



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 01132

(22) Data de depozit: 18/12/2017

(41) Data publicării cererii:

28/06/2019 BOPI nr. 6/2019

(71) Solicitant:

• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE  
CHIMICO-FARMACEUTICĂ - ICCF  
BUCUREȘTI, CALEA VITAN NR.112,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

• NICHITA CORNELIA,  
STR. ȘTIRBEI VODĂ, NR.107, BL.C24,  
SC.1, ET.8, AP.29, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• NEAGU GEORGETA, STR. MEHEDIŢI  
NR.4, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• NIȚĂ SULTANA, STR. BARBĂT VOIEVOD  
NR. 21, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(54) SOLUȚIE NAZALĂ ANTIINFLAMATOARE PE BAZĂ  
DE EXTRACTE VEGETALE ȘI NANOPARTICULE  
DE ARGINT, ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTEIA

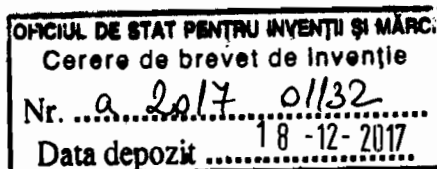
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un produs fitoterapeutic de tip soluție nazală antiinflamatoare standardizată și la un procedeu de obținere a acesteia. Produsul, conform invenției, are un conținut standardizat de flavonoide de 1,22...2,48% exprimat în rutin, 2,46...3,72% conținut de polifenoli totali, exprimat în acid galic, și 1,38...2,26% conținut de acizi polifenolicarboxilici, exprimat în acid cafeic. Procedeu, conform invenției, constă în combinarea extractelor vegetale selective obținute din speciile *Ocimum basilicum L.*, *Rosmarinus officinalis L.*, *Mentha piperita L.*, și *Eucalyptus globulus Labill L.(folium)* în

părți în volum 1:1:1:4...2:1:3:4 și omogenizarea acestora timp de 5...12 min la o viteză de 400...100 rot/min, urmat de adăugarea de nanoparticule de argint în concentrație de 2,5...5 ppm, după care amestecul este ultrasonat în ser fiziologic steril 0,9% NaCl, timp de 15...30 min la temperatura de 25°C, rezultând un produs cu activitate antiinflamatoare și lipsit de toxicitate.

Revendicări: 8





## SOLUTIE NAZALA ANTIINFLAMATOARE PE BAZA DE EXTRACTE VEGETALE SI NANOPARTICULE DE ARGINT SI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTEIA

Inventia se refera la obtinerea unui nou produs natural cu actiune antiinflamatoare, pe baza de extracte vegetale selective si nanoparticule de argint, cu aplicatii directe in sfera afectiunilor ORL precum si in alte afectiuni in care este implicat mecanismul inflamator si la procedeul de obtinere al acestuia. Produsul fitoterapeutic prezinta actiune antiinflamatoare semnificativa si o compozitie chimica standardizata, avand la baza principii active vegetale de tip - acizi polifenolicarboxilici, polifenoli totali si derivati flavonoidici, uleiuri esentiale, extrase din specile vegetale: *Ocimum basilicum* L.( *folium*), *Rosmarinus officinalis* L. (*folium*), *Menta piperita* L. (*folium*), *Eucaliptus globulus* Labill L.(*folium*) si nanoparticule de argint cu dimensiune standardizata.

Este cunoscut ca părțile aeriene (*folium*) aparținând speciei vegetale *Ocimum basilicum* L.( *folium*), contin 0,2 - 1 % ulei volatil (camfor, cineol, eugenol, estrargol- pana la 80%, linalol pana la 50%, sitosterol, anetol, ocimen, cineol, sescviterpene, derivați fenilpropanici), derivați flavonici (glicozide ale quercetolului și kaempferolului), acid cafeic, acid caftaric acid gentisic, acid chlorogenic, acid p-coumaric, acid ferulic, acid sinapic, taninuri, fitosteroli, saponine, principii active care genereaza *acțiune farmacodinamică* antisepetica, antispastica si antiinflamatoare [1, 2].

Este cunoscuta ca părțile aeriene (*folium*) aparținând speciei *Rosmarinus officinalis* L. au o compozitie chimica bogata in uleiuri esentiale, compusi diterpenici (carnosol, acid carnosolic, rosmanol, rosmadial), triterpene ( $\alpha$ - and  $\beta$ -amirenol, betulinol, acid ursolic, acid oleanolic), flavonozide (diosmetina, diosmina, derivati ai apigenolului si luteolului) acizi polifenolicarboxilici (acid rozmarinic, cafeic, gentisic, vanilic, siringic, galic) si componente anorganice care ii confera proprietati curative prin mecanismele de actiune biologice implicate si absenta toxicitatii [3].

