



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00040**

(22) Data de depozit: **19.01.2012**

(41) Data publicării cererii:
30.10.2012 BOPI nr. **10/2012**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA "OVIDIUS"**
CONSTANȚA, BD. MAMAIA NR.124,
CONSTANȚA, CT, RO

(72) Inventatori:
• **BRATU MIHAELA MIRELA,**
ALEEA LOTUS NR.8, BL.11 C, SC.A, AP.39,
CONSTANȚA, CT, RO;
• **NEGREANU-PÎRJOL TICUȚA,**
STR. SUCEAVA NR. 12, BL. V4, SC. C,
ET. 1, AP. 48, CONSTANȚA, CT, RO;

• **SURDU OLGA, STR.B.P.HAȘDEU NR.120,**
BL. L8B, SC. A, AP. 3, CONSTANȚA, CT,
RO;

• **DOROFTEI ELENA,**
STR. BADEA CĂRȚAN NR. 4, BL. 3C, SC. B,
ET. 1, AP. 26, CONSTANȚA, CT, RO;

• **HOȘTINĂ CORINA, BD. TOMIS NR. 324,**
BL. M3, SC. C, ET. 3, AP. 55, CONSTANȚA,
CT, RO;

• **MIREȘAN HORAȚIU, STR. TRAIAN**
NR. 62, BL. K4, AP. 75, CONSTANȚA, CT,
RO;

• **RONCEA FLORENTINA NICOLETA,**
STR. CPT. BOBRILĂ EUGENIU NR. 4,
BL. R1, SC. C, AP. 42, CONSTANȚA, CT,
RO

(54) EXTRACT BIOACTIV LIPOFIL DIN NĂMOL SAPROPELIC TERAPEUTIC ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTUIA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un extract bioactiv cu acțiune anti-oxidantă și efect de regenerare, stimulare și ecranare a radiațiilor UV, și la un procedeu de obținere a acestuia. Extractul conform invenției este constituit din 15...17% compuși cu catene hidrocarbonate saturate, 55...56% compuși organici cu oxigen, 24...25% compuși cu azot și sulf, 1,5...2% hidrocarburi aromatice și 0,2...0,5% beta-caroten. Procedeu conform invenției constă din extragerea nămolului sapropelic uscat și pulverizat, umectat în prealabil cu apă distilată cu un amestec 2:1 de metanol:cloroform, separarea suspensiei prin centrifugare, aducerea rezidului după

prima extracție până la pH 3,5...4 cu acid clorhidric 0,2 N, urmată de extracția peletului, cu reunirea celor două supernatante rezultate în urma extracției, separarea fazei cloroformice prin adăugarea de apă distilată, neutralizarea acesteia cu soluție alcoolică de hidroxid de potasiu 1 N, extragerea peletului rezidual cu benzen, cu reunirea finală a fazei cloroformice și a celei benzenice, și evaporarea solvenților, din care rezultă un extract ceros lipofilic de nămol care se condiționează.

Revendicări: 2

Figuri: 1



EXTRACT BIOACTIV LIPOFIL DIN NĂMOL SAPROPELIC TERAPEUTIC ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTUIA

DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția de față se referă la un extract bioactiv lipofil din nămol sapropelic terapeutic și la un procedeu de obținere a acestuia. Extractul bioactiv lipofil din nămol sapropelic terapeutic pentru uz extern este destinat domeniului sănătății umane, privind acțiunea trofică și regeneratoare, protectoare împotriva radiațiilor UV și împotriva radicalilor hiper reactivi ai oxigenului, putând fi utilizat ca principiu activ în produse dermo-cosmetice cu efect de protecție și regenerare a pielii.

Stadiul actual al cunoașterii

În ultimii ani există o preocupare și o cerere crescută de realizare de produse cosmetice cu principii active provenite din surse naturale, cum ar fi ape minerale, nămoluri terapeutice naturale sau obținute prin maturarea unor amestecuri de argile cu ape minerale și cu materiale vegetale de diverse proveniențe (Veniale F. and col. Appl. Clay Sci. 2007). Atenția din ce în ce mai mare care se acordă acestor surse de materii prime pentru industria dermo-cosmetică este justificată de noile concepte în domeniul pieții produselor dermo-cosmetice, care acordă o importanță din ce în ce mai mare principiilor active de origine naturală și terapiilor tradiționale.

Se cunosc produse dermo-cosmetice care au ca principii active nămolurile bituminoase integrale din Marea Moartă (Ahava), apa din Marea Moartă (Ahava), ape minerale de diverse proveniențe (Vichy, Avene). De asemenea, pornind de la surse existente în România, se fabrică game de produse cosmetice pe baza unui extract apos din nămolul terapeutic din Lacul Amara (Pell-Amar), precum și pe bază de ape minerale din stațiunea Băile Herculane (Iva Therm).

Materia primă utilizată pentru obținerea extractului bioactiv lipofil conform invenției, este reprezentată de **nămolul sapropelic terapeutic provenit din Lacul Techirghiol** care face parte din grupa sedimentelor terapeutice subacvatice organogene, ce are aspectul unui depozit de culoare neagră, plastic și unsuros, care din punct de vedere al *compoziției globale* este puternic hidratat (71,24%), bogat în hidrosulfură de fier coloidală și în substanțe minerale totale (20,36%), fiind prezente cantități semnificative de substanțe organice dozate (cca. 9,6%).

- *Substanțele organice* dozate (cca. 9,6%) sunt formate din substanțe humice, proteine, substanțe lipofile, celuloză, bitumine și pectine. Din datele menționate în literatura de specialitate, se evidențiază grupa *bituminelor*, cu pondere însemnată în substanțele organice dozate (cca. 33,4%) și care cuprinde substanțe cu efect estrogenic. *Substanțele humice*, cu o pondere de 9,95 % din totalul de substanțe organice, fără a atinge valori foarte mari, imprimă nămolului anumite caracteristici, frânează unele acțiuni enzimatică, înalt grad de gonflare, proprietatea de schimbatori de ioni. *Substanțele proteice*, cu o pondere de 11,6 % din total substanțe organice, prezintă interes prin rezerva energetică bogată și ușor asimilabilă pentru microorganismele care participă la procesul de peloidogeneză. *Celuloza*, fără să prezinte o valoare terapeutică ca atare, reprezintă cca. 5,0% din totalul de substanțe organice dozate.
- *Conținutul de substanțe minerale*, determinat prin analiză instrumentală, a pus în evidență prezența următoarelor microminerale: sodiu (16,1%), magneziu (14,28%), calciu (11,65%), potasiu (6,78%), fier (1,25%) și mangan (0,098%). Privită ca un tot unitar, fracțiunea solidă minerală are aspectul unui schelet de SiO₂ (cu conținut în silicați de cca. 27,7%) pe care se grefează săruri aquasolubile și acidosolubile.
- Dintre *Compușii cu sulf*, în special hidrogenul sulfurat liber atinge 0,044%, iar unele studii de literatură au pus în evidență și prezența hidrogenului sulfurat legat.
- *pH-ul* 8,2 indică un caracter bazic al peloidului, confirmat și de conținutul relativ ridicat în magneziu și calciu.

