



REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3534926 (13) T2

(51) Int. Cl.:A61K 36/87 (2006.01.01)
A61K 36/82 (2006.01.01)
A61K 36/45 (2006.01.01)
A61K 36/61 (2006.01.01)
A61K 36/73 (2006.01.01)
A61K 36/48 (2006.01.01)
A61P 31/04 (2006.01.01)
A61P 31/10 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0998 (22) Data de depozit: 2017.11.01 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17791112.0, 2017.11.01 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european:3534926, 2019.09.11 (31) Numărul cererii prioritare: 1660588; 16197217 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.11.02; 2016.11.04 (33) Țara cererii prioritare: FR; EP	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 10/2024, 2024.10.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 27/2024, 2024.07.03 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 10/2019, 2019.10.31
(71) Solicitant: ALPHANOSOS S.A.S., FR (72) Inventatori: MAYER Pascal, FR; BREUILS Laure, FR (73) Titular: ALPHANOSOS S.A.S., FR (74) Mandatar autorizat: GLAZACEVA Galina	

(54) Extract de compoziție din ierburi în calitate de agent antimicrobian și/sau antibiopelicular

(57) Rezumat:

În continuare este descris un extract dintr-o compoziție pe bază de plante care cuprinde cel puțin două plante uscate diferite, utilizate ca agent antimicrobian și/sau antibiofilm în tratamentul sau prevenirea infecțiilor microbiene cauzate de bacterii, cum ar fi de exemplu *Escherichia*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Streptococcus* sau *Staphylococcus*, sau de fungi, cum ar fi exemplul descris aici. S-a constatat că, într-un astfel de extract, ingredientele active își exercită efectele biologice în mod sinergic. Extractul poate constitui ingredientul activ al unui supliment alimentar, al unei compoziții nutraceutice, farmaceutice sau cosmetice sau al unui aliment funcțional sau al unui aditiv alimentar. Un proces de preparare a extractului menționat este, de asemenea, descris aici.

Revendicări: 23

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de titular)**DOMENIUL INVENȚIEI

5 Invenția este definită în revendicările 1-23 și se referă la un extract dintr-o compoziție din plante care cuprinde cel puțin două plante uscate diferite, utile ca agent antimicrobian și/sau antibiofilm. De asemenea, s-a constatat că într-un astfel de extract, ingredientele active își exercită efectele biologice într-o manieră sinergică.

CONTEXTUL INVENȚIEI

10 Ca orice organism viu, plantele conțin numeroase entități chimice, inclusiv substanțe chimice cu greutate moleculară mică, polipeptide, polizaharide, enzime. Un extract de plante este astfel un exemplu banal de amestec natural de entități chimice.

Activitățile biologice și terapeutice ale multor amestecuri de entități chimice obținute din plante reprezintă cunoștințe seculare și sunt compilate în numeroase manuscrise (a se vedea, de exemplu, 15 Encyclopedia of Herbal Medicine: The Definitive Home Reference Guide to 550 Key Herbs with all their Uses as Remedies for Common Ailments Hardcover - November 15, 2000, de Andrew Chevallier).

Știința modernă permite observarea efectelor biologice și terapeutice ale combinațiilor de entități chimice obținute din plante asupra unui număr mare de organisme.

De exemplu, este descris în Scheggi (Scheggi S. et al, Pharm. Biol. 2016 Jan 5:1-11. [Epub ahead 20 of print]) cum un model la șobolan permite testarea efectului împotriva depresiei al combinațiilor de entități chimice obținute din plante.

În Zhipeng QU (Oncotarget. 2016 Sep 1 Epub) se arată cum este posibil să se identifice 25 mecanismele moleculare anticancer candidate ale compusului Kushen Injection utilizând genomica funcțională. Compound Kushen Injection (CKI) a fost utilizat clinic în China timp de peste 15 ani pentru a trata diferite tipuri de tumori solide. Cu toate acestea, deoarece astfel de preparate din medicina tradițională chineză (TCM) sunt amestecuri complexe de metaboliți secundari ai plantelor, este esențial să se exploreze mecanismele moleculare care stau la baza acestora într-un mod sistematic. Acest studiu arată că CKI a inhibat proliferarea celulelor MCF-7 și a indus apoptoza într-un mod dependent de doză. Mai multe căi s-au dovedit a fi perturbate, iar ciclul celular a fost identificat ca potențială țintă primară a CKI în celulele MCF-7. De asemenea, CKI poate induce apoptoza în celulele MCF-7 printr-un mecanism independent de p53. În plus, aceștia au identificat noi lncARN (ARN lung non-codificator – non-codificatori ARN la plămâni) și au arătat că multe dintre acestea ar putea fi exprimate ca răspuns la tratamentul cu CKI.

Efectul amestecurilor de entități chimice obținute, de exemplu, din plante, ciuperci sau bacterii 35 asupra creșterii microorganismelor precum bacteriile și ciupercile a fost descris de mai multe ori, de exemplu în Venkatadri (Venkatadri B. et al., Indian J. Pharm. Sci. 2015 Nov-Dec;77(6):788-91).

Efectul combinațiilor de entități chimice obținute, de exemplu, din plante, ciuperci sau bacterii 40 asupra formării de biofilme (comunități de microorganisme integrate într-o matrice polimerică atașată de o suprafață) a fost, de asemenea, descris de multe ori, de exemplu în Suntar (Suntar I. et al., Pharm. Biol. 2016 Jun;54(6):1065-70 Epub 2015 Oct 29).

