



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00564

(22) Data de depozit: 15/09/2022

(41) Data publicării cererii:
29/03/2024 BOPI nr. 3/2024

(71) Solicitant:
• HOFIGAL EXPORT - IMPORT S.A.,
INTRAREA SERELOR NR.2, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

• SUCIU ALEXANDRU, STR. ANTON PANN
NR. 11, MEDIAȘ, SB, RO;
• ALEXANDRU GEORGETA,
STR. IZVORUL RECE NR.1, BL.M1/1,
SC.10, AP.446, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;
• CRIȘAN IULIANA, ALEEA FETEȘTI
NR. 16, BL.M9, SC.G, ET.2, AP.97,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) EXTRACT LIOFILIZAT CU PROPRIETĂȚI ANTIBACTERIENE
ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un extract liofilizat din plante, bazat pe efectul sinergic al compușilor bioactivi vegetali cu efecte antibacteriene, antiinflamatorii și de regenerare a țesuturilor și la un procedeu de obținere a extractului. Extractul liofilizat conform invenției este constituit din 25...50 părți de Aloe Vera (*Aloe barbadensis*), 15...20 părți de extract apos din pătlagină (*Plantago lanceolata*), 10...20 părți de extract apos din flori de gălbenele (*Calendula officinalis*)/părți aeriene peliniță (*Artemisia annua*) și 5...10 părți de soluție apoasă de propolis, părțile fiind exprimate în greutate pe 100 g

produs. Procedeu de obținere conform invenției începe cu amestecarea în ordine a gelului de Aloe vera, cu extractul apos de pătlagină, cu extractul apos de gălbenele/părți aeriene poliniță și cu soluția apoasă de propolis, sub agitare până la obținerea unei mase omogene, se trece amestecul printr-o moară coloidală microfină, se coagulează la - 40°C, se liofilizează la - 20°C și la final se macină până la o granulație medie de 15 μm.

Revendicări: 2



EXTRACT LIOFILIZAT CU PROPRIETĂȚI ANTIBACTERIENE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

Prezenta invenție se referă la obținerea unui extract liofilizat din plante, bazat pe efectul sinergic al compușilor bioactivi vegetali cu efecte antibacteriene, antiinflamatorii și de regenerare a țesuturilor.

Acest extract liofilizat, utilizat în produse de uz topic are efecte benefice din punct de vedere terapeutic, prin diminuarea proceselor inflamatorii și de vindecare a pielii.

Procedeul de obținere al extractului se referă la:

- crearea unor condiții optime de combinare a extractelor din plante medicinale sub formă de extract liofilizat, în vederea fabricării unei forme farmaceutice;
- prepararea unor combinații de extracte vegetale bogate în principii bioactive cu proprietăți antibacteriene, antiseptice și antiinflamatoare.

La obținerea extractului liofilizat care face obiectul prezentei invenții s-au avut în vedere următoarele:

- utilizarea unor materii prime cu activitate biologică crescută care să nu conțină sau să aibă o concentrație cât mai redusă de substanțe alergogene, pentru diminuarea riscului de apariție a unor reacții de hipersensibilitate și siguranța administrării produsului finit la cât mai multe categorii de pacienți;
- realizarea unor forme farmaceutice, având ca principiu activ extractul liofilizat, cu efecte benefice, specifice pentru prevenirea și/sau tratarea eficientă a leziunilor dezvoltate la nivelul țesuturilor moi.

Pielea este cel mai mare organ al corpului uman, cu rol deosebit de important în menținerea unui organism sănătos. Cele trei straturi din componența sa, epiderma, derma și hipoderma, protejează organismul față de mediul extern și menține constantă temperatura corpului.

Epiderma, stratul exterior și subțire, protejează organismul împotriva factorilor de mediu (ex: raze solare) și a proceselor inflamatorii și previne pierderile de apă din straturile profunde ale pielii. În cazul unei persoane tinere, epiderma se regenerează lunar, prin formarea de noi celule epiteliale.

Derma conferă elasticitate și rezistență pielii, asigură protecția mecanică a organismului (împotriva traumelor), furnizează nutrienți epidermei și reglează temperatura corpului.

Hipoderma este stratul profund al pielii, fiind format din țesut conjunctiv și țesut adipos.

În România, peste 1 milion de persoane sunt afectate de răni cronice, printre cele mai frecvente numărându-se escarele și ulcerul varicos (sau venos).

Rana reprezintă o discontinuitate la nivelul pielii, iar rănilile care nu se vindecă sau care nu au o evoluție favorabilă timp de 6-8 săptămâni, poartă numele de **răni cronice**.

Cele mai frecvente tipuri de răni cronice sunt:

- Escara (ulcerul de presiune) – rană cronică datorată presiunii prelungite la care sunt supuse țesuturile, între două planuri dure (pat și os), în cazul pacienților imobilizați (vârstnici, persoane paralizate, malnutrite, după intervenții chirurgicale).
- Ulcerul varicos (venos) – rană cronică apărută pe fondul unei insuficiențe venoase cronice (circulație venoasă deficitară la nivelul picioarelor).
- Ulcerul diabetic – rană cronică apărută la pacienții cu picior diabetic (un complex de afecțiuni circulatorii și nervoase, specifice bolnavilor cu diabet insulino-dependenți).
- Ulcerul arterial – rană cronică apărută la pacienții cu insuficiență arterială cronică, ce poate fi foarte dureroasă

O rană normală, precum o tăietură sau o arsură, se vindecă de obicei într-un interval destul de scurt. Acest lucru este valabil pentru majoritatea rănilor, datorită capacității de regenerare a țesuturilor.

Pentru a înțelege de ce rănilile cronice nu se vindecă de la sine, este necesar să amintim care sunt fazele naturale ale procesului de vindecare. Orice rană parcurge în mod natural trei stadii până la vindecare

1. Faza de curățare

În prima fază, denumită faza de curățare, rana poate fi superficială sau adâncă, este deseori dureroasă și poate sângera.

2. Faza de regenerare a țesuturilor

În cea de-a doua fază, țesuturile se regenerează printr-un proces complex denumit granulație. Rana “se umple” cu țesut nou, se curăță de reziduuri celulare, fibrină și exsudat în exces, iar infecția dispare. Țesutul rămas este sănătos, de culoare roșu aprins (țesut de granulație).

3. Faza de cicatrizare

În ultima fază, cea de-a treia, atunci când a început deja cicatrizarea (epitelizarea) se observă micșorarea evidentă a dimensiunii rănilii și formarea de piele nouă. Crusta se desprinde iar cicatricea se atenuază și în final dispare. Odată cu formarea noului țesut, funcțiile pielii sunt refăcute, rana putând fi considerată vindecată.

În cazul rănilor cronice, procesul de vindecare rămâne blocat într-una dintre aceste etape, cel mai adesea în faza de curățare, ca urmare a unor dezechilibre apărute la nivel celular, care împiedică închiderea rănilii.