- *Granulometria* nămolului sapropelic indică o compoziție pulverulentă cu valori mai mici de 0,315 mm a diametrului particulelor și cu o pondere de cca. 40,8% a fracțiunii de 0,045 mm, încadrându-se astfel în categoria materialelor pulverulente fine.

Nămolul sapropelic terapeutic din lacului Techirghiol, prezintă calități terapeutice deosebite, fiind puternic hidratat, bogat în substanțe minerale și mici cantități de substanțe organice, conținând hidrogen sulfurat, sulfură de fier, sulf nativ și substanțe enzimatică. Structura granulară fină, conținutul ridicat în coloizi organici și minerali, plasticitatea cu limite de umiditate foarte largi, conferă nămolului sapropelic o remarcabilă capacitate de absorbție a ionilor de calciu, magneziu, potasiu, fier, cu rol important prin mobilizarea acestora în organism. Procedurile medicale, bazate pe împachetari cu nămol sapropelic, sunt deosebit de eficiente în tratarea afecțiunilor aparatului locomotor (reumatism degenerativ, articular, inflamator, boli ale sistemului periferic), afecțiuni dermatologice, ginecologice, boli asociate (respiratorii, profesionale, endocrine, boli de nutriție și metabolice), boli ale sistemului nervos periferic, boli cardio-vasculare.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în producerea unui extract bioactiv lipofil din nămol sapropelic terapeutic ce conține substanțe minerale și substanțe organice, substanțe cu efect de stimularea creșterii și regenerării celulare, putând fi utilizat ca principiu activ în produse dermo-cosmetice cu efect de protecție și regenerare a pielii, în scopul tratării unor afecțiuni dermatologice.

Extractul bioactiv lipofil din nămol sapropelic terapeutic conform invenției, înlătură dezavantajele altor extracte bioactive lipofile folosite în produsele dermo-cosmetice, prin aceea că prezintă o remarcabilă capacitate de absorbție a ionilor de calciu, magneziu, potasiu, fier, cu rol important prin mobilizarea acestora la nivelul organismului, cu efect benefic asupra schimburilor metabolice.

Față de utilizarea integrală a nămolurilor terapeutice de diverse origini ca principiu activ în produsele dermo-cosmetice sau a extractelor apoase din aceste nămoluri, prezenta invenție prezintă **avantajele** că pe de o parte, prin procedeul propus sunt înlăturați compușii cu potențial iritant sau alergogen (ioni Cl^- , Br^- , Mg^{2+} , Na^+ în mari cantități, substanțe proteice), iar pe de altă parte, componenții lipofili din nămolul sapropelic obținut, au o mai bună compatibilitate și biodisponibilitate.

De asemenea extractul bioactiv lipofil din nămol sapropelic terapeutic conform invenției, atât prin compoziție, materii prime, excipienți folosiți, cât și prin tehnologiile abordate, prezintă maximă eficiență și efecte secundare minimale, este biocompatibil, are toxicitate redusă sau neglijabilă, prezintă o bună stabilitate (în timp și la lumină) și nu este factor poluant al mediului.

Se dă un exemplu de realizare a invenției, în legătură cu Figura nr. 1, care reprezintă Schema tehnologică a procedurii de obținere a extractului bioactiv lipofil din nămol sapropelic terapeutic din Lacul Techirghiol.

Exemplu de obținere a extractului lipofil din nămol sapropelic terapeutic conform invenției

80 g pulbere obținută prin uscarea și triturarea nămolului sapropelic terapeutic din Lacul Techirghiol (având un conținut în azot organic de 0,3117% și un conținut de cenușă după calcinarea la 550°C de 91,69% raportat la substanța uscată), se umidifică în 40 mL apă distilată timp de 1 oră. Suspensia omogenizată obținută se extrage cu 300 mL amestec metanol:cloroform 2:1 (v:v) timp de 30 minute la temperatura camerei. Suspensia se centrifughează 10 min. la 4000 rpm. Se obține supernatantul 1, iar peletul 1 obținut se tratează cu soluție HCl 0,2 N până la $\text{pH} = 3,5 - 4$ și se resuspendă în 300 mL amestec metanol:cloroform 2:1 (v:v) timp de 24 ore la 20°C, cu agitare. Suspensia se centrifughează 10 min. la 4000 rpm. Se obține supernatantul 2, care se reunește cu supernatantul 1. Peletul 2 obținut după a doua extracție se extrage în continuare cu benzen, până la epuizare. Se obține extractul benzenic. Cele două supernatante 1 și 2, reunite, rezultate în urma extracției la rece cu amestec metanol:cloroform 2:1 (v:v), sunt aduse în pâlnia de separare. Se adaugă 300 mL cloroform și 300 mL apă distilată. Se agită, iar după separarea fazelor se separă și se reține

faza cloroformică. Faza cloroformică astfel obținută este neutralizată cu soluție alcoolică KOH 1 N. În continuare, faza cloroformică este amestecată cu extractul benzenic iar amestecul obținut este antrenat cu un curent de aer cald, pentru îndepărtarea completă a solvenților organici. Se obține un extract ceros lipofil de nămol sapropelic.

Procedeul de obținere a extractului lipofil din nămol sapropelic terapeutic constă în următoarea Schemă tehnologică prezentată în Figura nr. 1, desen anexat prezentei descrieri.

Pentru patru eșantioane de nămol sapropelic extrase conform metodei propuse în cadrul invenției, s-a calculat randamentul de obținere al extractului lipofil de nămol sapropelic terapeutic (Tabel nr. 1).

Masa de substanțe lipofile extrase din nămolul uscat prin metoda propusă conform invenției, este de **0,903%**.

Tabel nr. 1. Masa de substanțe lipofile extrase prin metoda propusă conform invenției

Proba de nămol sapropelic	Masa de nămol umed (g)	Masa de nămol uscat și triturat (g)	Masa de extract lipofil obținut (g)
1.	970	360	3,0593
2.	863	320	3,4964
3.	647	240	1,7558
4.	826	306	2,7800

Analiza chimică a extractului lipofil de nămol sapropelic terapeutic s-a făcut prin spectrometrie IR, în intervalul 400 – 4000 cm^{-1} . În urma analizei spectrelor de vibrație FT/IR înregistrate pentru extractul lipofil de nămol sapropelic terapeutic, obținut conform invenției, s-a identificat prezența următoarelor grupări funcționale: 2848.90 - 2918.06 cm^{-1} -CH alifatic; 1738.65 cm^{-1} -C=O; 1462.75 cm^{-1} -CH; 1376.89 cm^{-1} -NO₂; 667.97 cm^{-1} -X; 667.97-539.84 cm^{-1} -vibrație de schelet; 508.22 cm^{-1} -COO; 419.97-508.22 cm^{-1} -grupări carboxilat și amino protonate din aminoacizi.