Este cunoscut faptul ca părțile aeriene (*folium*) aparținând *specie Mentha piperita* L. plantă ierbacee, perenă, originară din zona balcanică și nordul Europei, prezinta o *compoziție chimică complexă* formata din ulei volatil, taninuri și acizi fenolici (cafeic, clorogenic, ferulic, p-coumaric), flavonoide (glicozide ale rutinei și quercetolului, triterpene pentaciclice (acid ursolic și oleanolic), lipide, vitamina C, acizi organici (piruvic și  $\alpha$ -cetoglutamic), betaină, colină. Deasemeni sunt cunoscute utilizările terapeutice multiple ale speciei vegetale *Mentha piperita* L. ( *folium*) în infecții gastro-intestinale, balonări abdominale, diskinezii biliare, dureri reumatice, afecțiuni dermice și în unele afecțiuni ale mucoasei nazale și ale căilor respiratorii superioare datorita proprietatilor decongestionante [4].

Este cunoscuta ca părțile aeriene (*folium*) aparținând speciei vegetale *Eucaliptus globulus* Labill L..( *folium*), contin 1,6 - 5 % ulei volatil, tanin, rezine, fitosteroli, triterpene, flavone: eucaliptina, sideroxifilozida, engelitozida, quercitrozida, izoquercitrozida, rutozida, 3-ramnozida si 3-rutinozida kaempferolului, derivati ai stilbenului (piceidozida, raponticozida, astringinozida), principii active care genereaza o

acțiune farmacodinamică antiinflamatoare și antiseptică asupra căilor respiratorii (ulei volatil, tanin), având utilizări terapeutice deosebite în afecțiunile respiratorii și ORL (sinuzite, rinofaringite, laringite, amigdalite) [5,6].

Este cunoscută în literatura de specialitate importanța compusilor polifenolici, a flavonozidelor, și a acizilor polifenolcarboxilici ca principii active vegetale eficiente în lupta împotriva procesului inflamator, activitatea lor specifică datorându-se proprietăților remarcabile de scavenger de radicali liberi și inhibiției unor enzime cheie implicate în mecanismele inflamației.

De asemenea sunt cunoscute în literatura de specialitate proprietățile excepționale ale nanoparticulele de argint cum să fie acțiunea antibacteriană și antiinflamatorie, aceste nanoparticulele metalice, fiind utilizate pentru o gamă largă de aplicații biomedicale cum sunt: produsele farmaceutice, transportul medicamentelor, terapia cancerului, detectia moleculară, diagnosticul molecular [7, 8].

### Bibliografie

1. SJ Lee, K Umamo, T Shibamoto, KG Lee (Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties) - *Food Chemistry*, **91**, p. 131–137(2005);
2. M Ismail, Central Properties and Chemical Composition of *Ocimum basilicum*. Essential Oil, *Pharmaceutical biology*, **44**(8), p. 19–626 (2006);
3. Bibi Sadia, Shazia Irfan and Zahoor Ahmed Bazai, Chemical composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves under salt stress, *Pure Appl. Biol.*, **5**(2)p. 355-360 (2016);
4. Diane L. McKay and Jeffrey B. Blumberg, A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Peppermint Tea (*Mentha piperita* L.), *Phytother. Res.* **20**, p.619–633 (2006);
5. Aihua Song, Ying Wang, Yanmei Liu, Study on the chemical constituents of the essential oil of the leaves of *Eucalyptus globulus* Labill from China, *Traditional Medicines*, **4** (4), (2009);
6. G. Vázquez, E. Fontenla, J. Santos, M.S. Freire, J. González-Álvarez, G. Antorrena, Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts, *Industrial Crops and Products*, **28**(3), p. 279–285 (2008);
7. Kenneth K. Y. Wong, Stephanie O. F. Cheung, Liuming Huang, Jun Niu, Chang Tao, Chi-Ming Ho, Chi-Ming Che, and Paul K. H. Tam, Further Evidence of the Anti-inflammatory Effects of Silver Nanoparticles, *ChemMedChem* **4**, p.1129 – 1135(2009);
8. Ionel Popa, Ioana-Maria Nicola, Victoria Ceara, Cristian Boboc, Cristiana Alexandra Danes, Silver Nanoparticles Synthesis and Applications, *Electrotehnica, Electronica, Automatica (EEA)*, **64**(2), p.104-112 (2016);

Sunt cunoscute procedee de obținere a extractelor vegetale, cum ar fi macerarea, percolarea, percolarea fracționată, diacolarea, evacolarea, extractia solid-lichid.

