



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00211

(22) Data de depozit: 07/04/2017

(41) Data publicării cererii:
30/10/2018 BOPI nr. 10/2018

(71) Solicitant:
• LABORATOARELE FARES BIO VITAL
S.R.L., STR. PLANTELOR NR. 50,
ORĂȘTIE, HD, RO

(72) Inventatori:
• RADU MOLDOVAN IOAN,
STR. MUREȘUL, BL.22, SC.C, ET.1, AP.27,
ORĂȘTIE, HD, RO

(74) Mandatar:
CABINET N.D. GAVRIL S.R.L.,
STR.ȘTEFAN NEGULESCU NR.6A,
SECTOR 1, BUCUREȘTI

(54) SUPLIMENT ALIMENTAR

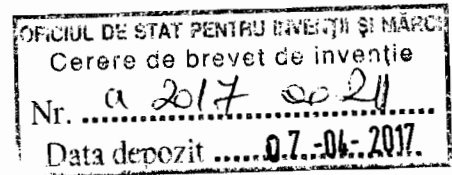
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un supliment alimentar cu acțiune de eliminare a microorganismelor din tractul respirator, digestiv sau genito-urinar. Suplimentul conform invenției este constituit, în procente masice, din 40% frunze de măslin (*Olive Folium*), 20% lichen de piatră (*Lichen Islandicus*), 20% muguri de plop (*Populi Gemmae*),

10% extract de scoarță de salcie (*Salcis cortex*) standardizat în minimum 15% salicină, precum și 10% cuișoare (*Caryophylli floris*).

Revendicări: 2
Figuri: 3





SUPLIMENT ALIMENTAR

Invenția se referă la un supliment alimentar pe bază de 5 plante medicinale, frunze de măslin (Olive Folium), lichen de piatră (Lichen Islandicus), muguri de plop (Populi Gemmae), extract de scoarță de salcie (Salicis cortex) și cuișoare (Caryophylli floris), realizat sub formă de capsule.

Frunzele de măslin sunt confirmate științific prin numeroase studii ca având efect de reducere a numărului microorganismelor potențial patogene. Studiile efectuate au arătat că oleuropeinele din frunzele de măslin au capacitatea de a pătrunde prin învelișul lipoproteic al germenilor inhibând astfel procesul de replicare al ARN-lui. De asemenea, cresc imunitatea prin stimularea directă a producției de fagocite.

Compoziție chimică:

- secoiridoide: oleuropeina, ligstrozida, oleurozida, hidroxitirozol, acid elenolic, glicozide ale oleuricinei A, B, oleaceina (3,4-DHPEA-EDA);
- derivați triterpenici: acid oleanolic, acid maslinic, β -amirin, eritrodiol, acid betulinic, uvaol, acid ursolic;
- calcone: olivina, heterozide ale olivinei;
- derivați flavonici: rutozida, heterozide ale apigenolului, luteolului, kemferolului, crisoeriolului, rutina, diosmetina;
- acizi fenolici: acid cumaric, cafeic, ferulic, vanilic;
- cumarine: esculetina, scopoletina, esculina;
- fitosteroli;
- derivați lignanici;
- alcaloizi: cinchonina, cinchonidina;
- hidrocarburi, esteri, ceruri, trigliceride, tocoferoli, esteroli.

Acțiuni:

- antibacteriană: extractul apos din frunzele de măslin are efect bactericid împotriva *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* și efect bacteriostatic împotriva *Bacillus subtilis*, datorită prezenței oleuropeinelor, care au capacitatea de a pătrunde prin învelișul lipoproteic al germenilor, inhibând replicarea ARN-ului. Hidroxitirozolul a demonstrat o activitate antimicrobiană mai largă decât oleuropeina, comparabilă cu cea a ampicilinei și eritromicinei din punct de vedere al spectrului și potenței.

De asemenea, extractul din frunzele de măslin este un agent antibacterian și pe *Salmonella typhi*, *Vibrio paraemoliticus* și *Streptococcus* (activ inclusiv pe tulpinile rezistente la peniciline). Activitatea împotriva *Mycobacterium tuberculosis* a

extractului etanolic de măslin 95% a fost evaluată folosind ca mediu de cultură bulionul.

Într-un studiu s-a evaluat efectul antibacterian al 3, 4-DHPEA-EA, un derivat al oleuropeinei obținut prin hidroliza enzimatică, împotriva bacteriilor Gram-pozitive. Concentrația minimă inhibitorie (CMI) a compusului, solubilizat fie în metanol, fie în dimetil-sulfoxid, a fost determinată prin metoda de microdiluție în bulion. Derivatul 3, 4-DHPEA-EA este activ pe izolate clinice de stafilococi: *Staphylococcus aureus* (CMI = 125-250 $\mu\text{g/ml}$) și *Staphylococcus epidermidis* (CMI = 7.81-62.5 $\mu\text{g/ml}$). Rezultatele obținute in vitro pot fi utilizate pentru a dezvolta noi direcții de terapie în tratamentul infecțiilor pe piele.

S-au analizat compușii polifenolici prezenți în frunzele de măslin, detectați prin HPLC și s-a evaluat activitatea antimicrobiana in vitro împotriva bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative și fungilor. Agenții testați cauzatori de infecții respiratorii și intestinale sunt Gram-pozitivi: *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*; Gram-negativi: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*; fungi: *Candida albicans* și *Cryptococcus neoformans*. Analiza HPLC a permis identificarea a 7 compuși polifenolici, printre care: acid cafeic, verbascosida, oleuropeina, luteolin-7-O-glicozida, luteolin-4-O-glicozida, rutina și apigenin-7-O-glicozida. Aceștia au acțiune antibacteriană și antifungică pe tulpinile testate și prezintă valori ale IC₂₅ <1mg/ml.

S-a testat activitatea antibacteriană a câtorva plante (năsturel, portocal, portocal amar, fenicul, creosot, bananier pitic asiatic și măslin) asupra tulpinilor de *Mycobacterium tuberculosis* rezistente la medicamente cu scopul de a trata tuberculoza și alte boli respiratorii. Dintre plantele testate, năsturelul, măslinul și speciile de portocal sunt cele mai active pe tulpinile de *M.tuberculosis* rezistente la medicamente, măslinul este cel mai activ pe tulpinile rezistente la izoniazida (tuberculostatic de primă intenție) la CMI =25 $\mu\text{g/ml}$. Aceste rezultate puntează importanța extractelor vegetale față de tulpinile de *M.tuberculosis* rezistente la tuberculostaticele medicamentoase.