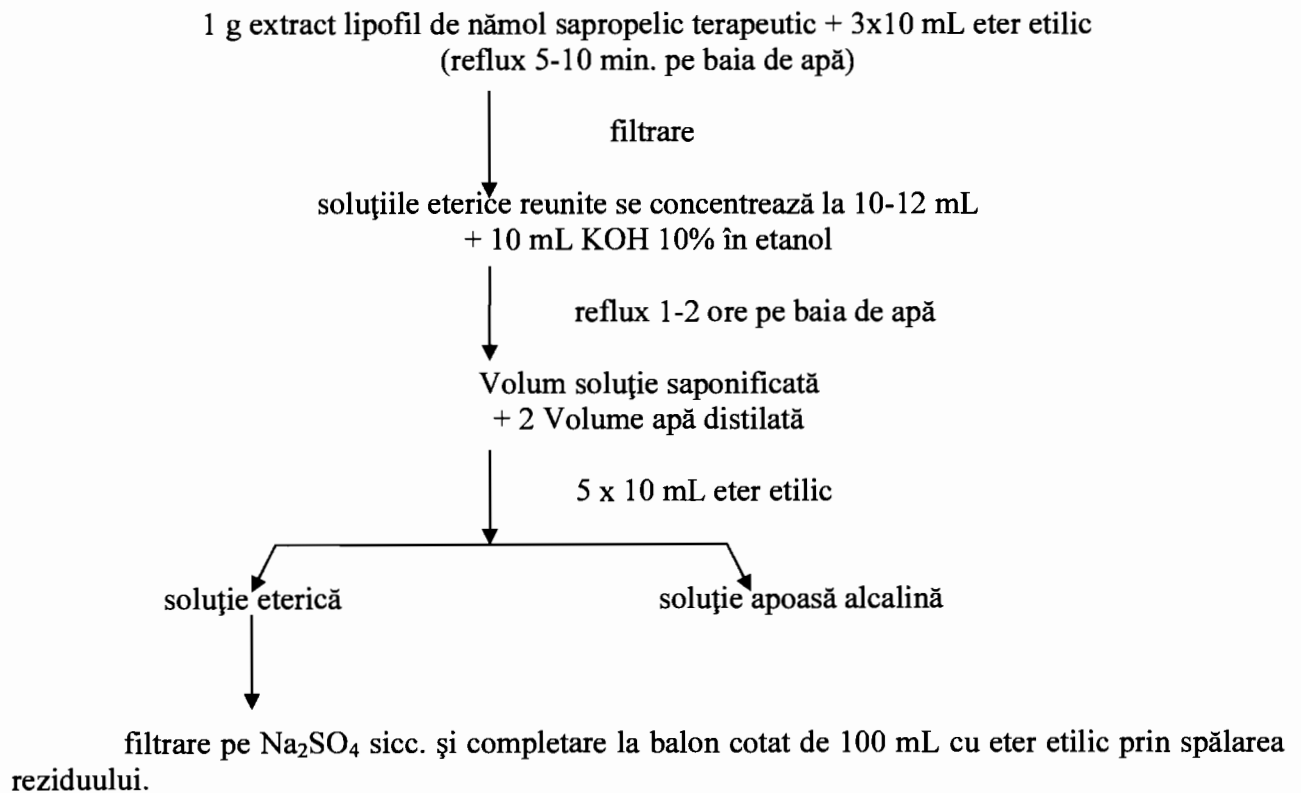
Determinarea conținutului de beta-caroten din extractul lipofil de nămol sapropelic terapeutic din Lacul Techirghiol

Pentru determinarea cantitativă a totalului carotenoidic s-a aplicat metoda colorimetrică, folosind ca substanță de referință beta-caroten soluție 2,5 mg% în benzen. Citirile s-au făcut la un spectrofotometru UV-Vis, la $\lambda = 470 \text{ nm}$. Metoda constă în saponificarea esterilor xantofilici cu KOH 10%, extracția xantofilelor rezultate în eter și măsurarea intensității colorației soluției eterice.

Extractul lipofil de nămol sapropelic analizat a prezentat un conținut de compuși carotenoidici de **192,149 mg%**, exprimați ca **beta-caroten**.

În Figura nr. 2 se prezintă schema de procesare a extractului lipofil de nămol sapropelic terapeutic din Lacul Techirghiol în vederea determinării conținutului de beta-caroten.

Figura nr. 2. Schema de procesare a extractului lipofil de nămol sapropelic terapeutic din Lacul Techirghiol în vederea determinării conținutului de beta-caroten



Extractul lipofil de nămol sapropelic din terapeutic obținut conform invenției, prezintă următoarea compoziție: compusi cu catene hidrocarbonate saturate 15-17%, compusi organici cu oxigen 55-56%, compusi cu N și S 24-25%, hidrocarburi cu nucleu aromatic 1,5-2%, beta caroten 0,2-0,5%.

Determinarea activității antioxidante a extractului lipofil de nămol sapropelic terapeutic

Determinarea activității antioxidante a extractului lipofil de nămol sapropelic terapeutic s-a efectuat prin metoda fotochemiluminescenței (antioxidative capacity in lipid medium, ACL), utilizând aparatul Photochem, Analytik Jena, înregistrându-se următoarele valori (Tabel nr. 2):

Tabel nr. 2. Activitatea antioxidantă a extractului lipofil de nămol sapropelic terapeutic

Nr. crt.	Tipul de extract lipofil de nămol sapropelic terapeutic	Volum de soluție de extract lipofil luat în lucru (μL)	Capacitatea antioxidantă înregistrată (nmol/proba)
1	Extract lipofil soluție stoc	5	2,810
2	Extract lipofil soluție stoc	10	90,688
3	Extract lipofil diluție stoc:metanol 1:10	5	-0,259
4	Extract lipofil diluție stoc:metanol 1:10	10	-0,084
5	Extract lipofil diluție	5	0,047

	stoc:metanol 1:3		
6	Extract lipofil diluție stoc:metanol 1:3	10	1,096

Probele de extract lipofil de nămol sapropelic terapeutic analizate prezintă o bună capacitate antioxidantă, diferențiată după cum urmează:

- În cazul soluției stoc (13,1 mg/mL) de extract lipidic s-a înregistrat cea mai ridicată valoare a capacității antioxidante (2,810 nmol/proba), la volumul de soluție luat în lucru de 5 μ L.

De asemenea, pentru comparație, s-a determinat capacitatea antioxidantă și în cazul a două diluții ale soluției stoc de extract lipidic cu reactivul de lucru metanol, astfel:

- S-a observat că diluția 1 (13,1 mg/mL) : 10 (metanol) este prea mare, au rezultat valori negative (0,259 nmol/proba, respectiv -0,084 nmol/proba), atât pentru volumul de probă de 5 μ L, cât și pentru volumul de 10 μ L.
- În cazul diluției soluției stoc 1 (13,1 mg/mL) : 3 (metanol), la volumul de soluție luat în lucru de 10 μ L, s-a înregistrat o valoare foarte bună a capacității antioxidante (1,096 nmol/proba), dar mai scăzută decât în cazul soluției stoc (2,810 nmol/proba), la volumul de 5 μ L.

- Comparând rezultatele obținute privind capacitatea antioxidantă a extractului lipidic soluție stoc și a celor două diluții cu reactivul de lucru (metanol), s-a observat că cea mai bună capacitate antioxidantă a fost înregistrată în cazul extractului lipidic soluție stoc (volum 5 μ L) urmată de extractul lipidic diluția 1 : 3 (volum 10 μ L). Considerăm că intervalul optim de concentrații ale extractelor lipofile de nămol sapropelic terapeutic pentru care se înregistrează capacități antioxidante foarte bune, sunt cele aferente volumului de 5 μ L al soluției stoc de extract (13,1 mg/mL) până la volumul de 10 μ L aferent diluției cu metanol 1 : 3. Conform calculelor, 1 mg extract lipofil de nămol sapropelic terapeutic, are capacitatea antioxidantă echivalentă cu a 42,9 nmoli standard Trolox.

