



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2014 00458

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

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

(71) Solicitant:  
• 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.SPĂTAR 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

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

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor extracte standardizate cu efect antimicrobian-antioxidant. Procedeu conform invenției constă din extracția materiei prime constând din herba de pufuliță cu flori mici sau herba de răchitan, frunze de brusture sau frunze de scorus negru, uscată, omogenizată și măcinată la temperatura de reflux cu etanol 70%, timp de 1 h, în rapoarte de extracție de 1:10...20, după care fiecare extract etanolic se analizează în ceea ce

privește conținutul de polifenoli totali exprimați în acid galic, iar soluțiile alcoolice filtrate se concentrează, produsele se reiau în etanol 70% la concentrația standard de 50 mg polifenoli totali exprimați în acid galic per 1 ml extract vegetal, rezultând extracte vegetale standardizate.

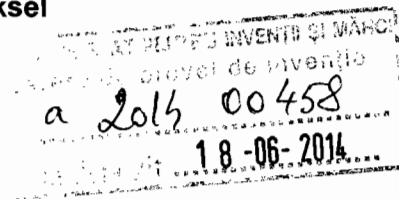
Revendicări: 7



## EXTRACTE VEGETALE CU EFECT ANTIMICROBIAN – ANTIOXIDANT. PROCEDEU DE OBTINERE PENTRU DOUA FORMULE ACTIVE

**AUTORI: Pirvu Lucia Camelia, Hlevca Cristina, Bubueanu Elena Corina,  
Nicu Ioana, Panteli Minerva, Rasit luksel**

**BREVET**



1. Inventia se refera la un procedeu de obtinere a unor produse vegetale, in fapt **doua formule active**, fiecare combinand cate doua extracte vegetale izolate din 4 materii prime vegetale cu activitate antimicrobian - antioxidanta, utilizabile pentru obtinerea de noi produse naturale de igiena sau cosmetica: **FORMULA 1** combina un extract antimicrobian din partea aeriana sau *herba* de pufulita cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L. cu un extract antioxidant din *herba* de rachitan/*Lithrum salicaria* L.; **FORMULA 2** combina un extract antimicrobian din frunze de brusture/*Arctium lappa* L. cu un extract antioxidant din frunze de scorus negru/*Aronia melanocarpa* L.

2. Este cunoscut faptul ca principalii patogeni responsabili de aparitia bolilor infectioase la om sunt **bacteriile gram-pozitive** incluzand cocci (ex., *Staphylococcus aureus* si *Streptococcus hemolytic*) si bacilli (ex., *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Listeria*, *Bacillus*), **bacteriile gram-negative** incluzand cocci (ex., *N. meningitides*, *N. gonorrhoeae*), coccobacilii (ex., *H. influenzae*, *B. pertussis*, *Brucella*) si bacilii (ex., *E.coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *H. pylori*, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*), si **fungii** (ex., genurile *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Pneumocystis*, etc.). Dintre acestia, statisticile arata ca, spre exemplu, in cazul *Staphylococcus aureus*, 90–95% dintre tulpini au capatat rezistenta la penicilina, 70–80% dintre acestea fiind metilicilin rezistente (MRSA).

2.1. Referitor la utilizarea extractelor vegetale ori compusilor vegetali separati drept agenti de combatere sau eradicare a infectiilor, este admis ca, desi compusii din plante au efecte antimicrobiene mult mai reduse fata de agentii de sinteza (de cateva ordine de marime mai mici fata de antibioticele chimice), acestia sunt de multe ori mai eficienti ca urmare a sinergismului care se stabileste intre compusii vegetali (Shanmugam et al., 2008 [1]).

2.2. Literatura de specialitate mai arata ca cele mai active specii fitochimice sunt compusii aromatici din categoria polifenolilor, cumarinelor, terpenoidelor si uleiurilor esentiale, la care se adauga compusi din clasa alcaloizilor, lectinelor si polipeptidelor (Marjorie M. 1999 [2]). In ceea ce priveste mecanismul lor de actiune, din studiile realizate de-a lungul timpului s-au tras urmatoarele concluzii: 1) acizii fenolici in forma oxidata actioneaza cel mai probabil prin inhibitia unor enzime

bacteriene, posibil prin reactia cu o serie de grupari specifice (de exemplu sulfhidril) ale unor proteine din invelisul microbial (Mason T. L. et al. 1987 [3]); <sup>b)</sup>quinonele complexeaza ireversibil aminoacizii nucleofili din proteinele peretelui celular microbial ceea ce conduce la inactivarea si pierderea functiei specifice adezinelor de pe suprafata bacteriei, ori polipeptidelor din perete celular, ori enzimelor legate la membrana (Marjorie M. 1999 [2]); <sup>c)</sup>flavonoidele, similar quinonelor au capacitatea de a complexa proteinele extracelulare sau solubile astfel interferand cu activitatea de pe suprafata peretelui celular, flavonoidele lipofile avand chiar capacitatea de a rupe membranele microbiene (Tsuchiya H. et al., 1996 [4]); de exemplu, dintre flavonoide, <sup>c.1)</sup>catechinele au dovedit abilitatea de a inhiba activitatea enzimei glucozil-transferaza izolata din *S. mutans* (Nakahara, K., et al 1993 [5]) pe cand <sup>c.2)</sup>taninurile au dovedit capacitatea de a stimula fagocitele (Haslam, E., 1996 [6]); <sup>d)</sup>cumarinele au indicat capacitatea de a actiona indirect prin stimularea activitatii macrofagelor; <sup>e)</sup>terpenele, terpenoidele, ca si uleiurile esentiale (ultimele din ele dovedite deopotriwa active pe bacterii, fungi, virusuri, dar si protozoare) cel mai probabil utilizeaza proprietatile lor lipofile, respectiv capacitatea de a trece prin peretele celular echivalenta cu distrugerea microorganismului (Marjorie M. 1999 [2]); <sup>f)</sup>alcaloizii actioneaza prin intercalarea in helixul DNA (Phillipson, J. D. et al, 1987 [7]) iar <sup>g)</sup>lectinele si polipeptidele actioneaza cel mai probabil prin formarea unor canale ionice sau inhibitia competitiva a adeziunii proteinelor microbiene la receptorii polizaharidici ai gazdei infectate (Zhang, Y., 1997 [8]).