Într-un alt studiu s-a evidențiat activitatea antibacteriană a aldehydelor alifatică din extractul de măslin pe *S. aureus* (*meticilino-sensibil și meticilino-rezistent*), *E. coli*, *S. epidermidis*, *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *S. enteritidis*, *S. typhi*, *B. cereus* și *L. monocytogenes*. *Acțiunea aldehydelor este datorată alterării funcției proteinelor din membrana bacteriilor, acționând cu grupările nucleofile sulfhidril, amino și hidroxil, aldehydele fiind molecule electronegative datorită atomului de oxigen aldehydic.*

Oleuropeina prezintă acțiune antibacteriană și pe *Mycoplasma*, *Campylobacter jejuni*, *H. Pilory* => reglarea florei gastro-intestinale, prin reducerea nivelelor *H. pilory* și *C. jejuni*. Un alt mecanism de acțiune posibil, pe lângă cel al distrugerii membranei bacteriene, este cel de creștere a sistemului imunitar prin stimularea fagocitozei (proces prin care fagocitele înglobează particule străine patogene).

- antivirală: studiile in vitro și pe animalele de experiență au sugerat că extractul din frunzele de măslin prezintă acțiune antivirală pe virusul HIV-1. Oleuropeina a fost brevetată în Statele Unite ale Americii pentru acțiunea antivirală împotriva bolilor virale, incluzând: herpesul (acțiune antivirală pe HSV-1 la concentrații >1mg/ml a extractului din frunze de măslin), mononucleoza și hepatita.

Mecanismul se bazează pe următoarele :

- proprietatea de a interfera cu producerea de aminoacizi esențiali pentru virusuri;
- proprietatea de a penetra direct celulele infectate și de a opri replicarea virală;
- în cazul retrovirusurilor, se neutralizează producția de revers-transcriptază și proteaza
- stimularea fagocitozei.

Studiile in vivo sugerează că extractul frunzelor de măslin posedă activitate antivirală pe rhabdovirus producător de septicemie hemoragică virală. Oleuropeina prezintă activitate antivirală pe virusurile ADN și ARN, cum sunt: herpetic, Epstein-Barr, hepatic, rotavirus, rinovirus bovin, parvovirus canin și virusul leucemiei feline.

150 de plante au fost evaluate pentru acțiunea antivirală împotriva rotavirusului producător de diaree. S-a arătat ca extractul apos de lotus indian, urzică, rooibos, lemn dulce și frunzele de măslin au acțiune antivirală puternică cu concentrație inhibitorie 50% (IC50) < 300μg/ml. Aceste rezultate demonstrează că extractele din aceste plante pot fi utilizate în tratamentul diareei produsă de infecția cu rotavirus.

Studiile au arătat, de asemenea că oleuropeina prezintă acțiune antivirală pe virusul respirator sincitial și virusul para-influenzae tip 3.

- antifungică: activă pe *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton*, *Microsporum*; acțiune datorată inhibării elastazei, un factor virulent esențial pentru colonizarea dermatofitelor

- vermifugă: s-a demonstrat că acidul măslinic este un coccidiostatic natural împotriva protozoarului parazit intracelular, *Eimeria tenella*. Acțiunea acidului măslinic la animalele infectate a fost comparată cu cea a salinomicinei sodice, evaluând greutatea corporală a puilor infectați. Numărul de leziuni a scăzut și a crescut greutatea corporală la grupul tratat cu acid măslinic față de grupul control. Rezultatele histopatologice ale cecumului la 120 ore post-infecție au arătat că rata infecției a scăzut semnificativ la puii tratați cu acid măslinic.

Salcia

Salix alba L. (fam. Salicaceae) este un arbore care poate ajunge până la 20 m înălțime, are o coroană neregulată, cu lujeri subțiri, flexibili, verzi-gălbui. Scoarța se desprinde ușor de pe ramuri. Frunzele sunt lanceolate, lungi de 4-10 cm; florile sunt unisexuate, în amenti și se formează o dată cu frunzele. Mugurii sunt alungit-ovoizi, alipiți de ramuri. Este o plantă de lunci și zăvoaie, cu cerințe mari față de umiditate.

Partea utilizată: extract din scoarță - Salicis cortex, care conține min. 15% salicina.

Scoarța de salcie s-a dovedit a fi o veritabilă sursă naturală de precursori ai acidului acetyl salicilic. Cercetările științifice au descoperit în compoziția sa saligenina, o substanță care se transformă în organism în acid salicilic, care însă nu irită tubul digestiv. Are un efect de reducere a temperaturii corpului prin mecanism sudorific fiind recomandată pentru reducerea disconfortului asociat acestor simptome.

. Compoziție chimică:

- salicina, salicortina, tremulacina, populina, fragilina, salicozida, triandrina, vimalina, piceina, grandidentatina, 3' și 4'-acetyl-salicortina;
- acizi și aldehide aromatice: salidrozida, vanilina, aldehida siringica, siringina, ac salicilic, vanilic, siringic, p-hidroxibenzoic, p-cumaric, cafeic, ferulic;
- alcool salicilic= saligenina;
- tanin, proantociani;
- flavonoide: heterozide ale cvercitolului, luteolinei, ampelopsina, calcona, izosalipurpozida, flavonone, eriodictiol-7-glucozida, naringenin-7-glucozida, catechina;
- s-au determinat de asemenea, microelemente și metale grele, cum ar fi: Cr, Cu, Fe, Ni, Zn, Ba, Cd și Pb;
- pirocatecol.

Acțiuni:

- antiinflamator: acidul salicilic intervine în metabolismul acidului arahidonic, inhibând ciclooxigenaza (COX1, COX2), 5-Lipooxigenaza (5-LO) și scăzând astfel sinteza de prostaglandine și leucotriene pro-inflamatorii.