12

În prezent sunt cunoscute pe piață, o serie de produse care conțin substanțe active obținute prin sinteza chimică, cât și produse naturale care posedă proprietăți antibacteriene, cicatrizante, de reepitelizare a țesuturilor, ca de exemplu: **Vulnamin Gel, Pinol, Lesoderm spray, Stratarxt Gel.**

Extractul liofilizat care face obiectul prezentei invenții este un amestec de extracte din plante medicinale și propolis, respectiv: 25....50 părți gel de Aloe Vera (*Aloe barbadensis*), 15.....20 părți extract apos din pătlagina (*Plantago lanceolata*), 10....20 părți extract apos din flori de gălbenele (*Calendula officinalis*)/peliniță (*Artemisia annua*) și 5...10 părți soluție apoasă de propolis, părțile fiind exprimate în greutate, pe 100 g produs.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este aceea că prin liofilizarea amestecului extractelor din plante cu soluție apoasă de propolis, principiile active nu se distrug și își mențin proprietățile biologice active, rezultând un principiu activ concentrat, sub formă de pulbere ce poate fi utilizat în diferite produse de uz topic cu efecte antibacteriene, antiinflamatorii și de regenerare a țesuturilor.

Liofilizarea ca proces tehnologic nou și complex de deshidratare prin înghețare în vid, este un procedeu prin care apa este eliminată aproape în totalitate dintr-un material vegetal. Prin liofilizare, activitatea microbiană este redusă aproape de 0, iar pulberea vegetală este sterilizată. Pulberile vegetale liofilizate nu necesită refrigerare și pot fi păstrate la temperatura camerei timp îndelungat (minim 5 ani). Liofilizarea NU alterează substanțele benefice bioactive aflate în produsul inițial. Prin acest procedeu sunt păstrate intacte toate substanțele nutritive cu efecte benefice. Umiditatea existentă în pulberile vegetale liofilizate este de maxim 2-3 %. Procesul de uscare prin liofilizare în cazul extractelor de plante medicinale este utilizat pentru a păstra conținutul de principii active, evitând astfel utilizarea excipienților sau a altor adjuvanți tehnologici.

Liofilizarea constă în congelarea rapidă a produsului (la temperaturi mai mici de -50°C) și eliminarea componentei lichide a extractului prin sublimare (adică prin trecerea directă de la starea solidă la starea de vapori). Procesul de uscare prin congelare este utilizat pentru stabilizarea, concentrarea și / sau creșterea termenului de valabilitate al acestor produse fără a distruge structura lor chimică. Uscarea prin congelare sau liofilizarea presupune extragerea apei din produs, sub formă de vapori folosind un vid de înaltă presiune. Vaporii se colectează pe un condensator sub camera de congelare, se transformă în gheață și se îndepărtează. O creștere treptată a temperaturii extrage toată umiditatea existentă în produs.

Datorită liofilizării se obțin extracte naturale 100%, uscate, fără excipienți, solvenți, reziduuri toxice. Pulberile uscate prin liofilizare nu necesită refrigerare sau conservanți chimici și pot fi transformate în tablete sau capsule sau înglobate în diferite forme farmaceutice de uz topic.

Produsele uscate prin congelare (liofilizare) sunt ușor de depozitat și transportat, deoarece volumul și greutatea lor pot fi reduse semnificativ.

Procedul de obținere al extractului liofilizat din plante medicinale conform invenției, este constituit din următoarele faze succesive:

- Obținerea gelului de aloe proaspăt (sub forma unei mase moi, dense, incolore) prin decojirea frunzelor proaspete
- Prepararea extractului apos de pătlagina (*Plantago lanceolata*) - 6-8g părți aeriene/100mL apă distilată folosind metoda extracției cu ultrasunete, timp de 1 h la 60°C, 80 kHz, urmată de filtrare
- Prepararea extractului apos de gălbenele/peliniță 6-8g părți aeriene/100mL apă distilată folosind metoda extracției cu ultrasunete, timp de 1 h la 60°C, 80 kHz, urmată de filtrare
- Amestecarea în ordine a gelului de aloe cu extractele apoase și cu soluție apoasă de propolis și omgenizare timp de 1-2 minute.
- Congelarea produsului la -80°C timp de 24 ore
- Liofilizarea produsului la -100°C
- Transformarea în pulbere prin măcinare pâna la o granulație sub 25 μm.

Extractul liofilizat realizat conform invenției posedă proprietăți biotrofice, energizante, vitalizante, tonifiante și vitaminizante, antioxidante. Folosit în preparate de uz topic menține sănătatea țesuturilor, influențează pozitiv procesele de regenerare tisulară, stimulează și normalizează schimburile de substanțe la nivel celular, restabilește și echilibrează funcțiile metabolice.

Tehnologia de preparare a extractului liofilizat realizat conform invenției permite păstrarea stabilității tuturor compușilor bioactivi din formulă.

Extractul liofilizat care face obiectul prezentei invenții este o asociere echilibrată a unor produse vegetale, sub formă de extracte, după cum urmează:

I. Aloe Vera este cunoscută drept "elixirul tinereții". Gelul proaspăt de *Aloe vera* obținut se utilizează în scopuri terapeutice. O condiție esențială este ca planta să aibă 2-3 ani, iar gelul să provine din celule bogate în mucilagii din miezul frunzelor.

În gelul din frunzele de Aloe vera s-au identificat saponozide, ulei esențial, substanțe minerale (Ca, Na, Fe, K, Cr, Mg, Zn, Cu etc.), beta-caroten, vitaminele B1, B2, B6, B12, niacină, aminoacizi, enzime, factori biotici, steroli, lignină, zaharuri (mono- și polizaharide). [Gheorghe Mencinicopschi, O. Bojor, Larisa Ionescu-Călinești, Compendiu de terapie naturală, Ed. Medicală, 2010, pag.218-221]

Gelul de Aloe are proprietăți antiinflamatorii, detoxifiante și de stimulare a colagenului, fiind ideal în tratamentele cosmetice de întreținere a pielii, în eczeme, ten uscat, dermatite, ulcerații, arsuri solare, acnee etc. Gelul și sucul de *Aloe vera* au efect calmant, de tonifiere, hidratare și protecție a pielii. *Aloe vera*, folosită în diferite formule cosmetice poate contribui la întârzierea semnelor specifice îmbătrânirii, ajută atât în păstrarea sănătoasă și proaspătă a pielii, cât și în vindecarea sau ameliorarea unor boli ale pielii, cum ar fi acneea, psoriazis, zona Zoster, tăieturi, arsuri, etc.

II. Pătlagina (*Plantago lanceolata*), cunoscută din antichitate, era recomandată împotriva hemoragiilor, indicație susținută și de Plinius, iar mai apoi de părinții fitoterapiei moderne Brunfels, Bock, Tabernaemontanus.

Produsul vegetal conține mucilag ozuronic, 5% pectine, 1,5-2,4% iridoide, triterpene pentaciclice (acid ursolic, acid oleanic), β -sitosterol, flovonoid (apigenol, luteolina..), taninuri, compuși fenilpropanici (verbascoidă, plantamaiozidă), acizi polifenolcarboxilici (acizii cinamic, clorogenic, etc), carotenoide, acizi organici (acizii benzoic, fumaric, citric), alantoina, vitaminele A,C și K, enzime proteolitice. Planta are proprietăți emoliente, astringente, antiinflamatoare, diuretice, hepatoprotectoare și imunostimulatoare. Cercetările efectuate de Em. Grigorescu și colab. (1973) au contribuit la elucidarea mecanismului de acțiune al frunzelor de pătlagină aplicate local în tratamentul furunculozei. Astfel, într-o primă fază, mucilagiul înmoaie tegumentul permițând enzimelor proteolitice să macereze pielea și, ca urmare, furunculul erupe. Compușii cu structură polifenolică sterilizează plaga deschisă. Carotenoidele, fitosterolii, acizii grași contribuie ulterior la regenerarea țesutului, iar taninurile acționează cicatrizant.

