



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00390**

(22) Data de depozit: **08/07/2020**

(41) Data publicării cererii:
28/01/2022 BOPI nr. **1/2022**

(71) Solicitant:

- **AGNES ITARA S.R.L., STR. VERONICA MICLE, NR.13, BL.18, SC.A, ET.2, AP.7, SUCEAVA, SV, RO;**
- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE CHIMICO-FARMACEUTICĂ - ICCF, CALEA VITAN NR.112, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

- **NICHITA CORNELIA, STR.ȘTIRBEI VODĂ, NR.107, BL.C24, SC.A, ET.8, AP.29, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **GRIGORE ALICE - ELENA, STR.CETATEA DE BALTĂ, NR.41, BL.07A, SC.1, ET.6, AP.38, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **FODOR MARIANA, STR.VERONICA MICLE, NR.13, BL.18, SC.A, ET.2, AP.7, SUCEAVA, SV, RO;**

- **COLCERU - MIHUL SVETLANA GABRIELA, STR.RÂMNICU SĂRAT, NR.29, BL.11A1, SC.A, ET.10, AP.42, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **RUSU NICOLETA, STR.ARIEȘUL MIC NR.1, BL.15, AP.28, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **BAZDOACA CRISTINA - MIRELA, BVD.DIMITRIE CANTEMIR, NR.13, BL.11, SC.A, ET.8, AP.29, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **MATEI DONCIU ROXANA ELENA, STR.PLT.MAJ.MARIN PAZON, NR.3, BL.G 14, SC.C, ET.2, AP.28, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **STARAȘ ADELA, STR.PRELUNGIREA BUCUREȘTI, NR.5, BL.C19, SC.A, ET.2, AP.3, CĂLĂRAȘI, CL, RO;**
- **BĂRBUȚĂ PAUL, CALEA FERENTARI, NR.72, BL.A5, SC.D, ET.1, AP.27, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PASTA DE DINȚI ANTIBACTERIANĂ PE BAZĂ DE ARGINT IONIC COLOIDAL ȘI EXTRACTE VEGETALE ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTEIA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs de tip pastă de dinți cu acțiune antibacteriană pe bază de argint ionic coloidal și extracte vegetale. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de extracție prin ultrasonare a unui material vegetal constituit din speciile *Salvia officinalis L.*, *Achillea millefolium L.*, *Monarda didyma L.*, în raport masic egal, concentrarea la vid a filtratului până la evaporarea completă a solventului, dizolvarea rezidului în glicerină vegetală,

etapă urmată de formularea produsului prin omogenizarea extractului vegetal cu soluție de argint coloidal, soluție de zinc ionic coloidal și gumă guar, adăugarea de carbonat de calciu, xilitol, tensidă de cocos, ulei de mentă, carbune activ, cu omogenizare, rezultând un produs antibacterian de tip pastă de culoare cenușie, cu miros mentolat și gust plăcut.

Revendicări: 5

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).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 220 390
Data depozit	08-07-2020

30

PASTA DE DINTI ANTIBACTERIANA PE BAZA DE ARGINT IONIC COLOIDAL SI EXTRACTE VEGETALE SI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTEIA

Inventia se refera la obtinerea unui nou produs de tip pasta de dinti naturala cu actiune antibacteriana, pe baza de argint ionic coloidal si extracte vegetale, cu aplicatie directa, ca produs de igiena personala.

Produsul pasta de dinti prezinta actiune antibacteriana semnificativa si o compozitie chimica standardizata, avand la baza principii active vegetale de tip - polifenoli totali, derivati flavonoidici si uleiuri esentiale, extrase din specile vegetale: *Salvia officinalis* L., *Achillea millefolium* L., *Monarda didyma* L., solutie de argint ionic coloidal, solutie de zinc ionic coloidal si carbune activ.

Este cunoscut ca părțile aeriene (*folium*) aparținând speciei vegetale *Salvia officinalis* L., (*folium*), conțin 1,5 – 2,5 % ulei volatil (camfor, 1,8-cineol, acetat de linalil, camfen, mircen, limonen), derivați flavonici (glicozide ale quercetolului și kaempferolului, luteolin), acizi polifenolicarboxilici: acid cafeic, acid rozmarinic, acid chlorogenic, acid ferulic, taninuri catehice, derivați mono și di terpenici [1-3].