In vitro, membrana corioalantoica a embrionului de găină a fost folosită pentru a studia efectul antiinflamator al salicinei și tremulacinei din scoarța de salcie. Debutul efectului a fost întârziat în comparația cu saligenina, salicilatul de sodiu și acidul acetilsalicilic, indicând astfel că principiile active pot fi metabolizate la salicina și tremulacina.

A fost testat, in vivo, efectul antiinflamator al tremulacinei. Aceasta a fost izolată și administrată subcutanat în doză de 100mg/kg greutate corporală pentru a demonstra inhibarea edemului indus de caragenan la nivelul labutei de șobolan. Pe lângă aceasta, tremulacina a inhibat migrarea leucocitelor peritoneului și a împiedicat formarea edemului indus de uleiul de croton de la nivelul urechii șoarecilor. Efectul antiinflamator este confirmat și de inhibarea sintezei de leucotriene B4 de la nivelul leucocitelor.

Într-un studiu s-au examinat 3 plante medicinale: mușetel, cretusca și salcia albă, utilizate tradițional ca și agenți antiinflamatori. Extractele apoase și compușii polifenolici izolați (apigenina, cvercetina și acidul salicilic) au fost incubati cu celulele

macrofagele și au fost măsurate interleukina-1 β , IL-6 și factorul de necroză tumorală α (TNF- α)- biomarkeri proinflamatori ai macrofagelor. Dintre extractele plantelor, scoarța de salcie albă a avut cea mai importantă activitate antiinflamatoare, reducând producția de IL-6 și TNF- α , fiind urmată de cretusca și apoi mușetel. Cele mai mici concentrații eficiente pentru a obține un efect antiinflamator nu au fost toxice. În concluzie, aceste descoperiri demonstrează activitatea antiinflamatoare a acestor extracte medicinale.

- analgezic: acidul salicilic împiedică transmiterea durerii în nociceptori, inhibă enzima COX (prin acest proces se inhibă producția de prostaglandine generatoare de durere).

Există și alți compuși care contribuie la efectul analgezic global. Aceștia pot fi: naringenina, catechinele și eriodictiolul care acționează prin inhibarea lipooxygenazei, hialuronidazei și prin eliminarea radicalilor liberi

- antipiretic: reduce febra prin scăderea sintezei de prostaglandine

Salicina administrată oral la șobolani în doza de 5mmol/kg greutate corporală reduce semnificativ febra indusă de drojdie, producând o temperatură normală și prevenind febra când este administrată concomitent cu drojdia. Totuși, salicina nu scade temperatura șobolanilor afebrili, pe de altă parte, atât salicilatul de sodiu, cât și saligerina scad semnificativ temperatura corporală la șobolanii afebrili

Lichenul de piatră

Cetraria islandica (Parmeliaceae), lichen întâlnit în zona alpină și subalpină pe stâncile și platourile înalte expuse vânturilor. Tal fruticos (tufă mică), creșt, înalt până la 12 cm, cu lobii divizați în două, plani, răsușiți sau aproape tubulari, tiviți pe margine cu cili groși și rigizi. Fața superioară lucioasă, verde cenușie, până la brun neagră. Fața inferioară mai deschisă la culoare. Roșiatic la locul unde se prinde de substrat. Apotecii marginale, lucioase, discoidale, cu diametrul de 2-8cm.

Partea utilizată - Lichen Islandicus.

Lichenul de piatră, cunoscut și sub denumirea de mușchi de Islanda are o rezistență extraordinară la condițiile climatice foarte aspre în care crește, aspect corelat cu capacitatea sa de a se apăra împotriva diferiților agenți patogeni. Are în compoziția sa polizaharide cu efect imunostimulator. Datorită cantității mari de mucilagiu conținute, care formează pe suprafața mucoaselor un strat protector, lichenul de piatră este foarte util pentru a calma iritațiile membranelor mucoase ale tractului respirator, ajutând la înlăturarea disconfortului de la nivelul lor.

Compoziție chimică:

- 50% polizaharide: lichenina 40%, amidon de licheni, izolichenina, galactomanan;

- acizi lichenici: acid usnic, fumaroprocetraric, procetraric, cetraric, protolichesterinic;

- ulei volatil, iod, enzime, vitamine A, B1, B12;

- minerale: plumb, cadmiu, mercur, arsen, calciu, magneziu, fier;
- hidrocarburi: 1, 8-heptadecadiene;
- alți carbohidrați compuși din celuloză și 3 hemiceluloze, care după hidroliză formează: manoza, galactoza și acid glucuronic;
- acizi grași: ac linoleic, oleic, linolenic;
- fosfolipide, steroli, carotenoide;
- mucilagii.

Acțiuni:

- antibiotic bacteriostatic pe bacteriile Gram pozitive anaerobe, tuberculostatic datorită prezenței acizilor lichenici;

In vitro, a fost testată activitatea antimicrobiană a extractului apos de lichen de piatră împotriva bacteriei *Sarcina lutea* (*Micrococcus luteus*) folosind 5 probe. Acțiunea inhibitoare a 1 ml extract apos 10% este comparabilă cu a 0.07 până la 0.85 UI de penicilina. S-a afirmat că activitatea extractului depinde de cantitatea acidului fumaroprotocetraric prezent.

Extractul etanolic a lichenului de piatră (15g/150ml) a fost studiat pentru activitatea împotriva *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* var. *mycoide*, *B. sphaericus*, *B. thurigiensis*, *B. megaterium*, *Mycobacterium smegmatis*, *Salmonella thyphimurium*, *Candida utilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum*, *Botrytis cineriae*, *Fusarium oxysporium*, *Streptomyces murinus* și *Nocardia corne*. S-a descoperit că lichenul de piatră este bacteriostatic pe bacteriile Gram pozitive

Acidul protolichesterinic are acțiune antibacteriană pe *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *M. aurum*, *M. tuberculosis* (CMI= 250 $\mu\text{g/ml}$), *H. pylori* (CMI₉₀= 32 $\mu\text{g/ml}$, când 90% din tulpini sunt inhibitate)

Au fost analizați câțiva compuși prezenți în diferite specii de licheni pentru activitatea in vitro împotriva *Mycobacterium aurum*, un organism non-patogenic cu o sensibilitate asemănătoare *M. tuberculosis*. Dintre compușii testați, acidul usnic din *Cladonia arbuscula* a prezentat activitatea cea mai crescută cu o valoare a CMI de 32 $\mu\text{g/ml}$. Atranorin și acidul lobaric, izolați din *Stereocaulon alpinum*, acidul salazinic din *Parmelia saxatilis* și acidul protolichesterinic din *Cetraria islandica*, toți au demonstrat activitate antimicobacteriană la valori ale CMI $\geq 125 \mu\text{g/ml}$