2.3. In ceea ce priveste eficienta antimicrobiana a polifenolilor vegetali, clasa cu utilizarea cea mai frecventa ca urmare a raportului beneficiu-risc favorabil, aceasta este in general sub cea a substantelor de sinteza inasa, in unele cazuri, s-au determinat si concentratii minime inhibitorii (CMI) apropiate (vezi Tabelul nr. 1).

**Tabel nr. 1** Comparatie intre CMI ale unor antibiotice chimice fata de compusi vegetali

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

2.4. Datele de literatură (Tim Cushnie TP, Andrew J. Lamb., 2005 [9]) mai arata ca in ceea ce priveste relatia dintre structura polifenolilor, in particular a flavonoidelor si efectul antimicrobian propriu-zis, <sup>a)</sup>hidroxilarea in pozitiiile 2,4- sau 2,6- la nivelul inelului B (fenil) ca si hidroxilarea in pozitiiile 5,7-ale nucleului A (flavan) este foarte importanta pentru activitatea lor antibacteriana si antimeticilin - rezistanta in cazul *Staphylococcus aureus* (MRSA); <sup>b)</sup>substitutia in pozitiiile 6 sau 8 cu o catena lunga alifatica, lavandulil (5-metil-2-izopropenil-hex-4-enil) ori geranil (trans-3,7-dimetil-2,6-octadienil) creste activitatea antimicrobiana; <sup>c)</sup>substitutia cu catene lungi de tip C8 si C10 creste

activitatea flavan-3-olilor; <sup>d</sup>)5-hidroxi-flavanonele si 5-hidroxiizoflavanonele cu grupari hidroxil in pozitia 2 sunt foarte active; <sup>e</sup>)chalconele sunt mult mai active impotriva MRSA decat flavanonele sau flavonele, gruparea -OH din pozitia 2 fiind foarte importanta pentru activitatea lor anti-stafilococcica; <sup>f</sup>)dimpotriva, gruparile metoxil induc o scadere drastica a activitatii antimicrobiene a flavonoidelor.

2.5. De asemenea, este cunoscut efectul antioxidant remarcabil al compusilor vegetali, in special al polifenolilor. Astfel, studii (Lucia P. et. al, 2007 [10]) asupra a 18 cei mai cunoscuti polifenoli din lumea vegetala (vezi **Diagrama 1**) arata ca daca (-)-epicatechina, (+)-catechina (apartinand subclasei flavan-3-olilor), quercetinul si kaempferolul (apartinand subclasei flavonolilor) sunt cei mai potenti antioxidanti cu 90% - 97% activitate scavenger de radicali liberi in model chimic (sistem luminol – apa oxigenata, pH=8.5; Iftimie N. et. al, 2003 [11]), naringina si naringenina (apartinand subclasei flavanonelelor) sunt cele mai slabe (AA% = 32% si 9%). Acizii fenolici, in speta acizii galic, clorogenic si rozmarinic s-au dovedit cu activitate antioxidanta buna, intre 80 si 90%.

