



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.04.2014** BOPI nr. **4/2014**

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

(73) Titular:  
• **UNIVERSITATEA "OVIDIUS" DIN  
CONSTANȚA, BD.MAMAIA NR.124,  
CONSTANȚA, CT, RO**

(72) Inventatori:  
• **BRATU MIHAELA-MIRELA,  
ALEEA LOTUS NR.8, BL.11 C, SC.C, AP.39,  
CONSTANȚA, CT, RO;**  
• **NEGREANU-PÎRJOL TICUȚA,  
STR.SUCEAVA NR.12, BL.V 4, SC.C, ET.1,  
AP.48, CONSTANȚA, CT, RO;**  
• **SURDU OLGA, STR.B.P.HAȘDEU NR.120,  
BL.L 8 B, SC.A, AP.3, CONSTANȚA, CT,  
RO;**

• **DOROFTEI ELENA, STR.BADEA CĂRȚAN  
NR.4, BL.3 C, SC.B, ET.1, AP.26,  
CONSTANȚA, CT, RO;**  
• **HOȘTINĂ CORINA, BD.TOMIS NR.324,  
BL.M 3, SC.C, ET.3, AP.55, CONSTANȚA,  
CT, RO;**  
• **MIREȘAN HORĂȚIU, STR.TRAIAN NR.62,  
BL.K 4, AP.75, CONSTANȚA, CT, RO;**  
• **RONCEA FLORENTINA NICOLETA,  
STR.CPT.DOBRIĂ EUGENIU NR.4,  
BL.R 1, SC.C, AP.42, CONSTANȚA, CT, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**RO 67351; RO 57715**

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



# RO 127870 B1

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

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

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

21           Din brevetul **RO 67351**, cu titlul "Procedeu de extracție și purificare a unor substanțe  
22 biologie active din nămoluri", se cunoaște un procedeu de extracție a nămolului cu un  
23 amestec de acizi anorganici și organici de preferință o soluție conținând 10% acid clorhidric  
24 și 1% acid citric la  $pH=3$ , la temperatura ambiantă, extractul brut se atomizează și produsul  
25 obținut se resolubilizează în apă în vederea purificării lui prin tratarea cu schimbători de ioni.

26           Se realizează astfel un extract brut atomizat cu un amestec de săruri anorganice și  
27 substanțe organice cu următorul conținut:

- 28           - substanțe minerale circa 60%;
- 29           - substanțe organice circa 35%;
- 30           - umiditate circa 5%;
- 31           -  $D_{20} = -30$ ;
- 32           - 1 g de substanță conține până la 10 000 unități inhibitoare de hialuronidază.

33           Produsul poate fi folosit ca atare pentru efectele sale antiinflamatorii și analgezice în  
34 creme și unguente sau alte forme terapeutice pentru uz extern.

35           Din brevetul **RO 57715**, cu titlul "Procedeu și instalație pentru obținerea unui produs  
36 activat din nămolurile terapeutice", se cunoaște un procedeu de obținere a unor extracte de  
37 nămoluri sub presiune de gaz inert, în care nămolul se supune la o presiune de gaz inert de  
38 10...20 atm pe un filtru 0/400 timp de 1...2 h, după care extractul obținut se aduce la  
39 concentrația dorită de la 0,8 g% până la 5,2 g%, se stabilizează prin ultrasonare de la 1 la  
40 6 min 0,5 W la  $0,01W/cm^2$ , se supune la o filtrare fină și la o filtrare bacteriologică, după care  
41 produsul lichid poate fi înfiolat sau folosit ca atare sau supus atomizării cu un regim de lucru  
42 la maximum  $40^{\circ}C$  sau liofilizării în condiții cunoscute, toate operațiile realizându-se sub  
43 protecție de gaz inert la presiunea de 1 atm.

44           Problema tehnică obiectivă pe care urmărește să o rezolve invenția, așa cum se  
45 înțelege din descriere, constă în obținerea unui extract de nămol lipsit de compuși cu  
46 potențial iritant sau alergogen și cu o bună compatibilitate și biodisponibilitate a compușilor  
47 lipofili adecvat pentru folosirea în produsele dermo-cosmetice.

# RO 127870 B1

Astfel, într-un prim aspect, invenția redă un extract bioactiv lipofil pe bază de nămol sapropelic terapeutic, având un conținut de compuși cu catene hidrocarbonate saturate 15...17%, compuși organici cu oxigen 55...56%, compuși cu azot și sulf 24...25%, hidrocarburi cu nucleu aromatic 1,5...2%, beta-caroten 0,2...0,5%.

În cel de-al doilea aspect, invenția se referă la un procedeu de obținere a extractului definit mai sus, în care 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 o oră, suspensia omogenizată obținută se extrage cu un amestec de metanol:cloroform în raport de 2:1 (v:v) timp de 30 min, 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 h 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 la 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.

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  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  în mari cantități, substanțe proteice), iar pe de altă parte, componentii 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.

