



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00004

(22) Data de depozit: 08/01/2020

(41) Data publicării cererii:
30/07/2021 BOPI nr. 7/2021

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN
CLUJ-NAPOCA, STR. VICTOR BABEȘ
NR. 8, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN
CLUJ-NAPOCA, CALEA MĂNĂȘTUR
NR.3-5, CLUJ- NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• LUCACIU ROXANA-LIANA,
STR. TARNIȚA NR.5, BL.A2, AP.31,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• HANGAN ADRIANA CORINA,
ALEEA PALTINULUI, NR.5, CLUJ-NAPOCA,
CJ, RO;

• VICAȘ LAURA GRAȚIELA,
STR. LEAGĂNULUI, NR.11, ORADEA, BH,
RO;
• SEVASTRE BOGDAN,
STR.POET GRIGORE ALEXANDRESCU,
NR.7, AP.11, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• HANGANU DANIELA, STR.DONATH
NR.54, BL.X, AP.18, CLUJ- NAPOCA, CJ,
RO;
• SEVASTRE-BERGHIAN
ALEXANDRA- CRISTINA,
STR.POET GRIGORE ALEXANDRESCU
NR.7, AP.11, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• PALL EMOKE, STR.FORTĂREȚEI, NR.3,
AP.2, CLUJ NAPOCA, CJ, RO;
• IONESCU CORINA MARIA LUCIA,
STR.PUIEȚILOR, NR.5, AP.3,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) SUPLEMENT ALIMENTAR CU PROPRIETĂȚI
ANTIOXIDANTE/ANTIPROLIFERATIVE

(57) Rezumat:

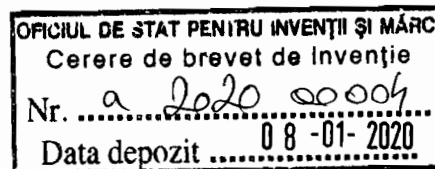
Invenția se referă la un supliment alimentar cu proprietăți antioxidante/antiproliferative. Suplimentul, conform invenției, este constituit în procente masice din 10..20% amestec de extracte liofilizate de *Artemisia annua L.*, *Verbascum phlomoides L.*, *Centaurea cyanus*

în raport 1:1:1, dizolvate într-un amestec hidro-glicerinat în raport 9:1.

Revendicări: 1
Figuri: 4

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).





SUPLIMENT ALIMENTAR CU PROPRIETĂȚI ANTIOXIDANTE / ANTIPROLIFERATIVE

Invenția se referă la un supliment alimentar reprezentat de un extract fluid care conține un amestec de extracte liofilizate de *Artemisia annua* L., *Verbascum phlomoides* L., *Centaurea cyanus* în raport 1:1:1, dizolvate într-un amestec hidro-glicerinat (90:10).

Domeniul de aplicare

Domeniul de aplicabilitate este medical, urmărindu-se încetinirea îmbătrânirii și prevenirea/tratarea unor afecțiuni care apar odată cu înaintarea în vârstă (cardiovasculare, stări degenerative, neoplazii).

În prezent tot mai mulți oameni apelează la tratamente naturiste, la cure cu ceaiuri sau la diverse produse din plante. Studiile de piață confirmă faptul că populația optează pentru produsele naturale datorită beneficiilor unanim recunoscute ale fitoterapiei: largă accesibilitate, rare efecte adverse, nu creează dependență, produsele sunt perfect asimilabile, permite asocierea cu alte terapii și diete, preparatele au prețuri accesibile.

Diverse fitopreparate, conținând una sau mai multe plante, administrate în doze adecvate neutralizează radicalii liberi înainte ca aceștia să producă vătămări cuantificabile în organism, exercitându-și pe această cale rolul antioxidant.

Fitoterapia cunoaște o continuă ascensiune, justificându-se pe această cale necesitatea extinderii cercetărilor asupra plantelor, cu prioritate asupra celor utilizate în medicina tradițională astfel încât preparatele să poată fi realizate în unități farmaceutice autorizate și să fie la îndemâna pacienților însoțite de recomandări profesionale.

Precizarea stadiului actual al invenției

Începând cu anul 1970 *Artemisia annua* L. (familia *Asteraceae*) și-a găsit utilitate în tratarea malariei datorită conținutului său bogat în artemisinină. În zilele noastre sunt în curs studii care doresc să demonstreze și demonstrează eficacitatea ca agent antitumoral a acesteia. Ca și principii active, pe lângă artemisinină, *Artemisia annua* L. conține flavonoide și polifenoli, asociere care se pare că potențează acțiunea antitumorală (studii în curs de derulare). Este demonstrat faptul că celulele tumorale acumulează fier. În momentul în care artemisinină ajunge în organism, la nivelul celulelor tumorale unde există un exces de fier, se eliberează două molecule de oxigen care formează radicali liberi și aceștia sunt atât de puternici încâtucid celulele tumorale. Acest lucru nu se întâmplă în celulele normale, prin urmare tratamentul este selectiv și nu este toxic. Administrarea unui preparat cu fier ar trebui să crească acțiunea citostatică a extractului de *Artemisia annua* L. Publicații reprezentative:

1. Zyad A, Tilaoui M, Jaafari A, Oukerrou I, Mouse H.A, More insights into the pharmacological effects of artemisinin, *Phytotherapy Research*, 2018, 32(2): 216-229.
2. Efferth T, From ancient herb to modern drug: *Artemisia annua* and artemisinin for cancer therapy, *Seminars in Cancer Biology*, 2017, 46: 65-83.

3. Mesa L.E, Lutgen P, Velez I.D, Segura A.M, Robledo S.M, *Artemisia annua* L., Potential source of molecules with pharmacological activity in human diseases, *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2015, 5(3): 436-450.
4. Ferreira J.F.S, Luthria D.L, Sasaki T, Heyerick A, Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer, *Molecules*, 2010, 15: 3135-3170

Verbascum phlomoides L. (familia *Scrophulariaceae*) și *Centaurea cyanus* (familia *Compositae*) sunt bogate în compuși fenolici (acid galic, quercetină) care dețin o multitudine de efecte biologice, incluzând acțiunea antioxidantă și abilitatea de a capta radicalii liberi. Capacitatea compușilor fenolici de a capta radicalii liberi este datorată prezenței în structura lor a grupării hidroxil. Proprietatea lor antiradicalică este îndreptată în mod direct spre radicalul hidroxil și spre anionul superoxid, care sunt specii foarte reactive implicate în procesul de deteriorare a ADN. Numeroase studii au demonstrat faptul că acidul galic este antioxidantul natural implicat atât în inhibarea cât și în captarea ROS (specii reactive de oxigen). De asemenea, este demonstrat faptul că acidul galic are acțiune antitumorală în cancer cervical, de plămâni, colon, sân și leucemie. Quercetina deține efect antioxidant și antitumoral, acționând ca și captator de ROS. Este implicată în prevenția cancerului indus de către stresul oxidativ și a fost demonstrat faptul că are activitate antitumorală în cancer hepatic, leucemie, cancer cervical. Publicații reprezentative:

1. Rauf A, Imran M, Khan I.A, Ur-Rehman M, Gilani S.A, Mehmood Z, Mubarak M.S, Anticancer potential of quercetin: a comprehensive review, *Phytotherapy Research*, 2018, 32: 2109-2130.
2. Khan F, Niaz K, Maqbool F, Hassan F.I, Abdollahi M, Nagulapalli-Venkata K.C, Nabavi S.M, Molecular targets underlying the anticancer effects of quercetin: an update, *Nutrients*, 2016, 8(9): 529.
3. Kashyap D, Mittal S, Sak K, Singhai P, Singh-Tuli H, Molecular mechanism of action of quercetin in cancer: recent advances, *Tumor Biol.*, 2016, 37: 12927-12939.
4. Ozgen S, Kilinc O, Selamoglu Z, Antioxidant activity of quercetin: a mechanistic review, *Turkish Journal of Agriculture – Food Science and Technology*, 2016, 4(12): 1134-1138.
5. Badhani B, Sharma N, Kakkar R, Galic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications, *RSC Advances*, 2015, 35(5): 27540-27557.
6. Subramanian A.P, John A.A, Vellayappan M.V, Balaji A, Jaganathan S.K, Supriyanto E, Yusof M, Gallic acid: prospects and molecular mechanisms of its anticancer activity, *RSC Advances*, 2015, 45(5), 35608-35621.
7. Kahraman C, Akdemir ZS, Tatli I, Promising cytotoxic activity profile, biologic activities and phytochemical screening of *Verbascum* L. species, *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 2012, 6(2): 63-75.
8. Tatli I, Akdemir Z, Traditional uses and biological activities of *Verbascum* sp. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, 31: 85-96.

Protejarea organismelor împotriva radicalilor liberi poate fi realizată prin aport de antioxidanți alimentari, în această categorie intrând și administrarea de fitoproduse. Studiile efectuate de-a lungul timpului au demonstrat faptul că administrarea pe termen lung a unei combinații de antioxidanți este mult mai eficientă decât administrarea unui singur antioxidant. Acesta este unul dintre motivele pentru care în prezenta invenție s-a studiat acțiunea antioxidantă/antitumorală a celor trei specii, respectiv *Artemisia annua* L., *Verbascum phlomoides* L. și *Centaurea cyanus* având ca și scop obținerea unui nou fitoprodus care să conțină cele trei plante, produs în care acțiunea antioxidantă/antitumorală să fie potențată în urma asocierii acestora printr-un efect sinergic. În plus, nu am găsit nici un patent cu o formulare pe bază de amestec *Artemisia annua* L., *Verbascum phlomoides* L. și *Centaurea cyanus* și de asemenea pe piața farmaceutică românească nu se comercializează un astfel de fitoprodus.

Patente internaționale reprezentative existente:

1. Titlul invenției: Pharmaceutical composition for preventing and treating renal cell carcinoma comprising fraction and subfraction of *Artemisia annua* L. Inventatori: Kwak Jong Hwan, Kim Hyung Sik, Choi Han Young, Lee Hye Won, Tae In Hwan, Son Ji Yeon, Jeon Yu Kyoung. Aplicant: Research&Business Found Sungkyunkwan University, 2017.
2. Titlul invenției: Compositions containing an extract of *Artemisia annua* L. for anti-aging. Inventatori: Lee Ok Chan, Rho Ho Sik, Hwang Kyeong Hwan, Cho Ga Young, Kim Duck Hee, Kim Han Kon, Aplicant: Amorepacific Corple, 2019
3. Titlul invenției: Anti-aging, anti-inflammatory and skin-astriction composition for skin external application comprising *Artemisia annua* L. cell culture extract and methods for preparing the same. Inventatori: Moh Sang Hyun, Oh Seung Taek, Lee Jeong Hun, Kim Hyoung Shik, Seo Hyo Hyun, Song Mi Young, Jung Hae Soo, Cho Moon Jin. Aplicant: Bio FD&C, 2014.

Problema pe care o rezolvă invenția:

Problema pe care o rezolvă invenția este asigurarea unor rapoarte între elementele compoziției având ca și scop obținerea unui efect sinergic, a unui preparat biocompatibil, cu utilitate în neutralizarea radicalilor liberi implicați în stresul oxidativ, cu rol în încetinirea îmbătrânirii și prevenirea/tratarea afecțiunilor cardiovasculare, neurodegenerative, neoplaziilor în terapie adjuvantă sau monoterapie.

Suplimentul alimentar conform invenției înlătură dezavantajele menționate anterior prin aceea că este constituit din 10-20% amestec de extracte liofilizate de *Artemisia annua* L., *Verbascum phlomoides* L., *Centaurea cyanus* în raport 1:1:1, dizolvate într-un amestec hidroglicerinat raport 9:1.

Prin administrarea fitoprodusului obținut în urma invenției se obțin următoarele avantaje:

- preparatul administrat în doze corespunzătoare, neutralizează radicalii liberi înainte ca aceștia să ducă la apariția unor afecțiuni în organism;
- *Artemisia annua* L. acționează ca antitumoral prin prezența artemisininei dar și a flavonoidelor și polifenolilor. Asocierea celor trei plante în cadrul aceluiași fitopreparat, utilizate în doze

corespunzătoare, s-a dovedit a fi benefică, acțiunea antioxidantă/ antitumorală fiind potențată în urma asocierii acestora (toate trei conțin flavonoide și polifenoli);

- încetinirea îmbătrânirii și prevenirea/tratarea unor afecțiuni care apar odată cu înaintarea în vârstă (cardiovasculare, stări degenerative, neoplazii).

Necesitatea obținerii unui astfel de produs derivă din dorința de a valorifica plantele din flora spontană a României, de a comercializa produse autohtone în defavoarea celor de import, precum și de utilizarea acestui produs ca antioxidant/antitumoral în scop preventiv/curativ.