Este cunoscută ca specia vegetală *Achillea millefolium* L., are în compoziția chimică 0,1 – 0,5, ulei volatil (thymol, carvacrol, sabinene, α -pinene, β -pinene limonene, γ -terpinene, camphene)[4], flavonozide (derivați ai apigenolului, quercetolului și luteolului), principii amare proazulenice, tanin, acizi organici, acizi polifenolicarboxilici (acid chlorogenic, acid cafeic) și vitamine (E și K) componente care generează acțiunea biologică antibacteriană și antiinflamatoare[5].

Este cunoscut faptul că specia vegetală *Monarda didyma* L., prezintă o compoziție chimică complexă, formată din compuși terpenici: thymol, p-cymene, γ -terpinolene, myrcene, camphene, γ -terpinolene, limonene[6, 7] compuși flavonoidici (rutin, hyperoside, apigenin-7-O-rutinoside, kaempferol diglicoside, luteolin, quercetin) acizi polifenolicarboxilici (acid rozmarinic, acid cafeic) acizi hidroxibenzoici (acid siringic) [8,9].

Este cunoscut în literatura de specialitate faptul că argintul ionic coloidal prezintă acțiunea antivirală, antibacteriană și antiinflamatorie [10-12]. Este cunoscută în literatura de specialitate importanța zincului coloidal pentru întărirea sistemului imunitar, precum și rolul său antioxidant, antiseptic, antiinflamator, antiviral, antibacterian și antimicotic [13].

De asemenea sunt cunoscute în literatura de specialitate proprietățile biologice ale extractelor vegetale cum ar fi acțiunea antivirală, antibacteriană și antiinflamatorie, ceea ce determină utilizarea acestora, în procesul de fabricație pentru o gamă largă de produse de igiena personală [14].

Bibliografie

1. Roby, Mohamed Hussein Hamdy, Mohamed Atef Sarhan, Khaled Abdel-Hamed Selim, and Khalel Ibrahim Khalel. "Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds

- in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts." *Industrial Crops and Products* 43 (2013): 827-831.
2. Gird, Cerasela Elena, Ioana Nencu, Teodora Costea, Ligia Elena Duțu, Maria Lidia Popescu, and Nicoleta Ciupitu. "Quantitative analysis of phenolic compounds from *Salvia officinalis* L. leaves." *Farmacia* 62, no. 4 (2014): 649-657.
 3. Porte, A., R. L. O. Godoy, and L. H. Maia-Porte. "Chemical composition of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil)." *Revista Brasileira de Plantas Medicinai* 15, no. 3 (2013): 438-441.
 4. Sahari Moghadam, A., A. Mehrafarin, and H. Naghdi Badi. "Chemical composition and antioxidant activity *Achillea millefolium* L. essential oils." *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 20, no. 1 (2017): 293-297.
 5. Afshari, Mahvash, Mehdi Rahimmalek, and Mehran Miroliaei. "Variation in polyphenolic profiles, antioxidant and antimicrobial activity of different *Achillea* species as natural sources of antiglycative compounds." *Chemistry & biodiversity* 15, no. 8 (2018): e1800075.
 6. Mattarelli, Paola, Francesco Epifano, Paola Minardi, Maura Di Vito, Monica Modesto, Lorenzo Barbanti, and Maria Grazia Bellardi. "Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from aerial parts of *Monarda didyma* and *Monarda fistulosa* cultivated in Italy." *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 20, no. 1 (2017): 76-86.
 7. Fraternali, Daniele, Laura Giamperi, Anahi Bucchini, Donata Ricci, Francesco Epifano, Giovanni Burini, and Massimo Curini. "Chemical composition, antifungal and in vitro antioxidant properties of *Monarda didyma* L. essential oil." *Journal of Essential Oil Research* 18, no. 5 (2006): 581-585.
 8. Savickiene, N., A. Dagilyte, Z. Barsteigiene, S. Kazlauskas, and J. Vaiciūniene. "Analysis of flavonoids in the flowers and leaves of *Monarda didyma* L." *Medicina* 38, no. 11 (2002): 1119-1122.
 9. Ahn, Jiyoung, Andie R. Alford, and Emily D. Niemeyer. "Variation in phenolic profiles and antioxidant properties among medicinal and culinary herbs of the Lamiaceae family." *Journal of Food Measurement and Characterization* (2020): 1-13.
 10. Galdiero, Stefania, Annarita Falanga, Mariateresa Vitiello, Marco Cantisani, Veronica Marra, and Massimiliano Galdiero. "Silver nanoparticles as potential antiviral agents." *Molecules* 16, no. 10 (2011): 8894-8918.
 11. Morrill, Kira, Kathleen May, Daniel Leek, Nicole Langland, La Deana Jeane, Jose Ventura, Corey Skubisz et al. "Spectrum of antimicrobial activity associated with ionic colloidal silver." *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 19, no. 3 (2013): 224-231.
 12. Shin, Seung Heon, Mi Kyung Ye, Mi Hyun Che, and Dong Won Lee. "Anti-Inflammatory Effect of Nano Silver in Chronic Rhinosinusitis Mouse Model." *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research* 11, no. 1 (2018): 8287-8292.
 13. Sonia, S., K. Ruckmani, and M. Sivakumar. "Antimicrobial and antioxidant potentials of biosynthesized colloidal zinc oxide nanoparticles for a fortified cold cream formulation: a potent nanocosmeceutical application." *Materials Science and Engineering: C* 79 (2017): 581-589.
 14. Sökmen, Münevver, Julia Serkedjieva, Dimitra Daferera, Medine Gulluce, Moschos Polissiou, Bektas Tepe, H. Askin Akpulat, Fikrettin Sahin, and Atalay Sokmen. "In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*." *Journal of agricultural and food chemistry* 52, no. 11 (2004): 3309-3312.