În figurile anexate, sunt prezentate următoarele:

- fig. 1 redă Diagrama fluxului de obținere a extractului lipofil de nămol sapropelic din Lacul Techirghiol;

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

- fig. 3 redă Morfologia fibroblastelor de șoarece în culturi stabilizate la 24 h de incubare fără extract (martor de cultură)-microscopie optică 100X;

- fig. 4 redă Morfologia fibroblastelor de șoarece în culturi stabilizate la 24 h de incubare cu extract lipofil de nămol sapropelic-Diluția 2 - microscopie optică 100X;

- fig. 5 redă Morfologia fibroblastelor de șoarece în culturi stabilizate la 24 h de incubare cu extract lipofil de nămol sapropelic-Diluția 9 - microscopie optică 100X;

- fig. 6 redă Morfologia fibroblastelor de șoarece în culturi stabilizate la 24 h de incubare cu extract lipofil de nămol sapropelic-Diluția 10 - microscopie optică 100X;

- fig. 7 redă Morfologia fibroblastelor de șoarece în culturi stabilizate la 24 h de incubare cu extract lipofil de nămol sapropelic- Diluția 11 - microscopie optică 100X;

# RO 127870 B1

- 1 - fig. 8 redă Morfologia fibroblastelor de șoarece în culturi stabilizate la 48 h de  
incubare cu extract lipofil de nămol sapropelic-Diluția 9 - microscopie optică 100X;
- 3 - fig. 9, redă Morfologia fibroblastelor de șoarece în culturi stabilizate la 48 de ore de  
incubare cu extract lipofil de nămol sapropelic-Diluția 11 - microscopie optică 100X;
- 5 - fig. 10 redă Diagrama viabilității fibroblastelor cultivate în prezența extractului lipofil  
de nămol sapropelic terapeutic, timp de 48 h;
- 7 - fig. 11 redă Diagrama viabilității fibroblastelor cultivate în prezența extractului lipofil  
de nămol sapropelic terapeutic, timp de 24 h;
- 9 - fig. 12 redă Efectul extractului de nămol sapropelic terapeutic 0,15% asupra creșterii  
radicelilor de *Triticum aestivum*, după un tratament de 12 h;
- 11 - fig. 13 redă Efectul extractului de nămol sapropelic terapeutic 0,5% asupra creșterii  
radicelilor de *Triticum aestivum*, după un tratament de 12 h;
- 13 - fig. 14 redă Celule meristemice de *Triticum aestivum*, varianta martor. Se observă  
numeroase profaze, o prometafază și central o anafază (400x);
- 15 - fig. 15 redă Celule meristemice de *Triticum aestivum*, varianta martor. Se observă  
numeroase profaze, o telofază și central o metafază (400x);
- 17 - fig. 16 redă Celule meristemice de *Triticum aestivum* tratate cu extract din nămol  
0,15%, 12 h. Se observă predominanța profazelor și creșterea volumului nuclear (400x);
- 19 - fig. 17 redă Celule meristemice de *Triticum aestivum* tratate cu extract din nămol  
0,5%, 12 h. Se observă predominanța profazelor și creșterea volumului nucleolar (400x);
- 21 - fig. 18 redă Celule meristemice de *Triticum aestivum* tratate cu extract din nămol  
4,5%, 6 h. Se observă 3 profaze și creșterea volumului nucleolar (400x);
- 23 - fig. 19 redă Celule meristemice de *Triticum aestivum* tratate cu extract din nămol  
4,5%, 12 h. Se observă predominanța profazelor, a telofazelor și creșterea volumului nuclear  
și nucleolar (400x).
- 25
- 27 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%).
- 29
- 31
- 33 - Substanțele organice dozate (circa 9,6%) sunt formate din substanțe humice, pro-  
teine, 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 enzimatice, înalt grad de  
gonflare, proprietatea de schimbători de ioni. Substanțele proteice, cu o pondere de 11,6%  
din total substanțe organice, prezintă interes prin rezerva energetică bogată și ușor asimila-  
bilă pentru microorganismele care participă la procesul de peloidogeneză. Celuloza, fără să  
prezinte o valoare terapeutică ca atare, reprezintă circa 5,0% din totalul de substanțe  
organice dozate.
- 35
- 37
- 39
- 41
- 43
- 45 - 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, fracțiu-  
nea solidă minerală are aspectul unui schelet de SiO<sub>2</sub> (cu conținut în silicați de circa 27,7%)  
pe care se grefează săruri aquasolubile și acidosolubile.
- 47