Acțiunea emolientă a extractelor apoase se datorează mucilagiului. La administrarea acestora, mucilagiul acoperă mucoasa inflamată cu un film protector. La locul de aplicare, taninurile precipită proteinele formând o peliculă impermeabilă și antibacteriană. Astfel, prin precipitarea proteinelor, suprafața leziunilor de la nivelul mucoaselor și pielii se reduce (efect cicatrizant).

III. Florile de gălbenele (*Calendula officinalis*) conțin glicozizi flavonici ca: izoquercitrina, narcizina, neohesperiozida, rutozid, terpenoide, alfa- și beta-smirina, lupeol, longispinogenină, steroli, ulei esențial, arvozida A, pigmenți carotinoidici, calendulină și polizaharide, rezine, tanin, acizi organici.

Datorită acțiunii antiinflamatoare, antiseptice, decongestive, cicatrizante și antimicrobiene, florile de gălbenele sunt indicate în ulcerații și eczeme, ajutând la grăbirea vindecării și la regenerarea rapidă a țesuturilor, prin aplicații locale. Cel mai des întâlnite utilizări externe sunt cele pentru arsuri, erupții cutanate, tăieturi, varicoză și dermatită. Ele și-au dovedit eficacitatea și

în tratamentul pentru pielea uscată, ulcerele piciorului, având un efect liniștitor și antiinflamator și în cazul înțepăturilor de albină.

IV. Pelinița (*Artemisia annua*) este originară din China și Vietnam unde crește la înălțimi de 1000-1500 m. Sub forma părții aeriene înflorite se utilizează de peste 2000 de ani ca remediu febrifug și antimalaric. Extern, frunzele se aplicau ca hemostatic în epistaxis, în tratamentul abceselor sau al furunculelor.

Prin distilare cu vapori de apă rezultă aproximativ 0,3% ulei volatile, fiind constituit din cca. 40 de compuși volatili. Se utilizează ca aromatizant pentru obținerea unor băuturi spirtoase de tip vermut și de asemenea se folosește în parfumerie, având o aromă agreabilă, revigorantă și ușor balsamică.

Componentele considerate a fi cele mai importante sunt lactonele secviterpenice, principiul activ al speciei, artemisinina (0,01-0,5%) fiind responsabilă de acțiunea antimalarică și febrifugă.

Componenta principală din *Artemisia annua*, artemisinina, are formula C₁₅H₂₂O₁₅. Artemisinina a fost utilizată pe scară largă pentru tratamentul malariei în ultimele decenii. În plus, se știe că artemisinina are activitate antibacteriană, antifungică, antivirală, antioxidantă, antitumorală și antiinflamatoare.. La peste 40 de ani de la descoperire, artemisinina rămâne medicamentul primordial împotriva malariei, reprezentând baza tuturor terapiilor antimalarice majore. Ani de cercetare care se întind pe o serie de discipline s-au axat pe explorarea și elucidarea mecanismelor artemisininei în rolul său antimalaric.

În plus, s-au descris și studiat și alte proprietăți ale artemisininei, existând un interes mare față de posibilele aplicații ale acesteia în tratamentul cancerului. Au loc cercetări active cu privire la rolurile sale potențiale în abordarea unei game de alte boli, în special efecte antiinflamatorii împotriva bolilor autoimune și a astmului alergic, acestea fiind raportate într-o serie de studii clinice. Unele dintre aceste rezultate se corelează cu observațiile imunosupresiei la pacienții supuși terapiei cu artemisinină pentru malarie. Efecte antivirale puternice ale artemisininei au fost raportate și în bolile herpetice și în cele produse de virusurile hepatitei B și C.

Descoperirile recente au identificat un rol remarcabil – chiar dacă e controversat – al artemisininei în diabet prin inducerea transdiferențierii celulelor α pancreatice pentru a genera celule β .

Soluția pentru rezistența la antibiotice care este o problemă de sănătate publică tot mai gravă, o reprezintă descoperirea de noi substanțe care să combată bacteriile, iar cercetători din toată lumea fac eforturi în acest sens. Extractele de pelin dulce au efecte formidabile în a ucide bacilul Koch vindecând astfel tuberculoza. Nu se cunoaște exact care este componenta responsabilă pentru acest efect. Studiile sunt în plină desfășurare.

V. Propolisul sau cleiul de albine, în stare naturală sau sub formă de extract reprezintă o sursă naturală de produși cu acțiune biologică complexă și care, așa cum s-a demonstrat, prezintă o paletă deosebit de largă de acțiuni terapeutice, chiar în afecțiuni cu care se confruntă civilizația secolului nostru.

Propolisul se prezintă ca o masă lipicioasă de culoare variabilă între verde, maro și negru, având miros aromat de rășini și balsamuri. Este solubil în alcool și eter și greu solubil în apă. Greutatea specifică este de 1,112 - 1,136 g/cm³. Punctul de topire este situat între 70 - 120°C. La temperatura de 37°C se înmoaie, iar la temperaturi scăzute este casant.

Propolisul este compus din rășini vegetale, balsam de diferite compoziții, ceară, uleiuri eterice, fier, microelemente - cupru, zinc, mangan, cobalt-, la care se adaugă polen, flavonoide, secreții ale glandelor salivare ale albinelor.

Compoziția chimică reprezintă un amestec de substanțe, în special: derivații flavonici, acidul ferulic (activ contra germenilor Gram pozitiv și Gram negativ), ceruri, aminoacizi, balsamuri, fermenți, microelemente (siliciu, magneziu, cupru, molibden, arsen, staniu, aluminiu, vanadiu, wolfram, fier, aur, iridiu, calciu, cadmiu, cobalt, stronțiu), substanțe antibiotice, rășini, acizi aromatici, acizi. Compoziția propolisului variază în funcție de specia vegetală de pe care s-a cules, dar, în medie, acesta conține 55% rășini și balsamuri, 30% ceruri și 10% uleiuri eterice, Propolisul conține un compus denumit pinocembrina, un flavonoid care acționează ca agent antifungic. Proprietățile antiinflamatoare și antimicrobiene recomandă propolisul în tratamentul rănilor. S-a constatat că extractul alcoolic de propolis, aplicat topic, a fost mai eficient decât o cremă cu steroizi, ajutând la reducerea mastocitelor în cazul intervențiilor chirurgicale orale. Mastocitele sunt asociate cu inflamația și încetinirea vindecării plăgilor.

De asemenea, studiile au arătat că produsul apicol poate veni în ajutorul persoanelor cu arsuri, contribuind la vindecarea mai rapidă, prin accelerarea regenerării celulelor sănătoase. O cremă cu propolis a fost testată prin comparație cu sulfadiazina de argint, un medicament folosit de obicei în tratamentul arsurilor de gradul II și III. Studiul a vizat persoane care sufereau de arsuri de gradul II și a concluzionat că ambele substanțe au eficacitate similară în vindecarea leziunilor respective.