Testarea capacității antioxidante a extractului lipofil de nămol sapropelic terapeutic obținut conform invenției, a evidențiat că acesta prezintă valori crescute ale activității antioxidante, ceea ce îl indică drept **agent antioxidant eficient**.

Determinarea factorului de protecție solară (SPF) pentru extractul lipofil de nămol sapropelic terapeutic

Probele de extract lipofil de nămol sapropelic terapeutic și soluțiile standard de acid para-amino benzoic (PABA) au fost preparate în etanol. Spectrul de absorbție al probelor și soluțiilor standard au fost determinate în domeniul de lungimi de undă 290-450 nm, utilizând etanolul ca martor. Valorile absorbanțelor citite în intervalul $\lambda = 290-320$ nm, au fost utilizate în ecuația Mansur pentru determinarea SPF. Pentru fiecare soluție s-a făcut un set de 3 determinări identice, iar rezultatele au fost mediate (Tabel nr. 3).

Tabel nr. 3. Valorile SPF determinate pentru extractul lipofilic din nămol sapropelic la diferite concentrații, în comparație cu soluții standard de acid para-amino benzoic (PABA)

Lungimea de undă, λ	Absorbanța Extract 0,5 mg/mL	Absorbanța Extract 0,1 mg/mL	Absorbanța Extract 0,02 mg/mL	Absorbanța PABA 0,02 mg/mL	Absorbanța PABA 0,01 mg/mL	Absorbanța Loțiune Elmiplant SPF 15 diluție 1/50
290	2.135	0.419	0.120	2.520	1.276	1.274
295	1.896	0.367	0.109	2.400	1.198	1.356
300	1.700	0.332	0.095	2.080	1.008	1.424
305	1.536	0.299	0.088	1.472	0.710	1.458
310	1.480	0.276	0.082	0.838	0.459	1.466
315	1.336	0.256	0.074	0.385	0.178	1.440
320	1.274	0.248	0.076	0.141	0.057	1.392
SPF	15.8	3.06	0.9	15.052	7.41	14.36

Se poate observa că extractul lipofilic din nămol sapropelic terapeutic are un **SPF mai mare de 15**, la concentrații de 0,5 mg/mL.

Testarea activității citotoxice a extractului lipofil din nămol sapropelic terapeutic pe culturi stabilizate de fibroblaste de șoarece (NCTC)

Extractul lipofil din nămol sapropelic terapeutic a fost testat *in vitro* în culturi de fibroblaste. Pentru testarea efectului compusilor studiați asupra celulelor s-au analizat viabilitatea celulară și morfologia celulară. Citotoxicitatea a fost testată prin metoda extractului, luând în lucru mai multe grade de diluție ale extractului lipofil de nămol sapropelic. Testarea s-a făcut pe o cultură de NCTC (fibroblaste de șoarece) linie stabilizată. Mediul de creștere a fost MEM cu adaos de antibiotice (penicilină, streptomycină, neomicină) și 10% ser fetal. Sterilizarea probei inițiale s-a făcut prin expunere la UV, iar extractele în mediul de cultură s-au realizat în hotă, în condiții de sterilitate.

Testarea citotoxicității s-a făcut prin metoda cu roșu neutru (RN) (Repetto et al., 2008), cu examinare la 24 și 48 ore. Observațiile morfologice s-au făcut pe placa de cultură, după colorare cu soluție Giemsa (Tabel nr. 4).

Plăcile de cultură au fost însămânțate cu celulele NCTC, la o densitate celulară de 50.000 celule/mL și s-au însămânțat în total: 2 plăci cu 24 godeuri, care au fost incubate cu soluțiile de extract timp de 24 și respectiv 48 ore, pentru care s-a făcut observația de testare a citotoxicității cu RN și 2 plăci cu 24 godeuri, care au fost incubate cu soluțiile de extract timp de 24 și respectiv 48 ore, pentru care s-au făcut observații de morfologie. Incubarea s-a făcut la +37°C într-o atmosferă cu 5% dioxid de carbon, timp de 24 h și respectiv 48 h. Pentru observații de morfologie, celulele din placă s-au fixat și s-a realizat colorația Giemsa, urmată de examinarea microscopică.

Tabel nr. 4. Rezultatele citirilor RN la 24 ore incubare

Diluțiile de extract folosite	Citire 1	Citire 2	Medie	Procent de viabilitate
Martor	0,685 0,748 0,745	0,740 0,743 0,741	0,733	100%
Diluția 1	0,654	0,708	0,690	94,0%

	0,699 0,692	0,686 0,705		
Diluția 2	0,650 0,706 0,708	0,672 0,689 0,670	0,683	93,1%
Diluția 3	0,649 0,702 0,724	0,674 0,685 0,668	0,683	93,1%
Diluția 4	0,637 0,705 0,712	0,674 0,682 0,700	0,685	93,4%
Diluția 5	0,642 0,723 0,709	0,686 0,682 0,669	0,685	93,4%
Diluția 6	0,645 0,696 0,690		0,677	92,3%
Diluția 7	0,624 0,695 0,695		0,671	91,5%
Diluția 8	0,624 0,687 0,683	0,656 0,663 0,674	0,664	90,5%
Diluția 9	0,566 0,612 0,616	0,657 0,667 0,667	0,630	85,9%
Diluția 10	0,555 0,609 0,609	0,613 0,623 0,603	0,602	82,1%
Diluția 11	0,552 0,598 0,599	0,620 0,608 0,600	0,596	81,3%

Tabel nr. 5. Rezultatele citirilor RN la 48 ore incubare

Diluțiile de extract folosite	Citire 1	Citire 2	Medie	Procent de viabilitate
Martor	0,974 0,971 1,035	1,054 1,004 1,029	1,011	100%
Diluția 1	0,891 0,954 0,977	0,957 1,008 1,019	0,967	95,0%
Diluția 2	0,898 0,965 0,979	0,879 0,908 0,907	0,925	91,4%
Diluția 3	0,862 0,946 0,948	0,937 0,955 0,949	0,932	92,1%
Diluția 4	0,863 0,948 0,949	0,976 0,979 0,976	0,948	93,7%

Diluția 5	0,912 0,992 1,006	0,960 1,031 0,938	0,973	96,2%
Diluția 6	0,893 0,971 0,974	0,85 0,994 0,996	0,968	95,7%
Diluția 7	0,864 0,948 0,957	1,032 1,032 1,005	0,973	96,2%
Diluția 8	0,886 0,955 0,970	0,976 0,988 0,998	0,958	94,7%
Diluția 9	0,839 0,890 0,918	0,922 0,941 0,941	0,908	89,8%
Diluția 10	0,815 0,882 0,910	0,896 0,888 0,894	0,880	87,0%
Diluția 11	0,796 0,865 0,849	0,837 0,825 0,849	0,837	82,7%

Pentru culturile incubate cu extract de nămol sapropelic terapeutic propus conform invenției, timp de 24 ore, s-au făcut următoarele observații morfologice:

În cazul diluțiilor 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, celulele nu au prezentat modificări morfologice, prezentând doar o densitate mai mică față de cea a matorului de cultură (Figurile nr. 3, 4).

