



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00775

(22) Data de depozit: 29/09/2017

(41) Data publicării cererii:
30/04/2019 BOPI nr. 4/2019

(71) Solicitant:
• PELL AMAR COSMETICS S.R.L.,
STR.DR.IONESCU CĂLINEȘTI NR.14,
BĂILE-BALTA ALBĂ, BZ, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
ȘI DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA
HULUBEI", STR.REACTORULUI NR.30,
MĂGURELE, IF, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE CHIMICO
FARMACEUTICĂ, CALEA VITAN NR 112,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL
PATOLOGIEI ȘI ȘTIINTELOR
BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ",
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.99-101,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• ZAINEA ELENA, BD.1 DECEMBRIE 1918,
BL.D2, AP.13, RĂMNICU SĂRAT, BZ, RO;
• HARASIM IULIANA, STR.CREȚEI NR.7,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• ZAINEA CĂTĂLIN,
BD.1 DECEMBRIE 1918, BL.D2, AP.13,
RĂMNICU SĂRAT, BZ, RO;
• DRAGOMIR SIMONA,
STR.ALECU BAĞDAT NR.34,
RĂMNICU SĂRAT, BZ, RO;
• PONTA CORNELIU CĂTĂLIN,
STR.AUREL VLAICU NR.138, SC.1, ET.2,
AP.9, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• VIRGOLICI MARIAN,
STR.GOLESCU DINICU NR.31, BL.1, SC.B,
AP.35, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• PINTILIE COSMIN ADRIAN,
ALEEA DONEA ALEXANDRĂ NR.1, BL.19,
SC.C, ET.4, AP.45, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• ZORILA FLORINA, STR.BUJORILOR
NR.5, BL.21, SC.B, ET.3, AP.22,
MĂGURELE, IF, RO;
• CUTRUBINIS MIHALIS, BLV.FERDINAND
INR.101, BL.P31, SC.1, ET.9, AP.39,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;

• ALBULESCU RADU NICOLAE AUREL,
STR.ROȘIAMONTANĂ NR.6, BL.07, SC.C,
ET.2, AP.125, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• GRIGORE ALICE ELENA, BD.UVERTURII
NR.43, BL.1, AP.131, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• NEAGU GEORGETA,
STR.MUNȚII MEHEDIȘTI NR.4, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• NIȚĂ SULTANA, STR.BĂRBAT VOIEVOD
NR.21, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• ALBULESCU ADRIAN,
STR.ROȘIA MONTANĂ NR.6, BL.07, SC.C,
ET.2, AP.125, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• PANTELI IRINA MINERVA,
STR.SPĂȚAR NICOLAE MILESCU 46-48,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• RAȘIT IUKSEL, BD.DINICU GOLESCU
NR.37, BL.4, SC.2, ET.1, AP.40, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BĂZDOĂCĂ CRISTINA MIRELA,
BD.DIMITRIE CANTEMIR NR.13, BL.11,
SC.A, ET.8, AP.29, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• RUSU NICOLEȚA, STR.ARIEȘUL MIC
NR.1, BL.15, AP.28, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• CODRIȚI ELENA,
STR.CÂMPIA LIBERTĂȚII NR.4, BL.PM
51, SC.3, ET.7, AP.117, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• TANASĂ CRISTIANA,
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR.126, BL.P 34,
SC.1, AP.30, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;
• POPESCU IONELA DANIELA,
BD.THEODOR PALLADY, NR.4, BL.M2,
SC.A, AP.28, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• MIHAI SIMONA, BD.CAMIL RESSU
NR.76, BL.S1B-S1C, SC.B, AP.34,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• ENCIU ANA-MARIA, STR.PLUGĂRIILOR
NR.1, BL.94, SC.A, AP.15, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) PROCEDEU NOU DE OBTINERE ȘI CARACTERIZARE A
EXTRACTULUI DE NĂMOL SAPROPELIC "PELL AMAR"

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs activ din nămol sapropelic, utilizat în tratamentul artritei reumatoide și al altor afecțiuni inflamatorii cronice. Procedeu conform invenției constă în prepararea extractului apos de nămol sapropelic, filtrarea extractului și aducerea în stare solidă a extractului filtrat prin liofilizare în două etape: într-o etapă de liofilizare principală, în condiții de precongelație la -20°C, presiune de 0,04 mbar, temperatură de -50°C, și o etapă de liofilizare finală, în condiții de presiune de 2,6 mbar și tem-

peratură de -10°C, urmate de sterilizarea extractului, prin iradiere cu radiații gamma, între 10 și 25 kGy, rezultând un produs având caracteristici microbiologice și farmacologice adecvate utilizării ca produs antiinflamator.

Revendicări: 3
Figuri: 15

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



Invenția se referă la un produs îmbunătățit, cu acțiune antiinflamatorie, utilizabil în industria farmaceutică, a dispozitivelor medicale și cosmetice, și procedeul de obținere a acestuia prin prelucrarea namolului sapropelic extras din lacul Balta Alba.

Preocupările cercetării socio-bio-medicale pe plan internațional se axează pe găsirea unor soluții preventive și terapeutice în bolile inflamatorii cronice și acute, de identificare și evaluare a noi mijloace de protecție, în vederea selectării de produși cu valențe terapeutice pentru clinică.

Studii recente readuc în atenție proprietățile anti-inflamatorii directe ale tratamentului cu nămol conducând astfel la idea că acțiunea acestuia asupra rețelei de citokine ar putea contracara efectele legate de stres, acționând asupra funcției celulelor endoteliale și plachetare.

În studiul realizat de Basili S. și colaboratorii (Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2001;314(1-2):209-14) s-au investigat efectele unui ciclu de 12 zile de tratament cu nămol, la pacienții cu tulburări aterotrombotice. La sfârșitul perioadei au fost analizați atât biomarkerii de inflamație, precum și modificările realizate asupra markerilor de trombocite in vivo și / sau activarea celulelor endoteliale. Nivelurile plasmatiche ale IL-6 au fost semnificativ reduse la sfârșitul tratamentului cu nămol ($p < 0,01$) la pacienți. În concluzie studiul sugerează ca acest tip de tratament poate fi folosit ca procedură relativ sigură de tratament la pacienții cu tulburări aterotrombotice.

Evcik D. și colaboratorii (Evcik D, Joint, bone, spine : revue du rhumatisme. 2007;74(1):60-5), au investigat eficacitatea balneoterapiei, a terapiei de împachetare cu nămol și a împachetărilor calde, la pacienții cu osteoartrita la nivelul genunchilor. Pacienți luați în studiu au fost împărțiți în 3 grupuri care au primit separat tratament - tratament balneoterapeutic, terapie cu împachetări cu nămol și terapie cu împachetări calde. După aplicarea a 10 sesiuni de tratament s-a constatat ca balneoterapia și terapia cu împachetări cu nămol au contribuit la îmbunătățirea calității vieții (a fost evaluată durerea cu Visual Analogue Scale-VAS și Western Ontario McMaster Osteoarthritis Index-WOMOI) pentru pacienții cu osteoartrita la nivelul genunchilor [2].

În studiul lui Cozzi și colaboratorii (Cozzi F, et al Clinical and experimental rheumatology. 2004;22(6):763-6.). s-a analizat efectul pe care îl are aplicarea tratamentului cu nămol asupra procesului inflamator la șobolanii Wistar, cu artrită indusă. Rezultatele acestui studiu sugerează un efect anti-inflamator al tratamentului cu nămol la șobolanii cu artrită, și ar putea explica efectele benefice ale tratamentelor termice cu nămol observate în unele boli reumatice inflamatorii.

Un alt studiu condus de Sarsan A. et al, la pacienți cu osteoartrită la nivelul genunchilor s-a demonstrat eficacitatea tratamentului prin împachetări cu nămol Sarsan A, Jo et al. (Journal of back and musculoskeletal rehabilitation. 2012;25(3):193-9). Ceccarelli F și colaboratorii (Clinical and experimental rheumatology. 2010;28(2):250-3.) în 2010 au constatat o efectul terapiilor de tip spa cu nămol poate conduce la îmbunătățiri semnificative imediat după terapie și până la 12 luni după tratament.

Brevetul RO 57715 descrie un procedeu de extracție sub presiune de gaz inert, ce permite obținerea unei soluții de 0,8-5,2%, purificat prin câteva trepte de filtrare, inclusiv filtrare bacteriologică, urmată de înfiolarea directă sau izolarea prin atomizare.

Brevetul RO 67351 propune un procedeu de extracție a nămolului prin tratament cu un amestec de acizi, urmată de atomizare, resolubilizare, purificare cu schibători de ioni. Produsul are proprietăți antiinflamatoare și analgezice și se folosește în creme, unguente și alte forme de administrare de uz extern.

Este cunoscut ca namolul provenit din lacul Balta Alba se utilizează în tratamentul afecțiunilor inflamatorii, cu precădere a celor cronice, iar extracte ale acestuia sunt utilizate la formularea de produse cosmetice și de îngrijire a sănătății. O formula de extract de namol sapropelic din namolul din Lacul Balta Alba a fost obiectul cererii de brevet 82009, care descrie un procedeu de preparare a unui produs activ din nămoluri sapropelice prin atomizarea extractului total apos, ce era tratat cu cărbune activ, filtrat și atomizat.

O altă cerere de brevet cu subiect asemanator, RO 116867 descrie produse destinate îngrijirii sănătății sau igienei personale, folosind însă alte surse și procedee de preparare decât cele din actuala cerere de brevet, de menționând un extract lichid din namol sapropelic din lacul Techirghiol.

Brevetul RO 122831 prezintă preparate pentru îngrijire orală (pastă de dinți), având componente active din nămol sapropelic, fără a prezenta însă detalii despre sursa de nămol și nici cu privire la modalitățile de preparare a extractului.

introduc în camera de precongelare (-25°C) a liofilizatorului Beta 1-8 Plus (Martin Christ, Germania). După precongelare, se trec recipientele în rafturile de congelare (-55°C) și se inițiază liofilizarea după atingerea temperaturii prescrise. Timpii și condițiile de operare pentru un ciclu de liofilizare:

- I. Închegarea:
Se setează timpul = 30 minute
- II. Încălzirea pompei de vid – timp = 20 minute
- III. Liofilizarea principală
Presiune = 0,04 mbar → temperatură = – (minus) 50°C
Timp = 24 ore
- IV. Liofilizare finală
Presiune = 2,6 mbar → temperatură = – (minus) 10°C
Timp = 6 ore

Aici merita introdusa o figura “diagrama procesului de liofilizare” ... ideal o diagrama reprezentativa de la ultimele loturi care respecta parametrii descrisi de dumneavoastra mai sus. Vedeti expl mai jos:

Obs. Spre deosebire de atomizare, liofilizarea nu produce și reducerea încărcăturii microbiene/sterilizarea extractului, motiv pentru care o noua etapa a fost introdusa in procesul de fabricatie: tratamentul prin iradiere. Pentru aceasta produsul este ambalat in saci din polietilena inchisi etans, continand maxim 0,5 kg fiecare. Acestia sunt impachetati in cutii de carton care sunt sigilate si expediate la iradiatorul industrial gamma IRASM – IFIN-HH pentru tratamentul prin iradiere la doze cuprinse intre 10 si 25 kGy pentru asigurarea sterilitatii extractului (produs farmaceutic) sau scaderii incarcaturii microbiene la un nivel acceptabil stipulat in standardele de fabricatie ale producatorului sau normele in vigoare in functie de aplicatie (supliment alimentar, etc).

Exemplul 3 Imbunatatirea calitatii produsului prin control microbial cu radiatii ionizante:

Una din cerintele de calitate pentru produsul de interes este incarcatura microbiana, care este in acelasi timp o cerinta legala pentru producatorii de medicamente (Pharmacopeia). Fluctuatiile in incarcatura microbiana pot proveni din materia prima, atat ca numar cat si ca tip de contaminanti.

Procesul de calificare a produsului cuprinde etapele din diagrama din figura urmatoare.

Tratamentul cu radiatii ionizante permite scaderea incarcaturii microbiene la un nivel care exclude posibilitatea depasirii limitelor maxim admise chiar in cazul fluctuatiilor mai sus amintite si permite stabilirea unor limite de alerta si actiune foarte joase.

Pentru produsul de interes tratamentul cu radiatii ionizante ofera avantajul major al posibilitatii tratarii produsului in vrac, in ambalajul comercial, fara a mai exista nici o actiune asupra acestuia pana la punerea pe piata sau utilizarea lui in formulari cosmetice, farmaceutice sau dispozitive medicale. Tratamentul rezolva in acelasi timp problema fluctuatiilor de incarcatura microbiana in mod global, fara sa conteze sursa de provenienta a acestora.