- antiinflamator (ac usnic) ~ ibuprofenul

S-a demonstrat că acidul lichesterinic, in vitro, inhibă enzima 5-lipooxigenaza (5-LO= catalizator în biosinteza leucotrienelor, care sunt bronhoconstrictoare implicate în procesele inflamatorii) din leucocitele porcine, la CI₅₀= 20 μM ; în plus, acidul lichesterinic inhibă biosinteza LT B₄ de la nivelul leucocitelor polimorfonucleare, cu CI₅₀= 9 μM

- antiviral in vitro: lichenina posedă activitate antivirală pe virusul mozaicului

tutunului prin inhibarea replicării virusului, iar acidul protolichesterinic este un inhibitor al activității ADN-polimerazei a HIV-1 la $CI_{50} = 24 \mu M$ (2)

- imunostimulator datorită fracțiunilor polizaharidice: in vitro extractul liofilizat stimulează fagocitoza granulocitelor până la 92.6% la o concentrație de 100 $\mu g/ml$

- expectorant, demulcent: datorită conținutului în mucilagii

- antiprotozoaric: s-au izolat 4 compuși din lichenul de piatră: acidul protolichesterinic, lichesterinic, protocetraric și fumaroprotocetraric, aceștia au fost evaluați pentru activitatea antiprotozoarică pe *Trypanosoma brucei*. Acidul protolichesterinic ($CMI = 6.30 \mu M$) și lichesterinic ($CMI = 12.5 \mu M$) au cea mai ridicată activitate pe acest tip de protozoar, având afinitate pe riboflavin-kinaza, sterol-14 α -demetilaza și glutation-sintetaza.

Muguri de plop

Populus nigra (fam. Salicaceae) este un arbore foarte înalt, de 30-35 m, cu ritidom gros, negricios, brăzdat longitudinal; tulpina este dreaptă, cu coroana largă, rară, neregulată; muguri ascuțiți, curbați la vârf, de 2-3 cm, brun-gălbui, cleioși și cu miros balsamic. Frunzele deltoide-triunghiulare, cu vârful ascuțit, marginea serată, glabre. Florile unisexuate sunt dispuse în amenturi. Mugurii de plop, se recoltează în februarie-martie, cu ocazia tăierii arborilor.

Mugurii de plop sunt numiți și propolis vegetal. Prin analize chimice de specialitate s-a arătat că există 5 substanțe prezente în același timp în propolis ca și în mugurii de plop dintre care 3 au proprietăți de reducere a numărului microorganismelor potențial patogene. Mugurii de plop mai conțin și derivați ai saligenolului care îi conferă proprietăți sudorifice, de reducere a temperaturii corpului.

Compoziție chimică:

- glicozide ale salicinei;
- rezine, saponozide;
- derivați flavonici: crizol, tetocrizol, apigenol;
- flavonoli: galangina, izalpinina, cvercitol, kempferol;
- flavonone: pinocembrina, pinostrobina;
- compuși polifenolcarboxilici: acid cafeic, izofeluric, dimetilcafeic, p-hidroxi-acetofenona, vanilină;
- acizi grași, alcooli alifatici, sescviterpene (bisabolol), uleiuri volatile, tanin.

Au fost izolate și analizate componentele volatile ai mugurilor proaspeți și uscați de plop negru folosind GC/MS. 48 de compuși volatili au fost identificați: alcooli sescviterpenici (α -, β - eudesmol) reprezentând 26.3-28.7% din uleiul volatil, alți compuși sescviterpenici (γ -selinen 7.6-8.8%, δ -cadinen 7.8-8.6%, α -elemen 3.3-5.2% și γ -cadinen 3.9-4.2%), hemiterpene 2.2-7.6%, monoterpene 1.6-5.7%, alcooli alifatici și aromatici, acizi alifatici.

Catecholul este un component din extractul mugurilor de plop, folosit ca marker la identificarea propolisului falsificat.

S-a realizat o analiză cantitativă a fenolilor totali, flavonoidelor și taninurilor din extractul etanolic de plop negru folosind următoarele standarde: catechina, cvercetina și acidul tanic. S-au determinat 51.78 ± 4.56 mg catechină Eq/g de extract, 13.67 ± 0.34 mg cvercetină Eq/g de extract și 228.72 ± 6.90 mg acid tanic Eq/g de extract.

Acțiuni:

Salicina este un pro-medicament care se metabolizează la saligenină la nivelul tractului gastro-intestinal și apoi la acidul salicilic după absorbție, generând un efect antiinflamator, analgezic și antipiretic;

- antiinflamatoare dată de uleiurile volatile;

Într-un studiu, au fost incluși șoareci la care s-au injectat 1ml caragenan (1%) în lăbuța dreaptă posterioară, apoi au fost împărțiți în 3 grupuri, fiecare grup primind: I- soluție sterilă izotonică NaCl 10ml/kg, II- extract din mugurii de plop negru 200mg/kg, III- diclofenac sodic 50mg/kg, ca și medicament de referință. Extractul și diclofenacul au fost administrate cu 1 oră înainte de caragenan. La grupul I a apărut un edem la 1 oră după administrarea caragenanului și a fost observat timp de 6 ore. Extractul și diclofenacul au cauzat o scădere a edemului lăbuței cu aproximativ 50% după 3 ore de tratament și 62% după 5 ore de tratament. Activitatea antiinflamatoare a extractului este atribuită cvercetinei, acizilor fenolici și pinocembrinei, mecanismul de acțiuni fiind asemănător diclofenacului, adică acționează prin inhibarea sintezei de prostaglandine

- expectorant- datorită prezenței uleiurilor volatile;

- analgezică, antipiretică date de derivații saligenolului care acționează prin inhibarea sintezei de prostaglandine;

- antibacteriană dată de fracțiunea lipofilă și acidul cafeic;