Se dă mai jos un exemplu pentru realizarea produsului, conform invenției:

Inițial se obțin ingredientele folosite la prepararea produsului final, astfel:

Gelul extras din frunzele de Aloe Vera trebuie folosit imediat după ce s-a obținut, altfel după câteva minute se va oxida și își va pierde din elementele nutritive valoroase pe care le conține. Este foarte important să se îndepărteze tot stratul galben de sub coaja frunzei de Aloe Vera atunci când se extrage gelul.

6,7 kg frunze de Aloe Vera se spală bine, se îndepărtează coaja de pe frunză cu un cuțit ascuțit, cu mare grijă. Se decojește și stratul galben de sub coajă. După ce toate straturile galbene au fost eliminate, rămâne doar un strat pur de gel Aloe Vera, care se utilizează imediat sau se conservă prin congelare sau adăugare de 0,5% benzoat de sodiu.

Extractul din frunze de pătlagină se prepară din 110 g părți aeriene de pătlagină, uscate în condiții menajate la 40°C și măcinate, umectate cu 830 ml apă timp de 30 min.. Se completează apoi cu restul de apă (940 ml) și se ultrasonează la 60°C, 80 Khz, timp de 60 min. După această perioadă, extractul este filtrat la vid, obținându-se aproximativ 1,6 kg soluție.

Extractul din flori de gălbenele/părți aeriene peliniță se prepară pornind de la 150 g material vegetal din flori de gălbenele/părți aeriene peliniță, uscat în condiții menajate la 40°C și măcinat, umectat cu 1080 ml apă timp de 30 minute. Se completează apoi cu restul de apă (1230ml) și se ultrasonează la 60°C, 80 Khz, timp de 60 min. După această perioadă extractul este filtrat la vid, obținându-se aproximativ 1,6 kg soluție.

Soluția apoasă de propolis se obține prin refluxare timp de 10 ore din 380 g propolis și 890 g apă, se filtrează și se obțin 800 g soluție de concentrație 30%.

După ce s-au obținut materiile prime necesare preparării produsului final se trece la prepararea acestuia, astfel:

Într-un omogenizator de capacitate de 10 litri se introduc sub agitare 4 kg gel Aloe vera, 1,6 kg extract apos de pătlagină, 1,6 kg extract apos de gălbenele/peliniță și 0,8 kg soluție apoasă de propolis. Se continuă agitarea timp de 15-30 min. până la obținerea unui amestec omogen și stabil după care se trece printr-o moară coloidală (microfină), prevăzută cu sistem de răcire, astfel încât dispersarea părții solide în masa de lichid să fie omogenă și uniformă. Masa de produs este încărcată apoi în tăvile liofilizatorului și congelate la o temperatură de -40°C timp de 24 ore, apoi liofilizate la o temperatură de -20°C sub vid (0,1mbar) timp de 4 zile, până la obținerea unei umidități de 2-3%. Extractul liofilizat se macină cu moara pentru pulberi până la o granulație medie de 15μm.

În felul acesta se obține un extract în care principiile active nu se distrug, prezintă stabilitate și biodisponibilitate corespunzătoare, și poate fi folosit cu succes în produse farmaceutice sub formă de comprimate sau capsule sau de uz topic cu proprietăți antimicrobiene, antiinflamatorii și de regenerare a țesuturilor.

Asocierea acestor extracte are drept avantaj realizarea unui produs cu eficiență crescută, în care componentele își potențează unul altuia proprietățile, accelerează procesul de vindecare și reduce riscul infecției.

Se menționează faptul că tehnologia folosită la prepararea produsului asigură stabilitatea tuturor componentelor bioactive din materialele vegetale folosite.

A fost testată activitatea antimicrobiană a extractelor liofilizate, conform invenției, notate cu H1 – extractul liofilizat cu peliniță și H2 – extractul liofilizat cu gălbenele.

I. Materiale și metode

I. 1 Investigarea activității antimicrobiene a extractelor H1 și H2

Activitatea antimicrobiană a extractelor H1 și H2 a fost evaluată față de o colecție de 57 tulpini bacteriene izolate din infecții cutanate aparținând Departamentului Botanică și Microbiologie (Facultatea de Biologie, Universitatea din București).

Evaluarea efectelor antimicrobiene a celor două extracte s-a efectuat prin metoda microdiluțiilor în mediu lichid. S-au pregătit suspensii ale extractelor în ser fiziologic la o concentrație de 100 mg/mL care ulterior au fost utilizate pentru realizarea de diluții seriale pentru fiecare extract în mediu de cultură TSB (*Tryptone Soy Broth*), în microplăci cu 96 de godeuri. Extractele au fost testate la următoarele concentrații (mg/mL): 75, 37.5, 18.75, 9.37, 4.68, 2.34. În godeurile conținând diferite concentrații ale extractelor de testat s-a pipetat un volum de 10 μ L de suspensie 10^6 UFC/mL (UFC – unități formatoare de colonii), pentru fiecare tulpină bacteriană testată. Plăcile au fost incubate la 37°C timp de 18-24 de ore. S-au folosit două godeuri control per tulpină: un control de creștere reprezentat de mediu lichid inoculat cu tulpina bacteriană și un control de sterilitate reprezentat de mediu lichid. Antibioticul ciprofloxacina a fost utilizat drept control pozitiv. Valorile concentrației minime inhibitorii (CMI) reprezentând concentrația cea mai mică a extractelor care a inhibat creșterea bacteriană au fost determinate macroscopic prin observarea turbidității godeurilor. Cea mai mică concentrație de extract care distruge complet microorganismele, la care nu se mai observă creștere bacteriană reprezintă concentrația minimă bactericidă (CMB) (CLSI, 2016), aceasta fiind stabilită prin evaluarea godeurilor din determinările CMI. Un volum de 10 μ L din fiecare godeu s-a inoculat pe mediu agarizat PCA (*Plate Count Agar*). După inoculare, plăcile au fost incubate la 37°C timp de 24 de ore și analizate pentru creștere bacteriană (Usman et al., 2014).

I.2 Evaluarea biocompatibilității extractelor

Biocompatibilitatea compușilor a fost evaluată pe celule Hep2, cultivate în mediu *StemMACS MSC Expansion Media*. Celulele au fost însămânțate la o densitate de 1×10^5 celule pe godeu în 250 μ L de mediu de cultură. S-au testat mai multe concentrații ale compușilor H1 și H2 – 10 mg, 5mg, 1 mg, 0.5 mg, 0.25 mg. Celulele s-au incubat la 37°C (5% CO₂) timp de 24 ore împreună cu diferite concentrații ale compușilor H1 și H2.

Evaluarea gradului de biocompatibilitate s-a realizat prin testele MTT și LDH. Testul MTT este un test de viabilitate ce permite evaluarea cantitativă a celulelor vii din cultură. Compusul

MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu] este permeabil pentru membranele celulelor vii. După 24 ore de incubare, s-a preparat o soluție de MTT 1mg/mL și fiecare probă a fost incubată în prezența a 1 mL soluție MTT timp de 4 h la 37°C și 5%CO₂. După metabolizarea compusului MTT se formează cristale de formazan solubile în izopropanol.

După solubilizarea cristalelor de formazan (prin adăugarea de 100 μL izopropanol rezultă o soluție (culoare violet) cu densitatea optică ce poate fi citită la 550 nm. Intensitatea culorii este direct proporțională cu numărul de celule vii din probă.

