



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 00211**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/05/2022** BOPI nr. **5/2022**

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

(73) Titular:
• **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

(56) Documente din stadiul tehnicii:
KR 100785074 B1; FR 2925856 A1

(54) **SUPLIMENT ALIMENTAR**

Examinator: dr. chimist CONSTANTINESCU ADELA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 132847 B1

RO 132847 B1

1 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*
3 *Gemmae*), extract de scoarță de salcie (*Salicis cortex*) și cuișoare (*Caryophylli flos*), realizat
sub formă de capsule.

5 Frunzele de măslin sunt confirmate științific prin numeroase studii ca având efect de
reducere a numărului microorganismelor potențial patogene. Studiile efectuate au arătat că
7 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 imunita-
9 tea prin stimularea directă a producției de fagocite.

Compoziție chimică:

11 - secoiridoide: oleuropeina, ligstrozida, oleurozida, hidroxitirozol, acid elenolic,
glicozide ale oleuricinei A, B, oleaceina (3,4-DHPEA-EDA);

13 - derivați triterpenici: acid oleanolic, acid maslinic, β -amirin, eritrodiol, acid betulinic,
uvaol, acid ursolic;

15 - calcone: olivina, heterozide ale olivinei;

17 - derivați flavonici: rutozida, heterozide ale apigenolului, luteolului, kemferolului,
crisoeriolului, rutina, diosmetina;

- acizi fenolici: acid cumaric, cafeic, ferulic, vanilic;

19 - cumarine: esculetina, scopoletina, esculina;

- fitosteroli;

21 - derivați lignanici;

- alcaloizi: cinchonina, cinchonidina;

23 - hidrocarburi, esteri, ceruri, trigliceride, tocoferoli, esteroli.

Acțiuni:

25 - antibacteriană: extractul apos din frunzele de măslin are efect bactericid împotriva
Pseudomonas aeruginosa, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*
27 și efect bacteriostatic împotriva *Bacillus subtilis*, datorită prezenței oleuropeinelor, care au
capacitatea de a pătrunde prin învelișul lipoproteic al germenilor, inhibând replicarea ARN-
29 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.

31 De asemenea, extractul din frunzele de măslin este un agent antibacterian și pe
Salmonella typhi, *Vibrio paraemoliticus* și *Streptococcus* (activ inclusiv pe tulpinile rezistente
33 la peniciline). Activitatea împotriva *Mycobacterium tuberculosis* a extractului etanolic de
măslin 95% a fost evaluată folosind ca mediu de cultură bulionul.

35 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. Concen-
37 trația 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
39 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
41 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
43 și s-a evaluat activitatea antimicrobiană *in vitro* împotriva bacteriilor Gram-pozitive și Gram-
negative și fungilor. Agenții testați cauzatori de infecții respiratorii și intestinale sunt Gram-
45 pozitivi: *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*; Gram-negativi: *P. aeruginosa*, *E. coli*,
Klebsiella pneumoniae; fungi: *Candida albicans* și *Cryptococcus neoformans*. Analiza HPLC
47 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.