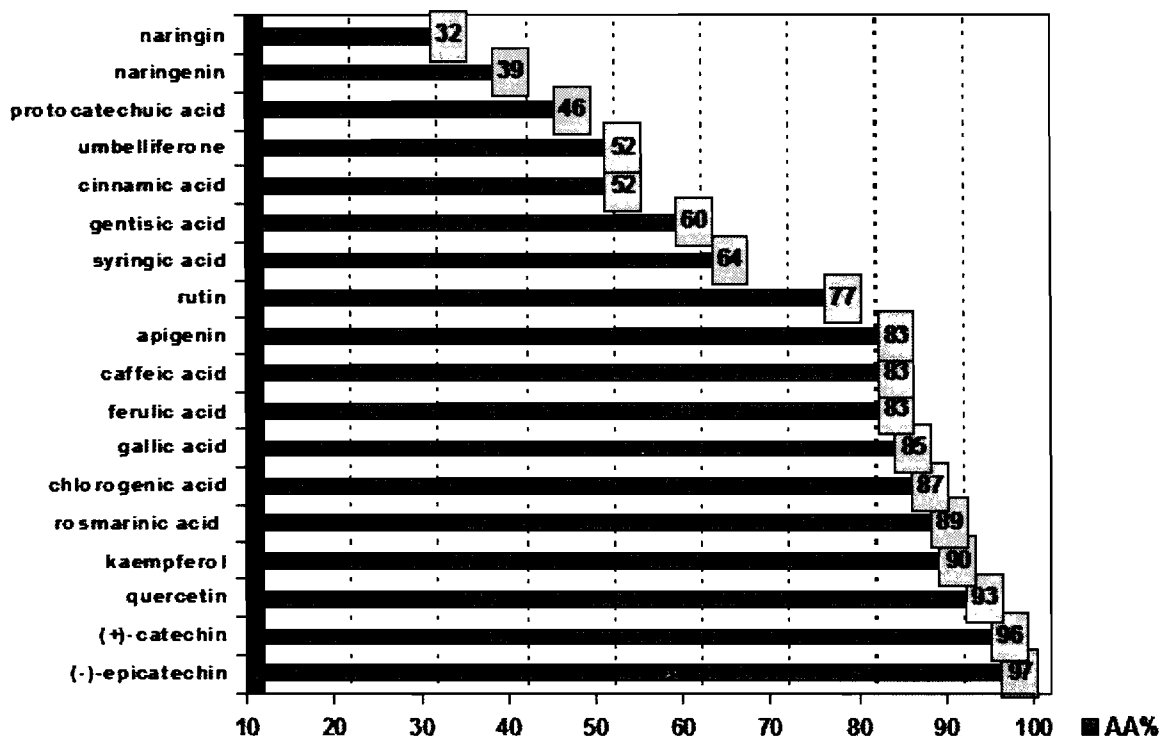


Figura 1. Activitatea antioxidanta a 18 cei mai cunoscuti polifenoli vegetali

2.6. Date fiind acestea si multe alte efecte biologice benefice pentru om, polifenolii vegetali sunt de mare interes atat in industria chimico-farmaceutica, cat si in industria produselor de igiena ori cosmetica. Drept dovada, industria cosmetica si/sau a produselor de igiena utilizeaza intens materii prime vegetale cunoscute pentru continutul chimic bogat in polifenoli antioxidant - antiinflamatori, ori polizaharide, pectine, mucilagi si uleiuri protectoare si regeneratoare, plus uleiuri volatile cu proprietati antimicrobiene bune, cel mai frecvent utilizate materii prime, respectiv extracte

vegetale fiind din *Matricaria chamomilla*/musetel, *Calendula officinalis*/galbenele, *Aloe vera*/aloe, *Helix hederai*/iedera, *Camellia sinensis*/ceai verde, *Avena sativa*/ovaz, *Lavandua angustifolia*/lavanda, *Ocimum basilicum*/busuiocul, *Rosmarinus officinalis*/rosmarin, *Centaurea cyanus*/albastrele alaturi de uleiurile esentiale de *Eucalyptus*/eucalipt, *Citronella* ori *Rosa centifolia*/trandafir, unele dintre ele fiind si testate farmacologic ([www.makingcosmetics.com/.../04-herbal-ingre](http://www.makingcosmetics.com/.../04-herbal-ingre)).

2.7. In ceea ce priveste prezenta inventie, este cunoscut efectul antimicrobian al pufulitei cu flori mici/*Epilobium hirsutum* (Lucia Battinelli, 2000 [13]), ca si cel al brusturelui/*Arctium lappa* (Juliana Vianna Pereira et al., 2005 [14]). De asemenea, exista date privind efectul antioxidant, anti-inflamator bun al rachitanului/*Lythrum salicaria* (Pirvu Lucia et al., Patent RO128214 (A2) 2013-03-29 - *Produse ecologice cu efect antioxidant destinate stabilizarii materialelor si procedeu de obtinere* [15]; Zeinep Tunalier et al., 2007 [16]), ca si cel al aroniei/*Aronia melanocarpa* (Jan Oszmianski et al., 2005 [17]).

### Bibliografie

1. Shanmugam Hemaiswarya, Anil Kumar Kruthiventi, Mukesh Doble. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 2008; 15: 639-652;
2. Marjorie Murphy Cowan. Plant products as Antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.*, 1999, 12(4): 564-582;
3. Mason TL., Wasserman BP. Inactivation of red beet beta-glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry*, 1987; 26: 2197-2202;
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;
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*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; 59: 968-973;
6. Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J Nat Prod.*, 1996; 59(2): 205-15;
7. Phillipson JD., O'Neil MJ. New leads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules. *Acta Pharm Nord.*, 1987; 1: 131-144;
8. Zhang Y, Lewis K. Fabatins: new antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiol Lett.* 1997; 1; 149(1): 59-64;
9. T.P. Tim Cushnie, Andrew J. Lamb. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2005; 26: 343-356;
10. Pirvu 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;
11. N. Iftimie, M. Giuginca, A. Meghea. *Rev Chim-Bucharest*, 2003; 55: 1025-1028;
12. [www.makingcosmetics.com/.../04-herbal-ingre](http://www.makingcosmetics.com/.../04-herbal-ingre)
13. Lucia Battinelli, Beatrice Tita, Maria Grazia Evandri, Gabriela Mazzanti. Antimicrobial activity of *Epilobium* spp. Extracts. *Il Farmaco* 2001; 56: 345-348;
14. Juliana Vianna Pereira, Débora Cristina Baldoqui Bergamo, José Odair Pereira, Suzelei de Castro França, Rosemeire Cristina Linhares Rodrigues Pietro Yara T. Corrêa Silva-Sousa. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. *Braz. Dent. J.*, 2005; 16(3).
15. Pirvu Lucia, Colceru Svetlana Mihul, Nita Sultana, Paraschiv Ileana. Patent RO128214 (A2) 2013-03-29;
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;
17. Jan Oszmianski, Aneta Wojdylo. *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol.*, 2005, 221: 809-813.