Lactat dehidrogenaza (LDH) este o oxidoreductază (E.C. 1.1.1.27) care este prezentă la majoritatea organismelor. Celulele care nu mai prezintă integritate membranală eliberează în mediul de cultură citoplasma în care există această enzimă (LDH). Este un test cantitativ care indică numărul de celule moarte din celule. Soluția rezultată în urma reacției poate fi citită spectrofotometric la 490 nm.

Pentru cuantificarea LDH:

i. S-au pregătit 100μL mix de reacție care a conținut în mod egal toate componentele mixului.

ii. Din placa de testat s-au colectat 50 μL de mediu în duplicat și s-au transferat într-o placă de 96 de godeuri.

iii. După ce s-au adăugat 100 μL peste fiecare probă placa a fost pusă la incubat timp de 15-20 de minute la întuneric

iv. pe baza nivelului de LDH din mediul de cultură, intensitatea culorii soluției de culoare roz a variat direct proporțional cu numărul de celule moarte din probă

v. S-a citit la spectrofotometru (Flex Station 3) la o lungime de undă de 490 nm.

1.3 Evaluarea citotoxicității extractelor prin testul annexin V/PI

Celulele apoptotice au fost cuantificate cu kitul Annexin V–AlexaFluor488/PI (Invitrogen, USA) conform recomandărilor producătorului. Celulele Hep-2 (Human Epithelioma-2, ATCC) au fost cultivate la o densitate de 5×10^4 în plăci sterile cu 12 godeuri (Costar) și incubate timp de 24 de ore pentru aderare. Ulterior, celulele au fost tratate cu trei concentrații ale celor 2 extracte H1 și H2 (1, 0.5, 2.5 și 0.1 mg/mL) timp de 24 și 48 de ore. La intervale de tratament diferite, celulele au fost prelevate și centrifugate la 1000 rpm timp de 5 min. Sedimentele celulare au fost spălate cu PBS, resuspendate în Annexin V binding buffer la o densitate de 10^6 celule/mL și colorate cu 5 μL Annexin V–AlexaFluor488 nm și 1 μL iodură de propidiu (100 μg/mL) timp de 15 minute la temperatura camerei, la întuneric. Celulele au fost analizate imediat cu ajutorul citometrului Accuri C6 plus (Becton Dickinson, SUA). Fluorescența a fost înregistrată pe FL1 (525/40nm) pentru Anexină V-AlexaFluor488 și pe FL2 (585/40nm) pentru iodura de propidiu. Celulele viabile sunt

negative atât pentru Anexină V-AlexaFluor488 (detectează externalizarea fosfatidilserinei în celulele apoptotice) și pentru iodură de propidiu, celule aflate în apoptoză timpurie prezintă fluorescență pozitivă pentru Anexină V-AlexaFluor488 și sunt negative pentru iodură de propidiu, celulele aflate în apoptoză/necroză târzie prezintă fluorescență pozitivă pentru ambii fluorocromi, iar celulele necrotice au prezentat fluorescență pozitivă pentru iodură de propidiu.

I.4 Influența extractelor H1 și H2 asupra ciclului celular

Evaluarea fracțiilor celulare în diferitele faze ale ciclului celular s-a realizat pe două linii celulare: Hep-2 și HT-29. Probe conținând 10^6 celule, tratate cu extractele H1 și respectiv H2 la concentrația de 1 mg/mL, au fost incubate timp de 30 minute în soluție tampon conținând PI și RNA-ză (Pharmlingen) și analizate cu citometrul în flux Accuri C6 Plus. Fluorescența a fost înregistrată pe FL2 (585/40nm), achiziționând cel puțin 10000 de evenimente pentru fiecare probă. Apoptoza a fost evaluată ca fracția sub-G0/G1. Frațiile G0/G1, S și G2/M au fost calculate pentru populația celulelor non-apoptotice.

I.5 Evaluarea influenței extractelor H1 și H2 asupra fagocitozei și exploziei oxidative

Probe de sânge periferic au fost recoltate de la un voluntar sănătos după obținerea consimțământului informat. Trusa FagoFlexEx® (Exbio, Praga, Republica Cehă) a fost folosită pentru a investiga cu ajutorul citometriei în flux explozia oxidativă și fagocitoza granulocitelor în probe de sânge total după stimulare cu *Escherichia coli*. Un volum de 50 μ L de sânge integral recoltat pe heparină a fost amestecat ușor cu 10 μ L PBS (control negativ) sau *E. coli* (control pozitiv) și cu 10 μ L dihidrodamină-123 (DHR123) și incubat pe baie de apă (20 min la 37°C). Influența asupra funcției fagocitare a granulocitelor a fost determinată prin adăugarea extractelor la acest amestec. După incubare, eritrocitele au fost lizate la temperatura camerei timp de 10 minute cu tampon de liză FACS. Intensitatea fluorescenței rodaminei 123, produsă prin oxidarea DHR123, a fost detectată cu ajutorul citometriei în flux (Accuri C6 Plus, BD Biosciences) folosind laserul de 488 nm. Rezultatele au fost analizate cu programul instrumentului și prezentate ca procent de granulocite cu fluorescență verde pozitivă, identificate pe baza proprietăților de împrăștiere a luminii (FSC versus SSC), cu excluderea debriurilor și agregatelor.

II. Rezultate

II.1 Determinarea activității antimicrobiene

Analiza activității antimicrobiene a pus în evidență că extractele H1 și H2 inhibă creșterea bacteriilor Gram pozitive și Gram negative izolate din infecții cutanate. Valorile CMI determinate prin metoda microdiluțiilor au fost cuprinse între >75 și 37.5 mg/mL. Rezultatele au arătat că

extractele au fost mai active față de tulpinile Gram pozitive (valori ale CMI de 37.5 mg/ml față de 20/33 tulpini) comparativ cu tulpinile Gram negative (valori ale CMI de 37.5 mg/ml față de 1/24 tulpini). Nu s-a detectat activitate antimicrobiană (valori ale CMI > 75 mg/mL) pentru extractul H1 față de 16/24 tulpini Gram negative și respectiv H2 față de 12/24 tulpini Gram negative. Dintre bacteriile Gram negative, cea mai sensibilă la acțiunea extractelor testate a fost tulpina *P. aeruginosa* 1609, extractele H1 și H2 exprimând activitate antimicrobiană la valori ale CMI de 37.5 mg/mL. Extractul H1 a fost mai activ față de tulpinile Gram pozitive comparativ cu extractul H2. Tulpinile de *Staphylococcus* (75-37.5 mg/mL) au fost mai sensibile la acțiunea celor două extracte testate comparativ cu tulpinile de *Enterococcus* (75 mg/mL).

II.2 Biocompatibilitatea extractelor

Pentru a considera că o anumită probă este biocompatibilă, valorile densităților optice pentru testele MTT trebuie să fie mai mari decât cele ale testului de cuantificare LDH (mai exact, spunem că o probă este biocompatibilă dacă cantitatea de celule viabile, metabolic active este mai mare decât cea a celulelor moarte).