In oricare din aceste doua forme sterile produsul se poate utiliza mai departe in diverse formulari cosmetice, produse de igiena dentara, dispozitive medicale, produse farmaceutice sau suplimente alimentare.

Exemplul 4 Validarea sterilizarii prin iradiere este un proces standardizat: ISO11137 reglementeaza modul prin care se afla doza de sterilizare potrivita pentru produsul dat si conditiile in care validarea este valabila.

Principiile de validare, care stau la baza metodelor descrise in standard, se refera la:

- Radiorezistenta
- Incarcatura microbiana de start
- Nivelul de sterilitate care trebuie atins

De cealalta parte, doza este limitata de rezistenta la degradare fizica / modificare chimica, sub actiunea radiatiilor, a fiecarui produs in parte (compatibilitatea materialului cu tehnica de sterilizare). Limitarea este reglementata prin aflarea dozei maxime de sterilizare (doza pana la care materialul de fabricatie ramane nemodificat in termeni de compozitie si proprietati).

Radiorezistenta este caracterizata prin marimea D10. Aceasta este cantitatea de radiatie necesara pentru a omori 90% (un \log_{10}) dintr-o populatie de microorganisme; mai este cunoscuta drept „doza de reducere

Brevetul RO 127870 se referă la extracte bioactive lipofile din nămol sapropelic terapeutic și procedeu de obținere a acestuia, dar în acest caz, procedurile de extracție presupun utilizarea de solvenți organici și izolarea de fracții lipofile, ce conține componente organice biogene.

Sunt cunoscute și alte produse cu origine similară, ca de exemplu extracte de nămoluri bituminoase de la Marea Moartă.

În figurile anexate, sunt prezentate următoarele:

Figura 1 prezintă schema generală a fluxului de obținere a produsului „produs activ Pell Amar”

Figura 2 prezintă etapele procesului de calificare la sterilizarea cu radiații ionizante

Figura 3 prezintă caracterizarea compoziției produsului prin analiza termică TG-DSC: (a) extract liofilizat versus atomizat; (b) în atmosferă inertă și oxidantă

Figura 4 prezintă spectrele Raman comparative pentru namolul sapropelic (verde), extract Pellamar (roșu) și extract Pellamar liofilizat (albastru)

Figura 5 prezintă diagrama procesului automatizat de digestie

Figura 6 prezintă spectrele de reflexie ale probelor Pellamar liofilizate, neiradiate și iradiate la 25 kGy

Figura 7 prezintă Aspectul citomorfologic al liniei celulare de monocite/macrofage umane în cultură. Celule control la confluență, la 48 ore după însămânțare (400 μm).

Figura 8. Densitatea optică și viabilitatea celulară la nivelul liniei celulare CRL-9855 după 48 de ore, la o densitate de 5000 celule, în urma tratamentului cu extract de namol.

Figura 9. Densitatea optică și viabilitatea celulară la nivelul liniei celulare CRL-9855 după 48 de ore, la o densitate de 10000 celule, în urma tratamentului cu extract de namol.

Figura 10. Densitatea optică și viabilitatea celulară la nivelul liniei celulare CRL-9855 după 72 de ore, la o densitate de 5000 celule, în urma tratamentului cu extract de namol.

Figura 11. Densitatea optică și viabilitatea celulară la nivelul liniei celulare CRL-9855 după 72 de ore, la o densitate de 10000 celule, în urma tratamentului cu extract de namol.

Figura 12. Nivelul concentrației citokinei pro-inflamatoare IL-6 în supernatantii proveniți de la celule tratate cu extract de namol sapropelic, versus control, control cu dexametazonă și control cu LPS. Datele reprezintă valorile medii obținute în urma analizei în duplicat.

Figura 13. Nivelul concentrației citokinei pro-inflamatoare TNF-α în supernatantii proveniți de la celule tratate cu extract de namol sapropelic, versus control, control cu dexametazonă și control cu LPS. Datele reprezintă valorile medii obținute în urma analizei în duplicat.

Figura 14. Nivelul concentrației citokinei pro-inflamatoare MIP-1α în supernatantii proveniți de la celule tratate cu extract de namol sapropelic, versus control, control cu dexametazonă și control cu LPS. Datele reprezintă valorile medii obținute în urma analizei în duplicat.

Figura 15. Nivelul concentrației citokinei pro-inflamatoare IL-1α în supernatantii proveniți de la celule tratate cu extract de namol sapropelic, versus control, control cu dexametazonă și control cu LPS. Datele reprezintă valorile medii obținute în urma analizei în duplicat.

Exemplul 1 de obținere al produsului prin atomizare:

Sistemul de atomizare: Are rolul de a prelucra soluția Pell Amar transformând-o în pulbere (produsul „principiul activ Pell Amar”).

Parametrii de funcționare ai atomizorului sunt: temperatura optimă de intrare 170-190° C, temperatura optimă ieșire 85-95° C, debitul pompei de alimentare reglat la 3-3,5 litri/ 1 h, viteza de atomizare 50 r/n, frecvența ventilator uscare 350-500 KHz. Soluția este antrenată către tubina atomizorului prin sistemul de pompare, iar fluxul de aer cald distribuit evaporă rapid lichidul. Se obțin aproximativ 600 g de atomizat plecând de la aproximativ 10 L de soluție. Pulberea astfel obținută poate fi uscată în recipiente cu capac neetans în etuva la 40 ° C și sterilizată termic timp de 90 min la 180 ° C în fiole din materiale inerte, rezistente la temperaturi, închise etanș.

Exemplul 2 de obținere al produsului prin liofilizare:

Soluția de extract tratată prin ultrasonicare (de către dispozitivul de ultrasonicare nr. 2) este colectată și în recipiente din sticlă curățate, sterile. Pentru liofilizare, se transferă în recipiente de polipropilenă de 50 ml și se

zecimale". Astfel, de tipul de microorganisme contaminante si de rezistenta la radiatii a acestora depinde eficienta oricarui tratament de sterilizare / decontaminare cu radiatii ionizante. Rezistenta la radiatii (*radiorezistenta*) este proprietatea unor organisme de a supravietui in mediu cu un anumit nivel de radiatii ionizante.

Incarcatura microbiana de start este importanta din perspectiva faptului ca orice proces de sterilizare nu este unul de tip totul sau nimic (care ar putea fi considerat unul calitativ), ci este unul de scadere treptata a incarcaturii, proportional cu doza agentului sterilizant. Prin urmare, o incarcatura de start mai mare va solicita o doza de sterilizare mai mare.

Nivelul de sterilitate care trebuie atins este cunoscut drept SAL (*Sterility Assurance Level*) si reprezinta probabilitatea ca, la doza validata, sa regasim totusi un obiect nesteril intr-o populatie de obiecte sterilizate. Pentru farmaceutice sterile nivelul minim acceptat al SAL este de 10^{-6} (maxim 1 obiect dintr-un milion, poate fi nesteril).

Principiile din standardul ISO 11137 pot fi aplicate si la iradierea in scopul reducerii incarcaturii microbiene. Practic, scopul nu va fi obtinerea unui produs steril, ci a unui curat sau foarte curat. Trebuie mentionat, totusi, ca practica nu trebuie folosita pentru a ascunde sau a acoperi, vicii de fabricatie sau conditii improprie din proces.

Iradierea experimentale au fost realizate cu ajutorul unui Gamma Chamber GC-5000 (iradiator de cercetare Co-60) la un debit de doza de aproximativ 4,9 kGy/h. Dozimetria a fost efectuata cu un sistem dozimetric ECB (citire oscilometrica) (ISO/ASTM 51538:2009) cu o incertitudine medie de 3 %. Toate dozele au fost exprimate ca doza absorbita in apa.

Astfel au fost iradiate probe din 3 loturi de extract „liofilizat” de namol sapropelic produse de CO (PELL AMAR) in 2015 (11, 12 si 13 /2015), utilizate mai departe drept referinte in testele microbiologice, fizico-chimice, toxicologice si de screening pentru realizarea experimentelor initiale de caracterizare.

Testele microbiologice pentru "Extractul liofilizat din namol sapropelic" au fost efectuate pe 3 loturi experimentale (lotul 11, 12, 13), inainte de a fi supus unui proces de sterilizare, pentru a verifica incarcatura microbiana a produsului dupa procesul de liofilizare.

Testul de incarcatura microbiana a fost efectuat prin metoda de cultivare in placa (plate count), utilizand mediul de cultura Tryptic soy agar, incubare la temperatura de 32°C timp de 5-7 zile (pentru parametrul Total microorganisme aerobe), iar pentru parametrul Total fungi a fost utilizata aceeasi metoda dar inocularea s-a efectuat in mediu Sabouraud dextrose agar cu antibiotic, incubare la temperatura de 22.5°C, timp de 5-7 zile. Incarcatura microbiana obtinuta a avut valori de ordinul 10^3 . Deasemenea, pentru cele trei loturi a fost verificata si prezenta celor 2 patogeni (*Ps. Aeruginosa* si *St. aureus*).

Tabel 1 Testarea încărcăturii microbiene a probelor de Extract liofilizat din namol sapropelic

PARAMETRU TESTAT/ Unitate de raportare	LOT 11	LOT 12	LOT 13
Total microorganisme aerobe/ gram	2450	1450	1900
Total fungi/ gram	< 10	< 10	< 10
Identificare <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / gram	Absent	Absent	Absent
Identificare <i>Staphylococcus aureus</i> / gram	Absent	Absent	Absent

Alte esantioane din extractul liofilizat au fost tratate cu radiatii gamma in cadrul Instalatiei de Iradiere IRASM, la doze diferite (10 kGy, 15kGy si 20 kGy), in vederea scaderii gradului de contaminare microbiana, cat si pentru stabilirea dozei optime de iradiere. Conditile de iradiere au fost optimizate si descrise in raportul stiintific al etapei precedente.

Pentru esantioanele de produs supuse tratamentului cu radiatii gamma s-a efectuat testul de sterilitate (test care certifica absenta microorganismelor vii in produsul de analizat). Astfel, din fiecare lot experimental s-au iradiat alte 3 esantioane a cate 1 gram la cele 3 doze de iradiere.

Testul de sterilitate a fost efectuat conform documentului de referinta European Pharmacopoeia, capitolul 2.6.1 – *Sterility test*, utilizant metoda de inoculare directa in mediul de cultura Tryptic soya broth. Probele au fost incubate la temperatura de 32°C, timp de 14 zile.

Tabelul 2 Testarea sterilității probelor de Extract liofilizat din namol sapropelic sterilizat prin iradiere

	LOT 11	LOT 12	LOT 13
--	--------	--------	--------

PARAMETRU TESTAT	10 kGy	15 kGy	20 kGy	10 kGy	15 kGy	20 kGy	10 kGy	15 kGy	20 kGy
TESTAREA STERILITATII	Steril	Steril	Steril	Steril	Steril	Steril	Steril	Steril	Steril

In urma rezultatelor obtinute putem concluziona ca oricare dintre dozele de mai sus poate fi utilizata in vederea obtinerii unui extract liofilizat steril, in conditiile in care nu apar modificari in cadrul procesului de fabricatie (de exemplu, incarcatura microbiana initiala a materiei prime).

Exemplul 4 Caracterizarea microbiologica a produsului Extractul liofilizat din namol sapropelic

Caracterizarea din punct de vedere microbiologic a produsului s-a realizat pentru a putea stabili incarcatura microbiana, cantitatea de endotoxine si proprietatile antimicrobiene.

Testele de incarcatura si identificare au fost efectuate conform documentului de referinta, European Farmacopoeia Ed.IX capitolul 2.6.12 Microbiological examination of non-sterile products: Microbial enumeration tests cu limitele:

- Total microorganisme aerobe: < 103 UFC / g;
- Total fungi: < 102 UFC / g;
- Pseudomonas aeruginosa: Absent / g;
- Staphylococcus aureus: Absent / g.

Testul de incarcatura microbiana a fost efectuat prin metoda de cultivare in placa (plate count). Pentru parametrul „Total microorganisme aerobe” a fost utilizat mediul de cultura „Tryptic soy agar”. Probele au fost incubate la temperatura de 32°C timp de 5-7 zile. Pentru parametrul „Total fungi” a fost utilizata aceeaasi metoda, dar inocularea s-a efectuat in mediu „Sabouraud dextrose agar” cu adaos de cloramfenicol, incubare la temperatura de 22,5°C timp de 5-7 zile.

Incercatura microbiana obtinuta a fost foarte variata, in cazul loturilor de produs. (Tabel 1) De asemenea, pentru cele trei loturi investigate a fost verificata si prezenta a 2 patogeni (Ps. aeruginosa si St. aureus).