Sunt cunoscute precedee de obtinere a pastei de dinti, cum ar fi omogenizarea si stabilizarea prin adaugare de excipienti si conservanti chimici si naturali, cum ar fi: glicerina, PEG-8, silice hidratata, fosfosilicat de sodiu de calciu, cocamidopropil betaină, sarea de sodiu al acidului gras de nuca de cocos si al N-metil taurinei, arome sintetice, dioxid de titan, carbomeri, zaharina sodica, monoterpene ciclice, fluorura de sodiu.

Produsele cunoscute si procedeele de obtinere a acestora prezinta o serie de dezavantaje cum ar fi: continut extracte vegetale nstandardizate in principii active de interes biologic, adaosul de conservanti chimici in cazul produselor si existenta unor

aspecte legate de stabilitatea argintului ionic coloidal si deasemeni costurile ridicate, in cazul procedeelor.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia consta in aceea ca se obtine un produs de tip pasta de dinti cu continut de extract vegetal standardizat, argint ionic coloidal, zinc ionic coloidal si carbune active, lipsit de toxicitate, care prezinta activitate antibacteriana semnificativa, printr-un procedeu special conceput care sa permita atat standardizarea principiilor active vegetale cat si standardizarea si stabilitatea fizico-chimica a produsului finit.

Produsul conform inventiei este constituit prin combinarea optima a ingredientelor specifice (carbonat de calciu, xilitol, tensida de cocos, ulei de mentă si agent antimicrobial Cosgar) cu solutie de argint ionic coloidal, solutie de zinc ionic coloidal, carbune active si un extract vegetal standardizat obtinut din speciile vegetale: *Salvia officinalis* L., *Achillea millefolium* L., *Monarda didyma* L.

Procedeu de obtinere a extractului standardizat este urmatorul:

Extractului standardizat care se prezinta sub forma lichida, cu miros si culoare caracteristica, este obtinut in urma procesului de extractia cu ultrasunete a speciilor vegetale *Salvia officinalis* L., *Achillea millefolium* L., *Monarda didyma* L., (in raport masic egal 1:1:1=m/m/m) uscate si macinate, utilizand solvent alcool etilic 50%(v), in raport material vegetal: solvent = 1:10...1:12 (m/v) la temperatura de 65...70°C, timp de 20...30 minute, etapa urmata de indepartarea deseului de planta prin filtrare si presare cand se obtine o solutie extractiva hidroalcoolica, care se supune procesului de concentrare la vid sub presiune redusa (72-75 mm Hg), la temperatura cuprinsa intre 60...70°C, pana la evaporarea completă a solventului si obtinerea unui reziduu spiss (g) de culoare galben-brun cu miros aromat de plante, care se dizolva in glicerina vegetala(mL) pentru a obtine o concentratie a extractului de 0,25g/mL, avand o compozitie standardizata cu continut de 0,8424...1,0296 mg/100mL acid clorogenic, 0,225...0,275 mg/100mL acid caffeic, 0,819...1,002 mg/100ml rutin, 1,1196...1,3695 mg/100ml quercetin hidrat, 0,4419...0,5401 mg/100ml kaempferol, 3,7296...4,5584 mg/100ml acid rosmarinic, 0,567...0,693 mg/100ml acid ferulic, 0,0234...0,0286 mg/100ml luteolin.

Procedeu de obtinere a pastei de dinti

Pasta de dinti, se obtine prin aplicarea metodei de omogenizare in sistem continuu care se realizeaza cu ajutorul echipamentului Thermomix (mixer industrial) si care consta intr-o prima etapa in omogenizarea in proportii bine definite a extractului standardizat cu solutie de argint ionic coloidal de concentratie 77ppm, solutie de zinc ionic coloidal de concentratie 5ppm si guma guar, timp de 5...10 minute la viteza de 400... 600 rot/min, proces urmat de adaugarea de carbonat de calciu, xilitol, tensida de cocos, ulei de mentă și agent antimicrobial Cosgar si reluarea procesului de omogenizare timp de 15...30 minute la viteza de 400...600 rot/min dupa care se aduga carbune activ si se continua omogenizarea pana la obtinerea unei paste cu aspect onctuos de culoare cenusie cu miros mentolat si gust placut.

Procedeu conform inventiei inlatura dezavantajele produselor cunoscute prin aceea ca are in compozitie solutie de argint ionic coloidal, solutie de zinc ionic coloidal, carbune activ si un extract vegetal cu un continut standardizat de 0,8424...1,0296

mg/100mL acid clorogenic, 0,225...0,275 mg/100mL acid cafeic, 0,819...1,002 mg/100ml rutin, 1,1196...1,3695 mg/100ml quercetin hidrat, 0,4419...0,5401 mg/100ml kaempferol, 3,7296...4,5584 mg/100ml acid rosmarinic, 0,567...0,693 mg/100ml acid ferulic, 0,0234...0,0286 mg/100ml luteolin. Produsul pasta de dinti este lipsit de toxicitate rezultatele obținute evidentând absența citotoxicității pe linia de fibroblaste murine L929(ATCC CRL-6364) in conditii de expunere standard timp de 24h. Examinarea la microscopul inversat a relevat ca in urma expunerii celulelor la diverse concentratii a pastei de dinti nu se inregistreaza modificari morfologice ale celulelor si nu se observa efecte citotoxice sau citopatiche.

Evaluarea cantitativă a efectelor citotoxice s-a realizat determinându-se viabilitatea celulară prin metoda MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol, cu ajutorul kitului CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS), *Promega*. La concentratii de 1 - 2,5%, testul permite clasificarea produsului pasta de dinti ca fiind practic lipsit de citotoxicitate, după o expunere de 24 ore.

Rezultatele obtinute in urma evaluarii contaminarii microbiene realizata prin metoda de testare a numărului total microorganisme aerobe viabile, în condițiile prevăzute de Farmacopeea Europeana (Vol. I, cap. 2.6.12.), demonstreaza ca pasta de dinti este conforma din punct de vedere al incarcaturii microbiene, prezentand valori sub cele maxime impuse de catre Farmacopeea Europeana in vigoare, respectiv < 10 UFC/g.

Rezultatele testarii farmacologice a actiunii specifice, respectiv a efectul antibacterian realizat prin metoda difuziometrica Kirby Bauer, in conditiile prevazute in Farmacopeea Romana X, au indicat un efect antibacterian semnificativ asupra microorganismelor *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 si *Escherichia coli* ATCC 8739 ceea ce permite utilizarea pastei de dinti atat ca produs de igiena personala cat si ca produs avand rol in prevenția și terapia afecțiunilor parodontale.