# RO 127870 B1

- 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.	1
- pH-ul 8,2 indică un caracter bazic al peloidului, confirmat și de conținutul relativ ridicat în magneziu și calciu.	3
- 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.	5 7
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, sulfura de fier, sulf nativ și substanțe enzimatice. 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 împachetări 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 cardiovasculare.	9 11 13 15 17
Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în producerea unui extract bioactiv lipofil din nămol sapropelic terapeutic ce conține substanțe minerale și mici cantități de substanțe organice, conține hidrogen sulfurat, sulfură de fier, sulf nativ și substanțe enzimatice, putând fi utilizat ca principiu activ în produse dermo-cosmetice cu efect de protecție și regenerare a pielii, în scopul tratării unor afecțiuni dermatologice.	19 21 23
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.	25 27
Se dă un exemplu de realizare a invenției, în legătură cu fig. 1, care reprezintă Schema tehnologică a procedurii de obținere a extractului bioactiv lipofil din nămol sapropelic terapeutic din Lacul Techirghiol.	29 31
<b>Exemplu de obținere a extractului lipofil din nămol sapropelic terapeutic conform invenției</b>	33
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 o oră. Suspensia omogenizată obținută se extrage cu 300 mL amestec metanol:cloroform 2:1 (v:v) timp de 30 min 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 pH = 3,5...4 și se resuspendă în 300 mL amestec metanol:cloroform 2:1 (v:v) timp de 24 h 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.	35 37 39 41 43 45 47 49

# RO 127870 B1

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

3 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 (tabelul 1).

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

9 *Tabelul 1*

*Masa de substanțe lipofile extrase prin metoda propusă conform invenției*

11 Proba de nămol sapropelic	Masa de nămol umed (g)	Masa de nămol uscat și triturat (g)	Masa de extract lipofil obținut (g)
13 1.	970	360	3,0593
2.	863	320	3,4964
15 3.	647	240	1,7558
4.	826	306	2,7800

17 Analiza chimică a extractului lipofil de nămol sapropelic terapeutic s-a făcut prin  
19 spectrometrie IR, în intervalul 400 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ . 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  $\text{cm}^{-1}$  - CH alifatic; 1738.65  $\text{cm}^{-1}$  - C=O; 1462.75  $\text{cm}^{-1}$  - CH; 1376.89  $\text{cm}^{-1}$  - NO<sub>2</sub>; 667.97  $\text{cm}^{-1}$  -X; 667.97-539.84  $\text{cm}^{-1}$  -vibrație de schelet; 508.22  $\text{cm}^{-1}$  - COO; 419.97-508.22  $\text{cm}^{-1}$  - grupări carboxilat și amino protonate din aminoacizi.

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

27 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.

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

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

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

## 41 **Determinarea activității antioxidante a extractului lipofil de nămol sapropelic terapeutic**

43 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 și substanța standard Trolox, înregistrându-se următoarele valori (tabelul 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/probă)
1.	Extract lipofil soluție stoc	5	2,810
2.	Extract lipofil soluție stoc	10	90,688
3.	Extract lipofil diluție soluție stoc : metanol p.a. 1:10	5	-0,259
4.	Extract lipofil diluție soluție stoc : metanol p.a. 1:10	10	-0,084
5.	Extract lipofil diluție soluție stoc : metanol p.a. 1:3	5	0,047
6.	Extract lipofil diluție soluție stoc : metanol p.a. 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 μL.

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 p.a., 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/probă), atât pentru volumul de probă de 5 μL, cât și pentru volumul de 10 μL.

- În cazul diluției soluției stoc 1 (13,1 mg/mL): 3 (metanol p.a.), la volumul de soluție luat în lucru de 10 μL, s-a înregistrat o valoare foarte bună a capacității antioxidante (1,096 nmol/probă), dar mai scăzută decât în cazul soluției stoc (2,810 nmol/probă), la volumul de 5 μL.

- 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 μL) urmată de extractul lipidic diluția 1 : 3 (volum 10 μL). 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 μL al soluției stoc de extract (13,1 mg/mL) până la volumul de 10 μL aferent diluției cu metanol p.a. 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 X = 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 (tabelul 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 compușilor 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 (tabelul 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 h, 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 h, 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 și, respectiv, 48 h. Pentru observații de morfologie, celulele din placă s-au fixat și s-a realizat colorația Giemsa, urmată de examinarea microscopică.

*Rezultatele citirilor RN la 24 h incubare*

Diluțiile de extract folosite	Citire 1	Citire 2	Medie	Procent de viabilitate	
Martor	0,685	0,740	0,733	100%	3
	0,748	0,743			5
	0,745	0,741			7
Diluția 1	0,654	0,708	0,690	94,0%	9
	0,699	0,686			
	0,692	0,705			
Diluția 2	0,650	0,672	0,683	93,1%	11
	0,706	0,689			
	0,708	0,670			
Diluția 3	0,649	0,674	0,683	93,1%	13
	0,702	0,685			
	0,724	0,668			
Diluția 4	0,637	0,674	0,685	93,4%	15
	0,705	0,682			
	0,712	0,700			
Diluția 5	0,642	0,686	0,685	93,4%	17
	0,723	0,682			
	0,709	0,669			
Diluția 6	0,645	-	0,677	92,3%	19
	0,696				
	0,690				
Diluția 7	0,624	-	0,671	91,5%	21
	0,695				
	0,695				
Diluția 8	0,624	0,656	0,664	90,5%	23
	0,687	0,663			
	0,683	0,674			
Diluția 9	0,566	0,657	0,630	85,9%	25
	0,612	0,667			
	0,616	0,667			
Diluția 10	0,555	0,613	0,602	82,1%	27
	0,609	0,623			
	0,609	0,603			
Diluția 11	0,552	0,620	0,596	81,3%	29
	0,598	0,608			
	0,599	0,600			