- antifungică dată de fracțiunea lipofilă

Pinocembrina este folosită, de secole, pentru tratarea infecțiilor microbiene. Cecetătorii au descoperit efectul antibacterian al pinocembrinei pe trei tipuri de bacterii Gram-negative (*E. coli*, *P. aeruginosa*, și *K. pneumoniae*) și trei bacterii Gram- pozitive (*B. subtilis*, *S. aureus* și *S. lentus*) măsurând concentrația minimă inhibitoare a extractului în DMSO (mg de extract/ml). S-a demonstrat efectul antiinflamator al pinocembrinei împotriva edemului indus la șoareci la nivelul lăbuței. Acest efect se manifestă prin down-reglarea TNF- α , IL-1 β și IL-6. S-a demonstrat *in vivo* și *in vitro* proprietatea farmacologică antimicrobiană asupra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Streptococcus mutans* și *Neisseria gonorrhoeae*. Pinocembrina are un efect antifungic, activ pe *Penicillium italicum* și *Candida albicans* la o concentrație minimă inhibitoare de 100 μ g/ml.

5. Cuișoare

Eugenia caryophyllata (fam. Myrtaceae) este originar din Indonezia și Malayezia și cultivat în Asia de sud-est. Are frunze opuse, coriacee și cu florile

grupate în cime corimbiforme.

Cuișoarele, originare din Indonezia, își trag denumirea de la forma mugurilor florali care se aseamănă cu niște cuie mici. Sunt utilizate în special pentru conținutul în ulei esențial care are proprietăți de reducere a numărului microorganismelor potențial patogene.

Compoziție chimică:

- ulei volatil (15-20%): eugenol (80-90%), acetat de eugenil (2-27%), metilsalicilat, metileugenol, benzaldehida, n-amil-metil cetona, carvacrol, timol, cinamaldehydă, furfural, vanilină, trans- α -bergamoten, alloaromadendren, selinen, cadinen, hidrocarburi sescviterpenice (3.2-4.8% β -cariofilen, α -humulen, α -amorfen, α -muurolen, calamenen, calacoren), α -, β - pinen, limonen, α -copen, α -cubeben, farnesol, esteri (hexanoat de etil, acetati de 2-heptanil, 2-nonanil, stiralil, benzil, terpenil, etilfenil), alți fenoli (izoeugenol, cavicol, 4-alilfenol), oxizi (cariofilen-oxid, humulen-epoxid);

- 10-12 % tanin: elagitanin;

- rezine, lipide, mucilagii;

- derivați 2-metil-benzopironici: eugenină, eugenitină, izoeugenitină, izoeugenitol, angustifolionol - eugenonă;

- flavonoide: derivați de cvercetină, kempferol, astragalină, izocvercetină, hiperozidă, ramnetin;

-acizi fenol-carboxilici: acid galic, protocatehic, elagic, cafeoilchinic, feruloilchinic, cumaroilchinic, ferulic, p-hidroxi-benzoic, cafeic, salicilic, siringic, vanilic, gentisic, p-cumaric;

- zaharuri: glucoză, xiloză, arabinoză;

- steroli (β -sitosterol, stigmasterol, campesterol) și glicozide steroidice, vitamine;

- triterpene (acid oleanolic 1%), acid crategolic (acid măslinic);

- aldehide (benzaldehydă, m-metoxibenzaldehydă), alcooli (alcool benzilic), hidrocarburi (naftalen).

Acțiuni:

- antibacterian cu spectru larg pe bacterii Gram-negative și Gram-pozitive (efect comparabil cu 500 μ g/ml neomicină), incluzând tulpinile multirezistente. Studiile pe animale au arătat o scădere a colonizării bacteriene la șoarecii cu pneumonie indusă, după administrarea uleiului de cuișoare timp de 15 zile. Studiile in vitro au demonstrat acțiunea antibacteriană a uleiului de cuișoare împotriva bacteriilor anaerobe responsabile de producerea acneei.

Actionează împotriva *S. aureus* rezistent la peniciline, inhibă creșterea patogenilor asociați cariilor dentare și bolilor parodontale. Uleiul de cuișoare a fost cel mai activ asupra *Branhamella catarrhalis*, cu o concentrație minimă inhibitoare de 0.025 mg/ml. Acțiunea a fost demonstrată și împotriva *S. aureus*, *Sarcina lutea*,

Bacillus subtilis, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Bordetella bronchiseptica, Clostridium perfringens și Moraxella glucidolytica, Yersinia enterocolitica.

Cercetătorii au descoperit acțiunea antibacteriană a uleiului de cuișoare și asupra: Bacillus cereus, Salmonella typhi, Pseudomonas aeruginosa, Helicobacter pylori, S. epidermidis, Streptococcus pneumoniae, S. Pyogenes, Listeria monocytogenes, Proteus vulgaris. Asocierea eugenolului cu vancomicina sau antibioticele β -lactamice a dus la potențarea efectului antibacterian, explicat prin faptul că eugenolul este capabil să distrugă membrana bacteriilor Gram-negative. La o concentrație de 1mM distruge 50% din membrana bacteriană, permițând astfel penetrarea vancomicinei și antibioticelor β -lactamice în bacterie și crescând efectul antibacterian.

Activitatea antibacteriană a eugenolului poate fi datorată interacțiunii eugenolului cu membrana celulelor bacteriene, membrana este distrusă și macromoleculele membranare sunt deformat.

- antiviral, activ pe virusul herpes simplex, hepatitei C, eugenina este responsabilă de acest efect și are ca mecanism de acțiune, inhibarea ADN-polimerazei, cu scăderea sintezei de proteine.

Replicarea acestor virusuri a fost inhibată la CI50= 25.6 μ g/ml pentru HSV1 și CI50= 16.2 μ g/ml pentru HSV2. Investigațiile au arătat că asocierea eugenolului cu aciclovir au dus la un efect sinergic.

- antifungic, activ pe speciile de Candida, Aspergillus, Trichophyton, M. canis. Uleiul esențial de cuișoare inhibă acumularea aflatoxinei B1 din Aspergillus, reduce cantitatea de ergosterol, un component specific membranei celulare fungice. Este activ, inclusiv pe tulpinile rezistente la fluconazol și are o acțiune similară nistatinei.