Shimizu M. și colab. (Antimicrob Agents Chemother. 2001 Nov;45(11):3198-201) au constatat că 45 un extract de *Arctos-taphylos uva-ursi* a redus semnificativ CMI (concentrațiile minime inhibitorii) ale antibioticelor beta-lactamice, cum ar fi oxacilina și cefmetazolul, împotriva *Staphylococcus aureus*, rezistent la meticilină. Același grup a izolat, de asemenea, compusul eficient și l-a identificat ca fiind corilagin.

Un alt grup (Denev P. et al., Acta Biochim. Pol. 2014;61(2):359-67. Epub 2014 Jun 18) a studiat 50 activitățile antioxidante, antimicrobiene și de modulare a neutrofilelor ale extractelor din șase plante medicinale: frunze de mur (*Rubus fruticosus*), frunze de scoruș negru (*Aronia melanocarpa*), frunze de păducel (*Crataegus monogyna*), părți aeriene de crețișoară (*Alchemilla glabra*), părți aeriene de crețușcă (*Filipendula ulmaria*) și frunze de zmeur (*Rubus idaeus*). Activitatea antimicrobiană a extractelor investigate împotriva a 11 agenți patogeni umani a fost investigată utilizând trei metode diferite, iar rezultatele acestui studiu au permis să se concluzioneze că extractele din frunze de crețușcă și mur au avut cel mai mare efect antimicrobian și cele mai mici concentrații minime inhibitorii (CMI) împotriva microorganismelor testate.

Yam T. și colab. (FEMS Microbiol Lett. 1997 Jul 1;152(1):169-74) și-au concentrat studiul asupra 55 activității microbiologice a extractelor brute integrale și fracționate din planta de ceai (*Camellia sinensis*) și a componentelor plantei de ceai. Au fost testate extracte apoase din planta de ceai (*Camellia sinensis*) de diferite tipuri și din diferite surse și s-a constatat că inhibă o gamă largă de bacterii patogene, inclusiv *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină. Extractele din planta de ceai au fost bactericide pentru stafilococi și *Yersinia enterocolitica* la concentrații mult mai mici decât „ceai de ceai”. Activitatea a fost

limitată la una dintre cele patru fracțiuni obținute dintr-un extract de ceai verde prin cromatografie de partiție. Testarea compușilor puri din planta de ceai și a substanțelor chimice înrudite a sugerat că activitatea antibacteriană a extractelor de ceai verde poate fi explicată prin conținutul său de epigallocatechină, galat de epigallocatechină și galat de epicatechină. În extractele de ceai negru, teaflavina și galații săi sunt

componente antibacteriene active suplimentare.

WO 2009/031041 raportează o compoziție care cuprinde (a) un compus antimicrobian având o anumită formulă chimică structurală dată, (b) un material antimicrobian selectat din bacteriocine lantionină, extract din planta de ceai [*Camellia sinensis*], extract de hamei [*Humulus lupulus* L], extract din coaja de struguri, extract de semințe de struguri, extract de Uva Ursi [*Arctostaphylos uva-ursi*] și combinații ale acestora.

WO 99/20289 raportează o soluție limpede de extract din plante care cuprinde un extract concentrat din plante și un lichid de umplere. Extractul concentrat din plante este raportat ca fiind selectat dintr-o listă lungă de extracte din plante, lista incluzând *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* și *Arctostaphylos uva-ursi*. Cu toate acestea, WO 99/20289 nu menționează nicio utilizare terapeutică sau medicală specifică a soluției revendicate pe bază de plante.

US 2015/0056255 raportează un produs pentru uz medicinal, cosmetic, colorant sau dermatologic, produsul cuprinzând un strat de produs vegetal fibros și un extract vegetal aplicat pe stratul de produs vegetal fibros. Se spune că extractul din plante include substanțe din una sau mai multe părți specifice ale uneia sau mai multor plante, plantele fiind selectate din cel puțin una dintr-o listă lungă de plante.

Azanida NN (Med. Aromat. Plants, 4:3, p.1-6, 2015) a publicat o analiză, care raportează o descriere și o comparație a celor mai frecvent utilizate metode de preparare a extractelor din plante medicinale. Autorii își încheie articolul afirmând că „nicio metodă universală de extracție nu este metoda ideală și fiecare procedură de extracție este unică pentru plante” (a se vedea „Concluzii”, rândurile 5-7).

Selman A. Wachsman et al. (Bacteriology, 31, p.157-164, 1945) raportează că diferite tulpini ale aceleiași specii bacteriene pot varia foarte mult în ceea ce privește rezistența lor la streptomycină. În această lucrare sunt utilizate diferite tulpini bacteriene de *Staphylococcus aureus* pentru a testa activitatea streptomycină. Cu toate acestea, niciun extract din plante nu este testat pe aceleași tulpini și, prin urmare, nu se pot extrage indicații clare din această lucrare.

Efectele biologice prevăzute în exemplele anterioare pot fi induse fie de o singură entitate chimică, cum ar fi în cazul medicamentelor standard, fie de efectele sinergice ale diferitelor entități chimice, cum ar fi în cazul extractelor. În unele cazuri, efectul biologic poate fi atribuit aproape în întregime unei singure entități chimice conținute în extract. În acest caz, extractul poate fi înlocuit cu entitatea chimică activă purificată.