Produsele cunoscute și procedeele de obținere a acestora prezintă o serie de dezavantaje cum ar fi: conținut de principii active vegetale nestandardizate, dimensiunea nestandardizată a nanoparticulelor de argint în cazul produselor și existența unor aspecte legate de stabilitatea nanoparticulelor de argint și costurile ridicate, în cazul procedeelor.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în aceea că se obține un produs fitoterapeutic, respectiv o soluție nazală pe baza de extracte vegetale selective și nanoparticule de argint, standardizat lipsit de toxicitate, care prezintă activitate antiinflamatoare semnificativă, printr-un procedeu special conceput care să permită atât standardizarea principiilor active vegetale cât și standardizarea și stabilitatea fizico-chimică a nanoparticulelor de argint.

Produsul conform inventiei este constituit prin combinarea optima a patru fractii selective obtinute din speciile vegetale *Ocimum basilicum* L.( *folium*), *Rosmarinus officinalis* L. (*folium*), *Menta piperita* L. (*folium*), *Eucaliptus globulus* Labill L.(*folium*), prin prelucrarea extractelor hidroalcoolice brute 50...70% alcool etilic (v), obtinute prin extractie solid-lichid, urmata de prelucrare prin concentrare pana la indepartarea completa a alcoolului etilic si omogenizarea in proportii bine definite a acestor extracte selective cu nanoparticule de argint sintetizate prin bioreducerea solutiilor apoase de nitrat de argint de diferite concentratii, cu ajutorul biomoleculilor polifenolice din compozitia extractele apoase obtinute din aceleasi specii vegetale mentionate mai sus.

Procedeul de obtinere a produsului fitoterapeutic de tip solutie nazala antiinflamatoare standardizata, conform inventiei consta in combinarea a patru extracte vegetale selective ES1:ES2:ES3:ES4 intr-un raport de asociere, parti in volume de 1:1:4...2:1:3:4 (v/v/v/v) si omogenizarea acestora prin ultra-mixare cu un echipament de tip Ultra-Turrax Digital High-Speed, timp de 5...12 minute la viteza de 400... 1000 rot/min, urmat de adausul de nanoparticule de argint in concentratie de 2.5...5 ppm, obtinute prin reducerea a solutiilor apoase de nitrat de argint in prezenta extractelor apoase obtinute din speciile *Ocimum basilicum* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Menta piperita* L., *Eucaliptus globulus* Labill L.(*folium*) si ultrasonarea amestecului in 100 mL ser fiziologic steril 0.9% NaCl timp de 15...30 minute. la temperature de 25 °C.

*Procedeul de obtinere a celor patru extracte selective este urmatorul:*

Extracte selective ES1(extract selectiv obtinut din specia vegetala *Ocimum basilicum* L), ES2(extract selectiv obtinut din specia vegetala *Rosmarinus officinalis* L), ES3(extract selectiv obtinut din specia vegetala *Menta piperita* L.), ES4(extract selectiv obtinut din specia vegetala *Eucaliptus globulus* Labill L. *folium*) care se prezinta sub forma lichida, cu miros si culoare caracteristice, sunt obtinute in urma procesului de extractia clasica solid – lichid a speciilor vegetale uscate si macinate si prelucrate in mod individual, utilizand solvent alcool etilic 50...70%(v), in raport material vegetal: solvent = 1:12...1:20 (m/v) la temperatura de reflux a solventului timp de 2...3 h, in 2...4 cicluri extractive, urmat de stationare la temperatura scazuta de 4 °C, filtrarea la vid pe hartie de filtru industrial ultra-pura cu un continut de  $\alpha$ -celuloza 100%, netratata chimic, decolorarea cu carbune activ 1%, reunirea filtratelor si prelucrarea acestora prin concentrare la vid sub presiune redusa cuprinsa intre 1.1...1.3 kPa la o temperatura cuprinsa intre 30...40 °C, pana la eliminarea totala a alcoolului etilic.