RO 132847 B1

Aceștia au acțiune antibacteriană și antifungică pe tulpinile testate și prezintă valori ale IC25 < 1 mg/ml.	1
S-a testat activitatea antibacteriană a câtorva plante (năsturel, portocal, portocal amar, fenicul, creosot, bananier pitic asiatic și măslin) asupra tulpinilor de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 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 <i>M. tuberculosis</i> rezistente la medicamente, măslinul este cel mai activ pe tulpinile rezistente la izoniazida (tuberculostatic de primă intenție) la CMI = 25 μg/ml. Aceste rezultate puntează importanța extractelor vegetale față de tulpinile de <i>M. tuberculosis</i> rezistente la tuberculostaticele medicamentoase.	3 5 7 9
Într-un alt studiu s-a evidențiat activitatea antibacteriană a aldehidelor alifatică din extractul de măslin pe <i>S. aureus</i> (meticilino-sensibil și meticilino-rezistent), <i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. typhi</i> , <i>B. cereus</i> și <i>L. monocytogenes</i> . Acțiunea aldehidelor este datorată alterării funcției proteinelor din membrana bacteriilor, acționând cu grupările nucleofile sulfhidril, amino și hidroxil, aldehidele fiind molecule electronegative datorită atomului de oxigen aldehydic.	11 13 15
Oleuropeina prezintă acțiune antibacteriană și pe <i>Mycoplasma</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>H. Pilory</i> => reglarea florei gastro-intestinale, prin reducerea nivelelor <i>H. pilory</i> și <i>C. jejuni</i> . 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).	17 19 21
- antivirală: studiile <i>in vitro</i> și pe animalele de experiență au sugerat că extractul din frunzele de măslin prezintă acțiune antivirală pe virusul HIV-1.	23
Oleuropeina a fost brevetată în Statele Unite ale Americii pentru acțiunea antivirală împotriva bolilor virale, incluzând: herpesul (acțiune antivirală pe HSV-1 la concentrații > 1 mg/ml a extractului din frunze de măslin), mononucleoza și hepatita.	25
Mecanismul se bazează pe următoarele:	27
- proprietatea de a interfera cu producerea de aminoacizi esențiali pentru virusuri;	
- proprietatea de a penetra direct celulele infectate și de a opri replicarea virală;	29
- în cazul retrovirusurilor, se neutralizează producția de revers-transcriptază și proteaza stimularea fagocitozei.	31
Studiile <i>in vivo</i> 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: herptic, Epstein-Barr, hepatic, rotavirus, rinovirus bovin, parvovirus canin și virusul leucemiei feline.	33 35
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) < 300 μg/ml. Aceste rezultate demonstrează că extractele din aceste plante pot fi utilizate în tratamentul diareei produse de infecția cu rotavirus.	37 39
Studiile au arătat, de asemenea că oleuropeina prezintă acțiune antivirală pe virusul respirator sincitial și virusul para-influenzae tip 3.	41
- antifungică: activă pe <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Trichophyton</i> , <i>Microsporium</i> ; acțiune datorată inhibării elastazei, un factor virulent esențial pentru colonizarea dermatofitelor;	43 45
- vermifugă: s-a demonstrat că acidul măslinie este un coccidiostatic natural împotriva protozoarului parazit intracelular, <i>Eimeria tenella</i> . Acțiunea acidului măslinie la animalele infectate a fost comparată cu cea a salinomicinei sodice, evaluând greutatea corporală a	47

RO 132847 B1

1 puilor infectați. Numărul de leziuni a scăzut și a crescut greutatea corporală la grupul tratat
cu acid măslinie față de grupul control. Rezultatele histopatologice ale cecumului la 120 ore
3 post-infecție au arătat că rata infecției a scăzut semnificativ la puii tratați cu acid măslinie.

Salcia

5 *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 des-
7 prinde ușor de pe ramuri. Frunzele sunt lanceolate, lungi de 4-10 cm; florile sunt unisexuate,
în amentii și se formează o dată cu frunzele. Mugurii sunt alungit-ovoizi, alipiți de ramuri. Este
9 o plantă de lunci și zăvoaie, cu cerințe mari față de umiditate.

11 Partea utilizată: extract din scoarță - *Salicis cortex*, care conține minimum 15%
salicină.

13 Scoarța de salcie s-a dovedit a fi o veritabilă sursă naturală de precursori ai acidului
acetil 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
15 de reducere a temperaturii corpului prin mecanism sudorific fiind recomandată pentru redu-
cerea disconfortului asociat acestor simptome.

17 Compoziție chimică:

19 - salicina, salicortina, tremulacina, populina, fragilina, salicozida, triandrina, vimalina,
piceina, grandidentatina, 3' și 4'-acetil-salicortina;

21 - acizi și aldehide aromatice: salidrozida, vanilina, aldehida siringica, siringina, acidul
salicilic, vanilie, siringic, p-hidroxibenzoic, p-cumaric, cafeic, ferulic;

23 - alcool salicilic = saligenina;

25 - tanin, proantociani;

27 - flavonoide: heterozide ale cvercitolului, luteolinei, ampelopsina, calcona, izosali-
purpozida, 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.