Rezultatele citirilor RN la 48 h incubare

Diluțiile de extract folosite	Citire 1	Citire 2	Medie	Procent de viabilitate
Martor	0,974	1,054	1,011	100%
	0,971	1,004		
	1,035	1,029		
Diluția 1	0,891	0,957	0,967	95,0%
	0,954	1,008		
	0,977	1,019		
Diluția 2	0,898	0,879	0,925	91,4%
	0,965	0,908		
	0,979	0,907		
Diluția 3	0,862	0,937	0,932	92,1%
	0,946	0,955		
	0,948	0,949		
Diluția 4	0,863	0,976	0,948	93,7%
	0,948	0,979		
	0,949	0,976		
Diluția 5	0,912	0,960	0,973	96,2%
	0,992	1,031		
	1,006	0,938		
Diluția 6	0,893	0,85	0,968	95,7%
	0,971	0,994		
	0,974	0,996		
Diluția 7	0,864	1,032	0,973	96,2%
	0,948	1,032		
	0,957	1,005		
Diluția 8	0,886	0,976	0,958	94,7%
	0,955	0,988		
	0,970	0,998		
Diluția 9	0,839	0,922	0,908	89,8%
	0,890	0,941		
	0,918	0,941		
Diluția 10	0,815	0,896	0,880	87,0%
	0,882	0,888		
	0,910	0,894		
Diluția 11	0,796	0,837	0,837	82,7%
	0,865	0,825		
	0,849	0,849		

Pentru culturile incubate cu extract de nămol sapropelic terapeutic, propus conform invenției, timp de 24 h, 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 martorului de cultură (fig. 3 și 4). În cazul diluțiilor 9 și 10, celulele au fost puțin modificate, observându-se alternanțe ale celulelor cu aspect normal cu celule alungite (fig. 5 și 6).



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 (fig. 7).	1
Pentru culturile incubate cu extract de nămol sapropelic terapeutic, propus conform invenției, timp de 48 h, s-au făcut următoarele observații morfologice:	3
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 (fig. 8 și 9).	5
În cazul diluțiilor 9 și 10, se observă o alungire la unele celule și o densitate celulară mai mică decât a martorului.	7
În cazul Diluției 11, se observă mai multe celule alungite, fusiforme, iar densitatea celulară este de aproximativ 85% față de martorul de cultură.	9
Rezultatele obținute au demonstrat un efect citotoxic al extractului lipofil de nămol sapropelic pentru celulele NCTC, numai pentru cantități mai mari de 50 uL 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 <b>toxicitate redusă și poate fi utilizat fără riscuri ca substanță activă pentru produse dermo-cosmetice.</b>	11
<b>Determinarea acțiunii fitotoxice a extractului lipofil de nămol sapropelic terapeutic prin testul Triticum</b>	13
Efectele substanțelor chimice asupra cromozomilor s-au studiat pe material vegetal, în special pe vârfuri de rădăcini de grâu, <i>Triticum aestivum</i> 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 solvențului, au fost imersate în cutii Petri semințe de <i>Triticum aestivum</i> 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 <i>Triticum aestivum</i> L. timp de 6, 12, respectiv, 24 h. 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 h, la frigider, apoi se realizează hidroliza acidă blândă, cu HCl 1 N timp de 12 min la 60°C. Colorarea radicelelor se realizează prin tehnica Feulgen, cu reactiv Schiff, timpul de colorare fiind de 90 min, după care se realizează intensificarea colorării în apă, timp de 20 min. 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.	15
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% (tabelul 6; fig. 14 și 15).	17
	19
	21
	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47
	49

# RO 127870 B1

1 Formarea radicelelor a fost accelerată când semințele de *Triticum aestivum* au fost  
imersate în soluțiile testate inițial, observându-se diferențe macroscopice față de martor.  
3 Indicele mitotic crește inițial, dar nu semnificativ, mai ales în varianta concentrației de 0,15%,  
tratament de 12 h, ceea ce atestă faptul că diviziunea celulară se desfășoară într-un ritm  
5 accelerat (tabelul 6).

7 *Tabelul 6*

9 *Variația indicelui mitotic în cazul radicelelor tratate cu soluții ale extractul 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

15 Prin analiza microscopică realizată, au fost înregistrate numărul total de celule  
17 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  
19 total de celule aflate în citochineză, din experimentele realizate, pentru fiecare variantă de  
lucru folosită (tabelul 7).