Atât compusul H1 cât și compusul H2 au fost citotoxici la concentrații de 10, respectiv 5 mg/mL, fapt ilustrat de valoare de densitate optică ridicată obținute pentru testul LDH. Începând cu o concentrație de 1 mg/mL, se observă o creștere a viabilității celulare, mai ales în cazul compusului H1 (**Figura 1**). Pentru concentrația de 0.25 mg/mL, ambii compuși au fost biocompatibili, așa cum reiese din testele MTT și LDH (**Figurile 1 și 2**). Aceste rezultate au fost confirmate și de examenul microscopic (microscopie contrast de fază). Se poate observa că, la o concentrație de 0.25 mg/mL, atât compusul H1 cât și compusul H2 nu au indus modificări morfologice la nivelul celulelor Hep2 (**Figura 3**).

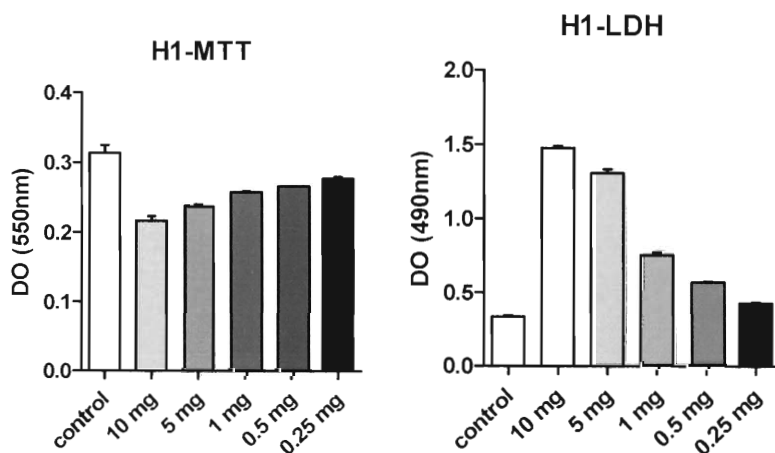


Figura 1. Testarea biocompatibilității compusului H1 – teste MTT și LDH

g

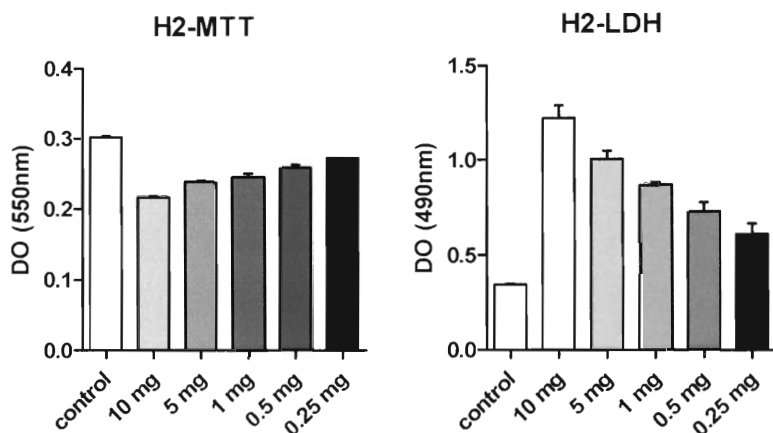


Figura 2. Testarea biocompatibilității compusului H2 – teste MTT și LDH

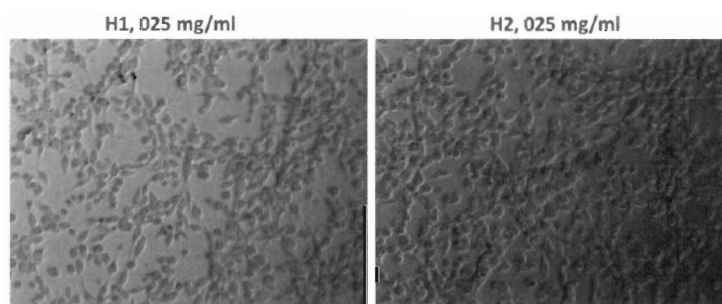
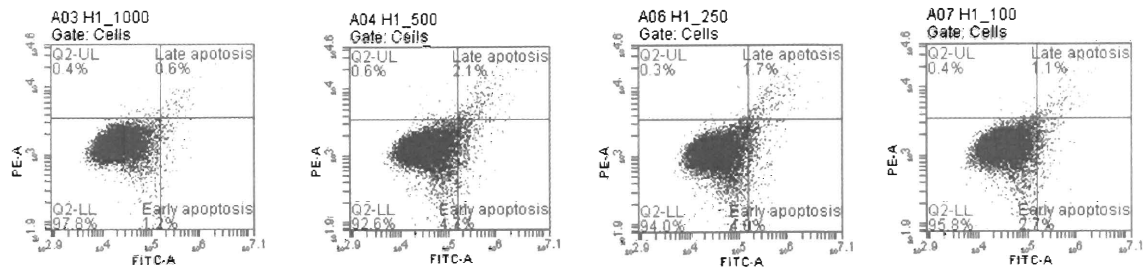


Figura 3. Morfologia celulelor Hep2 cultivate în prezența compușilor H1 și H2, microscopie contrast de faza (20X)

II.3 Activitatea citotoxică evaluată prin citometrie în flux

Efectele apoptotice ale extractelor apoase H1 și H2 au fost investigate prin colorare dublă (Annexin V-AlexaFluor488 / iodură de propidiu) și evaluare cu ajutorul citometriei în flux (Figurile 4 și 5). Rezultatele au arătat că extractele H1 și H2, la 24 și 48 de ore de tratament la concentrațiile de 1, 0.5, 0.25 și 0.1 mg/mL, induc efecte citotoxice scăzute, prin mecanisme asociate cu apoptoza. Sensibilitatea liniei celulare Hep-2 la extractul H1 a fost mai scăzută (% celule apoptotice: 1.8 - 6.8 și % celule necrotice: 0.3 - 0.9) comparativ cu extractul H2 (% celule apoptotice: 2.9 - 10.8 și % celule necrotice: 0.3 - 1). Apoptoza indusă de extractele testate a fost dependentă de concentrație (Tabel nr. 1 și 2).

24 de ore



48 de ore

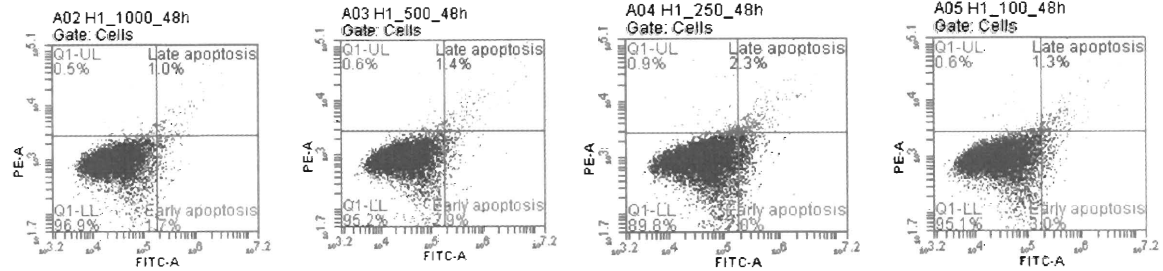
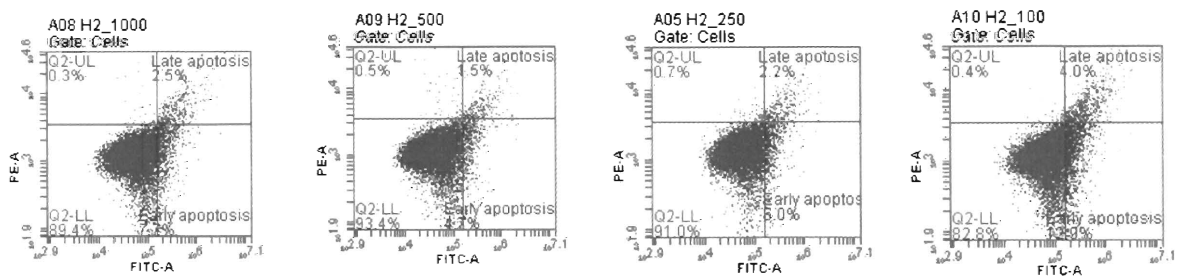


Figura 4. Diagrame obținute în urma analizei rezultatelor de citometrie în flux a celulelor Hep-2 cultivate în prezența a diferite concentrații ale extractului H1 (1, 0.5, 0.25 și 0.1 mg/mL), după 24h și respectiv 48h incubare la 37°C, 5%CO₂.