Efectele biologice ale unei entități chimice se pot datora fie reacțiilor chimice (transformărilor) cu entitățile chimice care alcătuiesc organismul, fie legării tranzitorii sau permanente la entitățile chimice, în special la macromoleculele care alcătuiesc organismul. O astfel de legare va modula activitatea entităților chimice ale organismului, în special a macromoleculelor, de exemplu creșterea sau scăderea activității unei enzime.

Din păcate, entitățile chimice nu au niciodată un singur efect asupra unui organism. În special, interacțiunile cu constituenții macromoleculari sunt numeroase. De fapt, este bine stabilit că orice entitate chimică, fie naturală, fie rezultată din sinteza chimică, va avea efecte nocive asupra organismelor (oameni, animale, plante, microfloră etc.) în funcție de doză. În cele din urmă, se poate observa și un efect pozitiv sau terapeutic legat de doză. Este evident că, pentru ca entitatea chimică să prezinte interes industrial, doza necesară pentru a observa efectul pozitiv sau terapeutic trebuie să fie mai mică decât doza pentru care efectele nocive devin inacceptabile.

Entitățile chimice care diferă în ceea ce privește compoziția sau structura lor chimică vor avea afinități (sau constante de legare) diferite față de diferitele macromolecule care constituie organismul și, prin urmare, moduri de acțiune diferite care duc la efectele nocive, pozitive și terapeutice observate.

Macromoleculele implicate în efectele nocive și cele implicate în efectele pozitive sau terapeutice sunt diferite în multe cazuri. Entitățile chimice care diferă în compoziția lor chimică vor avea, în majoritatea cazurilor, afinități (sau constante de legare) foarte diferite față de numeroasele macromolecule diferite care alcătuiesc organismul.

În cele mai multe cazuri, entități chimice diferite vor avea afinități (sau constante de legare) diferite față de o anumită macromoleculă. În cazuri rare, entități chimice diferite vor avea afinități (sau constante de legare) similare față de aceeași macromoleculă sau seturi de macromolecule implicate într-un efect pozitiv sau terapeutic. Printre aceste cazuri, va fi rar ca aceste entități chimice diferite să aibă afinități comparabile (sau constante de legare) față de macromoleculele implicate în efectul nociv dat.

Astfel, amestecurile de entități chimice diferite pot avea un efect sinergic pozitiv sau terapeutic fără un efect nociv cumulat dat. Astfel, pentru un efect pozitiv sau terapeutic dat, doza necesară pentru

fiecare entitate chimică diferită dintr-un amestec va fi mai mică decât doza necesară pentru fiecare entitate chimică considerată individual pentru a obține efectul pozitiv sau terapeutic dat. În cazurile în care efectele nocive induse de fiecare compus chimic diferit sunt diferite sau au o etiologie macromoleculară diferită, fiecare efect nociv al amestecului va fi mai mic decât efectul nociv al entității chimice considerate individual, deoarece aceasta este utilizată la o doză mai mică în amestec.

De reținut că situația sinergică a administrării simultane a unor doze reduse de entități chimice diferite este diferită de administrarea concomitentă a unor medicamente (entități chimice) diferite cu efecte terapeutice diferite, administrate în dozele lor standard. În această din urmă situație, efectele secundare mărite din cauza interacțiunilor medicamentoase sunt bine cunoscute. Una dintre cauzele efectelor secundare este posibila interacțiune chimică a diferitelor medicamente (entități chimice). În situația sinergică, fiecare entitate chimică este prezentă la o concentrație redusă și, prin urmare, cu rate mult mai mici de interacțiuni chimice. În scop ilustrativ, un amestec sinergic de 10 entități chimice (medicamente) diferite administrate fiecare la 1/10 din concentrația (doza) necesară pentru o entitate chimică (medicament) administrată individual, rata reacțiilor chimice între medicamente va fi redusă cu un factor de 100, astfel cum implică legea universală a acțiunii masei.

Prin urmare, este de interes să se utilizeze amestecuri sinergice de entități chimice diferite pentru a obține un efect pozitiv sau terapeutic dat cu efecte nocive reduse sau pentru a obține un efect pozitiv sau terapeutic crescut cu un anumit nivel de efecte nocive diferite. Într-adevăr, mai multe extracte sunt cunoscute ca având activități sinergice în raport cu entități chimice izolate (a se vedea, de exemplu, Deharo E. et al., Malar. J. 2011 Mar 15;10 Suppl 1:S5).

Extractele naturale compuse dintr-un amestec de entități chimice sinergice pot fi descoperite, de exemplu, prin testarea sistematică a numeroase extracte naturale din pulberi de plante unice sau compoziții din plante care conțin cel puțin două sau mai multe pulberi de plante diferite.

DESCRIEREA INVENȚIEI

S-a descoperit acum că un extract dintr-o compoziție din plante care cuprinde cel puțin două plante uscate selectate dintre *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* și *Arctostaphylos uva-ursi* este util ca agent antimicrobian și/sau antibiofilm în tratamentul sau prevenirea infecțiilor microbiene cauzate de bacterii cum ar fi, de exemplu, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Streptococcus* sau *Staphylococcus*, sau de ciuperci, cum ar fi, de exemplu, *Candida*. De asemenea, s-a constatat că, într-un astfel de extract, ingredientele active își exercită efectele biologice într-un mod sinergic.

Se descrie aici tratamentul sau prevenirea infecțiilor microbiene menționate mai sus, care constă în administrarea unei cantități eficiente de extract dintr-o compoziție pe bază de plante care cuprinde cel puțin două plante uscate selectate dintre *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* și *Arctostaphylos uva-ursi*, a unui liofilizat din extractul respectiv sau a unei compoziții farmaceutice sau veterinare care cuprinde extractul respectiv sau liofilizatul respectiv, unui subiect care are nevoie de aceasta.