3. Avand in vedere toate acestea, problema pe care o rezolva inventia de fata consta in identificarea materiilor prime vegetale si stabilirea asocierii componentelor, astfel obtinandu-se **doua formule active finale (FORMULA 1 si FORMULA 2)**, fiecare combinand cate doua extracte vegetale, un extract dominant cu efect antimicrobian si un extract secundar cu efect antioxidant, utilizabile pentru obtinerea de noi produse de igiena ori cosmetice.

4. Extractele vegetale selectate combina doua subclase de polifenoli vegetali, respectiv acizi fenolici si flavonozide, in diferite proportii sau concentratii. Ca urmare, aceste extracte vegetale au fost caracterizate calitativ printr-un screening HPTLC (in sistem specific pentru polifenoli vegetali, respectiv acetat de etil:acid formic:acid acetic:apa – 100:11:11:26), respectiv cantitativ (prin metoda clasica spectrofotometrica, respectiv reactia cu reactiv *Folin-Ciocalteu*) in vederea determinarii continutului specific in polifenoli. Rezultatele cantitative sunt exprimate in polifenoli totali exprimati in acid galic (GAE), procente de masa pe unitatea de volum (mg / mL extract).

5. Procedul de obtinere al **formulelor active finale** cu efect antimicrobian - antioxidant, respectiv **FORMULA 1** pe baza de extract de herba de pufulita/*Epilobium hirsutum* in combinatie cu extract din herba de rachitan/*Lythrum salicaria* si **FORMULA 2** pe baza de extract de frunze de brusture/*Arctium lappa* in combinatie cu extract din frunze de scorus negru/*Aronia melanocarpa*, raport intre polifenolii celor doua specii 4:1 (g/g) si un continut total de compusi activi de 50mg polifenoli totali exprimati in acid galic *per* 1 ml produs final conditionat, conform inventiei, prevede urmatoarele faze:

- a) extratia materiei prime vegetale cu alcool etilic 70% (v/v);
- b) filtrarea extractului;
- c) analiza si standardizarea extractului;
- d) amestecul componentelor in algorimul stabilit.

a. Extractia materiei prime se realizeaza astfel; materia prima vegetala constituita din partea aeriana sau *herba* de pufulita cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L., *herba* de rachitan/*Lithrum salicaria* L., frunze de brusture/*Arctium lappa* L. ori frunze de scorus negru/*Aronia melanocarpa* L. se extrage, fiecare separat, cu alcool etilic 70% in rapoarte de volum (v), la temperatura de reflux a masei de extractie si cu agitare continua in rapoarte specifice, masa materie prima uscata/volum solvent [alcool 70% (v)], pentru fiecare materie primă vegetala, respectiv:

- 1:20 (g/v) pentru *herba* de pufulita cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L.,
- 1:20 (g/v) pentru frunze de brusture/*Arctium lappa* L.,
- 1:10 (g/v) pentru *herba* de rachitan/*Lithrum salicaria* si
- 1:10 (g/v) pentru frunze de scorus negru/*Aronia melanocarpa* L.

b. Filtrarea celor 4 extracte alcoolice brute obtinute din cele 4 materii prime vegetale se realizeaza la cald (la 40-45°C), prin hartie de filtru industriala prevazuta cu con de siguranta.

c. Analiza si standardizarea extractelor se realizeaza prin <sup>c1)</sup>screeningul HPTLC al extractelor in sistem pentru polifenoli (acetat de etil:acid acetic glacial:acid formic:apa – 100:11:11:26) cand se urmareste continutul chimic calitative al extractelor urmat de <sup>c2)</sup>dozarea continutului extractelor brute in polifenoli totali exprimati in acid galic (FR X, metoda spectrofotometrica cu reactiv *Folin-Ciocalteu*). In mod practic, odata realizat acest screening analitic, fiecare extract alcoolic brut cu un continut cunoscut de polifenoli totali exprimati in acid galic (GAE) se va concentra la reziduu/spiss, iar produsul obtinut se va relua in etanol 70% (v) astfel incat sa se asigure concentratia finala de 50 mg polifenoli totali (GAE) *per* 1 ml extract in cazul tuturor extractelor. Odata obtinute aceste extracte vegetale standardizate in polifenoli totali (GAE) se vor amesteca 4 ml extract din *herba* de pufulita cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L. cu 1 ml extract din *herba* de rachitan/*Lithrum salicaria* L. (FORMULA 1), respectiv 4 ml extract din frunze de brusture/*Arctium lappa* L. cu 1 ml extract din frunze de scorus negru/*Aronia melanocarpa* L. (FORMULA 2), ceea ce inseamna un raport de 4:1 intre polifenolii celor doua specii vegetale. Cei 5 ml extract standardizat combinat, corespunzator fiecarei formule, se vor adauga intr-o cantitate (volum) de 50 ml produs final de igiena ori cosmetic, aceasta conducand la un continut de 5 mg polifenoli totali (GAE) *per* 1 ml produs final conditionat.