29 Acțiuni:

31 - 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.

33 *In vitro*, membrana corioalantoică a embrionului de găină a fost folosită pentru a
studia efectul antiinflamator al salicinei și tremulacinei din scoarța de salcie. Debutul efectului
35 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.

37 A fost testat, *in vivo*, efectul antiinflamator al tremulacinei. Aceasta a fost izolată și
administrată subcutanat în doză de 100 mg/kg greutate corporală pentru a demonstra
39 inhibarea edemului indus de caragenan la nivelul lăbuței de șobolan. Pe lângă aceasta,
tremulacina a inhibat migrarea leucocitelor peritoneului și a împiedicat formarea edemului
41 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.

43 Într-un studiu s-au examinat 3 plante medicinale: mușețel, crețușcă și salcia albă,
utilizate tradițional ca și agenți antiinflamatori. Extractele apoase și compușii polifenolici
45 izolați (apigenina, cvercetină și acidul salicilic) au fost incubati cu celulele macrofagele și au
fost măsurate interleukina-1 β , IL-6 și factorul de necroză tumorală a (TNF- α)- biomarkeri
47 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

RO 132847 B1

de crețușcă și apoi mușețel. 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:	1
- analgezic: acidul salicilic împiedică transmiterea durerii în nociceptori, inhibă enzima COX (prin acest proces se inhibă producția de prostaglandine generatoare de durere).	3
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:	5
- antipiretic: reduce febra prin scăderea sintezei de prostaglandine.	7
Salicina administrată oral la șobolani în doza de 5 mmol/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 saligenina scad semnificativ temperatura corporală la șobolanii afebrili.	9
Lichenul de piatră	11
<i>Cetraria islandica</i> (<i>Parmeliaceae</i>), lichen întâlnit în zona alpină și subalpină pe stâncile și platourile înalte expuse vânturilor. <i>Tal fruticos</i> (tufă mică), creț, 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 2-8 cm.	13
Partea utilizată - <i>Lichen Islandicus</i> .	15
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.	17
Compoziție chimică:	19
- 50% polizaharide: lichenina 40%, amidon de licheni, izolichenina, galactomanan;	21
- acizi lichenici: acid usnic, fumaroprotocetraric, protocetraric, cetraric, protolicheterinic;	23
- ulei volatil, iod, enzime, vitamine A, B1, B12;	25
- minerale: plumb, cadmiu, mercur, arsen, calciu, magneziu, fier;	27
- hidrocarburi: 1, 8-heptadecadiene;	29
- alți carbohidrați compuși din celuloză și 3 hemiceluloze, care după hidroliză formează: manoza, galactoza și acid glucuronic;	31
- acizi grași: acid linoleic, oleic, linolenic;	33
- fosfolipide, steroli, carotenoide;	35
- mucilagi.	37
Acțiuni:	39
- antibiotic bacteriostatic pe bacteriile Gram pozitive anaerobe, tuberculostatic datorită prezenței acizilor lichenici.	41
<i>In vitro</i> , a fost testată activitatea antimicrobiană a extractului apos de lichen de piatră împotriva bacteriei <i>Sarcina lutea</i> (<i>Micrococcus luteus</i>) folosind 5 probe. Acțiunea inhibitoare a 1 ml extract apos 10% este comparabilă cu a 0,07 până la 0,85 UI de penicilină. S-a afirmat că activitatea extractului depinde de cantitatea acidului fumaroprotocetraric prezent.	43
	45
	47

RO 132847 B1

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

Acidul protolichesterinic are acțiune antibacteriană pe *E. coli*, *B. subtilis*,
9 *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *M. aurum*, *M. tuberculosis* (CMI = 250 μg/ml), *H. pylori*
(CMI90 = 32 μg/ml, când 90% din tulpini sunt inhibate).