Procedeul conform inventiei inlatura dezavantajele produselor cunoscute prin aceea că produsul pasta de dinti antibacteriana contine extract vegetal standardizat, obținut din speciile vegetale *Salvia officinalis* L., *Achillea millefolium* L., *Monarda didyma* L., avand urmatoarea compozitie, determinata prin cromatografie de lichide de inalta performanta (HPLC-DAD): 0,8424...1,0296 mg/100mL acid clorogenic, 0,225...0,275 mg/100mL acid cafeic, 0,819...1,002 mg/100ml rutin, 1,1196...1,3695 mg/100ml quercetin hidrat, 0,4419...0,5401 mg/100ml kaempferol, 3,7296...4,5584 mg/100ml acid rosmarinic, 0,567...0,693 mg/100ml acid ferulic, 0,0234...0,0286 mg/100ml luteolin precum si solutie de argint ionic coloidal, solutie de zinc ionic coloidal, carbune activ si ingredient specific: guma guar, carbonat de calciu, xilitol, tensida de cocos, ulei de mentă, cosgar. Deasemenea produsul pasta de dinti este lipsit de toxicitate rezultatele obtinute evidentând absenta citotoxicității pe linia de fibroblaste murine L929(ATCC CRL-6364), este conform din punct de vedere al incarcaturii microbiene, prezentand valori sub cele maxime impuse de catre Farmacopeea Europeana in vigoare, respectiv < 10 UFC/g si prezinta o activitate antibacteriana semnificativa, asupra microorganismelor *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 si *Escherichia coli* ATCC 8739.

Procedeul conform inventiei inlatură dezavantajele procedeelelor cunoscute prin aceea că se realizeaza prin combinarea optima a extractului vegetal standardizat cu soluție argint ionic coloidal 77ppm, soluție zinc ionic coloidal 5 ppm si carbune active, extractul standardizat fiind obtinut in urma procesului de extractia a materialul vegetal

contituit din amestec in raport masic egal 1:1:1=m/m/m (*Salvia officinalis* L., *Achillea millefolium* L., *Monarda didyma* L.), maruntit si omogenizat, utilizand solvent alcool etilic 50% , in raportul material vegetal: solvent cuprins intre 1:10 (m/v) ...1:12 (m/v), prin ultrasonare timp de 20...30 minute la temperatura de 65...70°C, etapa urmata de indepartarea deseului de planta prin filtrare si presare cand se obtine o solutie extractiva hidroalcoolica care se concentreaza, la temperatura de 60...70°C si presiune scazuta (72-75 mm Hg), pana la evaporarea completa a solventului si obtinerea unui reziduu spiss de culoare galben-brun si miros caracteristic, care se dizolva in glicerina vegetala pentru a obtine o concentratie de 0,25g/ml (g reziduu spiss/ ml glicerina).

Procedeul conform inventiei inlatura dezavantajele procedeelor cunoscute prin aceea ca extract vegetal standardizat se omogenizeaza cu solutie argint ionic coloidal 77ppm, solutie zinc ionic coloidal 5 ppm si guma guar, timp de 5...10 minute la viteza de rotatie de 400...600rot/min dupa care se adauga carbonat de calciu, xilitol, tensida de cocos, ulei de menta si agent antimicrobian Cosgar si se continua agitarea timp de 15...30 de minute la viteza de rotatie de 400...600 rot/min dupa care se adauga carbune activ si se continua omogenizarea pana la inglobarea completa a carbunelui activ, rezultand pasta de dinti, cu aspect de masa onctuoasa de culoare cenusie cu miros mentolat cu proprietati fizico-chimice standardizate.

Avantajele produsului pasta de dinti antibacteriana, conform inventiei constau in aceea ca:

- extractul vegetal utilizat in procesul tehnologic de fabricatie, este standardizat avand urmatoarea compozitie, determinata prin cromatografie de lichide de inalta performanta (HPLC -DAD): 0,8424...1,0296 mg/100mL acid clorogenic, 0,225...0,275 mg/100mL acid caffeic, 0,819...1,002 mg/100ml rutin, 1,1196...1,3695 mg/100ml quercetin hidrat, 0,4419...0,5401 mg/100ml kaempferol, 3,7296...4,5584 mg/100ml acid rosmarinic, 0,567...0,693 mg/100ml acid ferulic, 0,0234...0,0286 mg/100ml luteolin
 - este lipsit de toxicitate, rezultatele obtinute evidentiaza absenta citotoxicitatii pe linia de fibroblaste murine L929(ATCC CRL-6364)
 - este conform din punct de vedere al incarcaturii microbiene, prezentand valori sub cele maximale impuse de catre Farmacopeea Europeana in vigoare, respectiv < 10 UFC/g.
 - prezinta o activitate antibacteriana semnificativa, asupra microorganismelor *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 si *Escherichia coli* ATCC 8739
- Avantajele procedeului de obtinerea a produsului pasta de dinti antibacteriana conform inventiei, constau in aceea ca:
- produsul este obtinut prin combinarea optima a extractului standardizat obtinut din speciile vegetale *Salvia officinalis* L., *Achillea millefolium* L., *Monarda didyma* L., cu o solutie de argint ionic coloidal, o solutie de zinc ionic coloidal si guma guar prin omogenizarea, proces urmat de adaosul de ingrediente (carbonat de calciu, xilitol, tensida de cocos, ulei de menta si agent antimicrobian Cosgar) si carbune activ.
 - produsul este obtinut printr-o tehnologie nepoluanta, economica si rapida, care conduce la obtinerea unui nou produs pasta de dinti pe baza de argint ionic coloidal, zinc ionic coloidal si carbune active, cu inalt potential antibacterian demonstrat prin testarea farmacologica.

- este practic netoxic, produsul finit fiind obtinute prin procedee nepoluante si solventi lipsiti de toxicitate.

Produsul pasta de dinti antibacteriana, este lipsit de toxicitate, rezultatele testarii farmacologice *in vitro* demonstreaza absența citotoxicității linia de fibroblaste murine L929(ATCC CRL-6364) in conditii de expunere standard timp de 24 h.

Evaluarea calitativă a efectelor citotoxice s-a realizat examinandu-se la microscop morfologia celulara, gradul de etalare, vacuolizare si detasare, liza celulara si integritatea membranara. Examinarea la microscopul inversat a relevat ca in urma expunerii celulelor la diverse concentratii a pastei de dinti nu se inregistreaza modificari morfologice ale celulelor si nu se observa efecte citotoxice sau citopatie.

Evaluarea cantitativa a efectelor citotoxice s-a realizat prin determinarea viabilitatii celulară prin metoda cu MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol, cu ajutorul kitului CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS), *Promega*. La concentratii de 1 - 2,5%, testul permite clasificarea produsului pasta de dinti ca fiind practic lipsit de citotoxicitate, după o expunere de 24 ore.

Rezultatele obtinute in urma evaluarii contaminarii microbiene realizata prin metoda de testare a numărului total microorganisme aerobe viabile, in conditiile prevazute de Farmacopeea Europeana (Vol. I, cap. 2.6.12.), demonstreaza ca pasta de dinti este conforma din punct de vedere al incarcaturii microbiene, prezentand valori sub cele maxime impuse de catre Farmacopeea Europeana in vigoare, respectiv < 10 UFC/g.

Rezultatele testarii farmacologice a actiunii specifice, respectiv a efectul antibacterian realizat prin metoda difuziometrica Kirby Bauer, in conditiile prevazute in Farmacopeea Romana X, au indicat un efect antibacterian semnificativ asupra microorganismelor *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 si *Escherichia coli* ATCC 8739 ceea ce permite utilizarea pastei de dinti atat ca produs de igiena personala cat si produs avand rol in preventia si terapia afectiunilor parodontale.

Se prezinta in continuare un exemplu de realizare a inventiei.

Obtinerea extractului standardizat

Mod de lucru:

450...600 g proba materialul vegetal amestec in raport masic egal 1:1:1=m/m/m (*Salvia officinalis* L., *Achillea millefolium* L., *Monarda didyma* L.), maruntit si omogenizat, se extrage utilizand solvent alcool etilic 50%, in raportul material vegetal: solvent cuprins intre 1:10 (m/v) ...1:12 (m/v), prin ultrasonare timp de 20...30 minute la temperatura de 65...70°C, etapa urmata de indepartarea deseului de planta prin filtrare si presare cand se obtine o solutie extractiva hidroalcoolica. Solutia se concentreaza, la 60...70°C si presiune scazuta (72-75 mm Hg), pana la evaporarea completa a solventului si obtinerea unui reziduu spiss de culoare galben-brun si miros caracteristic, care se dizolva in glicerina vegetala pentru a obtine o concentratie de 0,25g/ml.