Tabelul 3. Extract liofilizat Pell Amar – rezultate analiza incarcatura microbiana si identificari

PARAMETRU TESTAT / Unitate de raportare	LOT 016	LOT 017	LOT 019
Total microorganisme aerobe / gram	1350	2150	22850
Total fungi / gram	< 10	< 10	< 10
Identificare <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / gram	Absent	Absent	Absent
Identificare <i>Staphylococcus aureus</i> / gram	Absent	Absent	Absent

Exemplul 5 Testarea endotoxinelor bacteriene s-a realizat conform European Farmacopoeia Ed.IX capitolul 2.6.14 – Bacterial endotoxins, metoda D si Guidance for Industry, Pyrogen and Endotoxin Testing: Question and Answers, June 2012.

Determinarea cantitativa a endotoxinelor din extractul liofilizat Pell Amar s-a realizat in cadrul Laboratorului de Microbiologie IRASM prin metoda chinetica-cromogenica. Metoda a fost dezvoltata si validata de Charles River (USA), este o metoda biochimica care se bazeaza pe citirea unei modificari de culoare aparute in urma reactiei lizantului (extras din crabul-potcoava) cu endotoxinele, eventual, prezente in proba. Timpul de reactie este invers proportional cu cantitatea de endotoxine si este analizat de catre aparatul PTS Reader. Testele au fost efectuate utilizand cartuse dedicate cu sensibilitate de 5-0.05 EU / ml (EU – endotoxin units).

Inainte de inceperea testelor, pH-ul solutiilor a fost ajustat pentru fiecare lot, la 7. pH-urile initiale ale tuturor loturilor fiind peste 8, fapt care putea influenta rezultatele.

Validarea protocolului propus, in care s-a demonstrat ca proba nu interfereaza cu reactia, s-a realizat pe trei loturi. Primul pas a fost atabilirea unei dilutii de lucru la care nici unul din loturi sa nu interfereze cu reactia. Din acest punct de vedere cele trei loturi au interferat diferit, lotul 016 a interferat cel mai putin, iar lotul 019 a influentat cel mai puternic reactia, fiind nevoie de o dilutie mult mai mare.

Testele au fost efectuate pe dilutia de lucru (dilutia la care probele nu au interferat cu reactia), aceasta fiind dilutia stabilita pentru lotul 019.

Tabelul 4 Extract liofilizat Pell Amar – rezultate analiza endotoxine

PARAMETRU TESTAT / Unitate de raportare	LOT 016	LOT 017	LOT 019
Endotoxine (EU / g produs)	< 100	204.5	387.5



Exemplul 6 Caracterizarea efectelor antimicrobiene (IC_{50}) a loturilor de produs asupra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 si *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)

IC_{50} (inhibitory concentration) este un parametru util in industria farmaceutica, care arata dependenta dintre doza de substanta activa si raspuns.

Valorile IC_{50} au fost dererminate cu ajutorul cititorului de placi SpectraMax i3x (Molecular Devices) conform urmatorului protocol.

Intrucat loturile de produs au prezentat incarcatura microbiana diferita de la lot la lot, iar lotul 019 a prezentat o incarcatura forte ridicata, testele pentru evaluarea proprietatilor antimicrobiene au putut fi efectuate decat dupa sterilizarea loturilor de extract, prin iradiere.

Iradierea probelor, 3x3g extract pentru fiecare lot, repartizate in tuburi de polietilena, s-a realizat la temperatura camerei, intr-un iradiator gama cu o sursa gama de ^{60}Co de tip Gamma Chamber 5000 (BRIT, India) din cadrul departamentului IRASM, IFIN-HH. Probele au fost plasate in pozitia centrala a camerei de iradiere a iradiatorului GC-5000. Debitul de doza utilizat a fost de 6.51 kGy/h, iar doza absorbita de probe este cuprinsa intre intervalul (determinat cu un nivel de incredere de 95%): $D_1 = (7.0 \pm 0.5) \text{ kGy}$

Cate 1 g proba a fost dizolvat in cate 5 ml apa distilata sterila, concentratia finala fiind de 200mg/1ml(w/v).

Bacteriile au fost cultivate in cate 100 ml bulion Muller-Hinton (Merck), in vase de sticla cu volume de 300 ml, la 35-37°C, 150 rpm pentru 18-24 h. Dupa acesta perioada, microorganismele aflate la sfarsitul fazei de crestere exponentiala au fost recuperate prin centrifugare (7000 rpm, 8 min) si spalate in apa peptonata sterila. Dupa ultima spalare, microorganismele au fost resuspendate in bulion Muller-Hinton (MHb), suspensiile obtinute fiind omogene. Suspensiile au fost ajustate la aproximativ 5×10^6 UFC/ml (CFU - unitati formatoare de colonii)

Stabilirea IC_{50} s-a realizat prin metoda microdilutiei in placi cu 96 de godeuri. Mediul nutritiv folosit a fost MHb, iar insamantarile au fost facute dupa cum urmeaza:

- Coloana 1 – blank. 110 μ l mediu MHb;
 - Coloana 2 – 100 μ l MHb si 100 μ l extractul studiat, volum rezultat fiind de 200 μ l, la o concentratia finala de 100 mg/ml. Din aceasta coloana s-au realizat dilutiile binare succesive in coloanele 3-11;
 - Coloanele 3-11 – 100 μ l MHb peste care s-a transferat din godeurile din coloana anterioara 100 μ l mediu amestecat cu peptida. Din godeurile din ultima coloana (11) s-au aruncat cate 100 μ l;
 - In fiecare godeu din coloanele 3-11 s-au adaugat cate 10 μ l suspensie bacteriana.
 - Coloana 12 – control pozitiv, 100 μ l MHb si 10 μ l suspensii bacteriene (aproximativ 5×10^4 UFC / godeu);
- Pentru fiecare lot analizat experimentul s-a realizat in duplicat.

Placile insamantate au fost citite pentru 18 h in mod cinetic in cititorul de placi SpectraMaxi3x. IC_{50} a fost obtinut din curbele de inhibare.

Tabelul 5. Extract liofilizat Pell Amar – concentratiile necesare pentru IC_{50}

Microorganism / lot	LOT 016	LOT 017	LOT 019
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93.42 mg / ml	54.55 mg / ml	86.71 mg / ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	51.89 mg / ml	60 mg / ml	103 mg / ml
<i>Bacillus subtilis</i>	49.25 mg / ml	107.4 mg / ml	277.9 mg / ml

Nici unul dintre loturi nu prezinta proprietati bactericide, in conditiile testate.

Dat fiind faptul ca loturile de produs au valori depasite pentru parametrul „Total microorganisme aerobe” cu un maxim de contaminare intalnit la lotul 019, aceasta contaminare are influenta si asupra parametrului „Endotoxine”, unde putem observa o corelatie intre incarcatura si cantitatea de EU / g de produs.

Valorile IC_{50} variaza, de asemenea de la lot la lot, pentru acelasi microorganism.

Indepartarea endotoxinelor din produs se realizeaza printr-o ultima etapa de filtrare moleculara inainte de etapa de atomizare sau liofilizare.

Exemplul 7 Caracterizarea fizico-chimica a produsului a inclus determinarea compozitiei prin analiza termica simultana TG/DSC (termogravimetrie si calorimetrie diferentia dinamica), spectroscopie vibrationala FTIR si FT-Raman si spectrometrie de masa cu plasma cuplata inductiv (ICP-MS), conform descrierilor urmatoare. De asemenea caracterizarea fizico-chimica a inclus si calificarea la iradiere gamma prin colorimetrie.

Caracterizare globala a produsului s-a realizat prin analiza termica simultana – termogravimetrie (TGA) si calorimetrie diferentia la dinamica (DSC) in atmosfera dinamica de aer sau azot (100 ml/min), proba fiind supusa unui program de temperatura de 10 K/min:

Procese identificate:

- treapta I = 1 % din masa probei – pierdere de apa de cristalizare sau compusi organici volatili (VOC) la temperatura de 130 C;
- treapta a II-a = 2 % din masa probei – pierdere de compusi organici semivolatili (SVOC) pe un domeniu de temperatura cuprins intre 160 si 260 C;
- treapta a III-a = 1 % din masa probei – pierdere de apa sau compusi organici greu volatili sau produ si de piroliza (SVOC) la temperatura de 396 C;

Tranzitii de faza:

- 289 C;
- 520 C – corespunzatoare componentei anorganice;
- 566 C – corespunzatoare componentei anorganice;
- 593 C – corespunzatoare componentei anorganice;

Concluzii referitoare la compozitie:

- compozitia extractului este formata din: 1 % apa sau compusi organici volatili; 3 % componenta organica; 96 % componenta anorganica.
- componenta anorganica sufera minim 3 tranzitii de faza, care in corelatie cu date de analize elementale si spectroscopie vibrationala FT-Raman pot duce la confirmarea anumitor forme de cristalizare ale componentelor anorganice.

Exemplul 7 Caracterizarea structurii moleculare si amprentare produs prin spectroscopie FT-Raman

Parametri experimentali FT-Raman:

Spectrometrul FT-IR clasa Vertex 70, produs de Bruker Optics, Germania, echipat cu un modul Raman (RAM II) a fost utilizat pentru testarea nedistructiva a probelor de namol si extract Pellamar. Configuratia modulului FT-Raman utilizat in experimente: detector cu semiconductor din germaniu ultra pur racit cu azot lichid, sonda mobila FT-Raman, sursa de excitare laser NIR cu lungimea de unda de 1064 nm (Nd:YAG), iar puterea folosita pentru aceste probe a fost de 500 mW. Pentru interpretarea datelor experimentale spectrele FT-Raman au fost prelucrate cu aplicatia software OPUS ver. 6.5 (produs de Bruker Optics, Germania). Pentru fiecare proba au fost realizate cel putin 5 masuratori, iar spectrele prezentate mai jos reprezinta media acestora.

Interpretarea rezultatelor FT-Raman:

In spectrul FT-Raman se poate observa care este frecventa de vibratie a legaturilor, in cazul de fata legaturi covalente. In Figura X se observa benzile caracteristice pentru cele trei tipuri de probe, precum: 2858 cm^{-1} este banda specifica vibratiilor de intindere C-H, intre 1196 cm^{-1} si 1043 cm^{-1} sunt benzile specifice vibratiilor de intindere C-O (prezente cu o intensitate mai mare in cazul extractului Pellamar liofilizat), la 997 cm^{-1} este specifica gruparii vinilice, iar benzile 633 cm^{-1} si 460 cm^{-1} sunt specifice pentru vibratiile de intindere ale gruparilor C-C.

Concluzii referitoare la compozitie:

Spectrul FT-Raman dovedeste existenta unei fractii organice in extract, tinand cont ca sensibilitatea tehnicii nu poate depasi 1% din masa probei analizate, ceea ce este in concordanta cu rezultatele de analiza termica.

Exemplul 8 Caracterizarea compozitiei elementale efectuata prin metoda ICP-MS:

Prelevarea, digestia si testarea probei de produs se realizeaza intr-o camera curata (ISO 8). Prelevarea se realizeaza cu ustensile din teflon (PTFE) reutilizabile. Prepararea probei consta dintr-o etapa de digestie a matricii printr-o metoda adecvata (reactivi si conditii de atmosfera, presiune si temperatura de digestie), de exemplu intr-un cuptor/reactor cu microunde. Mai departe este important ca: domeniul de concentratii ale analitului sa se regaseasca in domeniul de lucru al instrumentului, ceea ce se poate ajusta prin diluarea probei. Digestia (prepararea) probelor se efectueaza cu un amestec de reactivi ultrapuri: acid azotic 60 % (15 mL) si acid clorhidric 30 % (1 mL). Aproximativ 40 ± 4 mg din specimenul test (pulbere) sunt cantarite in fiole din teflon de 40 mL (cu dop perforat pentru egalizarea presiunii), si montate apoi intr-un rastel din teflon (PTFE)

pentru un vas de digestie din teflon (PTFE) de 1 L sau 3.5 L. Vasul este mai departe introdus intr-un sistem inchis si presurizat cu azot pentru eliminarea contaminarii incrucisate si pastrarea elementelor volatile in faza lichida (solutie acida).

Lotul de probe digerate cuprinde: doua replicare din produs "SAMPLE", doua replicare de control pozitiv "QC-SPIKE"(pulbere peste care s-a adaugat o solutie multielement continand concentratii cunoscute din 67 de elemente cu trasabilitate la SRM NIST) si un control negativ "QC-BD"(blanc reactivi de digestie).

Vasul de digestie este inchis etans, presurizat cu azot la presiunea de 40 bari, si supus urmatorului program de temperatura, folosind o putere a microundelor de minim 1500 W:

- pornind de la temperatura ambienta (22 C), rampa la 50 °C in 5 min (5,75 °C/min);
- rampa la 250 °C in 40 min (5,75 °C/min);
- izoterma de 40 min la 250 °C.

Timpul total de digestie rezultat este de 85 min.