24 de ore



48 de ore

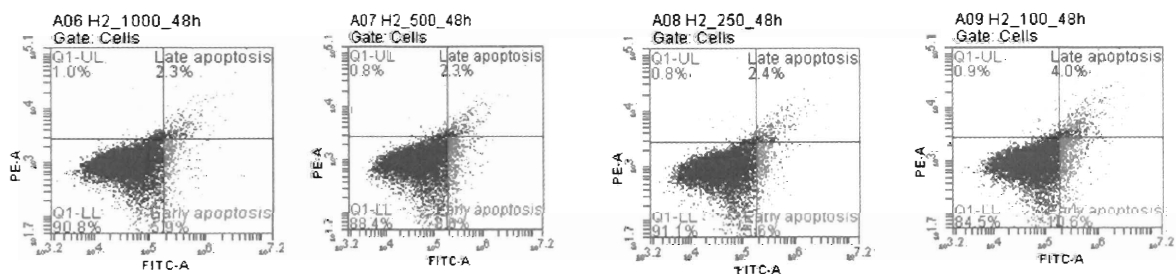


Figura 5. Diagrame obținute în urma analizei rezultatelor de citometrie în flux a celulelor Hep-2 cultivate în prezența a diferite concentrații ale extractului H2 (1, 0.5, 0.25 și 0.1 mg/mL), după 24h și respectiv 48h incubare la 37°C, 5%CO₂.

Tabel 1. Procentele populațiilor celulare (linia Hep-2) în diferite stadii (viabile, apoptotice și necrotice) tratate cu diferite concentrații ale **extractului H1** și evaluate prin colorare dublă cu ajutorul citometriei în flux.

Interval de timp	24 h				48 h			
Concentrații (mg/mL)	1	0.5	0.25	0.1	1	0.5	0.25	0.1
Viable (%)	97.8	92.6	94	95.8	96.9	95.2	89.8	95.1
Apoptoză timpurie (%)	1.2	4.7	4.0	2.7	1.7	2.9	2.5	3.0
Apoptoză târzie (%)	0.6	2.1	1.7	1.1	1.0	1.4	2.3	1.5
Moarte (%)	0.4	0.5	0.3	0.4	0.5	0.6	0.9	0.6

Tabel 2. Procentele populațiilor celulare (Hep-2) în diferite stadii (viabile, apoptotice și necrotice) tratate cu diferite concentrații ale **extractului H2** și evaluate prin colorare dublă cu ajutorul citometriei în flux.

Interval de timp	24 h				48 h			
Concentrații (mg/mL)	1	0.5	2.5	0.1	1	0.5	2.5	0.1
Viable (%)	89.4	93.4	91	92.1	90.8	88.4	91.1	94.5
Apoptoză timpurie (%)	7.75	4.06	6	3.25	5.9	8.5	5.6	0.6
Apoptoză târzie (%)	2.5	1.5	2.2	4.0	2.3	2.3	2.4	2.3
Moarte (%)	0.3	0.5	0.7	0.4	1	0.8	0.8	0.9

II. 4 Evaluarea efectelor extractelor H1 și H2 asupra ciclului celular

Tratamentul *in vitro* al celulelor cu extractele H1 și H2, la concentrații de 1 mg/mL, timp de 18-24 de ore a pus în evidență modificări reduse ale fracțiilor celulare în diferite faze ale ciclul celular, cu excepția extractului H1 care în cazul liniei celulare HT-29 a determinat la creștere a fracției celulare sub-G0 și blocajul ciclului celular în fazele S și G2/M (Fig. 6)

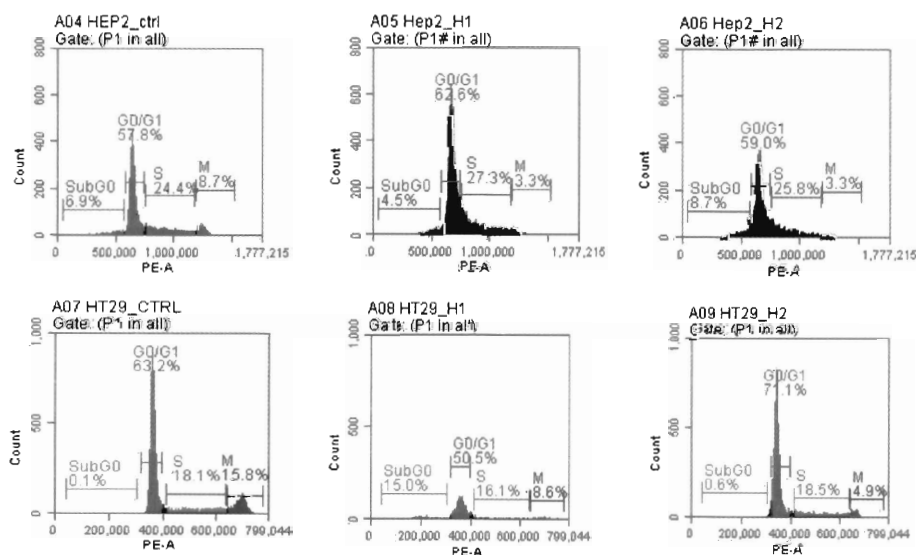


Figura 6. Histograme ale analizei ADN obținute pentru celulele Hep-2 și HT-29 supuse tratamentului cu extractele H1 și H2 la concentrația de 1 mg/mL timp de 24 de ore.

4

II. 5 Modularea producerii de ROS și a procesului de fagocitoză

Neutrofilele sunt componente esențiale ale sistemului imunitar înăscut, care asigură apărarea gazdei printr-o serie de funcții efectoare, precum fagocitoza, producerea de ROS (radical anion superoxid, peroxid de hidrogen și radical hidroxil), degranularea și formarea de NETs. Formarea de ROS în fagocite are loc ca urmare a activării NADPH oxidazei, proces numit explozie oxidativă (Gierlikowska et al., 2021). Aceste specii reactive de oxigen pot fi foarte toxici nu numai pentru agenții infecțioși, ci și pentru țesuturile gazdă. Producția excesivă de ROS poate promova procesul inflamator și poate contribui la deteriorarea celulelor și țesuturilor proprii organismului. Prin urmare, extractele vegetale cu efecte antioxidante și antiinflamatorii sunt de interes prin urmare pentru modularea farmacologică a producției de ROS. În studiul de față s-a evaluat efectele celor două extracte H1 și H2, la concentrații de 100, 50 și 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ asupra exploziei oxidative și procesului de fagocitoză realizat de granulocite. Rezultatele au arătat că extractul H1 nu afectează activitatea NADPH oxidazei, în timp ce extractul H2, la concentrația de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ stimulează producerea de ROS, cu un procent de 24.9% neutrofile cu explozie oxidativă, după 20 de minute de incubare (figura 7).