De exemplu, in cazul de fata, de la 100 g materie prima vegetala s-au obtinut, in medie:

- 1100 ml extract din *herba* de pufulita /*Epilobium hirsutum* L. cu un continut de 4.45 mg polifenoli totali (GAE) *per* 1 ml extract alcoolic brut care, daca se standardizeaza, conform inventiei, conduce la  $1100 \times 4.45 = 4895 : 50 \approx$  100 ml extract standardizat;

- 1300 ml extract din frunze de brusture/*Arctium lappa* L. cu un continut de 1.05 mg polifenoli totali (GAE) *per* 1 ml extract alcoolic brut care daca se standardizeaza, conform inventiei, conduce la  $1300 \times 1.05 = 1365 : 50 \approx$  27 ml extract standardizat;

- 750 ml extract din *herba* de rachitan/*Lithrum salicaria* L. cu un continut de 3.0 mg polifenoli totali (GAE) *per* 1 ml extract alcoolic brut care daca se standardizeaza, conform inventiei, conduce la  $750 \times 3 = 2250 : 50 \approx$  45 ml extract standardizat;

- 850 ml extract din frunze de scorus/*Aronia melanocarpa* L. cu un continut de 3.26 mg polifenoli totali (GAE) *per* 1 ml extract alcoolic brut care daca se standardizeaza, conform inventiei, conduce la  $850 \times 3.26 = 2771 : 50 \approx$  55 ml extract standardizat.

6. Prin aplicarea procedului, conform inventiei, rezulta doua avantaje:

- se obtin 4 extracte vegetale cu un continut standardizat in polifenoli totali exprimati in acid galic (50 mg GAE *per* 1 ml extract) care pot fi combinate in diferite formule si produse finale conditionate de igiena ori de uz cosmetic;

- se obtin 4 extracte vegetale cu efect antioxidant marcat, doua dintre ele, respectiv extractul din herba pufulita/*Epilobium hirsutum* si extractul din frunze de brusture/*Arctium lappa*, in plus cu efect antimicrobian pe bacterii frecvent intalnite (*S. aureus* si *E. coli*), care pot fi utilizate drept ingrediente sau baza pentru obtinerea de produse de igiena ori cosmetice noi, cu efect antimicrobian-antioxidant.

7. Se dau mai jos cele 6 exemple de realizare a procedurii, conform inventiei, pentru cele 4 extracte vegetale si cele doua formulele finale rezultate (**FORMULA 1** si **FORMULA 2**):

7.1.1. Extract alcoolic din herba de pufulita cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L. pentru obtinerea de produse de igiena ori cosmetice cu efect antimicrobian:

100g materie prima constituita din herba de pufulita cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L. uscata si macinata grosier se extrage, o singura data, cu 2000mL etanol 70% (v), 1 ora, cu agitare continua, la temperatura de reflux. Extractul hidroalcoolic brut rezultat se separa cald (40-45C°) de masa de materie prima prin filtrare pe hartie de filtru industriala prevazut cu con de siguranta, la presiune atmosferica. Se obtin circa 1100 mL solutie extractiva mucilaginoasa de culoare brun deschis; raport mediu de imbibitie 1:4,5 - g/v. Solutia extractiva alcoolica rezultata se analizeaza in ceea ce priveste calitatea si continutul in polifenoli totali exprimati in acid galic (GAE) dupa care se concentraza la reziduu/spiss. Produsul rezultat se reia in etanol 70% (v) la o concentratie standard de 50 mg polifenoli totali (GAE) per 1 ml extract final standardizat.

7.1.2. Extract alcoolic din herba de rachitan/*Lythrum salicaria* L. pentru obtinerea de produse de igiena ori cosmetice cu efect antioxidant:

100g materie prima constituita din herba de rachitan/*Lythrum salicaria* L. uscata si macinata grosier se extrage, o singura data, cu 1000mL etanol 70% (v), 1 ora, cu agitare continua, la temperatura de reflux. Extractul hidroalcoolic brut rezultat se separa cald (40-45C°) de masa de materie prima prin filtrare pe hartie de filtru industriala prevazut cu con de siguranta, la presiune atmosferica. Se obtin circa 750 mL solutie extractiva de culoare brun-verzui; raport mediu de imbibitie 1:2,5 - g/v. Solutia extractiva alcoolica rezultata se analizează in ceea ce priveste continutul calitativ si cantitativ in polifenoli totali exprimati in acid galic (GAE) dupa care se concentraza la reziduu/spiss. Produsul rezultat se reia in etanol 70% (v) la o concentratie standard de 50 mg polifenoli totali (GAE) per 1 ml extract final standardizat.

7.1.3. **FORMULA 1** - Extract standardizat combinat pe baza de herba de pufulita cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L. si herba de rachitan/*Lythrum salicaria* L. pentru obtinerea de produse de igiena ori cosmetice cu efect antimicrobian - antioxidant:

4ml extract alcoolic standardizat din herba de pufulita cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L. cu o concentratie de 50 mg polifenoli totali (GAE) per 1 ml extract, in total 4x50=200 mg polifenoli, se vor amesteca cu 1ml extract alcoolic standardizat din herba de rachitan/*Lythrum salicaria* L. cu o concentratie de 50 mg polifenoli totali (GAE) per 1 ml extract, in total 1x50=50 mg polifenoli, astfel



rezultand 5 ml extract standardizat combinat cu un continut total de 250 mg polifenoli totali, raport intre polifenolii speciilor/extractele vegetale 4:1 (g/g – v/v). Acesti 5 ml extract standardizat combinat, respectiv **FORMULA 1**, se vor adauga intr-o cantitate (volum) de 50 ml produs final de igiena ori cosmetic, insemnand un continut de 5 mg polifenoli totali (GAE) *per* 1 ml produs final conditionat.