Digeratul este apoi racit lent (aproximativ 40 minute), depresurizat la 40 °C, efectuandu-se mai departe 1 dilutie cu solutie de acid clorhidric 0,5 %. Concentratia rezultata este de 1:1375 din specimenul test este injectata in ICP-MS.

Parametrii ICP-MS:

Plasma gas: 15 L/min Ar (6.0 = 99.9999 %);

Carrier gas: 0.7 L/min Ar;

Makeup gas: 0.5 L/min Ar;

Nebulizer pump: 0.1 RPS;

Collision gas: 3 mL/min He (5.5 = 99.9995 %);

Parametrii de achizitie date ai spectrometrului de masa au fost urmatorii: modul de achizitie de date pentru „analiza cantitativa”, timpul de integrare 0,2 s per canal, sau 0,6 s per m/z (au fost monitorizate 3 canale din 20 de canale disponibile per m/z).

In secventa de rulare la ICP-MS probele au fost rulate intercalat cu 2 blancuri de spalare avand matrice similara cu cea a probei, pentru a dovedi lipsa „memoriei” (carry over).

Tabelul 6. Rezultate Screening ICP-MS produs liofilizat versus atomizat

Elem (ppb)	IQL* (ppb)	MQL** (ppb)	liof 11/2015	liof 12/2015	liof 13/2015	liof medie	liof stdev	atom 2013
23 Na	0.028	37.3	491,183,949.0	525,324,276.2	544,133,514.3	520,213,913.2	5.2%	561,572,893.4
34 S	0.025	32.6	88,166,304.8	102,266,233.2	89,281,979.1	93,238,172.4	8.4%	99,572,167.0
24 Mg	0.037	49.0	23,106,785.1	23,537,012.4	25,776,224.0	24,140,007.2	5.9%	25,942,498.2
39 K	0.029	56.6	6,795,797.9	6,938,774.7	7,747,685.0	7,160,752.5	7.2%	7,379,585.1
11 B	0.028	41.7	629,525.3	625,667.3	691,621.6	648,938.0	5.7%	647,914.7
44 Ca	0.049	64.9	132,217.1	169,179.1	159,229.4	153,541.9	12.5%	208,548.0
88 Sr	0.022	57.5	38,316.9	42,005.6	42,768.8	41,030.4	5.8%	56,979.5
56 Fe	0.021	28.0	370.4	567.2	487.6	475.1	20.8%	38,971.5
7 Li	0.160	206.0	30,994.9	30,634.7	33,573.9	31,734.5	5.1%	32,863.5
31 P	0.023	29.7	13,217.1	18,055.9	27,372.1	19,548.3	36.8%	31,603.0
27 Al	0.034	44.0	998.1	7,532.6	2,098.7	3,543.1	98.7%	9,144.5
55 Mn	0.027	35.0	1,092.1	1,239.6	1,235.0	1,188.9	7.1%	7,796.6
52 Cr	0.026	34.7	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	3,679.5
63 Cu	0.027	33.6	81.7	144.6	128.3	118.2	27.6%	1,633.0
60 Ni	0.036	43.9	649.9	671.4	716.7	679.4	5.0%	1,623.7
137 Ba	0.024	28.3	784.9	804.7	901.2	830.2	7.5%	1,077.1
95 Mo	0.027	29.8	1,042.8	697.5	1,005.5	915.3	20.7%	881.6
75 As	0.037	39.0	812.3	818.6	930.7	853.9	7.8%	713.3
47 Ti	0.063	76.1	<MQL	2,703.9	660.4	1,682.2	85.9%	598.2
238 U	0.021	27.5	427.0	420.0	455.9	434.3	4.4%	414.5

77 Se	0.024	28.3	147.4	188.0	358.0	231.1	48.4%	361.0
51 V	0.027	34.4	<MQL	<MQL	332.6	332.6	-	339.3
85 Rb	0.033	35.5	227.1	226.1	262.7	238.6	8.7%	230.8
66 Zn	0.032	42.6	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
202 Hg	0.025	34.2	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
107 Ag	0.025	139.8	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
69 Ga	0.025	28.5	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
9 Be	0.099	143.4	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
193 Ir	0.025	105.5	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
197 Au	0.039	55.6	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
181 Ta	0.023	81.5	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
90 Zr	0.025	41.1	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
72 Ge	0.056	61.1	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
128 Te	0.040	46.9	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
29 Si	0.035	46.4	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
146 Nd	0.039	45.5	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
59 Co	0.032	38.1	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
178 Hf	0.021	44.0	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
101 Ru	0.036	42.2	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
163 Dy	0.034	41.8	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
105 Pd	0.027	32.5	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
208 Pb	0.024	32.5	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
172 Yb	0.031	38.1	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
182 W	0.030	38.0	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
205 Tl	0.028	36.6	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
111 Cd	0.031	36.3	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
232 Th	0.028	35.8	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
167 Er	0.028	34.3	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
147 Sm	0.028	33.5	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
139 La	0.028	31.9	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
121 Sb	0.027	29.7	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
151 Eu	0.025	29.6	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
195 Pt	0.022	29.5	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
118 Sn	0.022	28.9	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
175 Lu	0.023	28.7	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
93 Nb	0.024	28.1	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
159 Tb	0.023	28.1	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
155 Gd	0.023	27.8	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
185 Re	0.022	27.5	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
103 Rh	0.020	27.0	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
169 Tm	0.021	25.8	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
140 Ce	0.022	25.5	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
165 Ho	0.020	25.0	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
133 Cs	0.023	24.6	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL
141 Pr	0.020	23.9	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	-	<MQL

Datorita incadrarii potentiale a produsului drept substanta activa farmaceutic, testarea impuritatilor s-a realizat si conform:

- Latest revision of The United States Pharmacopeial Convention, <232> Elemental Impurities – Limits, and <233> Elemental Impurities – Procedures, <730> Plasma Spectrochemistry / Physical Tests

- ICH Harmonised Guideline – Q3D Guideline for Elemental Impurities, Step 4 version, 16 December 2014

Astfel a fost dezvoltata o metoda analitica pentru 24 de impuritati elementale conform documentelor de referinta mentionate mai sus, rezultatele testelor efectuate fiind prezentate in tabelul urmator:

Testarea s-a facut in loturi de digestie continand 1 blanc (control negativ), 2 replicare proba si 2 replicare proba+spike100% (control pozitiv).

Izotopii tinta pentru determinare impuritati elementale sunt prezentati in tabellele 7 si 8:

Tabelul 7 Izotopi țintă pentru determinarea impurităților elementale

Nr. crt.	Element	Primul izotop tinta fara interferente izobare si abundenta sa naturala	Al doilea izotop tinta fara interferente izobare si abundenta sa naturala
1	Lithium	⁷ Li (92.58 %)	⁶ Li (7.42 %)
2	Vanadium	⁵¹ V (99.75 %)	N/A
3	Chromium	⁵² Cr (83.76 %)	⁵³ Cr (9.55 %)
4	Cobalt	⁵⁹ Co (100.00 %)	N/A
5	Nickel	⁶⁰ Ni (26.22 %)	⁶² Ni (3.65 %)
6	Copper	⁶³ Cu (69.09 %)	⁶⁵ Cu (30.91 %)
7	Arsenic	⁷⁵ As (100.00 %)	N/A
8	Molybdenum	⁹⁵ Mo (15.92 %)	⁹⁷ Mo (9.55 %)
9	Cadmium	¹¹¹ Cd (12.75 %)	N/A
10	Tin	¹¹⁸ Sn (24.03 %)	¹¹⁹ Sn (8.58 %)
11	Antimony	¹²¹ Sb (57.25 %)	N/A
12	Barium	¹³⁷ Ba (11.32 %)	¹³⁵ Ba (6.59 %)
13	Mercury	²⁰² Hg (29.86 %)	²⁰⁰ Hg (23.10 %)
14	Lead	²⁰⁸ Pb (52.30 %)	²⁰⁶ Pb (23.60 %)
ISTD	Scandium	⁴⁵ Sc (100 %)	N/A
ISTD	Yttrium	⁸⁹ Y (100 %)	N/A
ISTD	Bismuth	²⁰⁹ Bi (100 %)	N/A
Class 2B Elemental Impurities			
15	Selenium	⁷⁸ Se (23.52 %)	⁷⁷ Se (7.58 %)
16	Ruthenium	¹⁰¹ Ru (17.07 %)	⁹⁹ Ru (12.72 %)
17	Rhodium	¹⁰³ Rh (100.00 %)	N/A
18	Palladium	¹⁰⁵ Pd (22.23 %)	N/A
19	Silver	¹⁰⁷ Ag (51.82 %)	¹⁰⁹ Ag (48.18 %)
20	Osmium	¹⁸⁹ Os (16.15 %)	¹⁸⁸ Os (13.24 %)
21	Iridium	¹⁹³ Ir (62.70 %)	¹⁹¹ Ir (37.30 %)

22	Platinum	¹⁹⁵ Pt (33.80 %)	¹⁹⁴ Pt (32.90 %)
23	Gold	¹⁹⁷ Au (100 %)	N/A
24	Thallium	²⁰⁵ Tl (70.48 %)	²⁰³ Tl (29.52 %)

Tabelul 8 Rezultatele testelor de determinare impuritati elementale:

Element	ACC% AVG extract	Parenteral Limit	Oral Limit	MQL extract AVG (Factor de dilutie ~1313)	MQL / Parenteral Limit	QC-BK	extract liofilizat lot 11/2015	extract liofilizat lot 12/2015	extract liofilizat lot 13/2015	extract atomizat lot 2013
Li	101%	25000	250000	104783	4	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
V	111%	1000	10000	1357	1	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Cr	108%	110000	1100000	448867	4	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Co	96%	500	5000	1840	4	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Ni	88%	2000	20000	7644	4	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Cu	86%	30000	300000	151946	5	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
As	89%	1500	15000	6242	4	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Se	93%	8000	80000	30559	4	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Mo	112%	150000	1500000	599341	4	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Ru	97%	1000	10000	4185	4	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Rh	92%	1000	10000	4761	5	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Pd	83%	1000	10000	5027	5	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Ag *	47%	1000	10000	9137	9	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Cd	116%	200	2000	766	4	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Sn	119%	60000	600000	188574	3	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Sb	101%	9000	90000	39105	4	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Ba	122%	70000	700000	248696	4	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Os**	113%	1000	10000	1354	1	2412	9166	7231	5224	4150
Ir	112%	1000	10000	3772	4	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Pt	104%	1000	10000	3745	4	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Au	98%	10000	100000	46672	5	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Hg	97%	300	3000	1211	4	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Tl	122%	800	8000	2914	4	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Pb	128%	500	5000	1645	3	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL

Concluzii testare impuritati elementale toxice prin ICP-MS:

Metoda propusa este adecvata pentru testarea impuritatilor elementale in produsul final "crema" (0.8 g proba = factor de dilutie ~70:1), avand o concentratie maxima de 5% extract Pell Amar, exceptand Ag.

Metoda pentru testarea impuritatilor elementale in principiul activ "extract Pell Amar" (0.04 g proba = factor de dilutie ~1400:1):

- datorita MQL > limita parenterala, nu este adecvata. Acest lucru poate fi remediat prin utilizarea unui echipament ICP-MS cu analizor de masa de inalta rezolutie, a carui MQL este mai scazut de 100 de ori pentru impuritati elementale.

- datorita MQL < limita orala, este adecvata exceptand Ag si Os.

Exemplul 9 Caracterizarea fizico-chimica a inclus si calificarea la iradiere gamma prin colorimetrie

Pentru determinarea culorii s-a folosit un spectrofotocolorimetru de reflexie portabil MiniScan XE Plus, produs de HunterLab, cu o geometrie de măsurare $d/8^\circ$, diametrul fasciculului de măsurare 4 mm, componenta speculară inclusă, rezoluție spectrală 10 nm, domeniul indicelui de reflexie 0 - 150 %. Pentru toate măsurările s-a folosit observatorul standard 10° în combinație cu iluminantul D65 (echivalentul luminii solare la amiază în Europa de Vest și de Nord, iluminantul recomandat de CIE). Diferențele totale de culoare au fost evaluate folosind ecuația $dE^* 2000$ [Luo *et al.*, 2001; ISO, 2006], cu un raport luminozitate: saturație, KL:KC, de 2:1. Valorile colorimetrice raportate sunt prezentate în spațiul de culoare CIE Lab [Brainard, 2003] împreună cu valorile indicelui de alb, WI CIE (D65/10).