11 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
13 asemănătoare *M. tuberculosis*. Dintre compușii testați, acidul usnic din *Cladonia arbuscula*
a prezentat activitatea cea mai crescută cu o valoare a CMI de 32 μg/ml. Atranorin și acidul
15 lobaric, izolați din *Stereocaulon alpinum*, acidul salazinic din *Parmelia saxatilis* și acidul
protolichesterinic din *Cetraria islandica*, toți au demonstrat activitate antimicobacteriană la
17 valori ale CMI \geq 125 μg/ml:

- antiinflamator (ac usnic) ~ ibuprofenul;

19 S-a demonstrat că acidul lichesterinic, *in vitro*, inhibă enzima 5-lipooxigenaza
(5-LO = catalizator în biosinteza leucotrienelor, care sunt bronhoconstrictoare implicate în
21 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.

23 - antiviral *in vitro*: lichenina posedă activitate antivirală pe virusul mozaicului tutunului
prin inhibarea replicării virusului, iar acidul protolichesterinic este un inhibitor al activității
25 ADN-polimerazei a HIV-1 la CI50 = 24 μM (2);

- imunostimulator datorită fracțiunilor polizaharidice: *in vitro* extractul liofilizat
27 stimulează fagocitoza granulocitelor până la 92,6% la o concentrație de 100 μg/ml;

- expectorant, demulcent: datorită conținutului în mucilagii;

29 - antiprotozoaric: s-au izolat 4 compuși din lichenul de piatră: acidul protolichesterinic,
lichesterinic, protocetraric și fumaroprotocetraric, aceștia au fost evaluați pentru activitatea
31 antiprotozoarică pe *Trypanosoma brucei*. Acidul protolichesterinic (CMI = 6,30 μM) și
lichesterinic (CMI = 12,5 μM) au cea mai ridicată activitate pe acest tip de protozoar, având
33 afinitate pe riboflavin-kinaza, sterol-14α- demetilaza și glutatión-sintetaza.

Muguri de plop

35 *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;
37 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
39 dispuse în amenți. Mugurii de plop, se recoltează în februarie-martie, cu ocazia tăierii
arborilor.

41 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
43 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
45 reducere a temperaturii corpului.

Compoziție chimică:

47 - glicozide ale salicinei;

- rezine, saponozide;

RO 132847 B1

- derivați flavonici: crizol, tetocrizol, apigenol;	1
- flavonoli: galangina, izalpinina, cvercitol, kempferol;	3
- flavonone: pinocembrina, pinostrobină;	3
- compuși polifenolcarboxilici: acid cafeic, izofeluric, dimetilcafeic, p-hidroxi-acetofenona, vanilină;	5
- acizi grași, alcooli alifatici, sescviterpene (bisabolol), uleiuri volatile, tanin.	5
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.	7
Catecholul este un component din extractul mugurilor de plop, folosit ca marker la identificarea propolisului falsificat.	9
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 catechina Eq/g de extract, 13,67 ± 0,34 mg cvercetina Eq/g de extract și 228,72 ± 6,90 mg acid tanic Eq/g de extract.	11
Acțiuni:	13
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;	15
- antiinflamatoare dată de uleiurile volatile.	17
Într-un studiu, au fost incluși șoareci la care s-au injectat 1 ml caragenan (1%) în lăbuța dreaptă posterioară, apoi au fost împărțiți în 3 grupuri, fiecare grup primind: I - soluție sterilă izotonică NaCl 10 ml/kg, II - extract din mugurii de plop negru 200mg/kg, III - diclofenac sodic 50 mg/kg, ca și medicament de referință. Extractul și diclofenacul au fost administrate cu 1 h înainte de caragenan. La grupul I a apărut un edem la 1 h după administrarea caragenanului și a fost observat timp de 6 h. Extractul și diclofenacul au cauzat o scădere a edemului lăbuței cu aproximativ 50% după 3 h de tratament și 62% după 5 h de tratament. Activitatea antiinflamatoare a extractului este atribuită cvercetinei, acizilor fenolici și pinocembrinei, mecanismul de acțiune fiind asemănător diclofenacului, adică acționează prin inhibarea sintezei de prostaglandine:	19
- expectorant - datorită prezenței uleiurilor volatile;	21
- analgezică, antipiretică date de derivații saligenolului care acționează prin inhibarea sintezei de prostaglandine;	23
- antibacteriană dată de fracțiunea lipofilă și acidul cafeic;	25
- antifungică dată de fracțiunea lipofilă.	27
Pinocembrina este folosită, de secole, pentru tratarea infecțiilor microbiene. Cece-tătorii au descoperit efectul antibacterian al pinocembrinei pe trei tipuri de bacterii Gram-negative (<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , și <i>K. pneumoniae</i>) și trei bacterii Gram-pozitive (<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> și <i>S. lentus</i>) 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 <i>in vivo</i> și <i>in vitro</i> proprietatea farmacologică antimicrobiană asupra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Streptococcus mutans</i> și <i>Neisseria gonorrhoeae</i> . Pinocembrina are un efect antifungic, activ pe <i>Penicillium italicum</i> și <i>Candida albicans</i> la o concentrație minimă inhibitoare de 100 pg/ml.	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