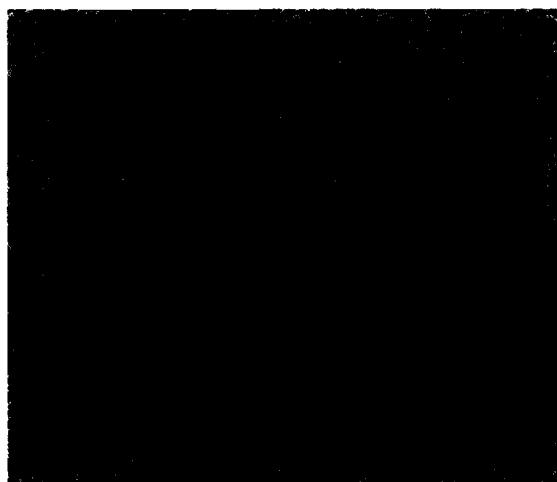


Figura nr. 3. Morfologia fibroblastelor de șoarece în culturi stabilizate la 24 de ore de incubare fără extract (mator de cultură)-microscopie optică 100X

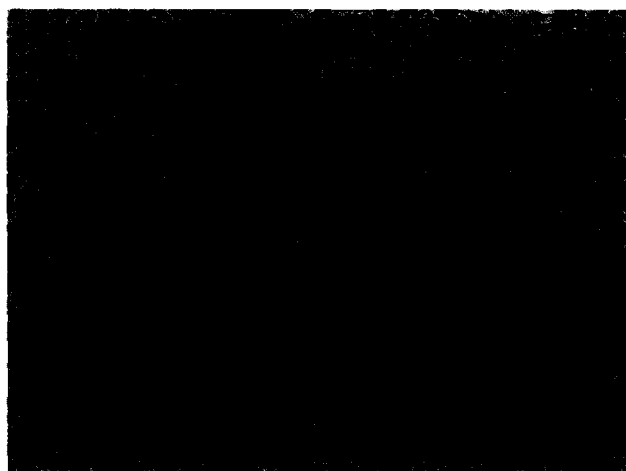


Figura nr. 4. Morfologia fibroblastelor de șoarece în culturi stabilizate la 24 de ore de incubare cu extract lipofil de nămol sapropelic-Diluția 2 - microscopie optică 100X

În cazul diluțiilor 9 și 10, celulele au fost puțin modificate, observându-se alternanțe ale celulelor cu aspect normal cu celule alungite (Figurile nr. 5, 6).



Figura nr. 5. Morfologia fibroblastelor de șoarece în culturi stabilizate la 24 de ore de incubare cu extract lipofil de nămol sapropelic- Diluția 9 - microscopie optică 100X

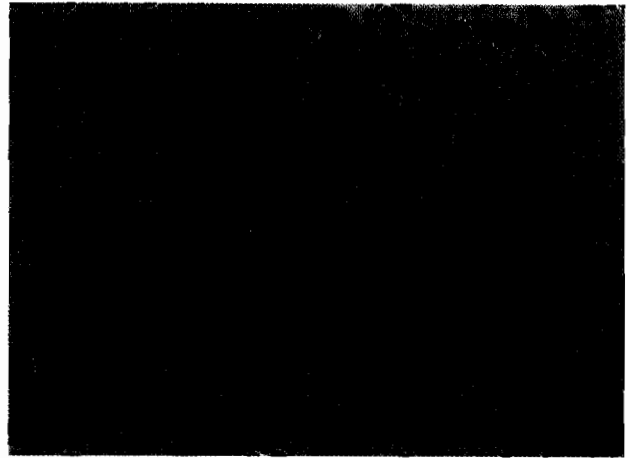


Figura nr. 6. Morfologia fibroblastelor de șoarece în culturi stabilizate la 24 de ore de incubare cu extract lipofil de nămol sapropelic- Diluția 10 - microscopie optică 100X

În cazul Diluției 11, densitatea celulară a fost mai mică decât la concentrațiile anterioare, iar celulele au fost mult mai alungite, multe dintre ele cu aspect fusiform, ceea ce denotă o citotoxicitate mai pronunțată (Figura nr. 7).



Figura nr. 7. Morfologia fibroblastelor de șoarece în culturi stabilizate la 24 de ore de incubare cu extract lipofil de nămol sapropelic- Diluția 11 - microscopie optică 100X

Pentru culturile incubate cu extract de nămol sapropelic terapeutic propus conform invenției, timp de 48 ore, s-au făcut următoarele observații morfologice:

În cazul diluțiilor 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, celulele nu au prezentat modificări morfologice. Celulele prezintă aspect normal, asemănător cu martorul de cultură, doar că densitatea celulară a fost mai mică (Figurile nr. 8, 9).

A handwritten signature in black ink, located at the bottom right of the page. The signature is stylized and appears to be a personal name.

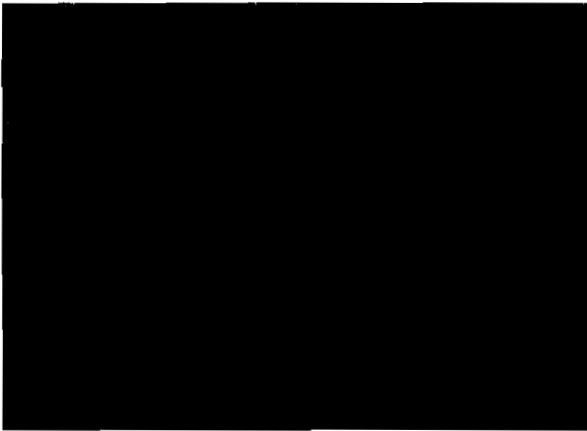


Figura nr. 8. Morfologia fibroblastelor de șoarece în culturi stabilizate la 48 de ore de incubare cu extract lipofil de nămol sapropelic-Diluția 9 - microscopie optică 100X

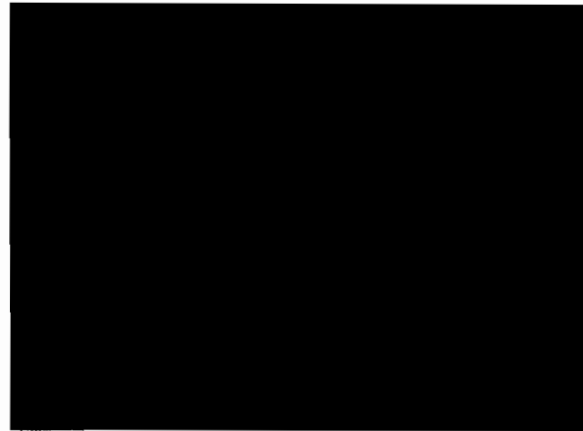


Figura nr. 9. Morfologia fibroblastelor de șoarece în culturi stabilizate la 48 de ore de incubare cu extract lipofil de nămol sapropelic-Diluția 11 - microscopie optică 100X

În cazul diluțiilor 9 și 10, se observă o alungire la unele celule și o densitate celulară mai mică decât a matorului.