*Procedeul de obtinere a nanoparticulelor de argint este urmatorul:*

Nanoparticulelor de argint se obtin prin aplicarea tehnologiei de sinteza care se realizeaza prin reactia de reducerea a solutiilor apoase de nitrat de argint de diferite concentratii (de ordin milimolar) in prezenta extractelor vegetale apoase obtinute din speciile de plante medicinale: *Ocimum basilicum* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Menta piperita* L., *Eucaliptus globulus* Labill L.(*folium*) si evaluate din punct de vedere al dimensiunii si al stabilitatii fizico-chimice in timp, pe durata a 6 luni, prin tehnica de difuzie dinamica a luminii.

Procedeul conform inventiei inlatura dezavantajele produselor cunoscute prin aceea ca are un continut standardizat de flavonoide 1.22...2.48 %, exprimat in rutin polifenoli totali 2.46...3.72% exprimat in acid galic, acizi polifenolicarboxilici 1.38...2.26 % exprimat in acid cafeic si dimensiune standardizata a nanoparticulelor de

argint acestea avand volumul hidrodinamic de 87.90...112.1 nm, este lipsit de toxicitate rezultatele obtinute evidentiand absenta citotoxicitatii atat pe linia de fibroblaste murine L929(ATCC CRL-6364) cat si pe linia de monocite umane SC(ATCC CRL-9855) si prezinta o activitate antiinflamatoare semnificativa, determinata prin evaluarea productiei de oxid nitric in macrofagele stimulate cu LPS (lipopoli-zaharide) si determinarea nivelului citokinelor pro-inflamatorii IL-1beta si TNF-alfa eliberate de monocitele/macrofagele stimulate cu LPS(lipopoli-zaharide).

Procedeul conform inventiei inlatura dezavantajele procedeelor cunoscute prin aceea ca extracte selective ES1(extract selectiv obtinut din specia vegetala *Ocimum basilicum* L), ES2(extract selectiv obtinut din specia vegetala *Rosmarinus officinalis* L), ES3(extract selectiv obtinut din specia vegetala *Menta piperita* L.), ES4(extract selectiv obtinut din specia vegetala *Eucalyptus globulus Labill L. folium*) care se prezinta sub forma lichida, cu miros si culoare caracteristice, sunt obtinute in urma procesului de extractia clasica solid – lichid a speciilor vegetale uscate si macinate si prelucrate in mod individual, utilizand solvent alcool etilic 50...70%(v), in raport material vegetal: solvent = 1:12...1:20 (m/v) la temperatura de reflux a solventului timp de 2...3 h, in 2...4 cicluri extractive, urmat de stationare la temperatura scazuta de 4 °C, filtrarea la vid pe hartie de filtru industriala ultra-pura cu un continut de  $\alpha$ -celuloza 100%, netratata chimic, decolorarea cu carbune activ 1%, reunirea filtratelor si prelucrarea acestora prin concentrare la vid sub presiune redusa cuprinsa intre 1.1...1.3 kPa la o temperatura cuprinsa intre 30...40 °C, pana la eliminarea totala a alcoolului etilic.

Procedeul conform inventiei inlatura dezavantajele procedeelor cunoscute prin aceea ca nanoparticulelor de argint se obtin prin aplicarea tehnologiei de sinteza care se realizeaza prin reactia de reducerea a solutiilor apoase de nitrat de argint de diferite concentratii (de ordin milimolar) in prezenta extractelor vegetale apoase obtinute din speciile de plante medicinale: *Ocimum basilicum* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Menta piperita* L., *Eucalyptus globulus Labill L.(folium)* sub agitare continua, avand dimensiune standardizata a volumului hidrodinamic de 87.90...112.1 nm si stabilitate fizico-chimica avand potentialul zeta -22...-25 mV, determinate prin difuzia dinamica a luminii.

Procedeul conform inventiei inlatura dezavantajele procedeelor cunoscute prin aceea ca produsului fitoterapeutic de tip solutie nazala antiinflamatoare standardizata, conform inventiei consta in combinarea a patru extracte vegetale selective ES1:ES2:ES3:ES4 intr-un raport de asociere, parti in volume ES1:ES2:ES3:ES4 = 1:1:1:4...2:1:3:4 (v/v/v/v) si omogenizarea acestora prin ultra-mixare cu un echipament de tip Ultra-Turrax Digital High-Speed, timp de 5...12 minute la viteza de 400... 1000 rot/min, urmat de adausul de nanoparticule de argint in concentratie de 2.5...5 ppm, obtinute prin reducerea a solutiilor apoase de nitrat de argint in prezenta extractelor apoase obtinute din speciile *Ocimum basilicum* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Menta piperita* L., *Eucalyptus globulus Labill L.(folium)* si ultrasonarea amestecului in ser fiziologic steril 0.9% NaCl timp de 15...30 minute la temperature de 25 °C.