Rezultate colorimetrie:

Tabelul 9 Coordonatele colorimetrice ale probelor neiradiate si iradiate la 25 kGy

proba	L*	a*	b*	dE* 2000	WI CIE
liofilizat neiradiat	98,17	-1,00	3,03	1,15	81,93
liofilizat iradiat (25 kGy)	96,11	-1,29	2,06		80,97
atomizat neiradiat	98,84	-0,86	3,74	1,14	80,58
atomizat iradiat (25 kGy)	96,77	-1,34	3,01		78,38

Concluzii colorimetrie:

În urma iradierii, atât pentru probele liofilizate, cât și pentru cele atomizate, se constată o scădere a factorilor de reflexie, fără ca să se modifice esențial forma curbei de reflexive – Fig. 7, ceea ce duce la o scădere a celor trei valori CIE Lab, astfel încât probele iradiate sunt mai întunecate, mai verzi și mai puțin galbene – Tabel 9. Aceste diferențe sunt mici, abia observabile, după cum se poate vedea din diferența totală de culoare care, pentru ambele tipuri de probe, este de aproape o unitate dE^*2000 , la limita discriminării observatorului uman standard. În ce privește gradul de alb, în urma iradierii acesta a scăzut cu o unitate pentru proba liofilizată și cu două unități pentru cea atomizată, valori tolerabile dacă le corelăm cu diferențele totale de culoare. Aceste rezultate sunt satisfacatoare pentru sterilizarea finala a produsului farmaceutic prin iradiere.

Caracterizarea farmacotoxicologica a produsului a inclus determinari de toxicitate acuta, citotoxicitate si genotoxicitate, conform descrierilor urmatoare.

Exemplul 10 Determinarea toxicitatii acute s-a efectuat pe șoareci albi, rasa Swiss, masculi și femele, furnizați de Institutul Cantacuzino. Testarea toxicitatii acute a avut ca scop atat determinarea (daca este posibil) a acestui parametru toxicologic, cat si incercarea de orientare pentru stabilirea dozelor pentru administrare cronica (si, in acelasi timp, pentru orientarea dozelor terapeutice).

Administrarea substantei in vederea determinarii DL50 s-a efectuat pe cale intraperitoneala; s-a ales aceasta ruta de administrare intrucat una din formele de administrare urmeaza sa fie injectabila, articular sau periarticular, iar rutele echivalente ar fi intramsuscular sau intraperitoneal. Fata de ruta IM, ruta IP are in sa avantajul ca permite administrarea unor volume (si implicit, cantitati) mai mari de substanta.

Dozele administrate au fost de cate 2 ml de solutie din fiecare lot, la concentratii de 10%, 5%, 1% si 0,1%, echivalent cu 10, 5, 1 si 0,1 g/Kg corp. Animalele au fost observate timp de 7 zile dupa administrare. In mod oarecum surprinzator, administrarea probelor nu a determinat mortalitati la animalele tratate. De asemenea, exceptand o initiala stare de apatie (circa 2-4 ore) la animalele care au primit dozele maxime) nu s-au

inregistrat alte modificari comportamentale. Putem presupune ca aceasta apatie este generata de marirea fluxului sanguin in zona viscerelor, datorita conditiilor de hiperosmolaritate temporara determinate de injectarea produsului la o hipertonie ridicata (10% fata de 0,9%). La necropsie nu s-au observat modificari ale organelor interne.

Concluziile studiului au fost ca produsul este practic inofensiv, conform clasificarii Hodge-Sterner.

Exemplul 11 Testarea toxicității subacute

Pentru acest studiu, s-au utilizat Soareci albi, rasa Swiss albino, de 18-22 g, proveniti de la biobaza Institutului Cantacuzino. Dupa adaptarea in conditiile viuariului INCDCF si repartizarea pe loturi, s-a procedat la administrarea substantelor de testat, dizolvat in apa distilata si sterilizate. Administrarea s-a facut prin injectare IP, ca si in cazul studiului toxicologic, pentru o perioada de 28 de zile. Lotul control a primit injectii IP de ser fiziologic, cu aceeasi frecventa. Tratamentul s-a efectuat pe loturi de 20 animale (10 masculi + 10 femele) pentru fiecare substanta si doza.

Ca si in cazul studiului de toxicitate acuta, nu s-au inregistrat mortalitati corelabile cu doza; practic, totalul de mortalitati a fost pentru respectiva perioada de 5 animale, distribuie 1 mascul la doza 5 g/Kg din Lotul 11, o femela la doza 1 g/Kg corp – lot 4, 1 mascul la lot 13 – 1g/kg corp, 2 masculi (lot control).

In concluzie, produsele nu prezinta risc de toxicitate la doza repetata, si se poate proceda la trecerea la etapa de testare preclinica a eficacitatii.

Exemplul 12 Evaluarea genotoxicității produsului s-a efectuat pe un model experimental animal, respectiv testul micronucleilor din maduva hematogena de soarece (Heddle JA (1993) A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutat Res 18:187–190, Schmid W (1975) The micronucleus test. Mutat Res 31:9–15). Pe scurt, animalele, soareci albi, masculi si femele, de 18-22 g, au fost injectati IP cu o doza de produs (pulbe uscata Pell Amar, obtinuta prin procedeul original – atomizare, si prin procedeul modificat, liofilizare) de 50 si de 500 mg/kg corp, produsul fiind solubilizat in apa bidistilata, aprotogena, la o concentratie de 50, respectiv 500 mg/mL. Drept produs de control s-a administrat ciclofosamidă, la o doza de mg/kg. Animalele au fost sacrificate la 24, respectiv 48 de ore dupa administrare, s-a recoltat maduva hematopoietica din femurul fiecarui animal si s-au realizat frotiuri care s-au colorat cu coloratia May-Grunwald-Giemsa. Pentru fiecare animal, au fost numarate un numar de 1000 celule, de pe trei frotiuri distincte. Rezultatele sunt rezumate in tabelul 11.

Lot	Nr. animale	Time sacrifice	EPC	ENC	EPC/ENC	Nr. micronuclei	% MN	Media % MN	SD
Pell Amar atomizat, Lot 1	3	24	1052.33	253.67	4.33	9.33	0.88	0,89±0,13	0,42
	3	48	1054.67	293.33	3.75	11.67	1.11	1,11±0,09	0,74
Pell Amar liofilizat, lot 11	3	24	1057.33	283.67	3.78	9.00	0.85	0,85±0,10	0,18
	3	48	1058.67	339.67	3.14	11.67	1.10	1,10±0,12	0,88
Pell amar liofilizat, lot 12	3	24	1054.33	274.67	3.91	8.67	0.82	0,82±0,04	0,23
	3	48	1066.00	360.67	3.01	11.67	1.10	1,10±0,20	0,81
Pell amar liofilizat, lot 13	3	24	1050.67	270.33	3.94	10.00	0.95	0,95±0,12	0,81
	3	48	1074.00	358.67	3.04	12.00	1.12	1,12±0,21	0,67
Mitothessal	3	24	1082.00	132.67	8.30	9.67	0.89	0,89±0,05	
	3	48	1043.67	142.67	7.72	11.33	1.09	1,09±0,21	
Mertroposin (Ciclofosamidă)	3	24	1047.67	276.67	3.98	91.33	8.71	8,71±0,27	0,00
	3	48	1032.00	215.33	5.01	128.00	12.36	12,36±1,00	0,01

Din examinarea datelor din tabelul 11, se observa ca nu exista diferente statistic semnificative intre populatiile de celule provenite de la animale tratate cu extractul de namol sapropelic si animalele din grupul control, in timp ce se observa diferente semnificative față de grupul control pozitiv.

Exemplul 13 Testarea toxicității dermale

Testarea s-a efectuat pentru substanța activă „principiul activ Pell Amar”. S-a lucrat în conformitate cu protocolul de testare pus la dispozitie de firma furnizoare a kitului, firma Mattek din Bratislava, distribuitor al kiturilor in vitro produse de compania americana Mattek. (Protocol: In Vitro EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT)). Toate materialele, respectiv piesele de derm reconstituit, mediile de cultură și consumabilele de lucru au fost furnizate de Mattek *(Bratislava, Slovacia). Pe scurt, probele din loturile 16, 17 și 19 au fost solubilizate în tampon fosfat salin, la o concentrație de 8% substanță uscată și filtrate steril prin membrane de 0,2 microni. Piesele de țesut reconstituit au fost plasate în plăci cu 6 de godeuri și, după o precultivare de 24 de ore în mediu DMEM-F12 cu 10% ser fetal, în incubator umidificat 5% dioxid de carbon, s-a procedat la transferul lor plăci noi, s-a adăugat mediu proaspăt, astfel încât suprafața fiecărei piese sa nu fie acoperită cu mediu de cultura. S-a procedat la adăugarea soluției de probă, pe suprafața liberă a implanturilor. S-au plasat plăcile în incubator, iar după o incubare de 2 ore, s-a procedat la spălarea pieselor cu TPS, apoi s-a aplicat reactivul MTT, iar după 3 ore s-au extras formazanii formați, s-au transferat pe o placă cu 96 de godeuri și efectuat citirea viabilității probelor de țesut expuse utilizând un cititor de microplăci Chameleon II (LabLogic, UK). Rezultatele sunt redată în tabelul 12.

Tabelul 12 Rezultatele testului de iritabilitate/corozivitate dermala

Produsul	Media DO	Stdev	p ⁽²⁾	Viabilitate relativa
PBS*, ¹	1,898	0,2908	-	100%
SDS**	0,029	0,0172	-	0
PA Liofilizat*	1,423	0,4653	0,035	74,58%
PA - Atomizat	1,398	0,9436	0,035	73,47%

*Media a trei replicare independente

** Martor pozitiv; 1: martor negativ; 2: testul t student, 2 cozi, distributii homoscedatice, fata de control pozitiv

În conformitate cu criteriile de clasificare, se trage concluzia ca produsele “Extract de namol – Pell Amar – produs liofilizat” si “Extract de namol – Pell Amar – produs atomizat” sunt neiritante (NI), si, in concluzie, pot fi utilizate in conditii de siguranta, in conformitate cu spectrul microbial determinat prin teste microbiologice, si in conformitate cu instructiunile de utilizare ale produselor, in forme condiționate.

Exemplul 14: Stabilirea viabilității/proliferării celulare și a potențialului citotoxic pentru extracte de nămol sapropelic

Experimentele au fost derulate pe linia celulară ATCC CRL-9855, linie de monocite/macrofage umane (Figura 8).

Realizarea culturile celulare a avut loc în mediu complet de cultură Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) ajustat cu 10% ser fetal bovin, 1% antibiotic-antimicotic, 1% supliment 0,1 mM hipoxantina și 0,016 mM timidina (HT), precum și 0,1% β-mercaptoetanol. Culturile celulare au fost incubate la 37°C și în atmosferă de 5% CO₂, cu durată de timp variabilă (48 ore/72 ore), cu concentrații diferite ale extractului de nămol liofilizat sau atomizat (75mM, 15mM, 6mM și 3mM), la densități celulare diferite (5000/10000 celule). Toate probele/controalele au fost lucrate în triplicat. Propagarea și întreținerea culturilor celulare s-a realizat în flask-uri de 25 cm², experimentele s-au derulat în plăci cu 96 godeuri.

Proliferarea a fost evaluată cu kitul CellTiter 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay (MTS), Promega, prin adăugarea a 20 μ L reactiv/godeu, apoi, după o perioadă de incubare de 3 ore a fost citita densitatea optica (DO) la 490nm. Numărul de celule viabile a fost proporțional cu DO citită (Figura 9, Figura 10, Figura 11, Figura 12).

A fost calculata jumătate din concentrația maximală inhibitorie (IC50) pentru a evalua efectele citotoxice ale extractului de nămol la diferite concentrații aplicate. IC50 a fost stabilită prin reprezentarea graficului de absorbantă a concentrațiilor fiecărui tratament aplicat liniei celulare ATCC-CRL-9855 și calculată conform curbelor grafice obținute pe baza relației doză-răspuns.

În urma realizării testului MTS, pe 5000 celule, incubate 48 de ore și ulterior tratate cu extractele liofilizate de namol a fost obținută o viabilitate celulară de 80-85% pentru celulele tratate, la concentrația cea mai mare (diluție 2), în timp ce pentru restul concentrațiilor (diluție 10, 25, 50) a fost înregistrată o viabilitate celulară de 95-100%.

A fost calculat IC50 și au fost obținute următoarele valori: pentru S1 – 2,027 M; pentru S2 – 1,69 M; pentru S3 – 1,67 M; pentru S4 – 1,63 M; pentru S5 – 2,13 M; pentru S6 – 1,54 M; pentru S7 – 1,77 M; pentru S8 – 1,69 M; pentru S9 – 1,62 M; pentru S10 – 1,75 M; pentru S11 – 2,21 M; pentru S12 – 1,64 M; pentru S13 – 2 M.