7.2.1. Extract alcoolic din frunze de brusture/*Arctium lappa* L. pentru obtinerea de produse de igiena ori cosmetice cu efect antimicrobian:

100g materie prima constituita din frunze de brusture/*Arctium lappa* L. uscate si macinate grosier se extrag, o data, cu 2000mL etanol 70% (v), 1 ora, cu agitare continua, la temperatura de reflux. Extractul hidroalcoolic brut rezultat se separa cald (40-45C°) de masa de materie prima prin filtrare pe hartie de filtru industriala prevazut cu con de siguranta, la presiune atmosferica. Se obtin circa 1300 mL solutie extractiva de culoare bruna; raport mediu de imbibitie 1:3,5 - g/v. Solutia extractiva alcoolica rezultata se analizeaza privind continutul calitativ si cantitativ in polifenoli totali exprimati in acid galic (GAE) dupa care se concentraza la reziduu/spiss. Produsul rezultat se reia in etanol 70% (v) la o concentratie de 50 mg polifenoli totali (GAE) *per* 1 ml extract final standardizat.

7.2.2. Extract alcoolic din frunze de scorus negru/*Aronia melanocarpa* L. pentru obtinerea de produse de igiena ori cosmetice cu efect antioxidant:

100g materie prima constituita din frunze de scorus/*Aronia melanocarpa* L. uscate si macinate grosier se extrag, o data, cu 1000mL etanol 70% (v), 1 ora, cu agitare continua, la temperatura de reflux. Extractul hidroalcoolic brut rezultat se separa cald (40-45C°) de masa de materie prima prin filtrare pe hartie de filtru industriala prevazut cu con de siguranta, la presiune atmosferica. Se obtin circa 750 mL solutie extractiva de culoare verde-brun; raport mediu de imbibitie 1:2,5 - g/v. Solutia extractiva alcoolica rezultata se analizeaza privind continutul calitativ si cantitativ in polifenoli totali exprimati in acid galic (GAE) dupa care se concentraza la reziduu/spiss. Produsul rezultat se reia in etanol 70% (v) la o concentratie de 50 mg polifenoli totali (GAE) *per* 1 ml extract final standardizat.

7.2.3. **FORMULA 2** – Extract standardizat combinat pe baza de frunze de brusture/*Arctium lappa* L. si frunze de scorus negru/*Aronia melanocarpa* L. pentru obtinerea de produse de igiena ori cosmetice cu efect antimicrobian-antioxidant:

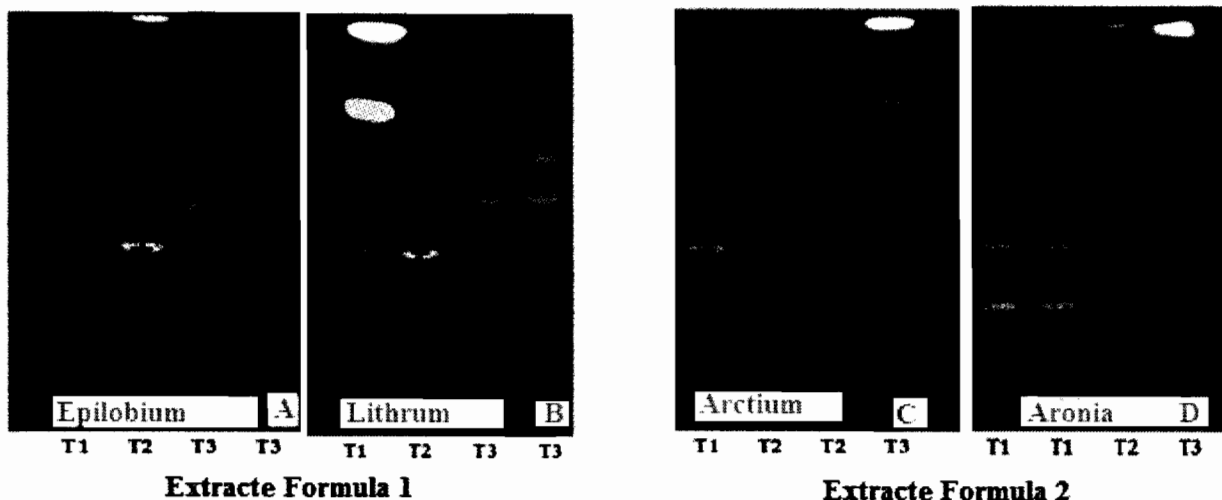
4ml extract alcoolic standardizat din frunze de brusture/*Arctium lappa* L. cu o concentratie de 50 mg polifenoli totali (GAE) *per* 1 ml extract, in total 4x50=200 mg polifenoli, se vor amesteca cu 1ml extract alcoolic standardizat din frunze de scorus negru/*Aronia melanocarpa* L. cu o concentratie de 50 mg polifenoli totali (GAE) *per* 1 ml extract, in total 1x50=50 mg polifenoli, astfel rezultand 5 ml extract standardizat combinat cu un continut total de 250 mg polifenoli totali, raport intre polifenolii speciilor/extractele vegetale 4:1 (g/g – v/v). Acesti 5 ml extract standardizat combinat, respectiv **FORMULA 2**, se vor adauga intr-o cantitate de 50 ml volum final produs de igiena ori cosmetic, aceasta insemnand un continut de 5 mg polifenoli totali (GAE) *per* 1 ml produs final conditionat.