Nu se cunoaște în prezent un preparat care să conțină un amestec cu efect sinergic de *Artemisia annua* L., *Verbascum phlomoides* L., *Centaurea cyanus*. În studiile experimentale de față, s-a demonstrat eficacitatea asocierii *Verbascum phlomoides* L., *Centaurea cyanus* la *Artemisia annua* L. având ca și scop obținerea unui nou fitoprodus cu acțiune antioxidantă/antitumorală.

Introducerea pe piață și comercializarea la nivelul unităților farmaceutice a unui astfel de fitopreparat ar fi benefică și ar ajuta la soluționarea unor probleme de sănătate cu care se confruntă populația. Pe această cale, s-ar putea pune la dispoziția pacienților prin intermediul unităților farmaceutice a unui produs nou competitiv. Produsul inovativ va deține efecte benefice, va fi ușor de administrat pe cale orală sub formă de picături și nu va avea efecte secundare.

Tehnologia de realizare:

Produsele vegetale au fost achiziționate de la centre de recoltare a plantelor medicinale fiind culese din flora spontană. Pregătirea produselor vegetale a constat în îndepărtarea totală a umidității prin uscare în etuvă la 40°C și apoi mărunțirea conform Farmacopeei Române Ed. X, respectiv trecere prin sita I.

Obținerea extractelor vegetale a fost efectuată conform normelor compendiale și anume s-a realizat extracția principiilor active prin macerare cu alcool (raportul produs vegetal/alcool 30° = 1/5), la temperatura camerei (20°C), timp de 24 ore. În etapa a doua soluția extractivă a fost adusă în rotavapor pentru îndepărtarea fracției volatile. Frația apoasă a fost congelată și apoi liofilizată utilizând Freeze dryer Alpha 1-2 Christ (Martin Christ, Osterode am Harz, Germany), la 20°C, 3 zile.

S-a ales obținerea de liofilizate deoarece prin liofilizare principiile active sunt mai bine extrase și sunt înlăturate substanțele balast.

Pentru administrare, extractele liofilizate ale celor trei plante (raport 1:1:1) sunt dizolvate într-un amestec hidro-glicerinat (90:10). Extractul fluid va fi repartizat în flacoane brune, etichetate pe care se vor menționa date de identificare ale produsului, preparatorului, modul de administrare, indicații terapeutice dar și precauțiile de utilizare.

S-a evaluat capacitatea antioxidantă a celor trei extracte de: *Artemisia annua* L., *Verbascum phlomoides* L. și *Centaurea cyanus* și a amestecului acestora în raport 1:1:1 *in vitro* și *in vivo*. Astfel, prin metoda DPPH am demonstrat capacitatea antioxidantă *in vitro*. *In vivo* am demonstrat efectul SOD-mimetic a celor trei extracte și a amestecului utilizând o tulpină de *S. Cerevisiae*. Am determinat capacitatea antioxidantă/antitumorală prin studii pe culturi celulare

(linia tumorală de melanom WM35 și linia fibroblastică HDF) pentru extractul de *Artemisia annua* L și pentru amestecul celor trei plante, în raport 1:1:1. Am evaluat „*in vivo*” pe șoareci de laborator raportul eficacitate terapeutică (antioxidantă / antitumorală) – risc (toxicitate), demonstrând eficacitatea terapeutică și lipsa de toxicitate pentru extractul de *Artemisia annua* L și pentru amestecul celor trei plante, în raport 1:1:1.

Evaluarea rezultatelor:

1. Caracterizarea extractelor de *Artemisia annua* L., *Verbascum phlomoides* L. și *Centaurea cyanus*:

Evaluarea conținutului în principii active a extractelor liofilizate a fost efectuată prin metoda HPLC cu detecție în UV (Aparat HPLC - ACME 9000, cu detector UV (Younglin Instrument)). Programul de procesare folosit: Autochro 3000, Coloana: Nucleosil C18 100x4,65μ, Eluent: metanol: apa: acid acetic = 300: 600: 6, λ de detecție: 370 nm. Standardul HPLC utilizat = etalon de quercetină. S-a determinat conținutul total de flavonoide exprimat în mg quercetină/100 g masă uscată (Tabel I).

Tabel I. Conținutul total de flavonoide (mg quercetină/100 mg masă uscată) utilizând metoda HPLC

Probă	Conținut total de flavonoide (mg quercetină/100 g masă uscată)
<i>Artemisia annua</i> L	688.10±0.00
<i>Verbascum phlomoides</i> L	467.263±0.22
<i>Centaurea cyanus</i>	541.31±2.72

2. Determinarea capacității antioxidante „*in vitro*” a extractelor liofilizate de *Artemisia annua* L., *Verbascum phlomoides* L. și *Centaurea cyanus* și a amestecului acestora (1:1:1):

•Metoda DPPH: capacitatea extractelor liofilizate de a neutraliza radicalii liberi a fost determinată prin metoda Brand-Williams utilizând 2,2-difenil-2-picril-hidrazil-hidrat (DPPH).

Tabel II. Activitatea antioxidantă *in vitro* evidențiată prin metoda DPPH

Probă	DPPH%
<i>Artemisia annua</i> L	9.03±1.11
<i>Centaurea cyanus</i>	83.42±00
<i>Verbascum phlomoides</i> L	86.36±13.67
Amestec (1:1:1)	115±0.22

Rezultatele obținute au demonstrat activitatea antioxidantă „*in vitro*” a celor trei extracte liofilizate și potențarea activității antioxidante în urma asocierii celor trei extracte, în raport 1:1:1. (Tabel II).

3. Determinarea activității SOD-mimetice „*in vivo*” a extractelor liofilizate de *Artemisia annua* L., *Verbascum phlomoides* L. și *Centaurea cyanus* și a amestecului acestora (1:1:1):

Determinarea a fost efectuată utilizând o tulpină de *S. Cerevisiae* Δsod1 (ATCC96687) (American Type Culture Collection) care are abilitatea de a deleta/inserta gena SOD₁ răspunzătoare de codificarea sintezei Cu₂Zn₂SOD. Celulele de drojdie au fost crescute în mediu îmbogățit tip YPD (1% celule de drojdie, 2% peptonă și 2% glicerol). Mediul solid conține agar

1.5%. Soluțiile de concentrații crescătoare (0, 30, 50, 70 μm – realizate într-un amestec DMSO:EtOH (1:4)) ale extractului liofilizat se adaugă pe mediul de cultură. Suspensiile de celule au fost turnate în plăci Petri și lăsate la temperatura camerei ca să se solidifice. Au fost utilizate discuri de hârtie de 6 mm diametru (Antibiotica test Blättchen) conținând 5 μL soluție 5mM menadionă în etanol sau 5 μL 17.5% H_2O_2 . După 3 zile de incubare la 28°C, au fost măsurate diametrele zonelor limpezi din jurul discurilor, reprezentând estimarea cantitativă a zonei protectoare. Stresul oxidativ a fost indus de menadionă care generează radicali superoxid și H_2O_2 care generează radicali $\text{OH}\cdot$. În prezența extractului se observă o scădere a diametrului ariei de inhibiție față de proba de control (0 μm) ceea ce indică că extractul are efect protector asupra stresului oxidativ produs atât de menadionă cât și de H_2O_2 . Se pare că efectul protector nu depinde semnificativ de creșterea concentrației soluției extractive și că este mai mare în cazul stresului oxidativ generat de menadionă (Tabel III).