În urma realizării testului MTS, pe 10000 celule, incubate 48 de ore și ulterior tratate cu extractele liofilizate de namol a fost obținută o viabilitate celulară de peste 80% la concentrația cea mai mare, în timp ce pentru restul concentrațiilor viabilitate celulară a fost de peste 90%.

A fost calculat IC50 și au fost obținute următoarele valori: pentru S1 – 1,72M; pentru S2 – 1,83M; pentru S3 – 1,58 M; pentru S5 – 1,68M; pentru S6 – 1,72M; pentru S7 – 1,79M; pentru S8 – 2,02M; pentru S9 – 1,79M; pentru S10 – 1,83M; pentru S11 – 2,12M; pentru S12 – 1,63M; pentru S13 – 2M.

Rezultatele IC50 pentru 5000 de celule incubate 72 de ore au fost: 1,39M pentru S1; 1,51M pentru S2; 1,37M pentru S3; 2,34M pentru S4; 1,52M pentru S5; 1,77M pentru S6; 2,09M pentru S7; 3,14M pentru S8; 1,44M pentru S9; 0,4M pentru S10; 1,41 M pentru S11; 1,93 M pentru S12 și 1,4 M pentru S13.

Rezultatele IC50 obținute pentru 10000 de celule incubate 72 de ore au fost 1,34M pentru S1; 1,36 M pentru S2; 1,37 M pentru S3; 1,55 M pentru S4; 1,64 M pentru S5; 2,14 M pentru S6; 1,83 M pentru S7; 1,88 M pentru S8; 1,42 M pentru S9; 3,35 M pentru S10; 1,58 M pentru S11; 35 M pentru S12 și 1,37 M pentru S13.

Datele obținute până în prezent indică existența unor efecte citotoxice relativ scăzute la concentrațiile cele mai mari ale extractelor de nămol analizate. La concentrații mai mici viabilitatea celulară a fost peste 95%.

Rezultatele conduc la concluzia că extractul de namol sapropelic terapeutic produs conform invenției, are o toxicitate redusă și poate fi utilizată fără riscuri ca substanța activă pentru produsele dermato-cosmetice.

Exemplul 15: Evaluarea efectelor anti-inflamatoare

Experimentele au fost derulate pe linia celulară ATCC CRL-9855, linie de monocite/macrofage umane (Figura 13). Realizarea culturilor celulare a avut loc în mediu complet de cultură Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) ajustat cu 10% ser fetal bovin, 1% antibiotic-antimicotic, 1% supliment 0,1 mM hipoxantina și 0,016 mM timidina (HT), precum și 0,1% β -mercaptoetanol. Culturile celulare au fost incubate la 37°C și în atmosferă de 5% CO₂. Propagarea și întreținerea culturilor celulare s-a realizat în flask-uri de 25 cm², experimentele s-au derulat în plăci cu 24 godeuri, cu o densitate de 100.000 celule (la inițiere). După 24 ore de incubare peste celule a fost adăugat extractului de nămol liofilizat sau atomizat (diferite concentrații - diluție 10 și 50) și lipopolizaharide (LPS), iar supernatantul a fost recoltat la 4 și respectiv 23 ore de la adăugarea extractelor. Controale: celule netratate, celule tratate cu LPS – 50 ng/mL și celule tratate cu dexametazonă – 40 ng/mL. Toate probele/controalele au fost lucrate în duplicat. Probele au fost alicotate și păstrate la -80° C până la analiză.

Din probele prelevate au fost analizate sub-probe (alicote) prin metoda xMAP – platforma Luminex200 (Luminex Corp, Austin, TX 78727, USA). În vederea analizei, s-a utilizat kitul multiplex Milliplex MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, HCYTOMAG-60K (Merck-Millipore, Billerica, MA 01821, USA) cu următorii analiți: IL-10, IL-1beta, IL-6, IL-8, RANTES, TNF α , GCSF, GMCSF, IL-12p70, IL1 α , IL-4 și MIP1 α , conform instrucțiunilor producătorului. Cuantificarea analitelor a fost realizată pe platforma de multiplexare Luminex200 pregătită în prealabil, cu softul dedicat xPONENT 3.1;

Au fost analizate intensitățile fluorescente medii (MFI) utilizând curba 5-Parameter Logistics pe platforma multiplex Luminex200. Nivelul de expresie a moleculelor analizate simultan a fost obținut prin interpolarea valorilor MFI rezultate în urma achiziției probelor pe curbe generate de software-ul xPONENT 3.1. Pentru toate curbele 5-PL, coeficientul de regresie (R²) a prezentat valori apropiate de 1.

S-a procedat la analiza corelației dintre concentrația normalizată a citokinelor în grupurile „Tratat D10”, „Tratat D50”, „Control”, „Control dexametazona”, „Control LPS” utilizând ca instrumente statistice analiza Pearson, folosind un pachet de calcul statistic adecvat. Ca valoare prag de semnificație se consideră $p < 0,05$. În urma analizei, s-a identificat o semnătură moleculară caracterizată prin următoarele:

- inițial, tratarea celulelor doar cu extract de nămol sapropelic nu a generat un răspuns inflamator;
- ulterior, tratarea celulelor cu lipopolizaharide (LPS) și cu extract de nămol sapropelic a condus la evidențierea modulării eliberării de citokine, respectiv scăderea eliberării de citokine pro-inflamatoare la concentrații crescute de nămol, generând astfel profiluri caracteristice unei activități anti-inflamatoare – sub-expresie a citokinelor pro-inflamatoare IL-6, TNF α , MIP-1 α și IL-1 α în supernatantul obținut la concentrația D10, față de concentrația D50 și față de loturile martor;

Profilul de expresie al citokinelor și factorilor de creștere este redat în figurile 13-16.

Analiza profilului de expresie a citokinelor pro-inflamatoare a evidențiat existența unor efecte anti-inflamatoare la concentrațiile cele mai mari ale extractelor de nămol analizate. Rezultatele conduc la concluzia că extractul de nămol sapropelic terapeutic, produs conform invenției, are efecte anti-inflamatoare și poate fi utilizat ca substanță activă pentru produse dermatocosmetice și dispozitive medicale.

Revendicări

1. Procedeu de obținere a unui produs activ din namol sapropelic, constând din prepararea extractului apos de nămol sapropelic, filtrarea extractului și aducerea extractului în stare solidă prin liofilizare, caracterizat prin aceea că extractul total apos, tratat prin metode fizice, este supus liofilizării în următoarele condiții

- înghețare la -20°C;
- Liofilizarea principală, Presiune = 0,04 mbar → temperatură = - (minus) 50°C;
- Liofilizare finală Presiune = 2,6 mbar → temperatură = - (minus) 10°C; și

prin aceea că Cu o compoziție preponderent minerală (min. 95%), macroelementele principale fiind Na, S, Mg, K, Cl, O, iar principalele oligoelemente, Ca, B, Sr, Li, P, Mn, în vederea utilizării în preparate farmaceutice, dispozitive medicale și produse dermocosmetice, cu efecte antiinflamatoare, utilizabil în tratamentul artrite reumatoide.

2. Procedeu de sterilizare a unui extract de nămol sapropelic, obținut conform revendicării 1, prin iradiere cu radiații gamma, între 10 și 25 KGrey, în vederea utilizării acestuia în preparate injectabile, cu utilizare în tratamentul artritei reumatoide.
3. Utilizarea unui set de metode de caracterizare analitice, microbiologice și farmacologice.

Desene

Fig. 1 Schema-flux a procesului tehnologic de realizare a extractului de nămol sapropelic

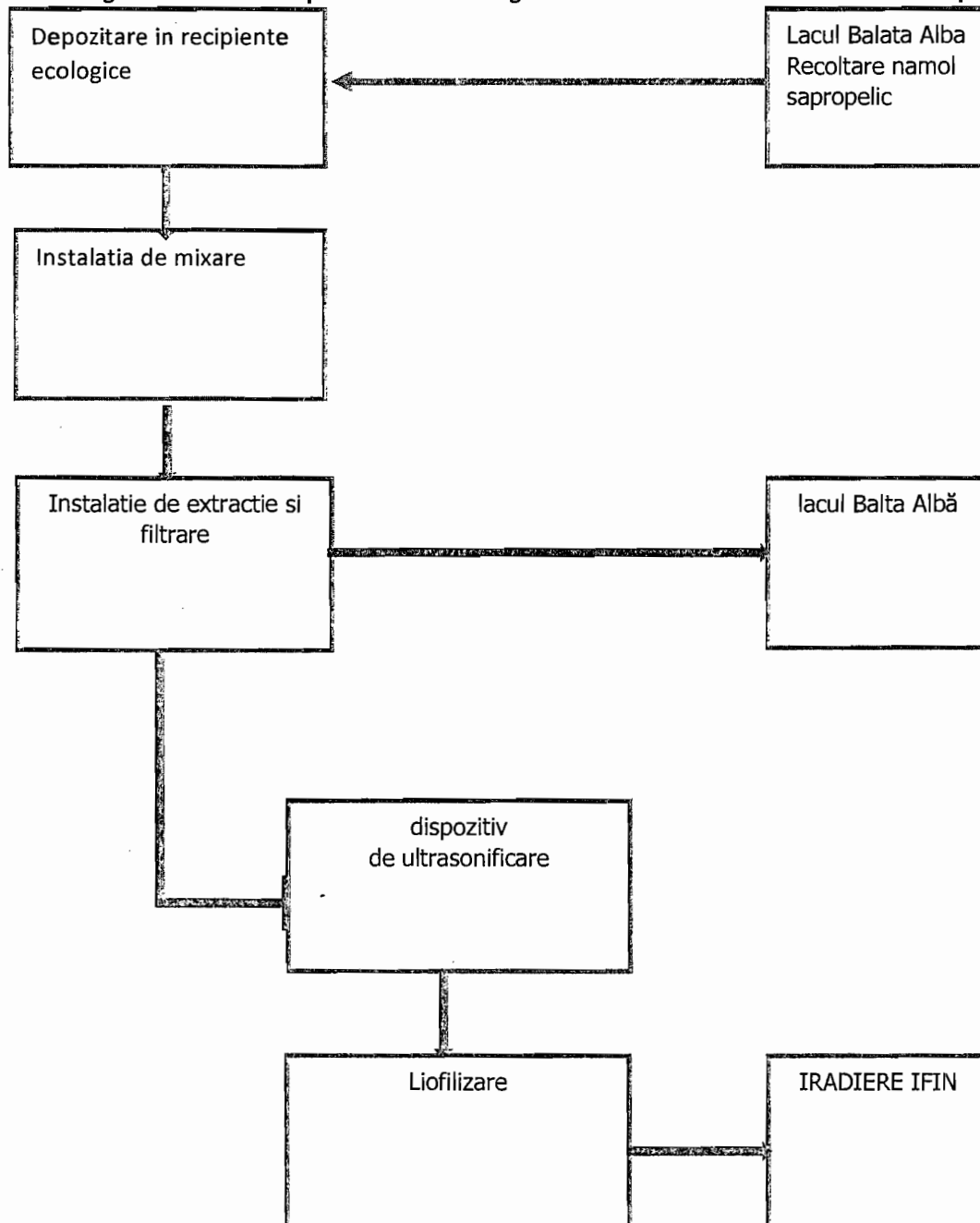


Figura 2 .