RO 132847 B1

1 Cuișoare

3 *Eugenia caryophyllata* (fam. *Myrtaceae*) este originar din Indonezia și Malaezia și
cultivat în Asia de sud-est. Are frunze opuse, coriacee și cu florile grupate în cime
corimbiforme.

5 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
7 esențial care are proprietăți de reducere a numărului microorganismelor potențial patogene.

Compoziție chimică:

9 - ulei volatil (15-20%): eugenol (80-90%), acetat de eugenii (2-27%), metilsalicilat,
metileugenol, benzaldehida, n-amil-metil cetona, carvacrol, timol, cinamaldehydă, furfural,
11 vanilină, trans- α -bergamoten, alloaromadendren, selinen, cadinen, hidrocarburi sescviter-
penice (3,2-4,8% β -cariofilen, α -humulen, α -amorfen, α -muurolen, calamenen, calacoren),
13 α -, β -pinen, limonen, α -copen, α -cubeben, famesol, esterii (hexanoat de etil, acetati de 2-
heptanil, 2-nonanil, stiralil, benzii, terpenil, etilfenil), alți fenoli (izoeugenol, cavicol, 4-
15 alilfenol), oxizi (cariofilen-oxid, humulen-epoxid);

- 10-12% tanin: elagitanin;

17 - rezine, lipide, mucilagii;

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

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

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

- zaharuri: glucoza, xiloză, arabinoză;

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

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

27 - aldehide (benzaldehydă, m-metoxibenzaldehidă), alcoolii (alcool benzilic),
hidrocarburi (naftalen).

29 Acțiuni:

- antibacterian cu spectru larg pe bacterii Gram-negative și Gram-pozitive (efect
31 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
33 administrarea uleiului de cuișoare timp de 15 zile. Studiile *in vitro* au demonstrat acțiunea
antibacteriană a uleiului de cuișoare împotriva bacteriilor anaerobe responsabile de
35 producerea acneei.

Acționează împotriva *S. aureus* rezistent la peniciline, inhibă creșterea patogenilor
37 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
39 fost demonstrată și împotriva *S. aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella*
pneumoniae, *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium perfringens* și *Moraxella*
41 *glucidolytica*, *Yersinia enterocolitica*.