Avantajele produsului fitoterapeutic de tip solutie nazala antiinflamatoare standardizata, conform inventiei constau in aceea ca:

- are un continut standardizat de flavonoide exprimat in rutin, polifenoli totali exprimat in acid galic, acizi polifenolicarboxilici exprimat in acid cafeic

- prezinta dimensiune standardizata a nanoparticulelor de argint acestea avand a volumul hidrodinamic de 87.90...112.1 nm si stabilitate fizico-chimica avand potentialul zeta - 22...-25 mV, determinate prin difuzia dinamica a luminii.

- este lipsit de toxicitate, rezultatele obtinute evidentiaza absenta citotoxicitatii atat pe linia de fibroblaste murine L929(ATCC CRL-6364) cat si pe linia de monocite umane SC(ATCC CRL-9855)

- prezinta o activitate antiinflamatoare semnificativa, determinata prin evaluarea productiei de oxid nitric in macrofagele stimulate cu LPS (lipopoli-zaharide) si determinarea nivelului citokinelor pro-inflamatorii IL-1beta si TNF-alfa eliberate de monocitele/macrofagele stimulate cu LPS(lipopoli-zaharide).

- prezinta efecte anti-inflamatorii semnificative inhibitia productiei de oxid nitric datorandu-se inhibitiei citokinelor pro-inflamatorii (IL-1 $\beta$  si TNF- $\alpha$ ).

Avantajele procedurii de obtinerea a produsului fitoterapeutic de tip solutie nazala antiinflamatoare standardizata conform inventiei, constau in aceea ca:

- produsul este obtinut din asocierea si combinarea optima a patru fractii selective obtinute din speciile vegetale *Ocimum basilicum* L.(*folium*), *Rosmarinus officinalis* L. (*folium*), *Menta piperita* L. (*folium*), *Eucaliptus globulus* Labill L.(*folium*), prin omogenizarea in proportii bine definite a acestor extracte selective proces urmat de adausul de nanoparticule de argint in concentratie de 2.5...5 ppm, si ultrasonarea amestecului in ser fiziologic steril 0.9% NaCl.

- produsul este obtinut printr-o tehnologie nepoluanta, economica, rapida, eficienta si flexibila care conduce la obtinerea unui nou produs fitoterapeutic de tip solutie nazala antiinflamatoare pe baza de extracte vegetale si nanoparticule de argint, cu inalt potential terapeutic, demonstrat prin testarea farmacologica a actiunii specifice.

- prezenta caracteristici optime de conditionare in produse terapeutice de uz uman destinate diferitelor afectiuni care includ mecanism inflamator .

- este practic netoxic fiind obtinut prin procedee extractive nepoluante si solventi lipsiti de toxicitate.

Rezultatele testarii farmacologice a actiunii specifice, respectiv a efectul antiinflamator realizat *in vitro* prin evaluarea productiei de oxid nitric in macrofagele stimulate cu LPS (lipopoli-zaharide) si determinarea nivelului citokinelor pro-inflamatorii IL-1beta si TNF-alfa eliberate de monocitele/macrofagele stimulate cu LPS(lipopoli-zaharide), indica un efect antiinflamator semnificativ si permit utilizarea solutiei nazala antiinflamatoare standardizata in terapia afectiunilor ORL, ca adjuvant in tratamentul rinitelor si rino-faringitelor acute si cronice, in sinuzite, in rinita cronica atrofica simpla.

Se prezinta in continuare un exemplu de realizare a inventiei.

### **Obtinerea extracte selective ES**

#### **Extractie vegetala**

#### **Mod de lucru:**

300 g proba materialul vegetal (*Ocimum basilicum* L. *folium*, *Rosmarinus officinalis* L. *folium*, *Menta piperita* L. *folium*, *Eucaliptus globulus* Labill L. *folium*), uscat si maruntit conform Farmacopeei si prelucrat in mod individual, se extrage utilizand solvent alcool etilic 50...70%(v) in raportul material vegetal: solvent avand valori cuprinse intre 1:12 (m/v) ...1:20 (m/v).