Uleiul de cuișoare are acțiune antifungică și pe Microsporum gypseum, Penicillium, Fusarium, Alternaria alternata, A. ochraceus, F. graminearum, F. moniliforme, Penicillium citrinum, P. viridicatum, Trichophyton rubrum, T. mentagrophytes, C. tropicalis, C. krusei, Saprolegnia spp., A. klebsiana și A. piscicida.

- antiplasmodică - 21 de compuși ai uleiului esențial au fost testați pentru activitatea antimalarică asupra tulpinilor de Plasmodium falciparum rezistente la clorochină. Printre acești compuși se află eugenolul cu CI50= 753 μ M, care este mai mică față de alți constituenți, cum sunt: nerolidol, acetat de linalil, α -pinen.

- antiparazitar, pesticid- uleiul de cuișoare inactivează, *in vitro*, Trichomonas vaginalis, Trypanosoma cruzi, Meloidogyne incognita dependent de doză, Cacopsylla chinensis (eugenol, cariofilen), Cimex lectularius L.

A fost evaluată activitatea *in vivo* și *in vitro* acaricidă a uleiului esențial de cuișoare asupra parazitului Psoroptes cuniculi. *In vitro*, diferite concentrații ale uleiului au fost testate și a fost observată rata de mortalitate a acarienilor la grupul tratat cu cuișoare față de grupul control. *In vivo*, 6 iepuri infectați cu P. cuniculi au fost tratați

topic cu ulei esențial diluat la 2.5% și comparați cu iepurii netratați. S-a observat un procent ridicat de mortalitate a acarienilor, iar tratamentul cu ulei de cuișoare a vindecat toți iepurii infectați, cei netratați au rămas infectați.

- repelent: uleiul de cuișoare, în concentrație de 5% are activitate repelentă 100% împotriva larvei *Leptotrombidium imphalum*

- antispastic: *in vitro*, uleiul de cuișoare antagonizează spasmele mușchilor traheei provocate cu carbacol, la porcușorul de Guineea și contracțiile musculare ale ileonului provocate electric. CE50 = 3.8 mg/ml a uleiului la nivelul traheei și CE50 = 6.8 mg/ml la nivelul ileonului

- analgezic: eugenolul poate acționa prin activarea canalelor ionice de calciu și clor la șoareci și prin interacțiunea cu receptorii capsaicinei. Concentrația de eugenol folosită a fost între 0.125-1mmol/l.

Acest efect a fost testat prin supunerea șoarecilor la testul plăcii încălzite la 55 gr. C pentru 25 sec. Uleiul de cuișoare s-a administrat i.p unui grup, morfina s-a administrat s.c. altui grup, iar grupul control a primit soluție salină. Analgezia produsă de uleiul de cuișoare s-a caracterizat printr-o creștere a latentei pe placa încălzită cu până la 6.2 sec (analgezie 82.3%), iar morfina a dus de asemenea la o creștere a timpului pe placă încălzită cu 13.3 sec.

- anestezic local: studiile clinice au arătat că gelul cu ulei de cuișoare (2:3 vol/vol cu glicerină) are acțiune asemănătoare cu a gelului de benzocaină, efect demonstrat prin inducerea durerii la nivelul mucoasei bucale.

Din literatura de brevete sunt cunoscute o serie de produse:

Brevetul RO115845 (B) - Compoziție medicamentoasă antitusivă - se referă la o compoziție ce cuprinde 1 ... 1,5 părți *Oleum Menthae piperitae*, 2 ... 3 părți *Oleum Abietinae*, 1,5 ... 2 părți *Oleum Pini*, 1,0 părți *Oleum Foeniculi*, 1 ... 1,5 părți *Oleum Juniperi*, 1,2 ... 1,5 părți *Oleum Thymi*, 10 ... 12 părți *Tinctura Cetrariae*, 8 ... 10 părți *Tinctură Lobariae*, 15 ... 18 părți *Tinctura Thymi*, 13 ... 15 părți *Tinctură gemmae Populi*, 15 ... 18 părți *Tinctură Silybi Mariani*, 7 ... 9 părți *Tinctură Origani*, iar restul până la 100 părți *Tinctură Equiseti*, părțile fiind exprimate în greutate.

Brevetul RO126280 - Produs fitoterapeutic cu efect anti-inflamator și procedeu de realizare a acestuia - prezintă produsul format din 5 părți în greutate fracție selectivă extrasă din părțile aeriene ale *Rosmarinus officinalis* și 2 părți în greutate fracție selectivă extrasă din *Populi gemmae*, conținând 5,53 ... 6,75% flavone exprimate în rutozid și 10,91 ... 13,33% polifenoli exprimați în acid galic, iar procedeu constă în dizolvarea a 2 părți fracție selectivă extrasă din *Populi gemmae* în alcool etilic 50%, într-un raport de 1/10 (m / v), apoi amestecarea 5 părți fracție selectivă de *Rosmarinus officinalis* și omogenizarea amestecului pentru 30 min, cu agitare,

solventul fiind eliminat la presiune redusă și la o temperatură de maximum 50 gr. C, rezultând în final, produsul care conține amestecul celor două fracții selective sub formă de pudră de culoare brună.

Brevetul DE202004016077 (U1) - Prezintă o compoziție farmaceutică sub formă de dozare solidă, de preferință pentru tratamentul local al bolilor inflamatorii ale gurii și gâtului, care cuprinde o combinație de lichen islandicus (mușchi islandez) și/sau extract cu cel puțin un anestezic local având efect antiinflamator, analgezic, antianginal, virucid.

Problema tehnică pe care urmărește să o rezolve invenția constă în obținerea unui supliment alimentar cu acțiune de eliminare a microorganismelor potențial patogene din tractul respirator, digestiv și genito-urinar.

Soluția tehnică la această problemă constă în aceea că se asociază într-o compoziție de supliment alimentar frunze de măslin (Olive Folium), lichen de piatră (Lichen Islandicus), muguri de plop (Populi Gemmae), extract de scoarță de salcie (Salicis cortex) și cuișoare (Caryophylli floris), realizat sub formă de capsule gelatinoase.

Suplimentul alimentar conform invenției constă în aceea că se amestecă 40% frunze de măslin (Olive Folium), 20% lichen de piatră (Lichen Islandicus), 20% muguri de plop (Populi Gemmae), 10% extract de scoarță de salcie (Salicis cortex) standardizat în min. 15% salicină și cu 10% cuișoare (Caryophylli floris), procentele fiind exprimate în greutate.