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

RO 132847 B1

Activitatea antibacteriană a eugenolului poate fi datorată interacțiunii eugenolului cu membrana celulelor bacteriene, membrana este distrusă și macromoleculele membranare sunt deformate.	1
- 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.	3
Replicarea acestor virusuri a fost inhibată la CI50 = 25,6 μg/ml pentru HSV1 și CI50 = 16,2 μg/ml pentru HSV2. Investigațiile au arătat că asocierea eugenolului cu aciclovir au dus la un efect sinergic.	5
- antifungic, activ pe speciile de <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Trichophyton</i> , <i>M. canis</i> .	7
Uleiul esențial de cuișoare inhibă acumularea aflatoxinei B1 din <i>Aspergillus</i> , reduce cantitatea de ergosterol, un component specific membranei celulare fungice. Este activ, inclusiv pe tulpinile rezistente la fluconazol și are o acțiune similară nistatinei.	9
Uleiul de cuișoare are acțiune antifungică și pe <i>Microsporum gypseum</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>Saprolegnia spp.</i> , <i>A. klebsiana</i> și <i>A. piscicida</i> .	11
- antiplasmodică - 21 de compuși ai uleiului esențial au fost testați pentru activitatea antimalarică asupra tulpinilor de <i>Plasmodium falciparum</i> rezistente la clorochină. Printre acești compuși se află eugenolul cu CI50 = 753 μM, care este mai mică față de alți constituenți, cum sunt: nerolidol, acetat de linalil, α-pinen.	13
- antiparazitar, pesticid - uleiul de cuișoare inactivează, <i>in vitro</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Meloidogyne incognita</i> dependent de doză, <i>Cacopsylla chinensis</i> (eugenol, cariofilen), <i>Cimex lectularius</i> L.	17
A fost evaluată activitatea <i>in vivo</i> și <i>in vitro</i> acaricidă a uleiului esențial de cuișoare asupra parazitului <i>Psoroptes cuniculi</i> . <i>In vitro</i> , 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. <i>In vivo</i> , 6 iepuri infectați cu <i>P. cuniculi</i> 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.	19
- repelent: uleiul de cuișoare, în concentrație de 5% are activitate repelentă 100% împotriva larvei <i>Leptotrombidium imphalum</i> ;	21
- antispastic: <i>in vitro</i> , 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;	23
- 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 0,125-1 mmol/l.	25
Acest efect a fost testat prin supunerea șoarecilor la testul plăcii încălzite la 55°C pentru 25 s. 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 latenței pe placa încălzită cu până la 6,2 s (analgezie 82,3%), iar morfina a dus de asemenea la o creștere a timpului pe placă încălzită cu 13,3 s.	27
- anestezic local: studiile clinice au arătat că gelul cu ulei de cuișoare (2:3 vol/vol cu glicerina) are acțiune asemănătoare cu a gelului de benzocaină, efect demonstrat prin inducerea durerii la nivelul mucoasei bucale.	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

RO 132847 B1

1 Din literatura de brevete sunt cunoscute o serie de produse:

2 Brevetul **RO 115845 (B)** - Compoziție medicamentoasă antitusivă - se referă la o
3 compoziție ce cuprinde 1...1,5 părți *Oleum Menthae piperitae*, 2...3 părți *Oleum Abietinae*,
4 1,5...2 părți *Oleum Pini*, 1,0 părți *Oleum Foeniculi*, 1...1,5 părți *Oleum Juniperi*, 1,2...1,5 părți
5 *Oleum Thymi*, 10...12 părți tinctura *Cetrariae*, 8...10 părți tinctură *Lobariae*, 15...18 părți
6 tinctura *Thymi*, 13...15 părți tinctura *gemmae Populi*, 15...18 părți tinctură *Silybi Mariani*, 7...9
7 părți tinctură *Origani*, iar restul până la 100 părți tinctură *Equiseti*, părțile fiind exprimate în
8 greutate.

9 Brevetul **RO 126280** - Produs fitoterapeutic cu efect anti-inflamator și procedeu de
10 realizare a acestuia - prezintă produsul format din 5 părți în greutate fracție selectivă extrasă
11 din părțile aeriene ale *Rosmarinus officinalis* și 2 părți în greutate fracție selectivă extrasă din
12 *Populi gemmae*, conținând 5,53...6,75% flavone exprimate în rutozid și 10,91...13,33%
13 polifenoli exprimați în acid galic, iar procedeul constă în dizolvarea a 2 părți fracție selectivă
14 extrasă din *Populi gemmae* în alcool etilic 50%, într-un raport de 1/10 (m/v), apoi
15 amestecarea 5 părți fracție selectivă de *Rosmarinus officinalis* și omogenizarea amestecului
16 pentru 30 min, cu agitare, solventul fiind eliminat la presiune redusă și la o temperatură de
17 maximum 50°C, rezultând în final, produsul care conține amestecul celor două fracții
18 selective sub formă de pudră de culoare brună.