Un obiect al prezentei invenții reprezintă un extract dintr-o compoziție pe bază de plante, care cuprinde cel puțin două plante uscate, selectate dintre *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* și *Arctostaphylos uva-ursi* și cel puțin o plantă selectată dintre *Vitis vinifera* var. *tinctoria*, *Euigenia caryophyllus* și *Desmodium adscendens*.

Respectiva compoziție pe bază de plante poate cuprinde, de asemenea, una sau mai multe plante uscate suplimentare, selectate dintre: *Achillea millefolium*, *Acorus calamus*, *Agrimonia eupatoria*, *Agropyrum repens*, *Agropyrum repens*, *Alchemilla vulgaris*, *Alkanna tinctoria*, *Althaea officinalis*, *Anethum graveolens*, *Angelica archangelica*, *Arbutus unedo*, *Arnica montana*, *Artemisia pontica*, *Artemisia vulgaris*, *Asparagus officinalis*, *Asperula odorata*, *Betula pendula*, *Borrago officinalis*, *Buxus sempervirens*, *Calamintha officinalis*, *Calendula officinalis*, *Calluna vulgaris*, *Carum carvi*, *Cassia angustifolia*, *Centaurea cyanus*, *Centaureum erythraea*, *Centella asiatica*, *Cetraria islandica*, *Chamaemelum nobile*, *Cham-omilla recutita*, *Chrysanthellum americanum*, *Cichorium endivia*, *Cichorium intybus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Citrus aurantium*, *Combretum micranthum*, *Crataegus oxyacantha*, *Cuminum cyminum*, *Cupressus sempervirens*, *Curcuma zedoaria*, *Cynara scolymus*, *Cytisus scoparius*, *Elettaria cardamomum*, *Eleutherococcus senticosus*, *Epilobium parviflorum*, *Erysimum officinale*, *Eucalyptus globulus*, *Eupatorium cannabinum*, *Foeniculum vulgare*, *Fraxinus excelsior*, *Fucus vesiculosus*, *Fumaric officinalis*, *Galium odoratum*, *Gentiana lutea*, *Geranium robertianum*, *Ginkgo biloba*, *Glechoma hederacea*, *Glycyrrhiza glabra*, *Handroanthus impetiginosus*, *Harpagophytum procumbens*, *Hieracium pilosella*, *Humulus lupulus*, *Hypericum perforatum*, *Hyssopus officinalis*, *Illicium verum*, *Inula helenium*, *Juqlans regia*, *Juniperus communis*, *Lamium album*, *Lavandula angustifolia*, *Levisticum officinale*, *Lippia citriodora*, *Lotus corniculatus*, *Lythrum salicaria*, *Malva sylvestris*, *Marrubium vulgare*, *Medicago sativa*, *Melissa officinalis*, *Mentha 3 piperita*, *Morus nigra*, *Myrtus communis*, *Olea europaea*, *Oriqanum maiorana*, *Panax qinseng*, *Papaver rhoeas*, *Parietaria officinalis*, *Passiflora in-carnata*, *Petroselinum crispum*, *Peumus boldus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pimpinella*

anisum, Plantago lanceolata, Plantago ovata, Potentilla anserina, Quercus robur, Rhamnus frangula, Rheum palmatum, Rosa centifolia, Rosmarinus officinalis, Rubia tinctorum, Rubus idaeus, Salix alba, Salvia officinalis, Sambucus nigra, Satureja montana, Silybum marianum, Solanum dulcamara, Tabebuia impetiginosa, Tanacetum vulgare, Taraxacum officinalis, Thymus serpyllum, Thymus vulgaris, Tilia tomentosa, Tilia cordata, Trigonella foenum-graecum, Tussilago farfara, Vaccinium myrtillus, Valeriana officinalis, Verbascum thapsus, Verbena officinalis, Viscum album, Zea mays și Zingiber officinale.

Un alt obiect al invenției este un extract dintr-o compoziție pe bază de plante care cuprinde de la trei la șapte plante uscate, selectate dintre *Filipendula ulmaria, Camellia sinensis, Arctostaphylos uva-ursi, Rheum palmatum, Rosmarinus officinalis, Vitis vinifera tinctoria, Desmodium adscendes, Eugenia caryophyllus* și *Eucalyptus globulus*, dintre care cel puțin două dintre aceste plante sunt selectate dintre *Filipendula ulmaria, Camellia sinensis* și *Arctostaphylos uva-ursi* și cel puțin una dintre aceste plante este selectată dintre *Vitis vinifera tinctoria, Desmodium adscendes* și *Eugenia caryophyllus*.

Un alt obiect al invenției îl reprezintă un extract dintr-o compoziție din plante care cuprinde următoarele plante uscate: *Rosmarinus officinalis, Filipendula ulmaria, Camellia sinensis, Vitis vinifera tinctoria* și *Arctostaphylos uva-ursi*.

Un alt obiect al invenției îl reprezintă un extract dintr-o compoziție din plante care cuprinde următoarele plante uscate: *Rheum palmatum, Filipendula ulmaria, Camellia sinensis, Vitis vinifera tinctoria* și *Arctostaphylos uva-ursi*.