În cazul Diluției 11, se observă mai multe celule alungite, fusiforme, iar densitatea celulară este de aproximativ 85% față de matorul de cultură.

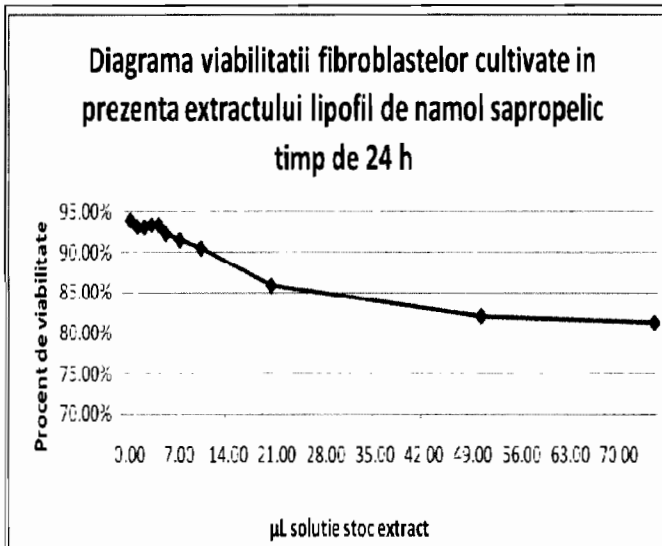


Figura nr. 10. Diagrama viabilității fibroblastelor cultivate în prezența extractului lipofil de nămol sapropelic terapeutic, timp de 24 ore

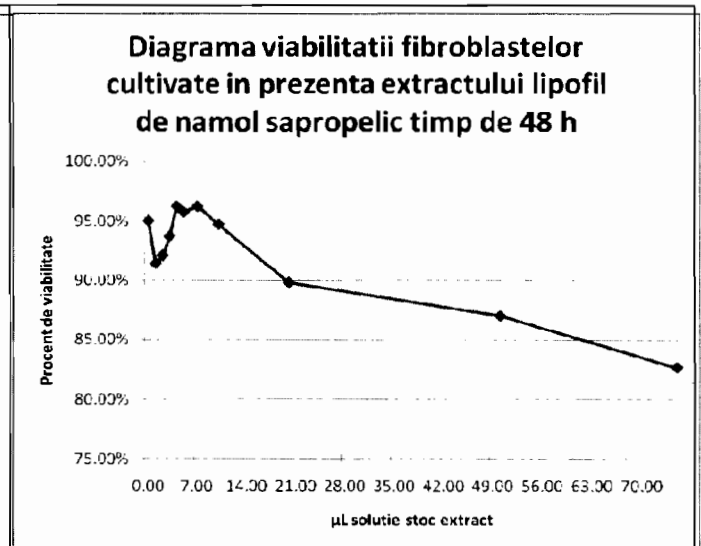


Figura nr. 11. Diagrama viabilității fibroblastelor cultivate în prezența extractului lipofil de nămol sapropelic terapeutic, timp de 48 ore

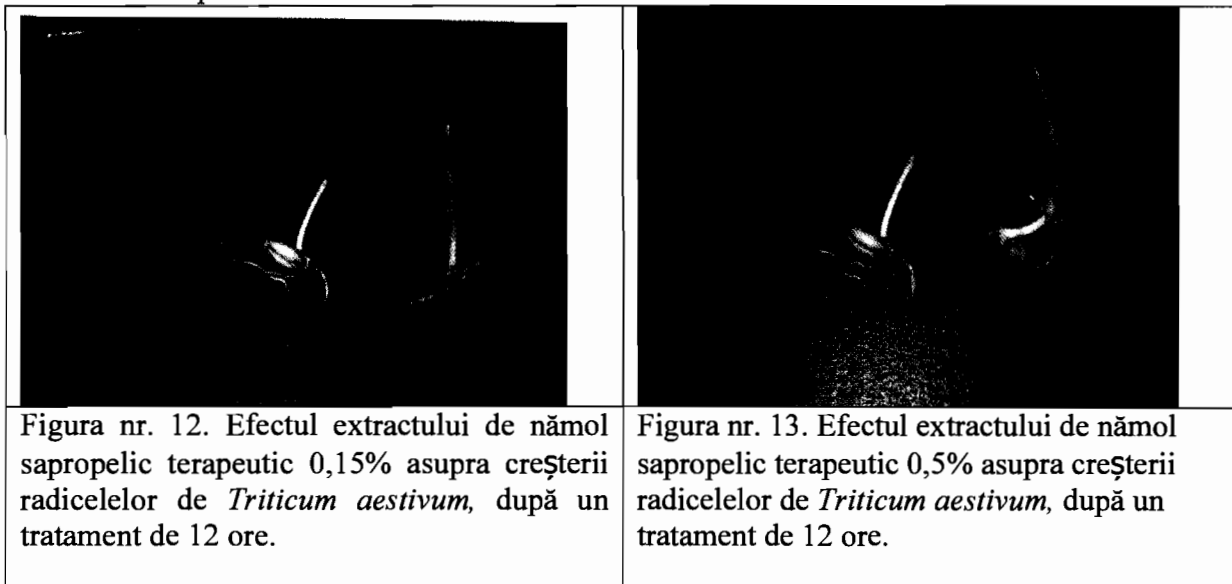
Rezultatele obținute au demonstrat un efect citotoxic al extractului lipofil de nămol sapropelic pentru celulele NCTC, numai pentru cantități mai mari de 50 μL din soluția-stoc (0,066 g extract lipofil de nămol sapropelic/mL). La concentrații mai mici nu s-au mai observat efecte de modificare a morfologiei fibroblastelor, acestea având o viabilitate de peste 95%. Rezultatele conduc la concluzia ca extractul lipofil de nămol sapropelic terapeutic propus conform invenției, are o **toxicitate redusă și poate fi utilizat fără riscuri ca substanță activă pentru produse dermo-cosmetice.**

Determinarea acțiunii fitotoxice a extractului lipofil de nămol sapropelic terapeutic prin testul *Triticum*

Efectele substanțelor chimice asupra cromozomilor s-a studiat pe material vegetal, în special pe vârfuri de rădăcini de grâu, *Triticum aestivum* L., testul Triticum (Bateman, 1977; Vennitt și Parry, 1984). Pentru stabilirea efectului extractului lipofil din nămol sapropelic terapeutic asupra mitozei celulare, s-au utilizat soluții alcoolice din extractul lipofil din nămol sapropelic obținut, în concentrații mici inițial: 0,5% și 0,15%. După evaporarea solventului, au fost imersate în cutii Petri semințe de *Triticum aestivum* L. timp de 12 ore. Ulterior, experimentele au fost reluate, datorită efectelor pozitive constatate, pentru testarea efectului unor concentrații mai mari, lărgind și aria timpului de testare. S-au utilizat soluții din extractul lipofil din nămol sapropelic obținut, în concentrațiile 2,5% și 4,5% în care au fost imersate semințe de *Triticum aestivum* L. timp de 6, 12, respectiv 24 de ore. În paralel martorul este imersat în apă potabilă. Efectele genotoxice ale extractului lipofil din nămol sapropelic testat pot fi apreciate prin măsurarea radicelelor crescute în diferitele variante experimentale (Fiskesjo, 1993). Când radicelele depășesc 1 cm lungime, acestea pot fi prelevate prin tăiere. După prelevare, radicelele se fixează cu un amestec de alcool etilic absolut și acid acetic glacial, în raport de volume 3:1, timp de 16 ore la frigider, apoi se realizează hidroliza acidă blândă, cu HCl 1 N timp de 12 minute la 60°C. Colorarea radicelelor se realizează prin tehnica Feulgen, cu reactiv Schiff, timpul de colorare fiind de 90 de minute, după care se realizează intensificarea colorării în apă, timp de 20 de minute.