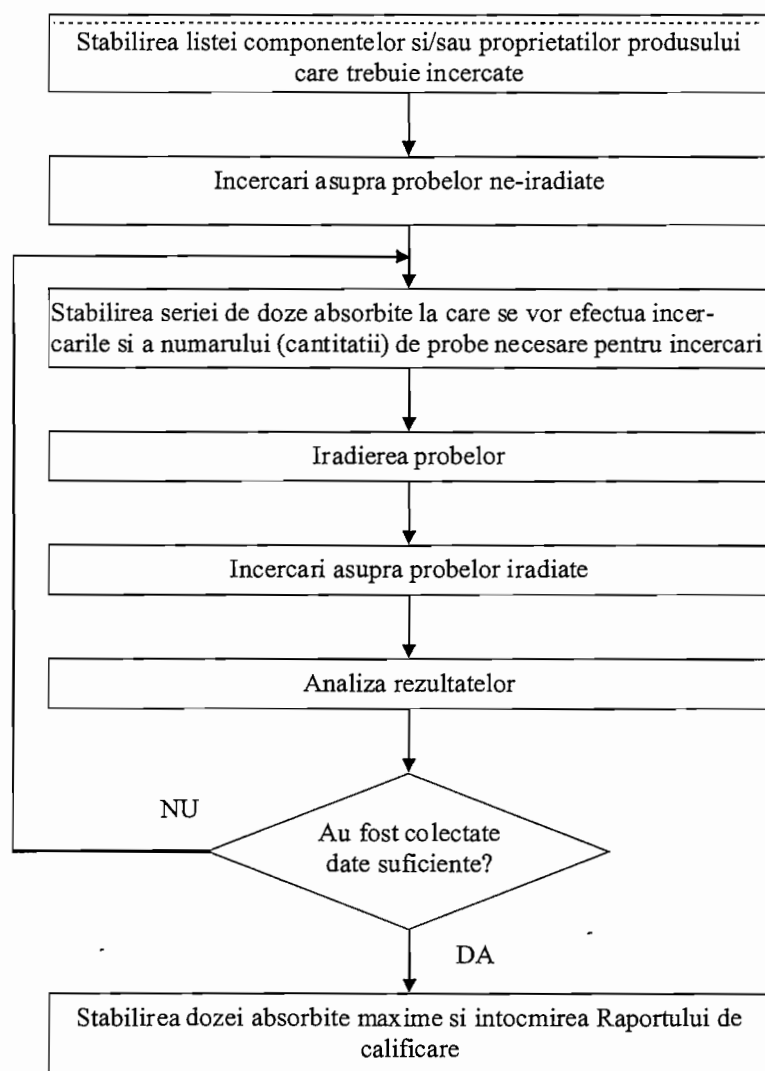
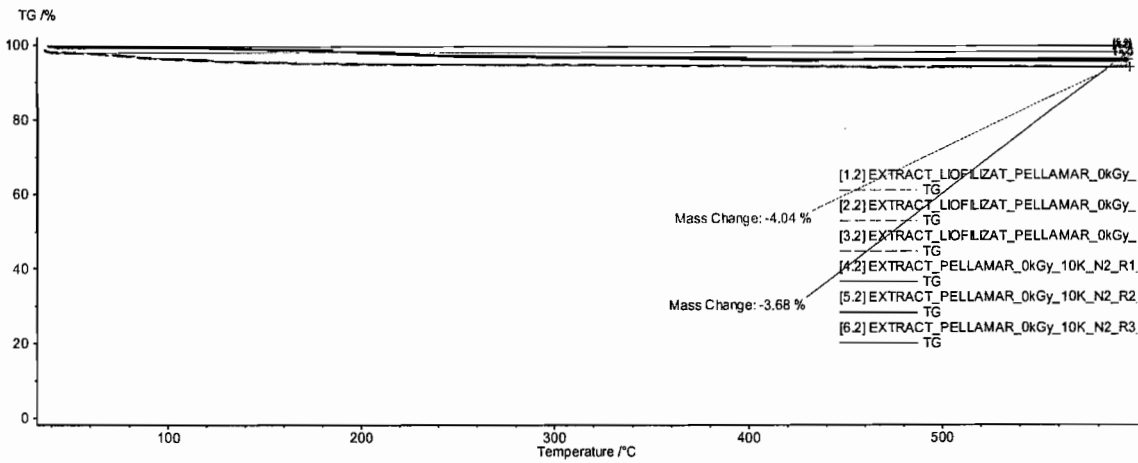


Figura 3

a)



b)

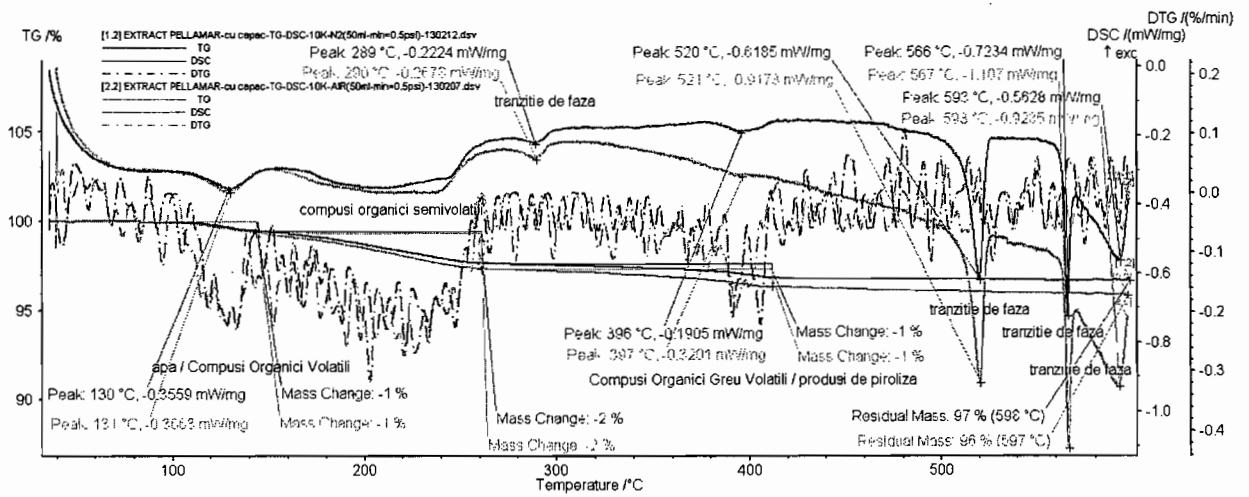


Figura 4:

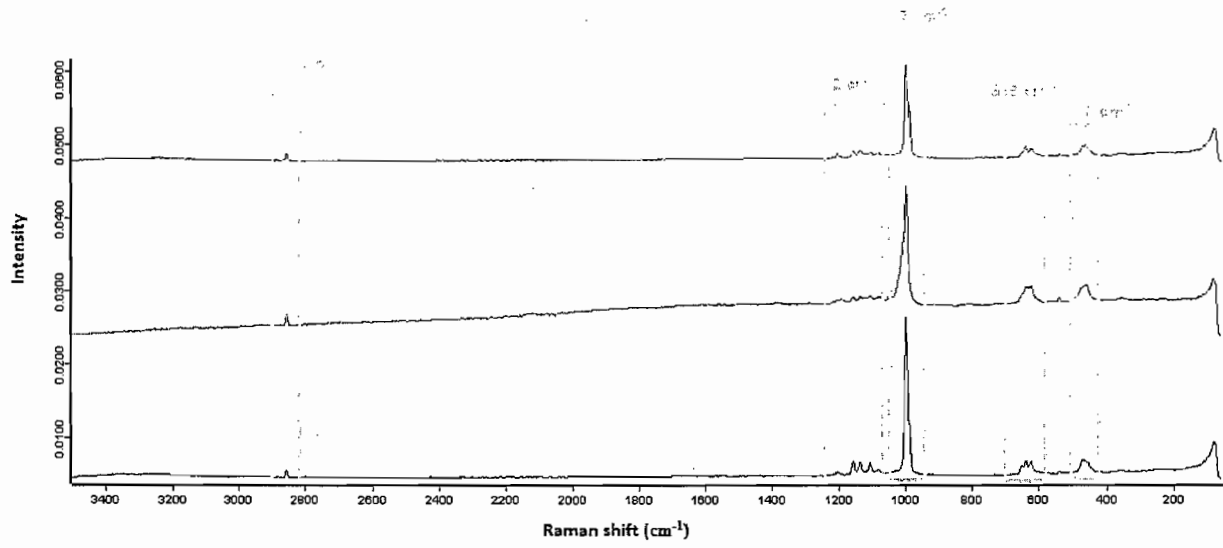


Figura 5.

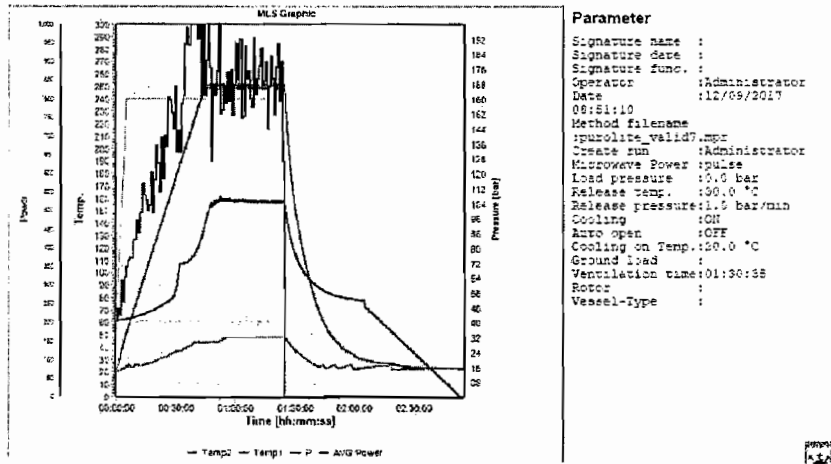
MLS Microwave Report

Systemtest: MWT AG

Application: pressPREP

Report 28/09/2017 05:46:47

Filename: DA_1_FIN_2_LIPC_1_sml_RAP_INCERC_2017092017MicrowavePELLAMARPELLAMAR_valid7_30 MWT AG



Remark:

MW Program

Step	Time [hh:mm:ss]	Temp 1 [°C]	Temp 2 [°C]	Press [bar]	Engery [Watt]
1	00:05:00	50	60	160	1,500
2	00:40:00	250	60	160	1,500
3	00:40:00	250	60	160	1,500

Fig. 6

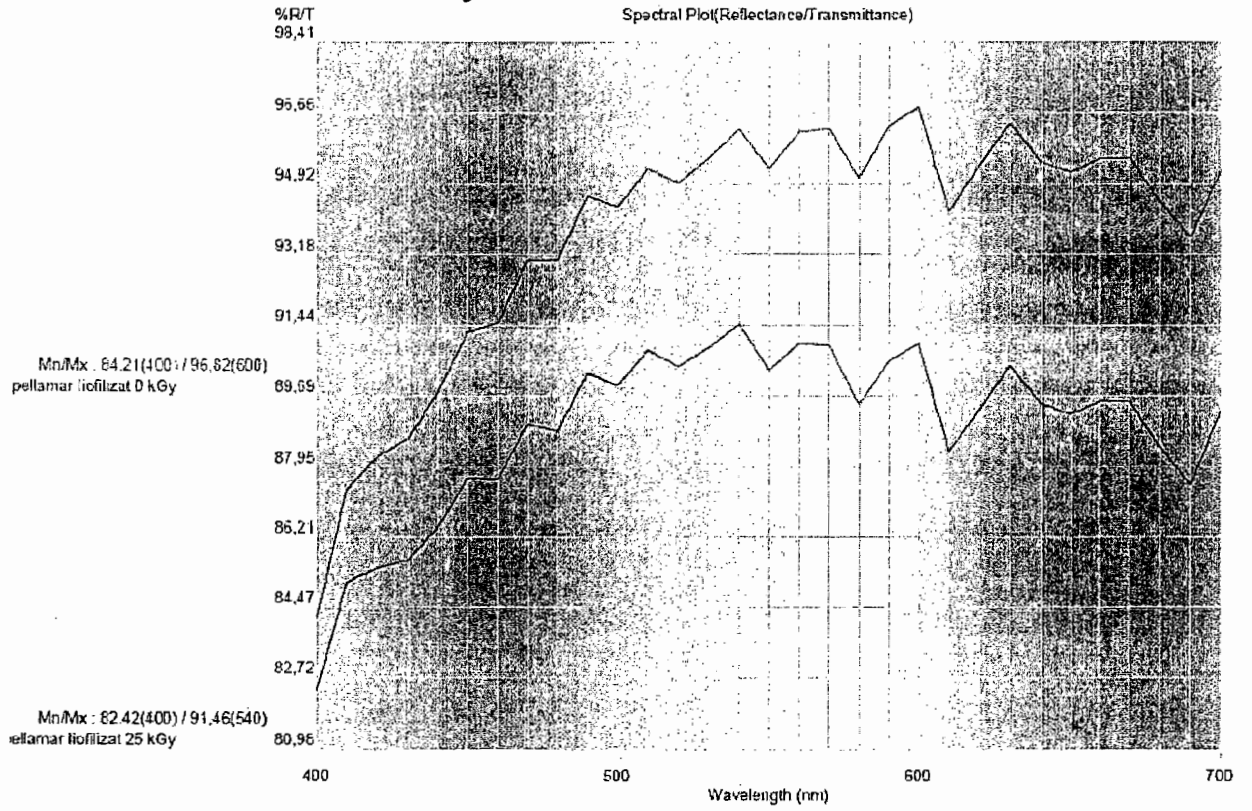


Fig.7

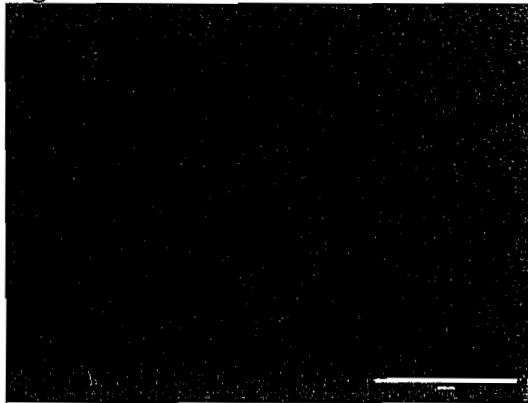


Fig. 8

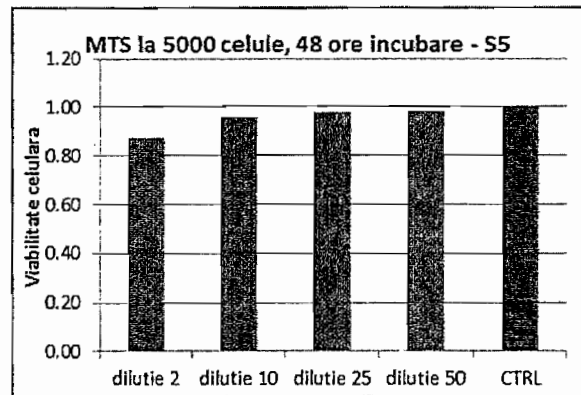
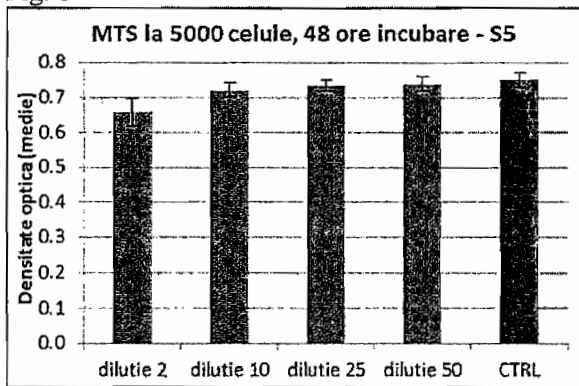