0034] Un alt obiect al invenției îl reprezintă un extract dintr-o compoziție din plante care cuprinde următoarele plante uscate: *Rheum palmatum, Rosmarinus officinalis, Filipendula ulmaria, Camellia sinensis, Vitis vinifera tinctoria, Eugenia caryophyllus* și *Arctostaphylos uva-ursi*.

Un alt obiect al invenției îl reprezintă un extract dintr-o compoziție din plante care cuprinde următoarele plante uscate: *Rheum palmatum, Rosmarinus officinalis, Filipendula ulmaria, Camellia sinensis, Vitis vinifera tinctoria, Eucalyptus globulus, Arctostaphylos uva-ursi, Mentha spicata* și *Rubia tinctorum*.

Un alt obiect al invenției îl reprezintă un extract dintr-o compoziție din plante care cuprinde cel puțin paisprezece sau cincisprezece plante uscate selectate dintre următoarele șaisprezece: *Rheum palmatum, Rosmarinus officinalis, Filipendula ulmaria, Satureja montana, Valeriana officinalis, Camellia sinensis, Vitis vinifera tinctoria, Fucus vesiculosus, Foeniculum vulgare, Arctostaphylos uva-ursi, Arbutus unedo, Eugenia caryophyllus, Juniperus communis, Combretum micranthum, Lippia citrodora* și *Tanacetum vulgare*.

Un alt obiect al invenției îl reprezintă un extract dintr-o compoziție din plante care cuprinde următoarele plante uscate: *Rheum palmatum, Rosmarinus officinalis, Filipendula ulmaria, Satureja montana, Valeriana officinalis, Camellia sinensis, Vitis vinifera tinctoria, Fucus vesiculosus, Foeniculum vulgare, Arctostaphylos uva-ursi, Arbutus unedo, Eugenia caryophyllus, Juniperus communis, Combretum micranthum* și *Lippia citrodora*.

Un alt obiect al invenției îl reprezintă un extract dintr-o compoziție din plante care cuprinde următoarele plante uscate: *Rheum palmatum, Rosmarinus officinalis, Filipendula ulmaria, Satureja montana, Valeriana officinalis, Camellia sinensis, Vitis vinifera tinctoria, Fucus vesiculosus, Foeniculum vulgare, Arctostaphylos uva-ursi, Arbutus unedo, Eugenia caryophyllus, Juniperus communis, Combretum micranthum, Lippia citrodora* și *Tanacetum vulgare*.

Toate compozițiile din plante menționate mai sus sunt, de asemenea, un obiect al invenției, ca intermediari în prepararea extractelor corespunzătoare.

Extractul poate constitui ingredientul activ al unui supliment alimentar, al unei compoziții nutraceutice, farmaceutice sau cosmetice sau al unui aliment funcțional sau al unui aditiv alimentar.

Extractul din invenție poate fi utilizat ca atare sau într-o formă uscată sau liofilizată.

Un supliment alimentar, o compoziție nutraceutică, farmaceutică, veterinară sau cosmetică sau un aliment funcțional sau un aditiv alimentar care conține extractul definit mai sus împreună cu excipienți adecvați sunt alte obiecte ale invenției.

Un astfel de supliment alimentar, o compoziție nutraceutică, farmaceutică, veterinară sau cosmetică sau un aliment funcțional sau un aditiv alimentar poate fi formulat sub orice formă adecvată, de exemplu, pentru administrare orală, inclusiv forme solide cum ar fi pulberi, granule, capsule, pastile, tablete (cu eliberare normală sau controlată), gume de mestecat sau forme lichide cum ar fi siropuri, picături, elixire, soluții și suspensii în general.

În plus, extractul conform invenției poate fi încorporat în alte formulări, cum ar fi creme, unguente, geluri, lapte, paste, creme pe bază de apă, emulsii, seruri, măști, balsamuri, fluide, spray-uri, supozitoare, supozitoare vaginale, plasturi transdermici și paste de dinți, geluri parodontale, ape de gură.

În conformitate cu prezenta invenție, expresia „compoziție din plante” se referă la o pulbere care conține una sau mai multe plante uscate diferite măcinate. Pulberea unei singure plante uscate poate fi

obținută din întreaga plantă sau dintr-o parte specifică a acesteia, de exemplu, flori, muguri, fructe, tulpini, frunze, semințe, rădăcini sau altele.

În conformitate cu invenția, un extract poate fi obținut prin simpla incubare a unei compoziții din plante cu un solvent de extracție (cu sau fără adăugarea unui zahăr) la temperatura camerei.

Solvenții de extracție adecvați conform invenției sunt apa și toți solvenții non-apoși autorizați pentru utilizare în producția de produse alimentare și ingrediente alimentare. De exemplu, în conformitate cu Directiva 2009/32/CE, o listă a acestor solvenți non-apoși include propanul, butanul, acetatul de etil, etanolul, dioxidul de carbon, acetona, oxidul de azot. Conform unor realizări specifice ale invenției, solventul de extracție este selectat dintre apă, etanol, acetat de etil și orice amestec al acestora.

Conform unei variante alternative de realizare, un extract poate fi obținut prin incubarea unei compoziții din plante cu un solvent de extracție (cu sau fără adăugarea unui zahăr) și încălzirea ulterioară, cu sau fără centrifugare și filtrare.

Conform unei variante alternative de realizare, un extract din apă poate fi obținut prin incubarea unei compoziții din plante cu apă (cu sau fără adăugarea unui zahăr) și încălzirea ulterioară (de exemplu, prin încălzirea preparatului lichid rezultat la o temperatură cuprinsă între 60 °C și 134 °C, de preferință între 119 °C și 121 °C, pentru o perioadă cuprinsă între 5 și 60 de minute, de preferință între 20 și 30 de minute).