Tabel III. Diametrul ariei de inhibiție pentru extractele liofilizate de *Artemisia annua* L., *Verbascum phlomoides* L., *Centaurea cyanus* și a amestecului acestora (1:1:1), în diferite concentrații, utilizând menadionă și H_2O_2

Extract liofilizat (μM)	<i>Artemisia annua</i> L. Diametrul ariei de inhibiție (cm)		<i>Verbascum phlomoides</i> L. Diametrul ariei de inhibiție (cm)		<i>Centaurea cyanus</i> Diametrul ariei de inhibiție (cm)		Amestec Diametrul ariei de inhibiție (cm)	
	Menadionă	H_2O_2	Menadionă	H_2O_2	Menadionă	H_2O_2	Menadionă	H_2O_2
Control (Menadionă 5 mM sau H_2O_2 17.5%)	8	7.7	8	7.5	8	7.5	8	7.5
30	4.9	5	6	6.2	5	5.2	3.4	3.9
50	4.4	4.9	5.8	6.2	4.5	5	2.9	3.7
70	4.3	4.6	5.8	6	4.4	5	2.7	3.6

Reducerea ariei de inhibiție a fost între 39-46% pentru *Artemisia annua* L., 38-45% pentru *Centaurea cyanus*, 25-28% pentru *Verbascum phlomoides* L. și 58-66% pentru amestecul acestora (1:1:1) împotriva stresului oxidativ generat de menadionă.

Reducerea ariei de inhibiție a fost între 38-43% pentru *Artemisia annua* L., 30-33% pentru *Centaurea cyanus*, 17-20% pentru *Verbascum phlomoides* L. și 51-55% pentru amestecul acestora (1:1:1) împotriva stresului oxidativ generat de H_2O_2 .

Dintre cele trei extracte liofilizate, cea mai bună activitate SOD mimetică *in vivo* o are extractul liofilizat de *Artemisia annua* L. și cea mai slabă extractul liofilizat de *Verbascum phlomoides* L. Și pe această cale este demonstrată eficacitatea asocierii celor trei plante (1:1:1), obținându-se o activitate SOD-mimetică *in vivo* net superioară.

4. Determinarea capacității antioxidante/antitumorale a extractului liofilizat de *Artemisia annua* L. și a amestecului (1:1:1) prin studii pe culturi celulare:

•**Cultura celulară:** evaluarea efectului antiproliferativ a fost efectuat atât pe fibroblaste dermice umane normale (HDFa-Invitrogen, Willow Creek, USA) cât și pe o linie de celule melanom uman (WM35) aflate în faza de creștere radială. Fibroblastele au fost cultivate în mediu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) îmbogățit cu 5% ser fetal de vițel, 50

$\mu\text{g/ml}$ gentamicină și 5 ng/ml amfotericină (Biochrom Ag, Berlin, Germany). Celulele WM35 au fost menținute în mediu RPMI îmbogățit cu 5% ser fetal de vițel, $50 \mu\text{g/ml}$ gentamicină și 5 ng/ml amfotericină (Biochrom Ag). Ambele culturi au fost incubate într-o atmosferă umedă la 37°C și 5% CO_2 .

•*Testul de proliferare celulară*: testele de citotoxicitate celulară au fost efectuate prin metoda cu bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazoliu (MTT) (CellTiter 96[®]Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega Corporation Madison, USA) respectând specificațiile producătorului. S-a utilizat un cititor de plăci ELISA (Tecan, Männedorf, Switzerland). S-a aplicat pe culturi extractul de *Artemisia annua* L. și amestecul (1:1:1) în concentrații de la 0.05 la $50 \mu\text{g/ml}$ timp de 24 h. Inițial s-a preparat o soluție stoc de extract care conține 0.3% DMSO. Fiecare experiment a fost efectuat în triplicat. Ca și control au fost utilizate culturile celulare tratate doar cu mediu. Viabilitatea celulară a fost determinată. Valoarea IC_{50} , ce reprezintă concentrația necesară inhibării a 50% din proliferarea celulară a fost calculată utilizând curba de calibrare prin regresie nonliniară.

Pentru linia celulară normală HDFa, $\text{CI}_{50}=19.19\mu\text{g/ml}$ (*Artemisia annua* L.), iar CI_{50} (amestec (1:1:1)) = $18.9\mu\text{g/ml}$. Pentru linia tumorală WM35, CI_{50} (*Artemisia annua* L.) = $5.5\mu\text{g/ml}$, în timp ce CI_{50} (amestec (1:1:1)) = $4.2\mu\text{g/ml}$. CI_{50} (*Artemisia annua* L.) pentru linia WM35 este de peste 3 ori mai mică (5.550 față de $19.19 \mu\text{g/ml}$) ceea ce demonstrează o citotoxicitate minimă asupra liniei celulare normale. Toxicitatea asupra liniei celulare normale HDFa este similară pentru *Artemisia annua* L. și pentru amestecul (1:1:1). Toate liniile celulare au avut un comportament similar până la concentrația de $1 \mu\text{g/ml}$, dar de la concentrația de $2.5 \mu\text{g/ml}$ diferența a devenit semnificativă. Efectul antitumoral al amestecului (1:1:1) este superior, valoarea CI_{50} obținută fiind mai mică.

