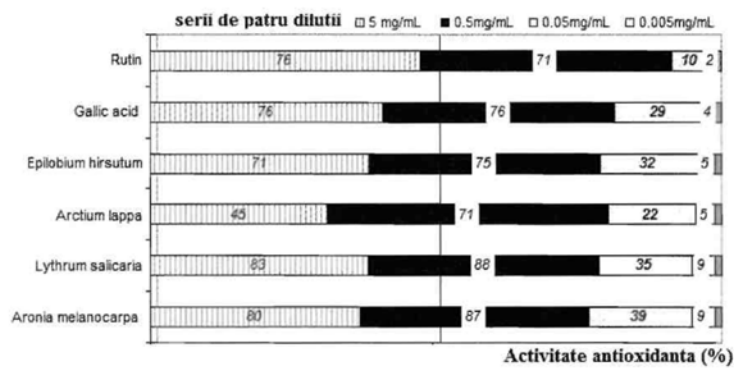


Diagrama 2