Prin termenul „zahăr” se înțelege aici un zahăr de calitate farmaceutică sau alimentară, cum ar fi, de exemplu, dextroza, lactoza, lactoza anhidră, manitolul, sorbitolul, maltoza, galactoza sau zaharoza.

Conform unei variante specifice de realizare a invenției, un astfel de zahăr este zaharoza.

Zahărul respectiv poate fi utilizat la concentrații care variază de la 1 la 100 g/l, opțional de la 50 la 75 g/l.

Prin termenul „supliment alimentar” se înțelege aici un produs alimentar destinat să suplimenteze dieta obișnuită și care este o sursă concentrată de nutrienți, cum ar fi vitamine și minerale sau alte substanțe cu efect nutrițional sau fiziologic, sub formă de doză unitară (a se vedea, de asemenea, Directiva 2002/46/CE din 10 iunie 2002).

Expresia „aliment funcțional” înseamnă includerea unor alimente caracterizate prin efecte suplimentare datorate prezenței de componente (în general non-nutrienți) prezente în mod natural sau adăugate, care interacționează mai mult sau mai puțin selectiv cu una sau mai multe funcții fiziologice ale organismului (biomodulare) care conduc la un efect pozitiv asupra menținerii sănătății și/sau prevenirea bolilor. Un aliment poate fi considerat „funcțional”, dacă este suficient de demonstrată influența sa benefică asupra uneia sau mai multor funcții ale organismului, în plus față de efectele nutriționale adecvate, astfel încât să fie relevant pentru o stare de bine și sănătate sau pentru reducerea riscului unei boli. Efectele benefice ar putea include atât menținerea, cât și promovarea unei stări de bine sau sănătate și / sau reducerea riscului unui proces patologic sau al unei boli (a se vedea AT Diplock et al: Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document, British Journal of Nutrition 1999, 81 (Suppl. 1), S1-S27).

În conformitate cu prezenta invenție, prin expresia „compoziție nutraceutică” se înțelege un produs, care nu numai că suplimentează dieta, dar ar trebui, de asemenea, să ajute la prevenirea și/sau tratamentul bolilor și/sau tulburărilor. Această expresie a fost inventată în 1989 de Stephen L. DeFélice (medic, fondator și președinte al Fundației pentru inovație în medicină (FIM)) care reunește conceptele de „nutriție” și „farmaceutic”).

Prin termenul „excipient” se intenționează aici să se facă referire la excipienții convenționali și anume compuși inerti față de ingredientul activ al unei compoziții.

Excipienții pot fi împărțiți în diverse clasificări funcționale, în funcție de rolul pe care sunt prevăzuți să îl joace în formula rezultată, de exemplu, în formele de dozare solide, aceștia pot acționa ca diluanți (de ex. lactoză, celuloză microcristalină), dezintegranți (de exemplu, amidon glicolat de sodiu, croscarmeloză sodică), lianți (de exemplu, PVP, HPMC), lubrifianți (de exemplu, stearat de magneziu), glidanți (de exemplu, SiO₂ coloidal) sau agenți de aromatizare (de exemplu, uleiuri de mentă, de lămâie). În formele de dozare lichide, acestea pot acționa ca solvenți, co-solvenți sau solubilizatori (de exemplu propilenglicol, glicerol, etanol, sorbitol, dextroză), agenți tampon (de exemplu fosfat de sodiu), agenți antimicrobieni (de exemplu sorbat de potasiu), agenți de umezire (de ex. polisorbați sau Tween), agenți anti-spumare (de exemplu, polidimetilsiloxan-dioxid de siliciu), agenți de îngroșare (de exemplu, metilceluloză sau hidroxietilceluloză) sau agenți îndulcitori (de exemplu, sorbitol, acesulfam-K).

După cum s-a spus deja, extractul din invenție este un agent antimicrobian și/sau antibiofilm și este utilizat în mod avantajos în tratamentul, prevenirea și/sau diagnosticarea infecțiilor microbiene la om și animale.

Un alt obiect al invenției este, prin urmare, utilizarea extractului din invenție în fabricarea unui medicament pentru tratamentul, prevenirea sau diagnosticarea infecțiilor microbiene. Un astfel de medicament poate fi util pentru oameni și animale.

În conformitate cu prezenta invenție, expresiile „tratament” sau „tratare” se referă la activități destinate vindecării, ameliorării simptomelor sau întârzierii progresiei unei boli sau a unei stări patologice.

Expresiile „prevenire” sau „prevenție” se referă la activitățile menite să reducă la minimum apariția sau efectele unei boli sau ale unei stări patologice. De exemplu, în cazul infecțiilor microbiene, prevenirea se referă în mod specific la prevenirea aderării și colonizării microbilor patogeni în celule, țesuturi și organe.

Expresiile „diagnostic” sau „diagnosticare” se referă la activități menite să identifice o serie de parametri fiziologici pentru a evalua prezența și amploarea unei anumite boli sau stări patologice.

Expresia „agent antimicrobian” va fi utilizată aici pentru a desemna un agent care este capabil să inhibe creșterea celulelor microbiene. Dacă celulele microbiene sunt celule microbiene patogene, agentul antimicrobian poate fi utilizat ca ingredient activ al unei compoziții farmaceutice sau veterinare pentru tratamentul infecțiilor microbiene la oameni sau animale.