5. Evaluarea „in vivo” pe șoareci de laborator a raportului eficacitate terapeutică (antioxidantă / antitumorală) – risc (toxicitate):

Anterior testării efectului antitumoral, s-a efectuat studiul preliminar de toxicitate al extractului liofilizat de *Artemisia annua* L. și al amestecului (1:1:1). Studiul a fost avizat de către Comisia de Bioetică a UMF „Iuliu-Hațieganu” Cluj-Napoca (aviz nr.369/28.IX.2017) și autorizat de către DSV Cluj (autorizație de proiect nr. 90/10.X.2017), în conformitate cu Legea 43/2014 și Directiva 63/2010 UE. Analiza parametrilor de proliferare tumorală a fost efectuată pe 5 loturi a câte 8 șoareci: lot control (inoculat cu soluție salină fiziologică), lot inoculat cu Carcinomul Ascitic Ehrlich (CAE) și netratat, lot inoculat CAE și tratat cu Doxorubicină, lot CAE tratat cu Doxorubicină și extract liofilizat de *Artemisia annua* L. și lot CAE tratat cu Doxorubicină și amestec (1:1:1). Numărul de loturi și numărul de animale per lot a fost redus la minim conform evaluărilor statistice și consultărilor bibliografice fără a împieta relevanța științifică a studiului. Modelul tumoral utilizat a fost CAE, inoculat intra peritoneal (i.p.), 10^6 celule ascitice/șoarece, în ziua 0. Lotului control și celui cu tumoră indusă i s-a administrat o terapie placebo, 0.5 ml soluție salină fiziologică / șoarece, i.p.. Antitumoralul utilizat drept referință este Doxorubicina clorhidrică (Adriablastină 10 mg , Pfizer), administrată în zilele 1 și 6, i.p. în doză de 2.5 mg/kg

masă corporală (dizolvată în maxim 0.5 ml soluție salină sterilă/șoarece). Cantitatea de *Artemisia annua* L. administrată este de 50 mg/kg masă corporală (doză stabilită în urma studiilor preliminare de toxicitate) și cantitatea de amestec (1:1:1) este de 50 mg/kg masă corporală (doză stabilită tot în urma studiilor preliminare de toxicitate), i.p. în zilele 1, 3 și 6. Înaintea inoculării i.p., extractele alcoolice au fost menținute într-un rotavapor la 40°C până s-a evaporat $\frac{3}{4}$ din volum, aducându-se apoi volumul cu soluție salină sterilă până la 0.5 ml/animal. Soluția a fost imediat administrată pentru a înlătura contaminarea bacteriană și fungică. Determinarea masei corporale a șoarecilor s-a realizat în zilele 0, 3, 6, 9, 12 și 14. Pe toată durata experimentului șoarecii au fost cazați în cuști din policarbonat, la 21-22°C, umiditate 40-60%, ciclul 12/12h lumină/întuneric, apă și furaj granulat standardizat la discreție. După 14 zile, șoarecii au fost supuși unei anestezii profunde cu izofluran, timp în care au fost recoltate probe de sânge și apoi au fost eutanasiați prin narcoză prelungită.

A. Studiul de toxicitate subacută al amestecului (1:1:1) comparativ cu al extractului liofilizat de Artemisia annua L.:

Studiul de toxicitate subacută al extractului liofilizat de *Artemisia annua* L. a fost realizat pe 10 șoareci Swiss adulți, 5 masculi și 5 femele negestante cu o greutate medie de 34.5±2.5g. Studiul de toxicitate subacută al amestecului (1:1:1) a fost realizat pe alți 10 șoareci (în aceleași condiții). Animalele au primit zilnic, timp de 14 zile, câte 1000 mg masă uscată./kg m.c. Animalele au fost evaluate clinic, zilnic pe tot parcursul experimentului; la sfârșitul experimentului au fost recoltate probe biologice și au fost eutanasiate. Sângele a fost utilizat pentru efectuarea examenului hematologic și biochimic. Șoarecii au fost necropsiați și au fost prelevate fragmente de ficat și rinichi în vederea examenului histopatologic. Secțiunile obținute din fragmentele de ficat și rinichi au fost colorate cu hematoxilină-eozină.

•Determinări biochimice:

S-a efectuat studiul toxicității la nivel hepatic (dozarea transaminazelor, albuminei și proteinei totale) și renal (dozarea creatininei și ureei). Determinările au fost realizate cu analizorul semiautomat pentru biochimie tip screen point, STAT - FAX 1904 Plus, Global Medical Instrumentation, Inc. 6511 Bunker Lake Blvd. Ramsey Minesota, 55303 USA și cu Kiturile Diagnosticum Zrt. Hungary, utilizate în conformitate cu specificațiile producătorului.

Tabel IV. Valorile biochimiei serice, administrare extract liofilizat *Artemisia annua* L. (1000 g / kg mc / 14 zile)

Lot	Uree (mg/dL)	Creatinină (mg/dL)	ALAT (U/L)	ASAT (U/L)	Proteină totală (g/dL)	Albumină (g/dL)
Masculi	15.97±2.35	0.350±0.130	32.56±1.34	125.78±45.98	5.54±0.22	3.45±0.32
Femele	19.90±6.52	0.360±0.182	46.89±2.54	185.76±56.72	6.06±0.18	3.67±0.78

Valori normale: Uree 12-28 mg/ml, Creatinină 0.3-1 mg/dl, ALAT 26-77U/L, ASAT 54-269 U/L, proteină totală 3.5-7.2g/dL, albumină 2.5-4.8g/dL (Hrapkiewicz și Medina, 2007) (Media±Eroarea Standard a Mediei) (n=5)

Tabel V. Valorile biochimiei serice, administrare Amestec (1:1:1) (1000 g / kg mc / 14 zile)

Lot	Uree (mg/dL)	Creatinină (mg/dL)	ALAT (U/L)	ASAT (U/L)	Proteină totală (g/dL)	Albumină (g/dL)
Masculi	14.63±1.44	0.412±0.022	43.56±1.96	137.64±33.76	5.71±0.22	3.05±0.32
Femele	18.88±5.33	0.459±0.135	52.22±2.34	195.12±42.77	6.32±0.18	2.97±0.21

Valori normale: Uree 12-28 mg/ml, Creatinină 0.3-1 mg/dl, ALAT 26-77U/L, ASAT 54-269 U/L, proteină totală 3.5-7.2g/dL, albumină 2.5-4.8g/dL (Hrapkiewicz și Medina, 2007) (Media±Eroarea Standard a Mediei) (n=5)

•**Determinări hematologice:**

S-a efectuat testarea toxicității hematologice (Eritrograma: determinare de eritrocite totale = E, hemoglobină = Hb, hematocrit = Ht, volum eritrocitar mediu = VEM, hemoglobină eritrocitară medie = HEM, concentrația hemoglobinei eritrocitare medii = CHEM, indice de anizocitoză = Ind.Aniz.; Leucograma: determinare de leucocite totale = Lt, limfocite = Limf, celule medii = CelMed, granulocite = Gra și Trombograma: determinare de trombocite totale, plateletocrit = Vol tromb%, volum trombocitar mediu = Vol tromb fl, indice de variație a volumului trombocitar = Var vol tromb fl). Determinările au fost realizate cu analizorul automat Abacus Junior Vet, Diatron, 3 Diff Messtechnik, Hungary.