Suplimentul alimentar conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- suplimentul alimentar susține apărarea organismului împotriva microorganismelor potențial patogene din tractul respirator, digestiv, genito-urinar;
- sudorific, susține reglarea temperaturii corporale;
- calmează iritațiile mucoaselor tractului respirator superior, ale tubului digestiv și ale tractului urinar;
- contribuie la fluidificarea și eliminarea secrețiilor mucoaselor tractului respirator;
- este un produs absolut natural, bine tolerat, fără efecte negative;
- constituie o alternativă viabilă la tratamentele cu antibiotice clasice pentru infecțiile respiratorii care nu mai răspund la antibioterapie sau pentru pacienții cu intoleranțe la acestea;
- produsul poate fi o alternativă naturală pentru persoanele care prezintă rezistență, intoleranță sau reacții alergice la antibioterapie;

- produsul poate fi considerat eficient la persoanele care prezintă patologie respiratorie, atât ușoară cât și severă (pacienții cu patologie bronhopulmonară cronică).

Se dă în continuare un exemplu de realizare a suplimentului alimentar conform invenției în legatură și cu fig. 1-3 care reprezintă:

Fig. 1 - Repartiția procentuală a patologiei în lot

Fig. 2 - Evoluția simptomelor în lot, exprimate procentual

Fig. 3 - Evoluția simptomelor la pacienții cu patologie bronhopulmonară cronică, exprimate procentual.

Suplimentul alimentar conform invenției, sub formă de capsule moi, este realizat astfel :

Într-o primă fază fiecare materie primă recepționată este supusă unui set de analize de laborator specific, conform specificațiilor tehnice de calitate întocmite pe baza literaturii de specialitate și legislației în vigoare.

Umiditatea plantelor fiind foarte importantă este monitorizată pe tot parcursul fluxului de fabricație; aceasta trebuie să se încadreze în limitele maxime stabilite în specificațiile fiecărei materii prime. Limitele de umiditate stabilite sunt de max. 13% pentru plante și max. 5% pentru extractul de scoarță de salcie.

După primirea avizului favorabil din partea Departamentului Controlul calității materiilor prime, acestea sunt depozitate în condiții de mediu controlat, temperatura 0 gr. C - 30 gr. C și umiditate relativă a aerului de maxim 75% până în momentul intrării în procesul de producție.

În activitatea de procesare, plantele din compoziția capsulelor moi sunt supuse operației de condiționare manuală, etapă în care sunt sitate și selectate în scopul îndepărtării corpurilor străine organice și minerale. După condiționare, plantele sunt mărunțite printr-o tehnologie specifică.

Frunzele de măslin, lichenul de piatră și mugurii de plop sunt tocați pe moară cu ciocane pe sită Ø 3 apoi pe moară cu ciocănele până la obținerea unei granulații de Ø 0,125.

Fructele de cuișoare sunt tocate pe moară cu ciocane pe sită Ø 3 apoi sunt date pe selector pe sitele Ø 1,25 și Ø 0,125; partea care rămâne pe sita superioară se retoacă până la obținerea unei granulații de Ø 0,125.

La finalul procesării sunt prelevate probe de către Controlul calității pentru verificarea caracteristicilor fizico-chimice prevăzute în standardul intern de calitate.

Pe baza formulei de fabricație, materiile prime sunt cântărite și intră în procesul de producție. Astfel se amestecă 1400 g frunze de maslin (*Olivae folium*) cu câte 700 g lichen de piatră (*Lichen Islandicus*) și muguri de plop (*Populi gemmae*), cu 350 g

cuisoare (Caryophylli flos) peste care se adauga 350g extract de scoarta de salcie (Salicis cortex) standardizat în min. 15% salicină.

Extractul de scoarță de salcie se adaugă peste plantele tocate, se omogenizează în omogenizatorul tip Cardinal, obținând astfel semifabricatul. După operația de omogenizare se prelevează probe din semifabricat, se analizează conform standardului de firmă iar acesta rămâne în carantină până la avizul favorabil primit din partea Controlului calității.

Operația de încapsulare se realizează folosind capsule gelatinoase achiziționate gata formate și mașina de încapsulat. Se alimentează mașina cu semifabricat și capsule, se setează gramajul dorit și se realizează încapsularea într-un proces semiautomat.

După încapsulare, capsulele sunt verificate de către Controlul calității și sunt introduse în mașina de curățat care îndepărtează pulberea de semifabricat rămasă pe exteriorul capsulelor în urma procesului de încapsulare. Capsulele astfel obținute sunt numărate și introduse în flacoane.

Ultima etapă a fluxului tehnologic cuprinde ambalarea secundară, adică etichetarea flacoanelor și introducerea acestora în cutii.

S-a realizat o evaluare multicentrică pentru evidențierea eficienței terapeutice în infecțiile respiratorii a suplimentului alimentar sub formă de capsule obținut conform invenției.

Material și metodă

Au fost incluse în studiu 58 de persoane cu vârste între 6-14 ani (21,31%), între 15-18 ani (9,83%) și adulți (68,85%), care au prezentat patologie respiratorie în următoarele proporții:

Patologia respiratorie	Nr. pacienți	procent
IACRS	24	40,00%
Rino-traheo-bronșită	13	22,00%
Bronșită cronică	4	6,70%
Supurație bronhopulmonară acutizată	5	8,00%
Bronsiectazii post TBC pulmonar	4	6,70%
BPOC supurat grd.C	4	6,70%

Sindrom bronșic spastic	2	3,30%
Sinuzită fronto-maxilară	2	3,30%
Pneumonie virală	1	1,70%
Status post-pneumonie	1	1,70%

Repartiția procentuală a patologiei în lot este prezentată în fig. 1

Persoanele au fost examinate de medicii de familie/ respectiv de medicii specialiști pneumoftiziologi care pe baza anamnezei, examenului clinic și paraclinic (unde a fost necesar), au stabilit diagnosticul și au inițiat administrarea capsulelor cu suplimentul alimentar, în doze corespunzătoare vârstei: copii: 1 capsulă de 2 ori pe zi, adulți: 1 capsula de 3 ori pe zi. S-a administrat timp de 10-22 de zile, în funcție de diagnostic, conform recomandării medicului.