Extractul vegetal a fost standardizat avand urmatoarea compozitie 0,8424...1,0296mg/100mL acid clorogenic, 0,225...0,275mg/100mL acid caffeic, 0,819...1,002 mg/100ml rutin, 1,1196...1,3695mg/100ml quercetin hidrat, 0,4419...0,5401 mg/100ml kaempferol, 3,7296...4,5584mg/100ml acid rosmarinic,

0,567...0,693mg/100ml acid ferulic, 0,0234...0,0286 mg/100ml luteolin, determinata prin cromatografie de lichide de inalta performanta (HPLC -DAD).

Obtinerea produsului pasta de dinti - Formulare

Mod de lucru

330...360 ml extract vegetal standardizat se omogenizeaza cu 1520...1560 ml solutie argint ionic coloidal 77ppm, 1080...1180 ml soluție zinc ionic coloidal 5 ppm și 24...30 g guma guar, timp de 5...10 minute la viteza de rotatie de 400...600rpm. Ulterior in vasul de lucru se adaugă 1620...1680 g carbonat de calciu, 160...190 g xilitol, 80...95 g tensida de cocos, 30...36 ml ulei de menta si 40...48 mL Cosgar și se continuă procesului de omogenizare timp de 15...30 minute la viteza de 400...600 rot/min, dupa care se adaugă 48...58 g cărbune active si se continua omogenizarea pana la inglobarea complete a carbunelui activ. Se obțin în medie 4800...5200 mg pasta de dinti, cu aspect de masa onctuoasa de culoare cenusie cu miros mentolat, cu pH 8.1...8.3, indice de aciditate 2.7...2.8 continut in argint de 14,30...16,50ppm și continut total de polifenoli 17,46...21,34 mg% .

Produsul pastă de dinți este lipsit de toxicitate, rezultatele testarii farmacologice *in vitro* demonstrand absența citotoxicității linia de fibroblaste murine L929(ATCC CRL-6364) in conditii de expunere standard timp de 24 h. Evaluarea calitativă a efectelor citotoxice s-a realizat examinându-se la microscop morfologia celulară, gradul de etalare, vacuolizare și detașare, liza celulară și integritatea membranară. Examinarea la microscopul inversat a relevat ca in urma expunerii celulelor la diverse concentratii a pastei de dinti nu se inregistreaza modificari morfologice ale celulelor si nu se observa efecte citotoxice sau citopatiche.

Evaluarea cantitativă a efectelor citotoxice s-a realizat prin determinarea viabilitatii celulară prin metoda MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazol, cu ajutorul kitului CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS), *Promega*. La concentratii de 1 - 2,5%, testul permite clasificarea produsului pasta de dinti ca fiind practic lipsit de citotoxicitate, după o expunere de 24 ore.

Rezultatele obtinute in urma evaluarii contaminarii microbiene realizata prin metoda de testare a numărului total microorganisme aerobe viabile, în condițiile prevăzute de Farmacopeea Europeana (Vol. I, cap. 2.6.12.), demonstreaza ca pasta de dinti este conforma din punct de vedere al incarcaturii microbiene, prezentand valori sub cele maxime impuse de catre Farmacopeea Europeana in vigoare, respectiv < 10 UFC/g.

Rezultatele testarii farmacologice a actiunii specifice, respectiv a efectul antibacterian, in conditiile prevazute in Farmacopeea Romana X, au indicat o activitate inhibitorie semnificativa asupra microorganismelor *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 si *Escherichia coli* ATCC 8739, ceea ce permite utilizarea pastei de dinti atat ca produs de igiena personala cat si produs cu rol in prevenția și terapia afecțiunilor parodontale.