Înainte de a fi supus procesului de extracție solid-lichid, amestecul material vegetal-solvent este ultrasonat timp de 10...30 minute, la temperatura cuprinsă între 20...40°C.

Timpul de extracție este de 2...3 h, la temperatura de reflux a solventului. Extractul se răcește la temperatura de +4°C și se filtrează pe hartie de filtru industrială ultra-pură cu un conținut de  $\alpha$ -celuloză 100%, netratată chimic. Filtratul obținut se supune operației de decolorare cu carbune activ 1 %.

#### **Prelucrarea extractelor vegetale**

Soluțiile hidroalcoolice obținute în urma celor 2...4 cicluri de extracție, după operația de filtrare și decolorare se reunesc și se supun concentrării la vid sub presiune redusă cuprinsă între 1.1...1.3 kPa până la eliminarea totală a alcoolului etilic, rezultând un extracte concentrate de culoare și miros caracteristic. Operația de concentrare se realizează la temperatura de 30...40 °C, utilizând un rotovapor tip Buchi B-480, prevăzut cu baie de apă termostată.

Astfel se obțin extracte selective ES1(extract selectiv obținut din specia vegetală *Ocimum basilicum* L), ES2(extract selectiv obținut din specia vegetală *Rosmarinus officinalis* L), ES3(extract selectiv obținut din specia vegetală *Menta piperita* L.), ES4(extract selectiv obținut din specia vegetală *Eucalyptus globulus* Labill L. *folium*), care sunt supuse procesului de omogenizare prin ultra-mixare.

#### **Sinteza nanoparticulelor de argint**

Extractele vegetale apoase sunt obținute în urma procesului de extracție clasică solid – lichid a speciilor vegetale, menționate mai sus, uscate și macinate și prelucrate în mod individual, utilizând solvent apă ultrapură, în raport material vegetal: solvent = 1:15...1:20 (m/v) la temperatura de reflux a solventului timp de 1...3 h, urmat de staționare la temperatura scăzută de 20 °C, filtrarea la vid pe hartie de filtru industrială.

Nanoparticulelor de argint se obțin prin aplicarea tehnologiei de sinteză care se realizează prin reacția de reducere a soluțiilor apoase de nitrat de argint de diferite concentrații 0.8...1.2 mM în prezența extractelor vegetale apoase obținute din speciile de plante medicinale: *Ocimum basilicum* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Menta piperita* L., *Eucalyptus globulus* Labill L.(*folium*) acestea putând fi utilizate în mod individual, raportul volumic dintre extractul vegetal apos selectat și soluțiilor de nitrat de argint fiind de 1:38...1:45 (v/v).

Nanoparticulelor de argint sunt evaluate din punct de vedere al dimensiunii și al stabilității în timp, pe durata a 6 luni, prin tehnica de difuzie dinamică a luminii.

Astfel, se obțin nanoparticulelor de argint având dimensiune standardizată a volumului hidrodinamic de 87.90...112.1 nm și potențialul zeta -22...-25 mV, determinate prin difuzia dinamică a luminii.

#### **Obținere produsului fitoterapeutic de tip soluție nazală antiinflamatoare standardizată**

Produsul fitoterapeutic de tip soluție nazală antiinflamatoare standardizată, este obținut prin combinarea optimă a patru extracte vegetale selective ES1:ES2:ES3:ES4 într-un raport de asociere, parti în volume de ES1:ES2:ES3:ES4= 1:1:1:4...2:1:3:4 (v/v/v/v) și

omogenizarea acestora prin ultra-mixare cu un echipament de tip Ultra-Turrax Digital High-Speed, timp de 5...12 minute la viteza de 400... 1000 rot/min, urmat de adausul de nanoparticule de argint in concentratie de 2.5...5 ppm, obtinute prin reducerea a solutiilor apoase de nitrat de argint in prezenta extractelor apoase obtinute din speciile *Ocimum basilicum* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Menta piperita* L., *Eucalyptus globulus* Labill L.(folium) proces urmat de ultrasonarea amestecului in ser fiziologic steril 0.9% NaCl, in raport de asociere parti in volume nanoparticule de argint:extracte vegetale selective omogenizate: ser fiziologic: 1:2:30...1:2.5:35 timp de 15...30 minute, la temperature de 25 °C.