21 *Tabelul 7*

23 *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

31 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%,  
33 după 12 h de tratament, cel mai mare indice este cel pentru extractul lipofil din nămol sapro-  
pelic în concentrație 0,15%, urmat de extractul lipofil din nămol sapropelic în concentrație  
35 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 h, ceea ce  
37 înseamnă că acesta a avut efectul cel mai puternic mitostimulator.

Pentru a ne convinge de efectul pozitiv al extractului testat, am lărgit ulterior aria  
39 experimentală, analizând efectul unor concentrații mai mari: 2,5% și 4,5%, pe timp de acțiune  
diferit: 6, 12 sau 24 h de tratament (tabelul 8), V8.

Tabelul 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

Tabelul 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 h 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 (tabelul 6). După 12 h de acțiune, cel mai mare indice este cel pentru concentrația 2,5% (22,6). De asemenea, după 24 h 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 (tabelul 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 (tabelul 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 (tabelul 9).

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

5 Extractul lipofil din nămol sapropelic terapeutic testat a prezentat un număr mic de  
efecte asupra materialului genetic și a mitozei celulare, în secțiunile din radicelele tratate  
7 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  
9 (fig. 16, 17, 18 și 19), indiferent de concentrație și timpul de acțiune, ceea ce sugerează  
un proces de transcriere intensificat pentru genele ARNr. Un număr mai mare de ribozomi  
la nivel celular implică automat și o intensificare a tuturor proceselor de biosinteză proteică.

11 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  
13 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  
15 negativ, genotoxic, ne îndreptățește să putem considera extractul testat drept utilizabil pentru  
uz uman.

17 Testele citogenetice la *Triticum aestivum* relevă o creștere a indicelui mitotic  
consecutiv tratamentelor cu extractul lipofil din nămol sapropelic folosit. Analiza mitozelor  
19 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  
21 susținute și de constatările macroscopice, respectiv dimensiunile crescute ale radicelelor.

S-a putut observa macroscopic că extractul lipofil din nămol sapropelic influențează  
23 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  
25 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,  
27 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  
29 obținut poate avea efect de stimulare a regenerărilor celulare.

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

# RO 127870 B1

## Revendicări

1. Extract bioactiv lipofil, pe bază de nămol sapropelic terapeutic, având un conținut de compuși cu catene hidrocarbonate saturate 15...17%, compuși organici cu oxigen 55...56%, compuși cu azot și sulf 24...25%, hidrocarburi cu nucleu aromatic 1,5...2%, beta-caroten 0,2...0,5%). 3 5
2. Procedeu de obținere a extractului de la revendicarea 1, **caracterizat prin aceea** 7  
**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 9  
cu apă distilată timp de o oră, suspensia omogenizată obținută se extrage cu un amestec de metanol:cloroform în raport de 2:1 (v:v), timp de 30 min, la temperatura camerei, suspensia 11  
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 h 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 la cele două supernatante 1 și 2 reunite, rezultate în urma extracției la rece cu amestec metanol:cloroform 2:1 (v:v), se adaugă cloroform și apă distilată, iar după separarea fazelor, se separă și se reține faza cloroformică, care este neutralizată cu soluție alcoolică 19  
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 21  
ceros lipofil de nămol sapropelic terapeutic, care se condiționează în cutii de aminoplast, depozitarea și conservarea făcându-se la loc răcoros, ferit de lumină. 23