8. Dovada efectului antimicrobian, respectiv antioxidant a celor 4 extracte vegetale este adusa de experimentarea microbiologica (metoda cilindrilor pe trei tulpini microbiene rezistente – vezi **Tabelul 1**) si de studiile privind activitatea antioxidanta (metoda cu DPPH – vezi **Diagrama 2**), cele doua experimente demonstrand clar activitatea antioxidanta (AA), *scavenging* de radicali liberi a celor 4 extracte, mai accentuate in cazul extractelor de rachitan si aronia, ca si efectul antimicrobian cert al extractelor de pufulita cu flori mici si brusture, obtinute conform inventiei (vezi punctul 7).

Punctual, s-au obtinut următoarele rezultate:

8.1. In cazul extractelor care alcatuiesc **FORMULA 1** (**Figura 1, cromatogramele A si B**), extractul din herba de pufulita cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L. a demonstrat atat un efect antimicrobian, pe ambele tulpini bacteriene, respectiv *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 si *Escherichia coli* ATCC 8739, cat si un efect antioxidant bun (AA=75% pentru dilutia 0.5mg/mL), in timp ce extractul din herba de rachitan/*Lythrum salicaria* L. a demonstrat un efect antioxidant puternic (AA=88%, de asemenea pentru dilutia 0.5mg/mL).

8.2. In cazul extractelor care alcatuiesc **FORMULA 2** (**Figura 1, cromatogramele C si D**), extractul din frunze de brusture/*Arctium lappa* L. a demonstrat un efect antimicrobian cert pe *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 si un efect antioxidant bun (AA=71% pentru dilutia 0.5mg/mL) in timp ce extractul din frunze de scorus negru/*Aronia melanocarpa* L. a demonstrat un efect antioxidant puternic (AA=87%, de asemenea pentru dilutia 0.5mg/mL).



**Figura 1.** Screening HPTLC pentru extractele vegetale, componente ale celor doua formule active.

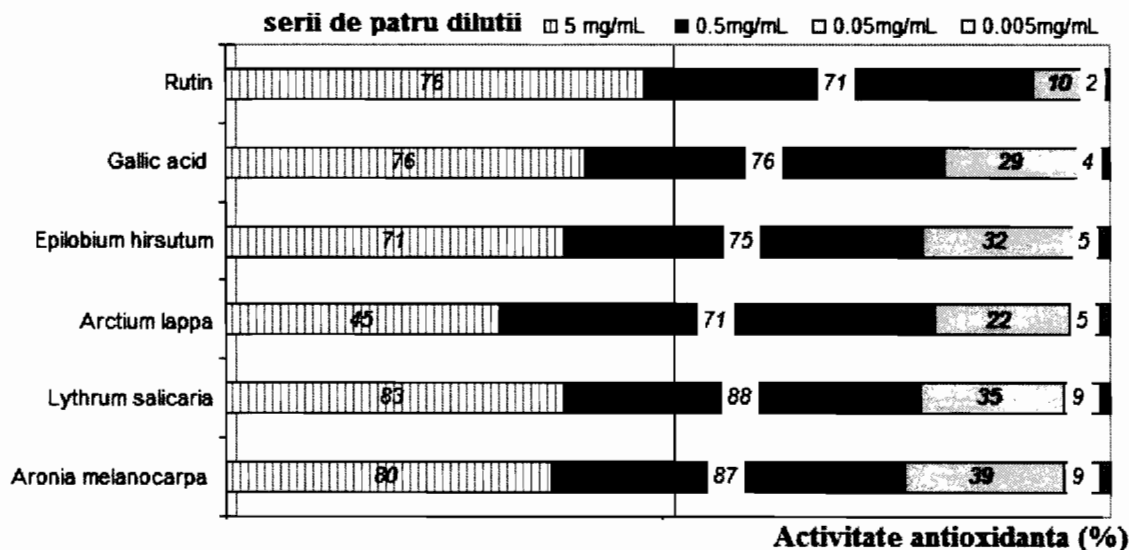
**Cromatograma A;** Track T1 – substante de referinta (acid clorogenic), Track T2 – substante de referinta (rutin, acid clorogenic, hiperozida, vitexina, quercetin); Tracks T3 – extract alcoolic din partea aeriana de *Epilobium hirsutum* L. (proba duplicat); **Cromatograma B;** Track T1 – substante de referinta (rutin, vitexin 2"-rhamnoside, hiperozida, quercitrin, quercetin); Track T2 – substante de referinta (rutin, apiin, hiperozida, acid cafeic, apigenin); Tracks T3 – extract alcoolic din partea aeriana de *Lythrum salicaria* L. (proba duplicat); **Cromatograma C;** Track T1 – substante de referinta (rutin, apiin, hiperozida, acid cafeic, apigenin); Tracks T2 – extract alcoolic din frunze de *Arctium lappa* L. (proba duplicat); Track T4 – substante de referinta (rutin, hiperozida, quercetin); **Cromatograma D;** Tracks T1 – extract alcoolic din frunze de *Aronia melanocarpa* L. (proba duplicat); Track T2 – substante de referinta (rutin, acid clorogenic, hiperozida, vitexina, quercetin); Track T3 – substante de referinta (hiperozida, quercetin).