REVENDICARI

1. Produsului pasta de dinti antibacteriana pe baza de argint ionic coloidal si extract vegetal standardizat **caracterizat prin aceea ca**, extract vegetal standardizat are un continut de 0,8424...1,0296mg/100mL acid clorogenic, 0,225...0,275mg/100mL acid caffeic, 0,819...1,002 mg/100ml rutin, 1,1196...1,3695mg/100ml quercetin hidrat, 0,4419...0,05401 mg/100ml kaempferol, 3,7296...4,5584mg/100ml acid rosmarinic, 0,567...0,693mg/100ml acid ferulic, 0,0234...0,0286 mg/100ml luteolin, compozitie determinata prin cromatografie de lichide de inalta performanta (HPLC -DAD).

2. Produsului pasta de dinti antibacteriana pe baza de argint ionic coloidal si extract vegetal standardizat, conform revendicarii 1, **caracterizat prin aceea ca**, are in compozitie solutie argint ionic coloidal 77ppm, solutie zinc ionic coloidal 5 ppm, guma guar, carbonat de calciu, xilitol, tensida de cocos, ulei de menta, cosgar si carbune activ, prezinta un pH 8.1...8.3, indice de aciditate 2,7...2,8 continut in argint de 14,30...16,50 ppm si continut total de polifenoli 17,46...21,34 mg% .

3. Produsului pasta de dinti antibacteriana pe baza de argint ionic coloidal si extract vegetal standardizat, conform revendicarii 1,2, **caracterizat prin aceea ca**, este lipsit de toxicitate, rezultatele testarii *in vitro* evidentiand absenta citotoxicitatii pe linia de fibroblaste murine L929, este conform din punct de vedere al incarcaturii microbiene, prezentand valori sub cele maxime impuse de catre Farmacopeea Europeana in vigoare, respectiv < 10 UFC/g si prezinta activitate antibacteriana semnificativa demonstrata *in vitro*, asupra speciilor *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 si *Escherichia coli* ATCC 8739

4. Procedu de obtinere a produsului pasta de dinti antibacteriana pe baza de argint ionic coloidal si extract vegetal standardizat, conform revendicarii 1,2,3, **caracterizat prin aceea ca**, este realizat prin asocierea extractului standardizat obtinut din speciile *Salvia officinalis* L., *Achillea millefolium* L., *Monarda didyma* L., cu solutie argint ionic coloidal 77ppm, solutie zinc ionic coloidal 5 ppm si carbune activ, fiind constituit din urmatoarele etape tehnologice:

- a) Obtinerea extractului vegetal standardizat
- b) Formularea produsului pasta de dinti antibacteriana

5. Procedu de obtinere a produsului produsului pasta de dinti antibacteriana pe baza de argint ionic coloidal si extract vegetal standardizat, prin asocierea extractului vegetal standardizat cu solutie argint ionic coloidal 77ppm, solutie zinc ionic coloidal 5 ppm si carbune activ, conform revendicarii 4 **caracterizat prin aceea ca**, extractului vegetal standardizat se obtine din materialul vegetal constituit din speciile *Salvia officinalis* L., *Achillea millefolium* L., *Monarda didyma* L., in raport masic egal, maruntit si omogenizat, care se extrage utilizand solvent alcool etilic 50%, in raportul material

vegetal: solvent cuprins între 1:10 (m/v) ...1:12 (m/v), prin ultrasonare timp de 20...30 minute, la temperatură cuprinsă între 65...70°C, etapa urmata de îndepărtarea deseului de plantă prin filtrare și presare, când se obține o soluție extractivă hidroalcoolică care se concentrează, la 60-70°C și presiune scăzută (72-75 mm Hg), până la evaporarea completă a solventului și obținerea unui reziduu spiss de culoare galben-brun și miros caracteristic, care se dizolvă în glicerina vegetală pentru a obține o concentrație de 0,25g/mL și ulterior omogenizarea acestui extract cu soluție argint ionic coloidal 77ppm, soluție zinc ionic coloidal 5 ppm și 27 g guma guar, timp de 5...10 minute la viteza de rotație de 400...600rot/min, etapa urmata de adăugarea de carbonat de calciu, xilitol, tensida de cocos, ulei de mentă, Cosgar și omogenizarea timp de 15...30 la viteza de rotație de 400...600rot/min după care se adăugă cărbune activ și se omogenizează până la înglobarea completă, rezultând produsul pasta de dinți antibacteriană de culoare cenușie cu miros mentolat și gust plăcut.