Obtinerea extractului lipofil din namol sapropelic  
din lacul Techirghiol

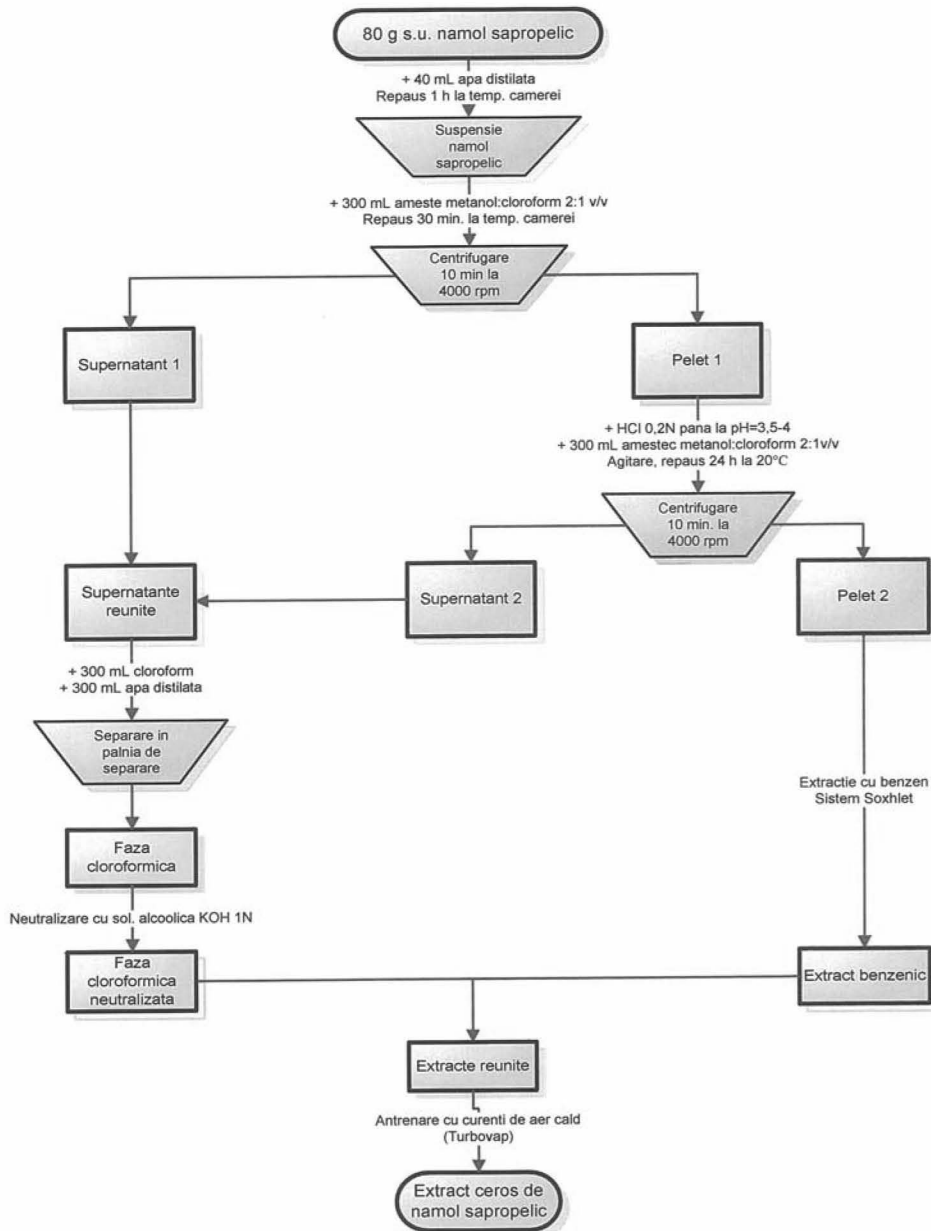


Fig. 1



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

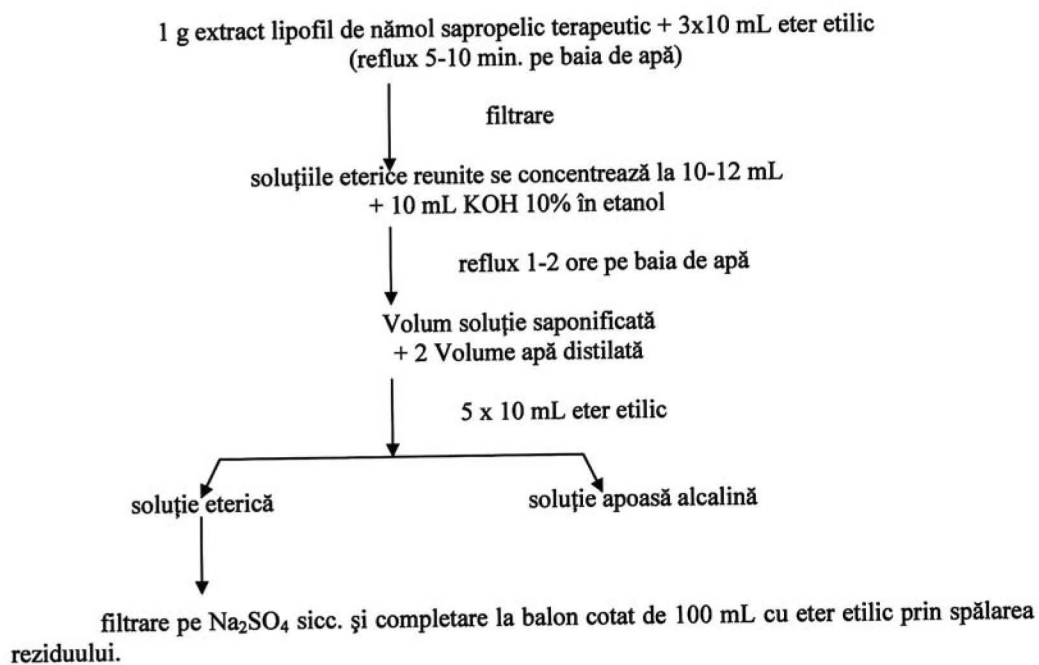
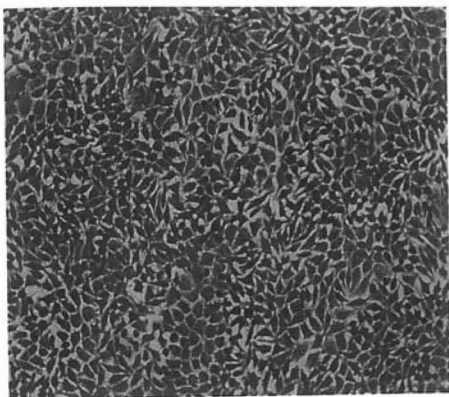


Fig. 2

(51) Int.Cl.