Fig. 9

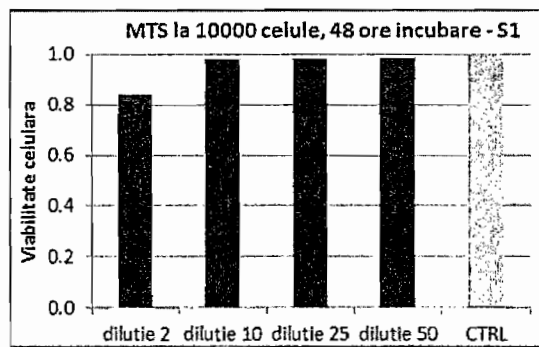
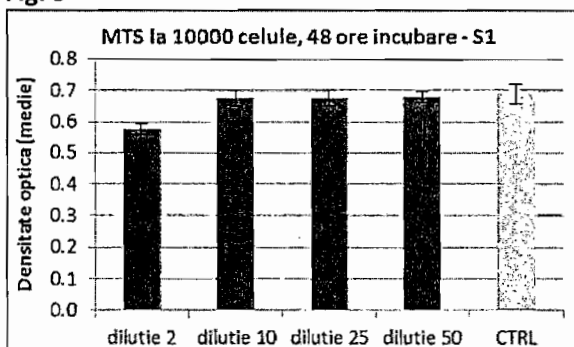


Fig. 10

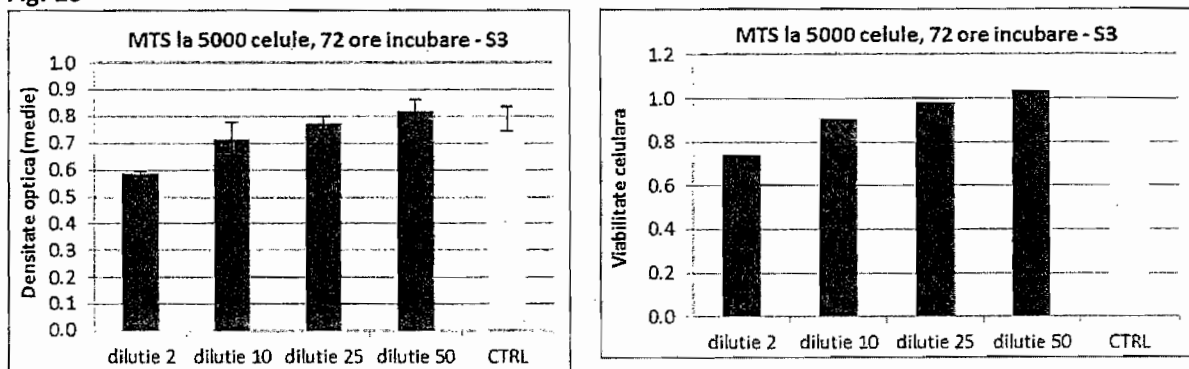


Fig. 11

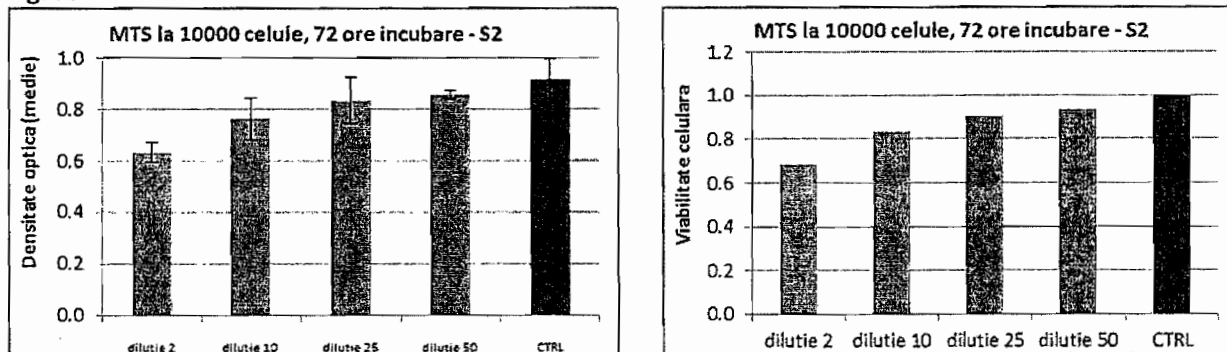


Fig. 12

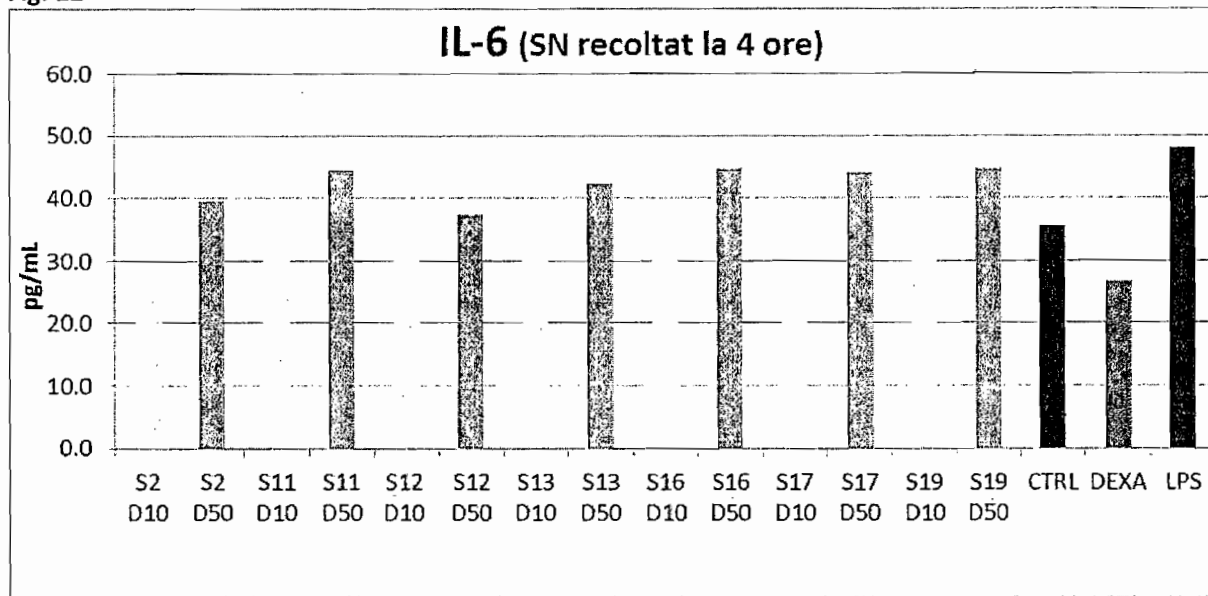


Fig. 13

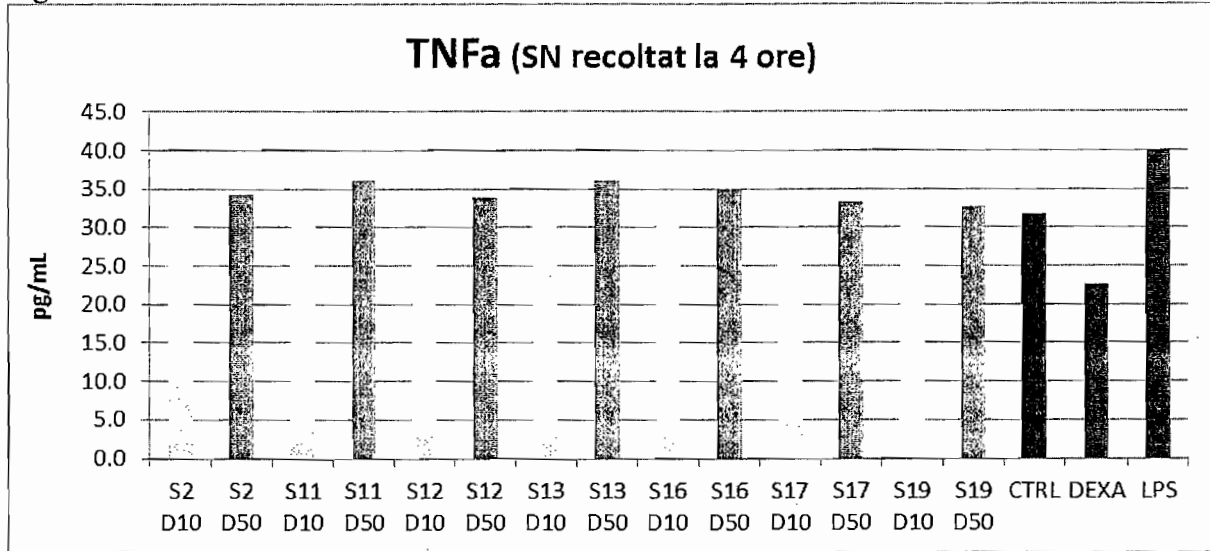


Fig. 14

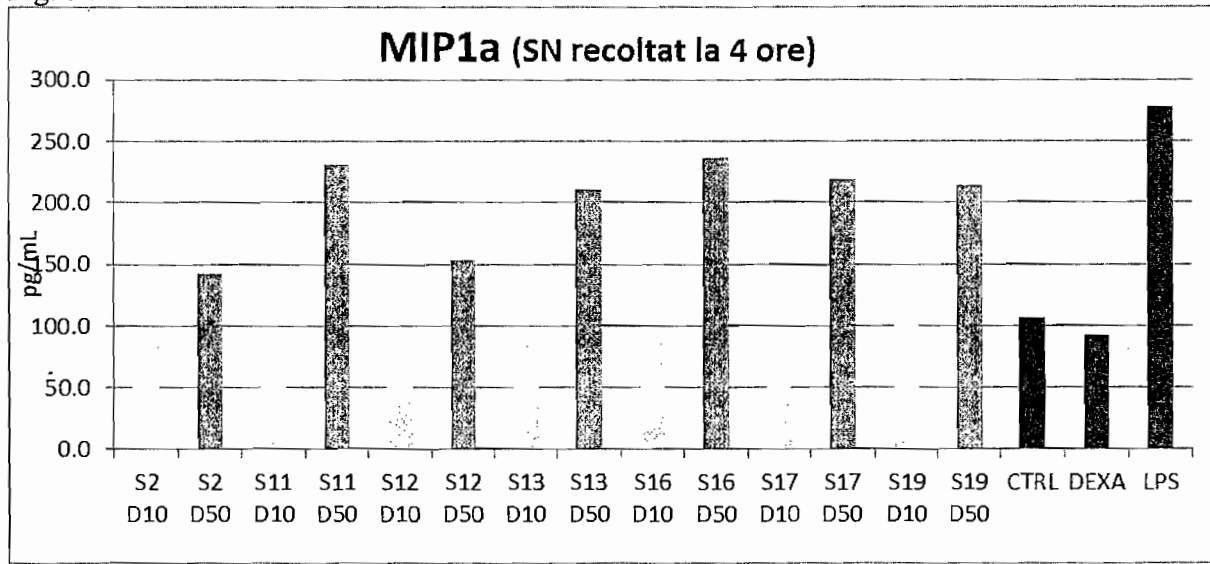


Fig. 15