Au fost monitorizate simptomele specifice aferente infecțiilor respiratorii: starea generală, starea febrilă/ frisoane, disfagie, disfonie, tuse, cu notarea acestora la începutul tratamentului (Vizita 1 - inițial) și cu evaluarea lor în perioada de mijloc a tratamentului (Vizita 2 - intermediară) și la sfârșitul tratamentului (Vizita 3 - final).

Rezultate

La persoanele care au prezentat patologie respiratorie, după administrarea produsului, simptomele precum febra, disfagia și disfonia s-au remis complet (100%), starea generală influențată s-a remis la 98,14% dintre pacienți, iar tusea la 84,21% dintre aceștia (fig. 2).

Tratamentul fitoterapeutic a fost suficient pentru ameliorarea/dispariția simptomelor clinice la 96,72% dintre pacienți, la 2 pacienți (3,27%) a fost necesară asocierea unui produs alopatic (antibiotic cu spectru larg) datorită polipatologiei respiratorii cronice severe.

Produsul a fost bine tolerat la toți pacienții.

Luând separat persoanele cu patologie bronhopulmonară cronică (patologie respiratorie complexă - 8 pacienți) și urmând tratamentul cu suplimentul alimentar capsule, s-a constatat, urmărind simptomele de bază ale patologiei, ameliorarea tusei (87,5% din cazuri) și acțiune favorabilă asupra expectorației mucopurulente/purulente, care a devenit absentă la 75% din cazuri și asupra hemoptiziei care s-a ameliorat la toți pacienții (fig.3).

Concluzie

Formula inovativă a suplimentului alimentar alcătuită din 5 plante medicinale - frunze de măslin (*Olivae folium*), lichen de piatră (*Lichen Islandicus*), muguri de plop (*Populi gemmae*), extract din scoarță de salcie (*Salicis cortex*) standardizat în min.

15% salicină și cuișoare (*Caryophyllorum flos*) - poate fi considerată eficientă la persoanele care prezintă patologie respiratorie, atât ușoară cât și severă (pacienții cu patologie bronhopulmonară cronică), constituind o alternativă viabilă la tratamentele antibiotice clasice pentru infecțiile respiratorii, care nu mai răspund la antibioterapie sau pentru pacienții cu intoleranțe la acestea.

REVENDICĂRI

1- Supliment alimentar sub formă de capsule gelatinoase caracterizat prin aceea că se amestecă 40% frunze de măslin (Olive Folium), 20% lichen de piatră (Lichen Islandicus), 20% muguri de plop (Populi Gemmae), 10% extract de scoarță de salcie (Salicis cortex) standardizat în min. 15% salicină și cu 10% cuișoare (Caryophylli floris), procente fiind exprimate în greutate.

2 - Supliment alimentar sub formă de capsule gelatinoase conform revendicării 1 caracterizat prin aceea că are acțiune de eliminare a microorganismelor potențial patogene din tractul respirator, digestiv și genito-urinar.



Fig. 1

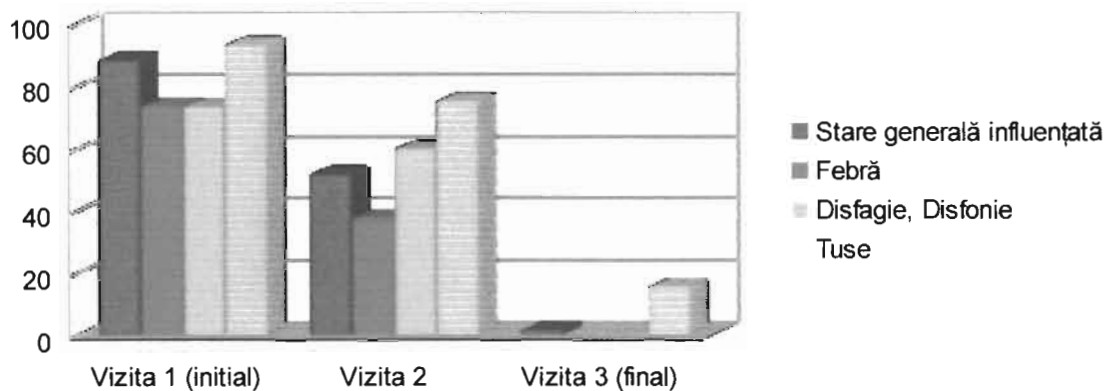


Fig. 2

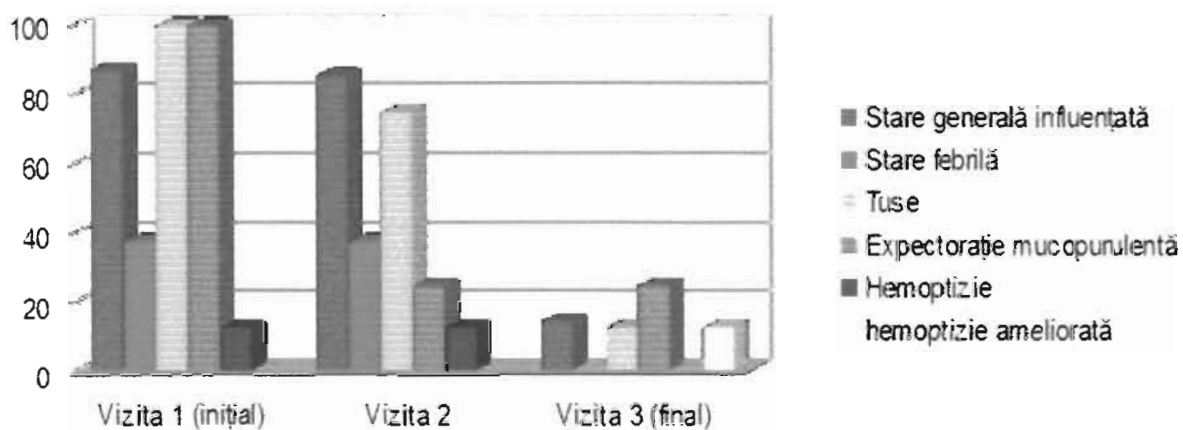


Fig. 3