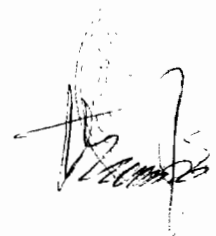
Efectele citogenetice ale extractului lipofil din nămol sapropelic obținut conform invenției, sunt apreciate prin calcularea indicelui mitotic și analiza aberațiilor cromosomale observate în diferitele etape ale mitozei. Efectuarea fotografiilor s-a realizat la un microscop optic trinocular Epifluorescent Microscope Fluo 2 cu cameră foto digitală Bel Photonics DV-1300.

S-au analizat câte 5 preparate pentru fiecare variantă, pe fiecare preparat s-au studiat câte 10 câmpuri microscopice pentru calcularea indicelui mitotic și 10 câmpuri pentru studiul aberațiilor cromosomale. Pentru determinarea indicelui mitotic, s-au numărat minimum 500 de celule pentru fiecare variantă experimentală.



Analiza microscopică a radicelelor netratate a relevat un aspect normal al cromozomilor, precum și o desfășurare fără anomalii a fazelor diviziunii celulare, indicele mitotic având valoarea 19,6% (Tabel nr. 6; Figurile nr. 14, 15).

Formarea radicelelor a fost accelerată când semințele de *Triticum aestivum* au fost imersate în soluțiile testate inițial, observându-se diferențe macroscopice față de martor.



Indicele mitotic crește inițial, dar nu semnificativ, mai ales în varianta concentrației de 0,15%, tratament de 12 ore, ceea ce atestă faptul că diviziunea celulară se desfășoară într-un ritm accelerat (Tabel nr. 6).

Tabel nr. 6. Variația indicelui mitotic în cazul radicelelor tratate cu soluții ale extractului lipofil din nămol sapropelic, în variantele experimentale, V1 și V2

Concentrația de extract din nămol, % (variantă)	Timpul de acțiune (ore)	Indicele mitotic (%)
0 (martor)	0	19,6
0,15 (V1)	12	21,8
0,5 (V2)	12	21,4

Prin analiza microscopică realizată, au fost înregistrate numărul total de celule analizate, numărul total de celule aflate în profază, numărul total de celule aflate în metafază, numărul total de celule aflate în anafază, numărul total de celule aflate în telofază și numărul total de celule aflate în citochineză, din experimentele realizate, pentru fiecare variantă de lucru folosită (Tabel nr. 7).

Tabel nr. 7. Numărul total de celule analizate pentru martor și pentru variantele de lucru V1, V2

Varianta	Total celule cercetate	Total celule în interfază	Total celule în diviziune	Total celule în profază	Total celule în metafază	Total celule în anafază	Total celule în telofază	Total celule în citochineză
Martor	500	402	98	25	14	12	24	23
V1	500	391	109	28	15	12	29	25
V2	500	393	107	29	13	10	31	24

Analizând rezultatele obținute se observă că indicele mitotic crește față de martor în toate variantele experimentale. Astfel, dacă la martor indicele mitotic are valoarea 19,6%, după 12 ore de tratament cel mai mare indice este cel pentru extractul lipofil din nămol sapropelic în concentrație 0,15% urmat de extractul lipofil din nămol sapropelic în concentrație 0,5%. În ansamblu cea mai mare valoare a indicelui mitotic s-a înregistrat pentru extractul lipofil din nămol sapropelic în concentrația 0,15%, pe timp de acțiune 12 ore, ceea ce înseamnă că acesta a avut efectul cel mai puternic mitostimulator.

Pentru a ne convinge de efectul pozitiv al extractului testat am lărgit ulterior aria experimentală, analizând efectul unor concentrații mai mari: 2,5% și 4,5%, pe timp de acțiune diferit: 6, 12 sau 24 de ore de tratament (Tabel nr. 8).

Tabel nr. 8. Variația indicelui mitotic în cazul radicelelor tratate cu soluții ale extractului lipofil din nămol sapropelic terapeutic, în diferite variante experimentale, V3 - V8

Concentrația de extract din nămol, % (variantă)	Timpul de acțiune (ore)	Indicele mitotic (%)
0 (martor)	0	19,6
2,5 (V3)	6	19,8
2,5 (V4)	12	22,6
2,5 (V5)	24	24,4
4,5 (V6)	6	19,2
4,5 (V7)	12	20,2
4,5 (V8)	24	21,8

Tabel nr. 9. Numărul total de celule analizate pentru martor și variantele experimentale, V3 – V8

Varianta	Total celule cercetate	Total celule în interfază	Total celule în diviziune	Total celule în profază	Total celule în metafază	Total celule în anafază	Total celule în telofază	Total celule în citochineză
Martor	500	402	98	25	14	12	24	23
V3	500	401	99	26	12	11	28	22
V4	500	387	113	29	14	14	30	26
V5	500	378	122	32	15	12	33	30
V6	500	404	96	24	12	11	25	24
V7	500	399	101	27	13	11	26	24
V8	500	391	109	30	13	12	28	26

S-a observat că indicele mitotic crește față de martor în toate variantele experimentale (V3 – V8), proporțional cu timpul de acțiune al extractului folosit. Astfel dacă la martor indicele mitotic are valoarea 19,6 după 6 ore de acțiune cel mai mare indice este cel pentru extractul lipofil din nămol sapropelic în concentrație 2,5% (19,8) urmat de extractul lipofil din nămol sapropelic în concentrație 4,5% (19,2) care este mai mic, dar nu semnificativ față de martor (Tabel nr. 6). După 12 ore de acțiune cel mai mare indice este cel pentru concentrația 2,5% (22,6). Deasemenea după 24 ore de acțiune cel mai mare indice este cel pentru concentrația 2,5% (24,4), ceea ce înseamnă că acesta a avut efectul cel mai puternic mitostimulator (Tabel nr. 8).

Analizând numărul de celule se poate observa că în aproape toate variantele experimentale a scăzut numărul de celule în interfază și a crescut numărul de celule în diviziune. Dintre celulele aflate în diviziune în toate variantele experimentale cel mai mare număr de celule sunt cele aflate în profază, urmate de cele aflate în telofază și respectiv citochineză. Cel mai mic număr de celule aflate în diviziune în toate variantele experimentale este cel al celulelor aflate în metafază și anafază (Tabel nr. 9). Cel mai mare număr de celule în profază (32) îl întâlnim în varianta V5, iar cel mai mic (24) în varianta V6. Cel mai mare număr de celule în telofază (33) îl întâlnim în varianta V5, iar cel mai mic (25) în varianta V6. Cel mai mare număr de celule în citochineză (30) îl întâlnim în varianta V5, iar cel mai mic (22) în varianta V3. Cel mai mare număr de celule în metafază (15) îl întâlnim în varianta V5, iar cel mai mic (12) în variantele V3 și V6. Cel mai mare număr de celule în anafază (14) îl întâlnim în varianta V4, iar cel mai mic (11) în variantele V3, V6 și V7 (Tabel nr. 9).