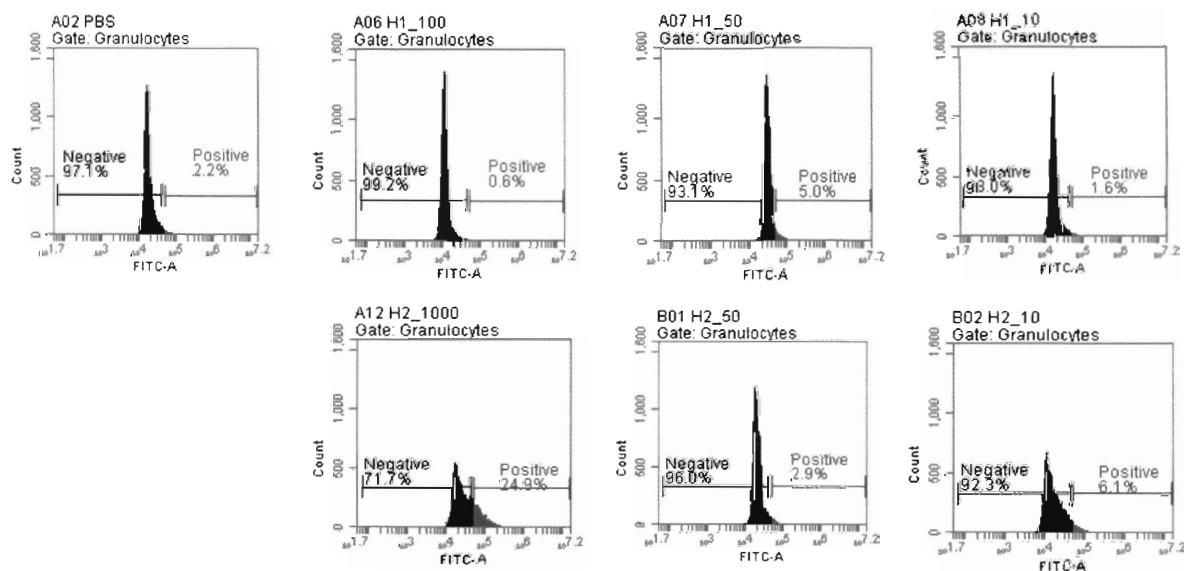


Figura 7. Histograme obținute în urma analizei rezultatelor de citometrie în flux a granulocitelor din sânge total, tratate cu extractele H1 și H2 (100, 50 și 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), timp de 20 minute. Negative: granulocite negative pentru explozia oxidativă, Positive: granulocite cu explozie oxidativă. PBS: probă control tratată cu PBS (*phosphate buffer saline*).

De asemenea, extractele vegetale nu au interferat cu fagocitoza, deoarece rezultatele au arătat că procentul de granulocite care realizează fagocitoză nu s-a schimbat în comparație cu controlul *E. coli*. În concluzie, datele sugerează că extractul H1 nu a determinat stimularea fagocitozei cu activarea NADPH oxidazei pentru producerea de radicali liberi, iar contactul direct

dintre granulocite, extractul H1 și bacterii nu interferează cu stimularea exploziei oxidative, deoarece procentul de granulocite fagocite nu s-a modificat în comparație cu controlul *E. coli*. Rezultate similare au fost obținute și în cazul extractului H2, la concentrații de 50 și 10 $\mu\text{g/mL}$. Extractul H2, la concentrații de 100 $\mu\text{g/mL}$ a manifestat un efect pro-inflamator moderat, indicat de stimularea NADPH oxidazei, detectată în cazul a 24.9% granulocite (Figura 7 și 8).

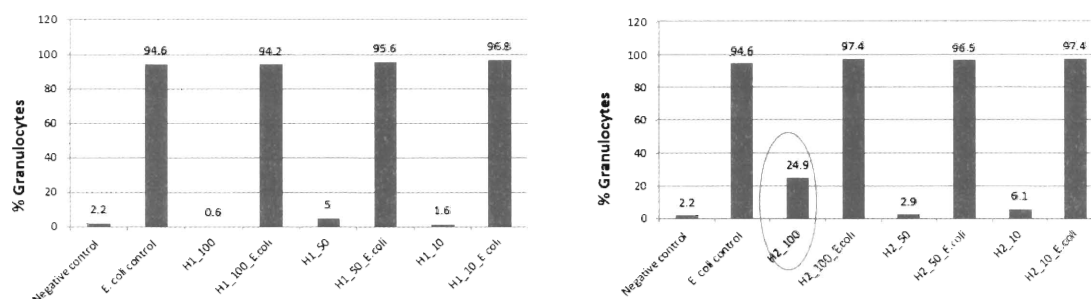


Figura 8. Reprezentarea grafică a procentului de granulocite fluorescente corespunzător stimulării fagocitozei și respectiv activării NADPH oxidazei pentru producerea de radicali liberi ca urmare a contactului direct dintre sânge periferic și extractele H1 și H2 (100, 50 și 10 $\mu\text{g/mL}$), după incubare timp de 20 minute.

Bibliografie

- Usman JG, Sodipo OA, Sandabe UK (2014) In vitro antimicrobial activity of Cucumis metuliferus E. Mey. Ex. Naudin fruit extracts against Salmonella gallinarum. Int J Phytomed 6(2):268–274.
- Gierlikowska, B., Stachura, A., Gierlikowski, W., & Demkow, U. (2021). Phagocytosis, Degranulation and Extracellular Traps Release by Neutrophils-The Current Knowledge, Pharmacological Modulation and Future Prospects. Frontiers in pharmacology, 12, 666732. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.666732>

Revendicări

1. Extract liofilizat din plante bazat pe efectul sinergic al compușilor bioactivi vegetali cu efecte antibacteriene, antiinflamatorii și de regenerare a țesuturilor **caracterizat prin aceea că** este constituit din 25.....50 părți gel de Aloe Vera (*Aloe barbadensis*), 15.....20 părți extract apos din pătlagina (*Plantago lanceolata*), 10.....20 părți extract apos din flori de gălbenele (*Calendula officinalis*)/părți aeriene peliniță (*Artemisia annua*) și 5.....10 părți soluție apoasă de propolis, părțile fiind exprimate în greutate, pe 100 g produs.
2. Procedeu de preparare a extractului conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că**, se amestecă în ordine gelul de Aloe vera (*Aloe vera*), extractul apos de pătlagină (*Plantago lanceolata*), extractul apos de gălbenele (*Calendula officinalis*)/părți aeriene peliniță (*Artemisia annua*) și soluția apoasă de propolis sub agitare până la obținerea unei mase omogene, se trece apoi prin moara coloidală (microfină), se congelează la -40°C , se liofilizează la -20°C și se macină până la o granulație medie de $15\mu\text{m}$.