**Tabel nr. 1** Diametrul zonelor de inhibitie asupra unor tulpini standardizate (ATCC)

Proba test	Tulpini test	Diametru zona inhibitie (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	-

**Unde:**

diametrul < 10 mm inseamna lipsa de activitate si este notata cu semnul '-';  
 diametrul de 11 – 15 mm inseamna activitate slaba si este notata cu semnul '+';  
 diametrul de 16 – 20 mm insemana activitate moderata si este notata cu semnul '++';  
 diametrul > 20 mm insemana activitate certa sau buna si este notata cu semnul '+++'



**Diagrama 2.** Activitatea antioxidanta (%) a celor 4 extracte vegetale comparativ cu doua substante de referinta (Acid galic, respectiv, Rutin) realizata in serii de patru dilutii fiecare (5 – 0.5 – 0.05 – 0.005 mg / 1 ml proba/ extract )

Astfel, s-a demonstrat ca cele 4 extracte vegetale, obtinute conform inventiei (vezi punctul 7), au atat efect antioxidant, cat si efect antimicrobian (cazul particular al extractelor de pufulita cu flori mici si brusture) pe tulpini bacteriene rezistente, ceea ce sustine utilizarea acestora drept materie prima ori baza a unor produse de igiena ori cosmetice cu efect antimicrobian – antioxidant.

**EXTRACTE VEGETALE CU EFECT ANTIMICROBIAN – ANTIOXIDANT.  
PROCEDEU DE OBTINERE PENTRU DOUA FORMULE ACTIVE**

**AUTORI: Pirvu Lucia Camelia, Hlevca Cristina, Bubueanu Elena Corina,  
Nicu Ioana, Panteli Minerva, Rasit Iuksel**

**REVENDICARI**

1. Procedeu de obtinere al unor extracte vegetale standardizate izolate din partea aeriana sau *herba* de pufulita cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L., *herba* de rachitan/*Lithrum salicaria* L., frunze de brusture/*Arctium lappa* L. si frunze de scorus negru/*Aronia melanocarpa* L., **caracterizat prin aceea ca**, este constituit din urmatoarele faze:

- a) extratia materiei prime vegetale cu alcool etilic 70% (v/v);
- b) filtrarea extractului;
- c) analiza si standardizarea extractului;
- d) amestecul componentelor in algorimul stabilit.

2. Procedeu, conform revendicarii 1, **caracterizat prin aceea ca**, materia prima constituita din *herba* de pufulita cu flori mici/*Epilobium hirsutum* L., ori *herba* de rachitan/*Lithrum salicaria* L., ori frunze de brusture/*Arctium lappa* L. ori frunze de scorus negru/*Aronia melanocarpa* L., uscata, macinata si omogenizata se extrage, fiecare separat, la temperatura de reflux cu etanol 70% (v), timp de 1 ora, in rapoarte de extractie specifice, dupa cum urmeaza: 1:20 (g/v) pentru *herba* de pufulita/ *Epilobium hirsutum* L., 1:20 (g/v) pentru frunze de brusture/ *Arctium lappa* L., 1:10 (g/v) pentru *herba* de rachitan/ *Lithrum salicaria* L. si 1:10 (g/v) pentru frunze de scorus/ *Aronia melanocarpa* L.

3. Procedeu, conform revendicarii 1, **caracterizat prin aceea ca**, fiecare extract etanolic filtrat rezultat se analizeaza in ceea ce priveste continutul chimic calitativ (aspectul calitativ este foarte important intrucat asigura existenta unui efect antimicrobian) si cantitativ (acest aspect asigura intensitatea efectului antimicrobian si/sau antioxidant) in polifenoli totali exprimati in acid galic (GAE).

4. Procedeu, conform revendicarii 1, **caracterizat prin aceea ca**, solutiile alcoolice filtrate rezultate se concentreaza la reziduu/*sicc*, iar produsele rezultate se reiau in etanol 70% (v), la concentratia standard de 50mg polifenoli totali exprimati in acid galic (GAE) per 1 ml extract vegetal astfel rezultand 4 extracte vegetale standardizate.

5. Procedeu, conform revendicarii 1, **caracterizat prin aceea ca**, extractele standardizate obtinute se combina in raport 4:1 rezultand cele doua formule de amestecuri de extracte astfel: **FORMULA 1** – la 4 parti de extract standardizat din *herba* de pufulita cu flori mici/ *Epilobium hirsutum* L. se adauga 1 parte de extract standardizat din *herba* de rachitan/ *Lithrum salicaria* L.; **FORMULA 2** – la 4 parti de extract standardizat din frunze de brusture/ *Arctium lappa* L. se adauga 1 parte extract standardizat din frunze de scorus negru/ *Aronia melanocarpa* L.

6. Procedeu, conform revendicarii 1, **caracterizat prin aceea ca**, extractele vegetale combinate, respectiv **FORMULA 1** ori **FORMULA 2**, se adauga in cantitate de 5 ml la 50 ml produs final de igiena ori de uz cosmetic, sau de 10 ml la 100 ml produs final de igiena ori de uz cosmetic, astfel incat sa rezulte concentratia de 5 mg polifenoli totali exprimati in acid galic (GAE) *per* 1 ml produs final de igiena ori de uz cosmetic, adica concentratia efectiva demonstrata in *screening*-ul microbiologic.

7. Procedeu, conform revendicarii 1, **caracterizat prin aceea ca**, extractele rezultate sunt extracte standardizate cu efect antioxidant, respectiv antimicrobian (in cazul particular al extractelor din *herba* de pufulita cu flori mici/ *Epilobium hirsutum* L. si frunze de brusture/ *Arctium lappa* L.), deci utilizabile pentru obtinerea de produse noi de igiena ori de uz cosmetic cu efect antimicrobian - antioxidant.