Analizând comparativ, cel mai puternic efect stimulator al diviziunii celulare în cazul extractului lipofil din nămol sapropelic îl are concentrația 2,5% pe timp de acțiune 12 și 24 de ore (variantele experimentale V4 și V5).

Extractul lipofil din nămol sapropelic terapeutic testat a prezentat un număr mic de efecte asupra materialului genetic și a mitozei celulare, în secțiunile din radicele tratate constatându-se sporirea numărului de celule în diviziune, respectiv o acțiune stimulatorie a procesului de diviziune și o creștere a volumului nuclear, dar îndeosebi a volumului nucleolar (Figurile nr. 16, 17, 18, 19), indiferent de concentrație și timpul de acțiune, ceea ce sugerează un proces de transcriere intensificat pentru genele ARN_r. Un număr mai mare de ribozomi la nivel celular implică automat și o intensificare a tuturor proceselor de biosinteză proteică.

În acest context apare efectul de stimulare a diviziunii celulare și respectiv de scurtare a duratei ciclului celular. Este corectă astfel afirmația conform căreia extractul lipofil din nămol sapropelic obținut conform invenției și testat, are efect de regenerare celulară, de stimulare a metabolismului celular. Constatarea efectelor pozitive și absența oricărui efect negativ, genotoxic, ne îndreptățește să putem considera extractul testat drept utilizabil pentru uz uman.

<p>Figura nr. 14. Celule meristemate de <i>Triticum aestivum</i>, varianta martor. Se observă numeroase profaze, o prometafază și central o anafază (400x).</p>	<p>Figura nr. 15. Celule meristemate de <i>Triticum aestivum</i>, varianta martor. Se observă numeroase profaze, o telofază și central o metafază (400x).</p>
<p>Figura nr. 16. Celule meristemate de <i>Triticum aestivum</i> tratate cu extract din nămol 0,15%, 12 ore. Se observă predominanța profazelor și creșterea volumului nucleolar (400x).</p>	<p>Figura nr. 17. Celule meristemate de <i>Triticum aestivum</i> tratate cu extract din nămol 0,5%, 12 ore. Se observă predominanța profazelor și creșterea volumului nucleolar (400x).</p>
<p>Figura nr. 18. Celule meristemate de <i>Triticum aestivum</i> tratate cu extract din nămol 4,5%, 6 ore. Se observă 3 profaze și creșterea volumului nucleolar (400x).</p>	<p>Figura nr. 19. Celule meristemate de <i>Triticum aestivum</i> tratate cu extract din nămol 4,5%, 12 ore. Se observă predominanța profazelor, a telofazelor și creșterea volumului nuclear și nucleolar (400x).</p>

Testele citogenetice la *Triticum aestivum* relevă o creștere a indicelui mitotic consecutiv tratamentelor cu extractul lipofil din nămol sapropelic folosit. Analiza mitozelor indică apariția unui număr scăzut de aberații interfazice și aberații cromozomale identificate în diferite etape ale mitozei, procesul de diviziune celulară fiind însă stimulat. Observațiile sunt susținute și de constatările macroscopice, respectiv dimensiunile crescute ale radicelelor.

S-a putut observa macroscopic că extractul lipofil din nămol sapropelic influențează pozitiv procesul de diviziune celulară, dimensiunea radicelelor de *Triticum aestivum* fiind evident mai mare în cazul semințelor tratate, comparativ cu cele netratate, ceea ce indică o creștere a numărului de celule care se divid și o reducere a duratei de desfășurare a ciclului celular. Extractul lipofil din nămol sapropelic terapeutic obținut conform invenției, testat pe semințe de *Triticum aestivum* L., are efect de regenerare celulară, de stimulare a metabolismului celular. Extrapolând la uzul uman, extractul lipofil din nămol sapropelic obținut poate avea efect de stimulare a regenerărilor celulare.

Rezultatele obținute pot constitui argumente serioase în a considera extractul lipofil din nămol sapropelic testat biologic, drept utilizabil pentru uz uman.



EXTRACT BIOACTIV LIPOFIL DIN NĂMOL SAPROPELIC TERAPEUTIC ȘI PROCEDU DE OBTINERE A ACESTUIA

REVEDICĂRI

1. Extract bioactiv lipofil pe bază de nămol sapropelic terapeutic având un conținut de compusi cu catene hidrocarbonate saturate 15-17%, compusi organici cu oxigen 55-56%, compusi cu N și S 24-25%, hidrocarburi cu nucleu aromatic 1,5-2%, beta caroten 0,2-0,5%.
2. Procedu de obținere a extractului de la Revendicarea 1 caracterizat prin aceea că nămolul sapropelic terapeutic, având un conținut în azot organic de 0,3117% și un conținut de cenușă după calcinarea la 550°C de 91,69% raportat la substanța uscată, se umidifică cu apă distilată timp de 1 oră, suspensia omogenizată obținută se extrage cu un amestec de metanol:cloroform în raport de 2:1 (v:v) timp de 30 minute la temperatura camerei, suspensia se centrifughează 10 min. la 4000 rpm, obținându-se supernatantul 1 și peletul 1, care se tratează cu soluție HCl 0,2 N până la pH = 3,5 - 4 și se resuspendă cu un amestec metanol:cloroform 2:1 (v:v) timp de 24 ore la 20°C, cu agitare și centrifugare 10 min. la 4000 rpm, obținându-se supernatantul 2, care se reunește cu supernatantul 1, iar peletul 2 obținut după a doua extracție se extrage în continuare până la epuizare cu benzen, obținându-se extractul benzenic, iar cele două supernatante 1 și 2 reunite, rezultate în urma extracției la rece cu amestec metanol:cloroform 2:1 (v:v), sunt aduse în pâlnia de separare, unde se adaugă cloroform și apă distilată, iar după separarea fazelor se separă și se reține faza cloroformică care este neutralizată cu soluție alcoolică KOH 1 N și care este amestecată apoi cu extractul benzenic din care se îndepărtează complet solvenții organici prin antrenare cu un curent de aer cald, obținându-se un extract final ceros lipofil de nămol sapropelic terapeutic care se condiționează în cutii de aminoplast, depozitarea și conservarea făcându-se la loc răcoros, ferit de lumină.

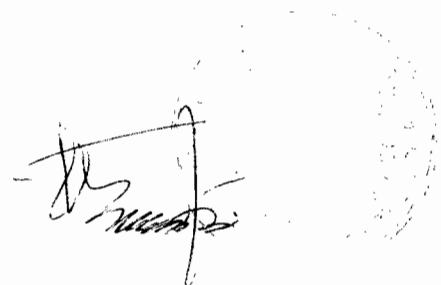


Figura nr. 1. Schema tehnologica a procedului de obtinere a extractului bioactiv lipofil din namol sapropelic terapeutic