Tabel VI. Valorile eritrogramei, administrare extract liofilizat *Artemisia annua* L. (1000 g / kg mc / 14 zile)

Lot	E ($10^{12}/l$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	VEM (fl)	HEM (pg)	CHEM (g/dl)	Ind.Aniz. (fl)
Masculin	8.58±0.81	13.08±1.31	41.08±2.01	47.87±1.34	15.24±0.19	31.84±0.68	33.59±1.24
Feminin	8.89±1.19	14.12±1.59	44.36±3.96	49.89±3.62	15.88±0.88	31.83±0.73	35.36±1.58

Valori normale: E 7-12.5 $10^{12}/l$, Hb 10.2-16.6 g/dl, Ht 39-49 % (Hrapkiewicz și Medina, 2007) (Media ± Eroarea Standard a Mediei) (n=5)

Tabel VII. Valorile eritrogramei, administrare Amestec (1:1:1) (1000 g / kg mc / 14 zile)

Lot	E ($10^{12}/l$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	VEM (fl)	HEM (pg)	CHEM(g/dl)	Ind.Aniz.(fl)
Masculin	8.92±0.44	14.25±0.31	43.15±1.91	48.33±0.53	15.29±0.13	31.36±0.17	34.32±0.20
Feminin	9.49±1.02	13.11±0.59	45.96±2.12	49.92±2.22	15.31±0.18	32.03±0.51	35.68±1.08

Valori normale: E 7-12.5 $10^{12}/l$, Hb 10.2-16.6 g/dl, Ht 39-49 % (Hrapkiewicz și Medina, 2007) (Media ± Eroarea Standard a Mediei) (n=5)

Tabel VIII. Valorile leucogramei, administrare extract liofilizat *Artemisia annua* L. (1000 g / kg mc / 14 zile)

Lot	Lt $10^9/l$	Limf $10^9/l$	Cel Med $10^9/l$	Gra $10^9/l$
Masculin	9.02±1.93	6.49±1.14	0.23±0.04	2.30±0.91
Feminin	9.65±1.77	6.80±0.46	0.29±0.09	2.56±1.21

Valori normale: Lt 6-15 $10^9/l$ (Hrapkiewicz și Medina, 2007) (Media ± Eroarea Standard a Mediei) (n=5)

Tabel IX. Valorile leucogramei, administrare Amestec (1:1:1) (1000 g / kg mc / 14 zile)

Lot	Lt $10^9/l$	Limf $10^9/l$	Cel Med $10^9/l$	Gra $10^9/l$
Masculin	10.25±1.04	7.03±0.11	0.21±0.01	1.99±0.41
Feminin	9.99±0.83	6.66±0.22	0.30±0.05	2.47±0.89

Valori normale: Lt 6-15 $10^9/l$ (Hrapkiewicz și Medina, 2007) (Media ± Eroarea Standard a Mediei) (n=5)

Tabel X. Valorile trombogramei, administrare extract liofilizat *Artemisia annua* L. (1000 g / kg mc / 14 zile)

Lot	Trombocite $10^9/l$	Vol tromb. %	Vol tromb fl	Var.vol.tromb. fl
Masculin	905.60±149.11	0.59±0.09	6.56±0.23	7.04±0.23
Feminin	941.60±302.34	0.68±0.19	7.36±0.72	8.78±1.76

Valori normale: Trombocite 800-1100 $10^6/l$ (Hrapkiewicz și Medina, 2007) (Media ± Eroarea Standard a Mediei) (n=5)

Tabel XI. Valorile trombogramei, administrare Amestec (1:1:1) (1000 g / kg mc / 14 zile)

Lot	Trombocite $10^9/l$	Vol tromb. %	Vol tromb fl	Var.vol.tromb. fl
Masculin	889.60±79.33	0.63±0.02	6.47±0.12	6.98±0.13
Feminin	941.60±100.56	0.57±0.07	7.57±0.22	8.90±0.57

Valori normale: Trombocite 800-1100 $10^6/l$ (Hrapkiewicz și Medina, 2007) (Media ± Eroarea Standard a Mediei) (n=5)

Testarea toxicității subacute a arătat că animalele nu au prezentat modificări clinice pe parcursul experimentului, toate animalele au supraviețuit până la final. Nu s-au înregistrat modificări notabile ale masei corporale, toate loturile în studiu având o ușoară tendință ascendentă. Parametrii biochimici și hematologici nu au suferit modificări, ei menținându-se în limite normale la toate animalele luate în studiu. Am demonstrat faptul că asocierea celor trei plante în cadrul Amestecului (1:1:1) nu este cu nimic mai toxică decât administrarea *Artemisiei annua* L. neasociată.

•*Analiza histopatologică:*

Imediat după sacrificarea animalelor fragmente din țesuturile hepatice și renale au fost colectate în soluție de formalină tamponată 40%, incluse la parafină și colorate cu hematoxină-eozină. Examinarea a fost realizată cu Microscopul Optic Olympus 1 CX41.

Studiul histologic al *ficatului* (Figura 1 și 2) a prezentat o structură normală, hepatocitele au aspect normal, sunt separate prin capilare sinusoidale, canalicule biliare și țesut de susținere. Cordoanele celulare ale lui Remack sunt bine evidențiate, țesutul de susținere intralobular este reprezentat de țesut conjunctiv în cantitate redusă, fibre de colagen și reticulină.

Studiul histologic al *rinichiului* (Figura 1 și 2) a evidențiat un aspect normal al parenchimului renal, la nivelul corticalei renale glomerulul renal este bine delimitat. Tubii contorți prezintă celule intacte cu nucleii sferici situați central. Țesutul conjunctivo-vascular din stroma corticalei este slab reprezentat.

Am demonstrat și pe această cale faptul că asocierea celor trei plante nu este cu nimic mai toxică decât administrarea *Artemisiei annua* L. neasociată.

B. Analiza parametrilor de proliferare tumorală:

Pentru loturile cu tumoră indusă a fost colectat lichidul ascitic al CAE pentru a analiza parametri de proliferare tumorală (aspirare cu siringa din lichidul peritoneal). Determinarea concentrației celulelor tumorale a fost realizată utilizând camera Burker, iar determinarea viabilității celulare a fost evaluată prin colorare cu albastru de tripan.