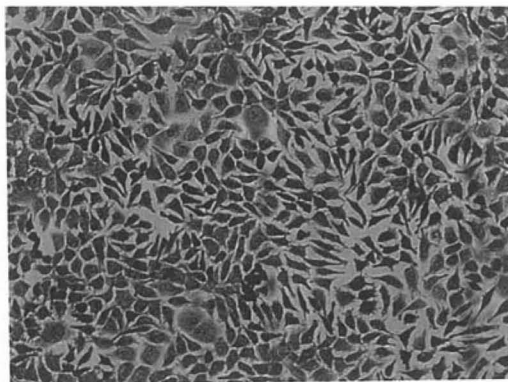
**A61K 35/04** (2006.01),

**A61P 17/00** (2006.01)



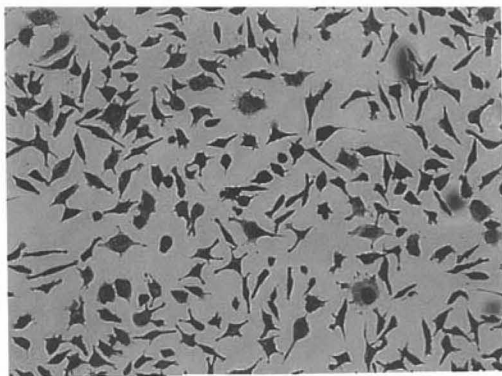
Morfologia fibroblastelor de șoarece în culturi stabilizate la 24 de ore de incubare fără extract (martor de cultură)-microscopie optică 100X

**Fig. 3**



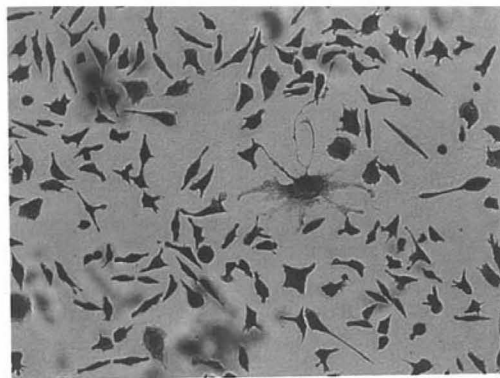
Morfologia fibroblastelor de șoarece în culturi stabilizate la 24 de ore de incubare cu extract lipofil de nămol sapropelic-Diluția 2 - microscopie optică 100X

**Fig. 4**



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

**Fig. 5**



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

**Fig. 6**

(51) Int.Cl.

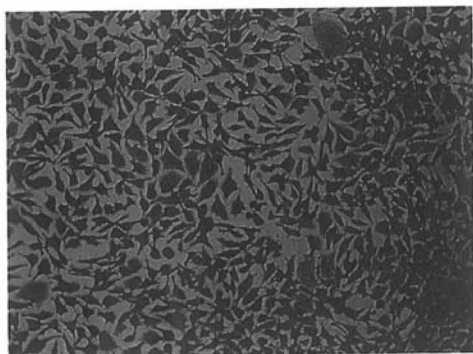
**A61K 35/04** (2006.01),

**A61P 17/00** (2006.01)



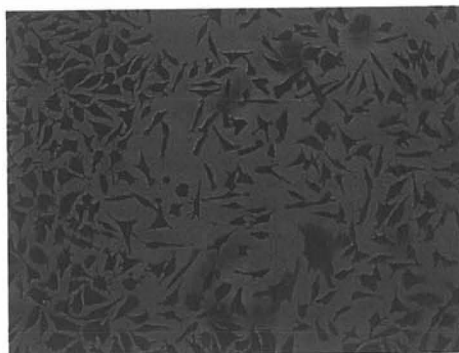
Morfologia fibroblastelor de șoarece în culturi stabilizate la 24 de ore de incubare cu extract lipofil de nămol sapropelic- Diluția 11 - microscopie optică 100X

**Fig.7**



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

**Fig. 8**



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

**Fig.9**

(51) Int.Cl.