19 Brevetul **DE 202004016077 (U1)** - Prezintă o compoziție farmaceutică sub formă de
20 dozare solidă, de preferință pentru tratamentul local al bolilor inflamatorii ale gurii și gâtului,
21 care cuprinde o combinație de *lichen islandicus* (mușchi islandez) și/sau extract cu cel puțin
22 un anesteziec local având efect antiinflamator, analgezic, antianginal, virucid.

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

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

30 Suplimentul alimentar conform invenției constă în aceea că se amestecă 40% frunze
31 de măslin (*Olive Folium*), 20% lichen de piatră (*Lichen Islandicus*), 20% muguri de plop
32 (*Populi Gemmae*), 10% extract de scoarță de salcie (*Salicis cortex*) standardizat în minimum
33 15% salicina și cu 10% cuișoare (*Caryophylli flos*), procentele fiind exprimate în greutate.

34 Suplimentul alimentar conform invenției prezintă următoarele avantaje:

35 - suplimentul alimentar susține apărarea organismului împotriva microorganismelor
36 potențial patogene din tractul respirator, digestiv, genito-urinar;

37 - sudorific, susține reglarea temperaturii corporale;

38 - calmează iritațiile mucoaselor tractului respirator superior, ale tubului digestiv și ale
39 tractului urinar;

40 - contribuie la fluidificarea și eliminarea secrețiilor mucoaselor tractului respirator;
41 este un produs absolut natural, bine tolerat, fără efecte negative;

42 - constituie o alternativă viabilă la tratamentele cu antibiotice clasice pentru infecțiile
43 respiratorii care nu mai răspund la antibioterapie sau pentru pacienții cu intoleranțe la
44 acestea;

45 - produsul poate fi o alternativă naturală pentru persoanele care prezintă rezistență,
46 intoleranță sau reacții alergice la antibioterapie;

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

RO 132847 B1

Se dă în continuare un exemplu de realizare a suplimentului alimentar conform invenției în legătură și cu fig. 1...3 care reprezintă:	1
- fig. 1, repartitia procentuală a patologiei în lot;	3
- fig. 2, evoluția simptomelor în lot, exprimate procentual;	
- fig. 3, evoluția simptomelor la pacienții cu patologie bronhopulmonară cronică, exprimate procentual.	5
Suplimentul alimentar conform invenției, sub formă de capsule de gelatină, este realizat astfel:	7
Într-o primă fază fiecare materie prima 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.	9
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 maximum 13% pentru plante și maximum 5% pentru extractul de scoarță de salcie.	11
După primirea avizului favorabil din partea Departamentului Controlul calității materiilor prime, acestea sunt depozitate în condiții de mediu controlat, temperatura 0...30°C și umiditate relativă a aerului de maximum 75% până în momentul intrării în procesul de producție.	13
În activitatea de procesare, plantele din compoziția capsulelor de gelatină 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.	15
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.	17
Cuișoarele 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.	19
La finalul procesării sunt prelevate probe de către Controlul calității pentru verificarea caracteristicilor fizico-chimice prevăzute în standardul intern de calitate.	21
Pe baza formulei de fabricație, materiile prime sunt cântărite și intră în procesul de producție. Astfel se amesteca 1400 g frunze de măslin (<i>Olivae folium</i>) cu câte 700 g lichen de piatra (<i>Lichen Islandicus</i>) și muguri de plop (<i>Populi gemmae</i>), cu 350 g cuișoare (<i>Caryophylli flos</i>) peste care se adaugă 350 g extract de scoarța de salcie (<i>Salicis cortex</i>) standardizat în minimum 15% salicină.	23
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.	25
Operația de încapsulare se realizează folosind capsule de gelatină 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.	27
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.	29
Ultima etapă a fluxului tehnologic cuprinde ambalarea secundară, adică etichetarea flacoanelor și introducerea acestora în cutii.	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