S-a constatat o scădere semnificativă a volumului ascitic și a concentrației celulelor tumorale în cazul lotului CAE+Doxorubicină+*Artemisia annua* L. față de lotul CAE+Doxorubicină și de asemenea o scădere a volumului ascitic și a concentrației celulelor tumorale în cazul lotului CAE+Doxorubicină+Amestec (1:1:1) față de lotul CAE+Doxorubicină+*Artemisia annua* L. ceea ce demonstrează eficacitatea asocierii extractului vegetal cu Doxorubicina și mai mult eficacitatea asocierii celor trei plante în Amestec (1:1:1) la Doxorubicină. Pe această cale este demonstrată activitatea antitumorală superioară a Amestecului (1:1:1) față de administrarea doar a *Artemisiei annua* L. (Figura 3).

Determinarea masei corporale a șoarecilor s-a realizat în zilele 0, 3, 6, 9, 12 și 14. S-a constatat o scădere semnificativă a masei corporale în cazul loturilor CAE+Doxorubicină și CAE+Doxorubicină+*Artemisia annua* L. față de CAE, o scădere mai accentuată în cazul lotului CAE+Doxorubicină+*Artemisia annua* L. față de lotul CAE+Doxorubicină și mai mult, o scădere mai accentuată în cazul lotului CAE+Doxorubicină+Amestec față de lotul CAE+Doxorubicină+*Artemisia annua* L. ceea ce demonstrează eficacitatea superioară a asocierii

amestecului vegetal (1:1:1) cu Doxorubicina față de asocierea doar a *Artemisiei annua* L. la Doxorubicină. Este evidențiat astfel efectul antitumoral superior al Amestecului (1:1:1) față de *Artemisia annua* L. singură (Figura 4).

C. *Determinarea enzimelor implicate direct (SOD, CAT) și indirect (XOD, Px) în stresul oxidativ din celulele CAE și din sânge a fost realizată utilizând Specord 200 PLUS și kituri achiziționate de la BioVision, USA, conform specificațiilor producătorului.*

Inocularea CAE este asociată cu creșterea marcată a activității celor 4 enzime deoarece celulele tumorale determină o creștere a radicalilor liberi de oxigen. Pentru loturile CAE+Doxorubicină și CAE+Doxorubicină+*Artemisia annua* L. și CAE+Doxorubicină+Amestec (1:1:1) se înregistrează scăderi semnificative ale activității celor 4 enzime comparativ cu lotul CAE. Diferență semnificativă se obține între lotul CAE+Doxorubicină+*Artemisia annua* L. față de CAE+Doxorubicină ceea ce demonstrează intensificarea efectului antioxidant în urma asocierii *Artemisiei annua* L. cu Doxorubicina. De asemenea diferență semnificativă se obține și între lotul CAE+Doxorubicină+Amestec (1:1:1) față de CAE+Doxorubicină+*Artemisia annua* L. ceea ce demonstrează intensificarea efectului antioxidant în urma asocierii Amestecului (1:1:1) cu Doxorubicina (Tabel XII).

Tabel XII. Influența extractului de *Artemisia annua* L. și a Amestecului (1:1:1) asupra activității CAT, SOD, XOD, Px (celule tumorale ascitice) (mU/g) la șoarecii inoculați cu CAE (Media ± Eroarea Standard a Mediei) (n = 8 animale / grup) (Anova one way, Bonferoni post test, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 în comparație cu lotul CAE + Doxo, # p<0.05 comparativ cu lotul CAE + Doxo + *Artemisia annua* L.).

Lot	CAT	XOD	Px	SOD
CAE	3.52±0.11	0.34±0.05	0.65±0.04	2.50±0.12
CAE + Doxo	1.81±0.09	3.00±0.08	3.90±0.10	1.21±0.08
CAE + Doxo + <i>Artemisia annua</i> L.	1.00±0.07***	3.22±0.10***	4.02±0.06***	0.50±0.04***
CAE + Doxo + Amestec (1:1:1)	0.73±0.05***#	3.64±0.12***#	4.39±0.13***#	0.44±0.03***

Între celulele tumorale ascitice și sânge s-a constatat o corelație pozitivă a activității pentru enzimele antioxidante (CAT și SOD) și una negativă pentru enzimele XOD și Px. Corelația negativă denotă o intensificare a stresului oxidativ în celulele tumorale, la concentrația la care se manifestă și efectul citotoxic/antiproliferativ, ceea ce sugerează că alterarea capacității antioxidante poate fi considerată unul din posibilele mecanisme citotoxice și/sau antiproliferative ale extractului de *Artemisia annua* L. și al Amestecului (1:1:1). (Tabel XII și XIII).

Tabel XIII. Influența extractului de *Artemisia annua* L și a Amestecului (1:1:1) asupra activității CAT, SOD, XOD, Px (sânge) (mU/mL) la șoarecii inoculați cu CAE. (Media ± Eroarea Standard a Mediei) (n = 8 animale / grup) (Anova one way, Bonferoni post test, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 în comparație cu lotul CAE + Doxo, # p<0.05, ## p<0.01 comparativ cu lotul CAE + Doxo + *A. annua*).

Lot	CAT	XOD	Px	SOD
Martor	1.04±0.06	1.13±0.04	0.52±0.04	0.80±0.07
CAE	6.92±0.10	4.20±0.14	3.75±0.14	4.47±0.11
CAE + Doxo	5.01±0.07	2.21±0.09	2.54±0.11	3.11±0.08
CAE + Doxo + <i>Artemisia annua</i> L.	4.34±0.10***	1.43±0.10***	2.03±0.11***	2.01±0.07***
CAE + Doxo + Amestec (1:1:1)	3.95±0.08***#	1.02±0.12***#	1.73±0.10***	1.74±0.05***##

Efectul antioxidant/antitumoral al Amestecului (1:1:1) este superior față de cel al extractului de *Artemisia annua* L. singur, fiind demonstrată potențarea efectului antioxidant/antitumoral în

urma administrării Amestecului (1:1:1) cu Doxorubicina față de administrarea extractului liofilizat de *Artemisia annua* L. cu Doxorubicină după inocularea CAE la șoareci.

În concluzie, amestecul de *Artemisia annua* L. + *Verbascum plomoides* L. + *Centaurea cyanus* (1:1:1) deține proprietăți antioxidante/antitumorale superioare extractului de *Artemisia annua* L., ceea ce demonstrează utilitatea noului fitoprodus propus.