Expresia „agent antibiofilm” va fi utilizată aici pentru a desemna un agent care este capabil să inhibe formarea biofilmului de către celulele microbiene și/sau să faciliteze dispersia biofilmelor preformate. Spre deosebire de agenții antimicrobieni convenționali, un agent antibiofilm nu afectează în mod direct supraviețuirea microbiană și, prin urmare, se preconizează că rezistența la acești agenți nu va apărea cu ușurință.

În conformitate cu prezenta invenție, termenul „sinergic” se referă la un efect sau o activitate biologică (în cazul de față antimicrobiană sau antibiofilm), prezentată de extractul unei compoziții pe bază de plante a invenției (și anume care cuprinde cel puțin două plante uscate selectate dintre *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* și *Arctostaphylos uva-ursi*), care este mai mare decât suma efectelor sau activităților extractelor plantelor uscate individuale corespunzătoare.

Un asemenea efect sau activitate biologică mai mare poate fi ilustrată, de exemplu, în termeni de inhibare a creșterii planctonice (activitate antimicrobiană), în termeni de inhibare a formării biofilmului (activitate antibiofilm) sau în termeni de număr de tulpini, în care pot fi identificate una sau ambele activități.

Conform unei realizări particulare a invenției, infecțiile microbiene sunt cauzate de bacterii, cum ar fi, de exemplu, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*, *Streptococcus pyogenes* sau de către ciuperci, de exemplu *Candida albicans*.

Conform unei alte realizări specifice a invenției, infecțiile microbiene sunt cauzate de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* sau *Staphylococcus pseudintermedius*.

Staphylococcus aureus, o bacterie Gram-pozitivă comensală, este un agent patogen principal care poate provoca o mare varietate de boli la om, de la infecții ale pielii și ale țesuturilor moi, la septicemie severă, șoc toxic sau pneumonie. *Staphylococcus aureus* este o cauză importantă a infecțiilor nosocomiale, iar multe tulpini spitalicești de *Staphylococcus aureus* au devenit rezistente la antibiotice, mai ales la metilicilină. Nu există încă niciun vaccin disponibil, dar se depun eforturi importante pentru a dezvolta imunoterapia activă și pasivă împotriva diferitelor ținte ale *Staphylococcus aureus*.

Pentru a evalua astfel de activități biologice pentru extractul invenției și pentru eșantioane comparative, au fost utilizate multe tulpini diferite, care vor fi menționate în secțiunea „Exemple”.

În special, următoarele tulpini bacteriene au fost utilizate pentru a testa atât activitatea antimicrobiană, cât și activitatea antibiofilm a extractelor din invenție.

ATCC 25923, cunoscută și ca Seattle 1945, este o tulpină de *Staphylococcus aureus* utilizată pe scară largă în cercetarea academică (este citată în 627 de publicații din octombrie 2016 (a se vedea N!H-NCBI-Pubmed)). Comportamentul său de rezistență la antibiotice a fost bine caracterizat (a se vedea, de exemplu, Reimer L.G. et al., Antimicrob. Agents Chemother. 1981 Jun;19(6):1050-5).

ATCC 29213 este, de asemenea, o tulpină de *Staphylococcus aureus* utilizată pe scară largă în cercetarea academică [citată în 327 de publicații din octombrie 2016 (a se vedea N!H-NCBI-Pubmed)]. Aceasta a fost utilizată în cercetarea biofilmelor (a se vedea, de exemplu, Ceri H. et al., J. Clin. Microbiol. 1999 Jun;37(6):1771-6).

ATCC 1228 este o tulpină de *Staphylococcus epidermidis* [citată în 101 publicații din octombrie 2016 (a se vedea NIH- NCBI-Pubmed)]. Codul de reglementări federale (FDA) enumeră această tulpină ca fiind organismul de testare preferat pentru neomicină [a se vedea, de asemenea, Robertson J.H. et al., Appl. Microbiol. 1971 Dec;22(6):1164-5).

ATCC 43300 este o tulpină de *Staphylococcus aureus* izolată dintr-un studiu clinic (citată în 81 de publicații din octombrie 2016 (a se vedea NIH-NCBI-Pubmed), inclusiv Lubenko și colab., J. Antimicrob. Chemother. 2008 Nov;62(5):1065-9).

Tulpina Newman a *Staphylococcus aureus* a fost izolată în 1952 dintr-o infecție umană și a fost utilizată extensiv în modele animale de infecții stafilococice datorită fenotipului său robust de virulență [a se vedea Baba T. et al., Journal of bacteriology, 190 :300-310 (2008)]. Spre deosebire de MRSA (*Staphylococcus aureus* rezistent la metilicilină) dobândit în spital, *Staphylococcus aureus* Newman poartă doar un număr mic de secvențe de inserție (SI) și nu are determinanți cunoscuți de rezistență la antibiotice.

Alte tulpini utilizate în exemple sunt, de asemenea, utilizate în mod obișnuit în cercetarea academică sau în industrie, pentru controlul calității (QC). Majoritatea acestora sunt, de asemenea, rezistente la metilicilină.