RO 132847 B1

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

3 Material și metodă

Au fost incluse în studiu 58 de persoane cu vârste între 6-14 ani (21,31%), între
5 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%

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

21 Persoanele au fost examinate de medicii de familie/respectiv de medicii specialiști
pneumoftiziologi care pe baza anamnezei, examenului clinic și paraclinic (unde a fost
23 necesar), au stabilit diagnosticul și au inițiat administrarea capsulelor cu suplimentul ali-
mentar, în doze corespunzătoare vârstei: copiii: 1 capsulă de 2 ori pe zi, adulți: 1 capsulă de
25 3 ori pe zi. S-a administrat timp de 10-22 de zile, în funcție de diagnostic, conform recoman-
dării medicului.

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

31 Rezultate

33 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 tușea la 84,21% dintre aceștia
35 (fig. 2).

37 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
alopat (antibiotic cu spectru larg) datorită polipatologiei respiratorii cronice severe. Produsul
39 a fost bine tolerat la toți pacienții.

41 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
43 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).

RO 132847 B1

Concluzie

Formula inovativă a suplimentului alimentar alcătuită din 5 plante medicinale -frunze de măslin (<i>Olivae folium</i>), lichen de piatră (<i>Lichen Islandicus</i>), muguri de plop (<i>Populi gemmae</i>), extract din scoarță de salcie (<i>Salicis cortex</i>) standardizat în minimum 15% salicină și cuișoare (<i>Caryophylli flos</i>) - poate fi considerată eficientă la persoanele care prezintă patologii respiratorii, 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.	1
	3
	5
	7
	9

RO 132847 B1

1

Revendicări

3

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 minimum 15% salicina și cu 10% cuișoare (*Caryophylli flos*),
5
7 procente fiind exprimate în greutate.

9

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.

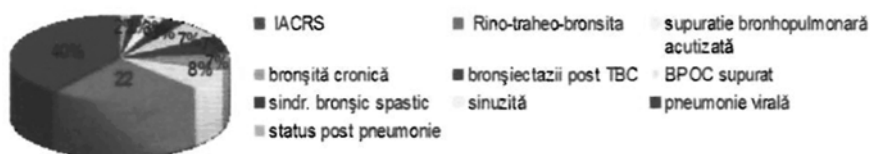


Fig. 1

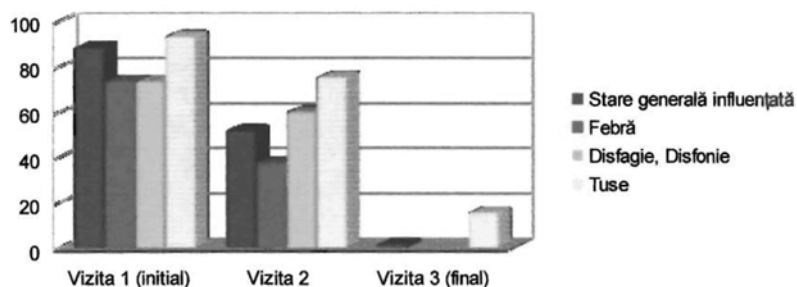


Fig. 2

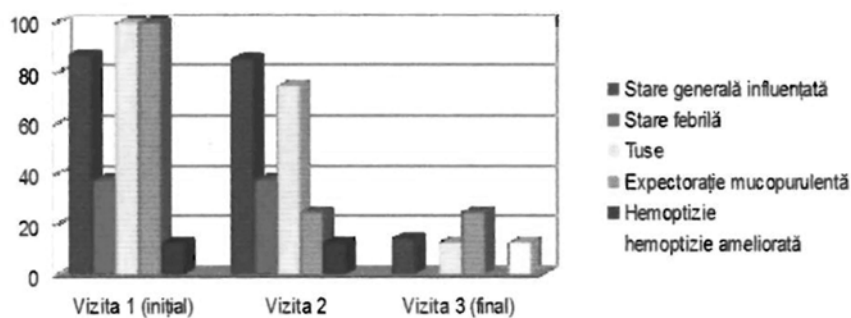


Fig. 3