Produsul fitoterapeutic de tip solutie nazala antiinflamatoare, prezinta un continut standardizat de flavonoide 1.22...2.48 %, exprimat in rutin polifenoli totali 2.46...3.72% exprimat in acid galic, acizi polifenolicarboxilici 1.38...2.26 % exprimat in acid cafeic si dimensiune standardizata a nanoparticulelor de argint acestea avand volumul hidrodinamic de 87.90...112.1 nm si stabilitate fizico-chimica avand potentialul zeta -22...-25 mV, determinate prin difuzia dinamica a luminii.

Produsul fitoterapeutic de tip solutie nazala antiinflamatoare, este lipsit de toxicitate, rezultatele testarii farmacologice *in vitro* demonstreaza absenta citotoxicitatii atat pe linia de fibroblaste murine L929(ATCC CRL-6364) cat si pe linia de monocite umane SC(ATCC CRL-9855).

Rezultatele testarii *in vitro* a actiunii specifice, respectiv a efectul antiinflamator realizat prin evaluarea productiei de oxid nitric in macrofagele stimulate cu LPS (lipopoli-zaharide) si determinarea nivelului citokinelor pro-inflamatorii IL-1beta si TNF-alfa eliberate de monocitele/macrofagele stimulate cu LPS(lipopoli-zaharide), demonstreaza o activitate antiinflamatoare semnificativa si permit utilizarea solutiei nazala antiinflamatoare standardizata in terapia afectiunilor ORL, ca adjuvant in tratamentul rinitelor si rino-faringitelor acute si cronice, in sinuzite, in rinita cronica atrofica simpla.



## REVENDICARI

1. Produsului fitoterapeutic de tip solutie nazala antiinflamatoare standardizata pe baza de extracte vegetale si nanoparticule de argint, **caracterizat prin aceea ca**, are un continut standardizat de flavonoide 1.22...2.48 %, exprimat in rutin polifenoli totali 2.46...3.72% exprimat in acid galic, acizi polifenolicarboxilici 1.38...2.26 % exprimat in acid cafeic.

2. Produsului fitoterapeutic de tip solutie nazala antiinflamatoare standardizata pe baza de extracte vegetale si nanoparticule de argint, conform revendicarii 1, **caracterizat prin aceea ca**, are un continut de nanoparticulelor de argint si prezinta dimensiune standardizata a acestora avand volumul hidrodinamic de 87.90...112.1 nm si stabilitate avand potentialul zeta -22...-25 mV, determinate prin difuzia dinamica a luminii.

3. Produsului fitoterapeutic de tip solutie nazala antiinflamatoare standardizata pe baza de extracte vegetale si nanoparticule de argint, conform revendicarii 1,2, **caracterizat prin aceea ca**, este lipsit de toxicitate, rezultatele testarii *in vitro* evidentiand absenta citotoxicității atât pe linia de fibroblaste murine L929(ATCC CRL-6364) cât și pe linia de monocite umane SC(ATCC CRL-9855)

4. Produsului fitoterapeutic de tip solutie nazala antiinflamatoare standardizata pe baza de extracte vegetale si nanoparticule de argint, conform revendicarii 1,2,3 **caracterizat prin aceea ca**, prezinta activitate antiinflamatoare semnificativa demonstrata *in vitro*, prin evaluarea producției de oxid nitric în macrofagele stimulate cu LPS (lipopoli-zaharide) si determinarea nivelului citokinelor pro-inflamatorii IL-1beta și TNF-alfa eliberate de monocitele/macrofagele stimulate cu LPS(lipopoli-zaharide).

5. Procedeu de obtinere a produsului fitoterapeutic de tip solutie nazala antiinflamatoare standardizata pe baza de extracte vegetale si nanoparticule de argint, conform revendicarii 1,2,3,4 **caracterizat prin aceea ca**, este realizat prin asocierea extractelor vegetale selective obtinute din speciile *Ocimum basilicum* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Menta piperita* L., *Eucaliptus globulus* Labill L.(folium), cu nanoparticulelor de argint, fiind constituit din urmatoarele etape tehnologice:

- a) Obtinerea extracte vegetale selective
- b) Sinteza a nanoparticulelor de argint
- c) Obtinere produsului fitoterapeutic de tip solutie nazala antiinflamatoare standardizata