Revendicare:

Supliment alimentar caracterizat prin aceea că este constituit 10-20% amestec de extracte liofilizate de *Artemisia annua* L., *Verbascum phlomoides* L., *Centaurea cyanus* în raport 1:1:1, dizolvate într-un amestec hidro-glicerinat raport 9:1.

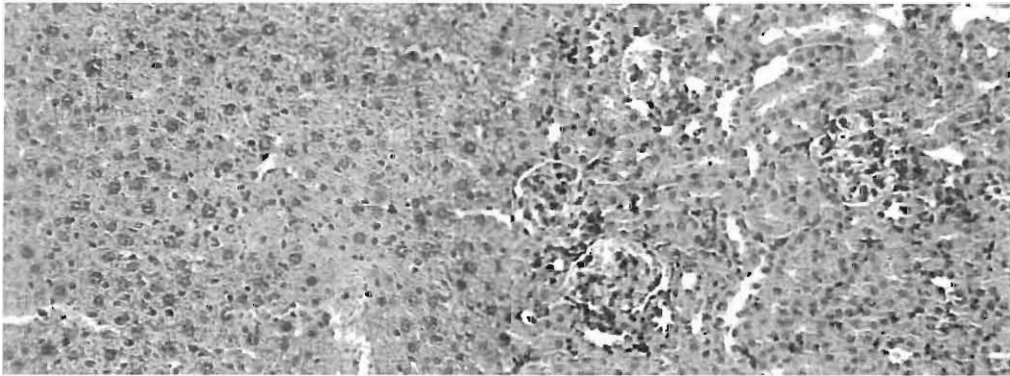


Figura 1. Administrare extract *Artemisia annua* L. (1000 g / kg mc / 14 zile). HE (x200)
Stânga = Lobulul hepatic Dreapta = Corticala renală

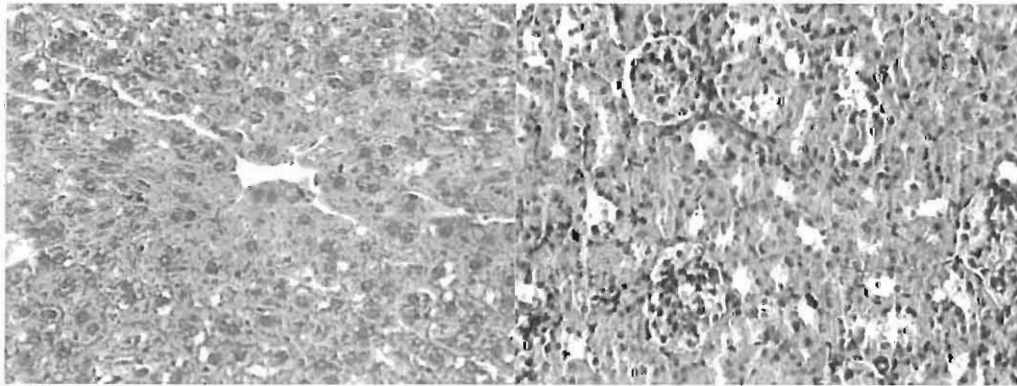


Figura 2. Administrare Amestec (1:1:1) (1000 g / kg mc / 14 zile). HE (x200)
Stânga = Lobulul hepatic Dreapta = Corticala renală

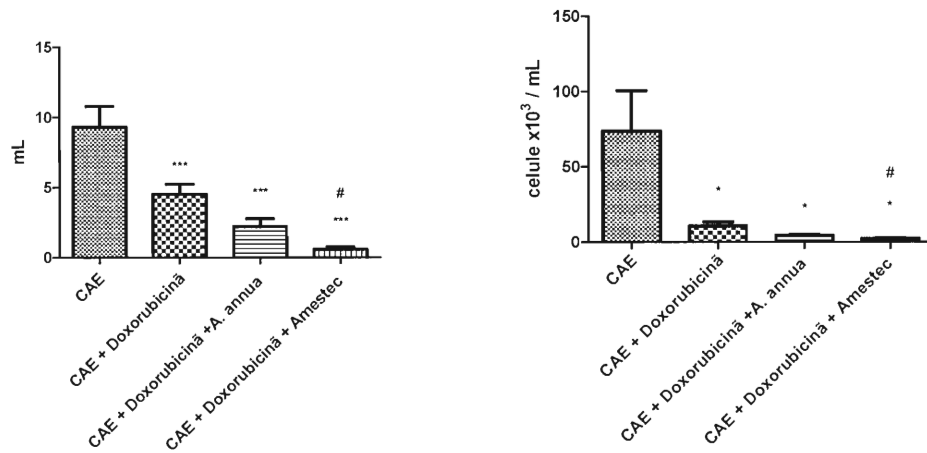


Figura 3. Influența extractului *Artemisia annua* L. și a amestecului (1:1:1) asupra volumului ascitic (mL)(stânga) și a concentrației celulare tumorale a lichidului peritoneal (10³/mL) (dreapta) la șoarecii inoculați cu CAE (Media ± Eroarea Standard a Mediei) (n = 8 animale / grup) (Anova one way, Bonferoni post test, * p<0.05, *** p<0.001, comparativ cu lotul CAE, # p < 0.05, comparativ cu lotul CAE + Doxorubicina + *Artemisia annua* L.)

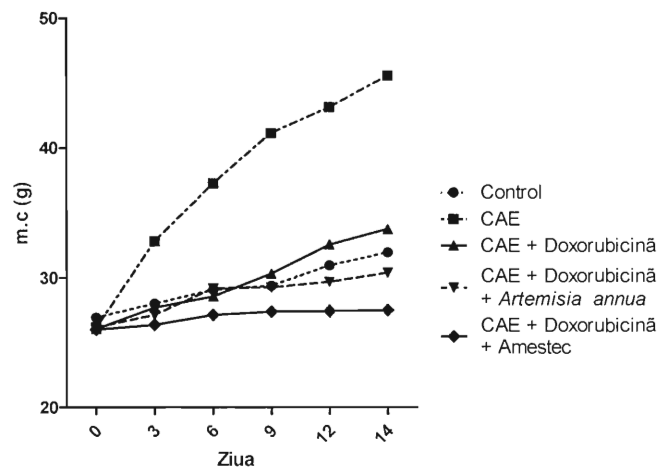


Figura 4. Influența *Artemisia annua* L. și a Amestecului (1:1:1) asupra dinamicii masei corporale la șoarecii inoculați cu CAE (Media ± Eroarea Standard a Mediei) (n = 8 animale / grup) (Anova two way, Bonferoni post test).