A61K 35/04 (2006.01),

A61P 17/00 (2006.01)

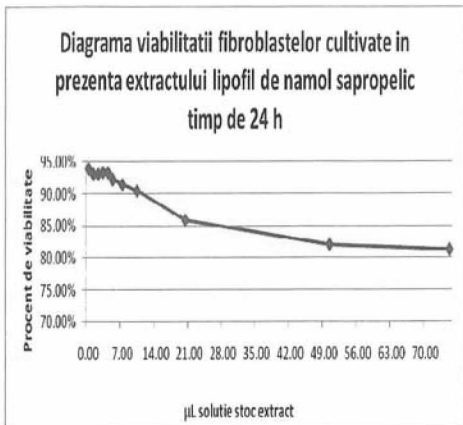


Diagrama viabilității fibroblastelor cultivate în prezența extractului lipofil de nămol sapropelic terapeutic, timp de 24 ore

Fig. 10

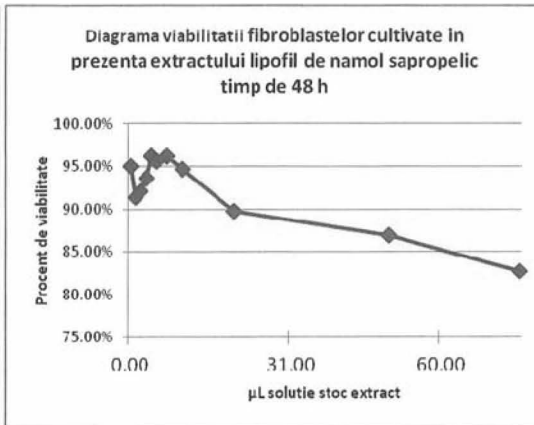


Diagrama viabilității fibroblastelor cultivate în prezența extractului lipofil de nămol sapropelic terapeutic, timp de 48 ore

Fig. 11



Efectul extractului de nămol sapropelic terapeutic 0,15% asupra creșterii radicelelor de *Triticum aestivum*, după un tratament de 12 ore.

Fig. 12



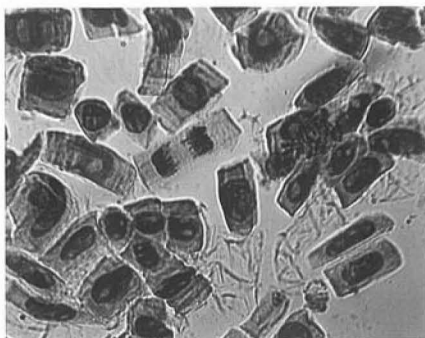
Efectul extractului de nămol sapropelic terapeutic 0,5% asupra creșterii radicelelor de *Triticum aestivum*, după un tratament de 12 ore.

Fig. 13

(51) Int.Cl.

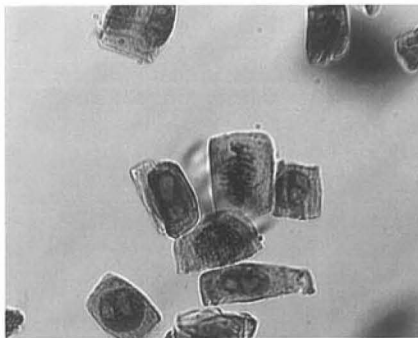
A61K 35/04 (2006.01),

A61P 17/00 (2006.01)



Celule meristemice de *Triticum aestivum*, varianta martor. Se observă numeroase profaze, o prometafază și central o anafază (400x).

**Fig. 14**



Celule meristemice de *Triticum aestivum*, varianta martor. Se observă numeroase profaze, o telofază și central o metafază (400x).

**Fig. 15**



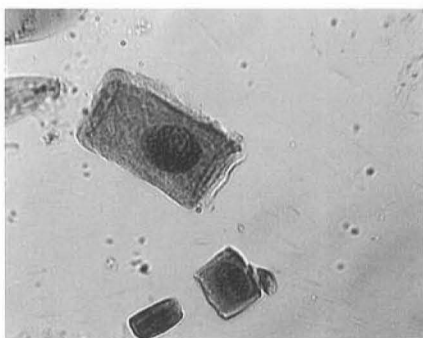
Celule meristemice de *Triticum aestivum* tratate cu extract din nămol 0,15%, 12 ore. Se observă predominanța profazelor și creșterea volumului nucleolar (400x).

**Fig. 16**



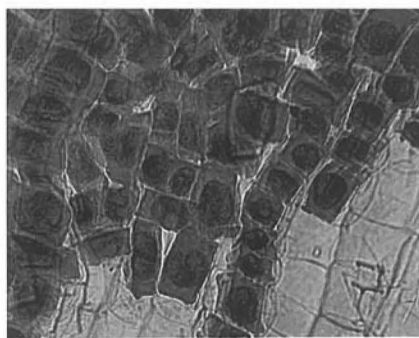
Celule meristemice de *Triticum aestivum* tratate cu extract din nămol 0,5%, 12 ore. Se observă predominanța profazelor și creșterea volumului nucleolar (400x).

**Fig. 17**



Celule meristemice de *Triticum aestivum* tratate cu extract din nămol 4,5%, 6 ore. Se observă 3 profaze și creșterea volumului nucleolar (400x).

**Fig. 18**



Celule meristemice de *Triticum aestivum* tratate cu extract din nămol 4,5%, 12 ore. Se observă predominanța profazelor, a telofazelor și creșterea volumului nuclear și nucleolar (400x).

**Fig. 19**



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
 sub comanda nr. 252/2014