6. Procedeu de obtinere a produsului fitoterapeutic de tip solutie nazala antiinflamatoare standardizata pe baza de extracte vegetale si nanoparticule de argint, prin asocierea extractelor vegetale selective cu nanoparticulelor de argint si etape ulterioare de prelucrare, conform revendicarii 5 **caracterizat prin aceea ca**, inainte de etapa de extractie, se ultrasoneaza materialul vegetal uscat si maruntit timp de 10...30 minute, la temperatura cuprinsa intre de 20...40°C, are loc apoi extractia solid -lichid, timp de 2...4h, la temperatura de reflux a solventului, dupa care, se raceste extractul la temperatura de +4°C, se filtreaza la vid pe hartie de filtru industrială ultra-pura cu un continut de  $\alpha$ -

celuloza 100%, netratata chimic si se decoloreaza cu carbune activ 1 %, aplicand intre 2-4 cicluri extractive, dupa care se realizeaza etapele de prelucrare care cuprind: reunirea filtratelor si concentrarea acestora la vid sub presiune redusa cuprinsa intre 1.1...1.3 kPa la o temperatura cuprinsa intre 30...40 °C, pana la eliminarea totala a alcoolului etilic, rezultand un extracte vegetale selective.

7. Procedeu de obtinere a produsului fitoterapeutic de tip solutie nazala antiinflamatoare standardizata pe baza de extracte vegetale si nanoparticule de argint, prin asocierea extractelor vegetale selective cu nanoparticulelor de argint si etape ulterioare de prelucrare, conform revendicarii 5, **caracterizat prin aceea ca**, nanoparticulelor de argint se realizeaza prin reactia de reducerea a solutiilor apoase de nitrat de argint de diferite concentratii 0.8...1.2 mM in prezenta extractelor vegetale apoase obtinute din speciile de plante medicinale: *Ocimum basilicum* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Menta piperita* L., *Eucaliptus globulus Labill* L.(*folium*) rezultate in urma procesului de extractia clasica solid – lichid a speciilor vegetale, mentionate mai sus, uscate si macinate si prelucrate in mod individual, utilizand solvent apa ultrapure, in raport material vegetal: solvent = 1:15...1:20 (m/v) la temperatura de reflux a solventului timp de 1...3 h, urmat de stationare la temperatura scazuta de 20 °C, filtrarea la vid pe hartie de filtru industrial, acestea putand fii utilizate in mod individual, raportul volumic dintre extractul vegetal apos selectat si solutiilor de nitrat de argint fiind de 1:38...1:45 (v/v), rezultand nanoparticulelor de argint cu dimensiune standardizata a volumului hidrodinamic de 87.90...112.1 nm si potentialul zeta -22...-25 mV, determinate prin difuzia dinamica a luminii.

8. Procedeu de obtinere a produsului fitoterapeutic de tip solutie nazala antiinflamatoare standardizata pe baza de extracte vegetale si nanoparticule de argint, conform revendicarii 5, 6, 7, **caracterizat prin aceea ca**, este obtinut prin combinarea optima a patru extracte vegetale selective ES1(extract selectiv obtinut din specia vegetala *Ocimum basilicum* L), ES2(extract selectiv obtinut din specia vegetala *Rosmarinus officinalis* L), ES3(extract selectiv obtinut din specia vegetala *Menta piperita* L.), ES4(extract selectiv obtinut din specia vegetala *Eucaliptus globulus Labill* L. *folium*), intr-un raport de asociere, parti in volume de ES1:ES2:ES3:ES4= 1:1:1:4...2:1:3:4 (v/v/v/v) si omogenizarea acestora prin ultra-mixare cu un echipament de tip Ultra-Turrax Digital High-Speed, timp de 5...12 minute la viteza de 400... 1000 rot/min, urmat de adausul de nanoparticule de argint in concentratie de 2.5...5 ppm, obtinute prin reducerea a solutiilor apoase de nitrat de argint in prezenta extractelor apoase obtinute din speciile *Ocimum basilicum* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Menta piperita* L., *Eucaliptus globulus Labill* L.(*folium*) proces urmat de ultrasonarea amestecului in ser fiziologic steril 0.9% NaCl, in raport de asociere parti in volume nanoparticule de argint:extracte vegetale selective omogenizate: ser fiziologic: 1:2:30...1:2.5:35 timp de 15...30 minute. la temperature de 25 °C, rezultand produsului fitoterapeutic de tip solutie nazala antiinflamatoare standardizata, cu aplicatii in terapia afectiunilor ORL, ca adjuvant in tratamentul rinitelor si rino-faringitelor acute si cronice, in sinuzite, in rinita cronica atrofica simpla.