Pentru referința la ATCC 33591, a se vedea Reyes N. et al., J. Antimicrob. Chemother. 2006 Aug;58(2):462-5, Epub 2006 May 30. Pentru referința la ATCC 33592, a se vedea Teka A. et al., BMC Complement Altern Med. 2015 Aug 18;15:286. Pentru referința la NCTC 12493, a se vedea Carey B.E. et al., J. Antimicrob. Chemother. 2006 Aug;58(2):455-7, Epub 2006 Jun 20. Pentru referința la ATCC 700698, a se vedea Kirker K.R. et al., Int. J. Antimicrob Agents, 2015 Oct;46(4):451-5, Epub 2015 Jul 9. Pentru referința la ATCC 700699, a se vedea Sy C.L. et al., J. Clin. Microbiol. 2016 Mar;54(3):565-8, Epub 2015 Dec 16. Pentru referința la ATCC 9144, a se vedea Carson C.F. și colab., Antimicrob. Agents Chemother. 2002 Jun;46(6):1914-20. Pentru referința la ATCC BAA-44, a se vedea Monecke S. et al., PLoS One. 2011 Apr 6;6(4):e17936. Pentru referința la ATCC 14990, a se vedea Bernardo T.H. et al., Scientific World Journal. 2015;751791, Epub 2015 Jun 3). Pentru referința la ATCC 49444, a se vedea Ramsey KJ et al., J Food Prot. (2010). Pentru referința la ATCC 60193, a se vedea Petrikaite V et al., Medicina (Kausas). 2007;43(8):657-63. Pentru referința la ATCC 11775, a se vedea Usman H et al., Afr J Tradit Complement Altern Med. 2007 Jun 10;4(4):488-94. Pentru referința la ATCC 13883, a se vedea Supardy NA et al., J Microbiol Biotechnol. 2012 Jun;22(6):872-81. Pentru referința la ATCC 33090, a se vedea Le Marc Y et al. 2002 Mar;73(2-3):219-37. Pentru referința la ATCC 19115, a se vedea Vodnar DC., Chem Cent J. 2012 Jul 28;6(1):74. doi: 10.1186/1752-153X-6-74. Pentru referința la ATCC 27853, a se vedea Reimer LG et al., Antimicrob Agents Chemother. 1981 Jun;19(6):1050-5. Pentru referința la ATCC 13076, a se vedea Fioretto F et al., Braz J Med Biol Res. 2005 Aug;38(8):1259-65. Epub 2005 Jul 30. Pentru referința la ATCC 13311, a se vedea Leguerinel I et al., Int J Food Microbiol. 2007 May 1;116(1):88-95. Epub 2007 Jan 13. Pentru referința la ATCC 27336, a se vedea Chen S et al., Appl Environ Microbiol. 2013 Jul;79(13):4015-23. doi: 10.1128/AEM.00704-13. Epub 2013 Apr 19. Pentru referința la ATCC 43079, a se vedea Farrow JA și Collins MD, Syst. Appl. Microbiol. 5: 483-493, 1984. Pentru referința la ATCC BAA-1323, a se vedea Svensson Mikael D et al., Microbiology 148: 3933-3945, 2002.

Suplimentul alimentar, compoziția nutraceutică, farmaceutică sau cosmetică a invenției pot fi formulate corespunzător pentru diferite căi de administrare. Astfel de căi de administrare includ: calea auriculară, bucală, cutanată, dentară, nazală, oftalmică, orală, orofaringiană, rectală, respiratorie (inhalație), sublinguală, topică sau vaginală.

În general, compozițiile care cuprind extractele din invenție se administrează într-o „cantitate eficientă din punct de vedere terapeutic”.

În sensul prezentei descrieri și al revendicărilor următoare, termenul „care cuprinde” include, de asemenea, termenii „care constau, în principal, din” sau „care constau din”.

Cantitatea de compoziție efectiv administrată va fi de obicei stabilită de un medic, în funcție de circumstanțele relevante, inclusiv afecțiunea care trebuie tratată, calea de administrare aleasă, compoziția efectiv administrată, vârsta, greutatea corporală și răspunsul subiectului individual, severitatea simptomelor subiectului și altele asemenea. Pentru orice compoziție, doza eficientă din punct de vedere terapeutic poate fi estimată inițial fie în teste pe culturi celulare, fie pe modele animale, de obicei șoareci, șobolani, cobai, iepuri, câini sau porci.

Modelul animal poate fi, de asemenea, utilizat pentru a determina intervalul de concentrație și calea de administrare adecvate. Aceste informații pot fi apoi utilizate pentru a stabili dozele și căile de administrare utile la om. Pentru calcularea dozei umane echivalente (HED) se recomandă utilizarea tabelului de conversie furnizat în documentul Guidance for Industry and Reviewers (2005, U.S. Food and Drug Administration, Rockville, Maryland, SUA).

În conformitate cu invenția, doza de extract care urmează să fie administrată oamenilor poate fi ajustată cu referire la compoziția din plante utilizată pentru prepararea acestuia și, în consecință, la cantitatea de plante simple uscate, măcinate, prezente în compoziția din plante. De obicei, pentru prepararea extractului final se utilizează de la 0,001 la 500 g din fiecare plantă uscată măcinată, opțional de la 0,01 la 100 g. Acest extract poate fi utilizat ca atare sau sub formă liofilizată sau uscată în compoziția finală pentru uz uman sau animal sau poate fi diluat suplimentar.

Doza eficientă precisă pentru un subiect uman va depinde de gravitatea bolii sau afecțiunii, de starea generală de sănătate a subiectului, vârsta, greutatea și sexul subiectului, regimul alimentar, momentul

și frecvența administrării, alte terapii simultane, sensibilitatea la reacții și toleranța/răspunsul la tratament. Această cantitate poate fi stabilită prin experimente de rutină și ține de aprecierea clinicianului.

Tratamentul poate fi o schemă cu doză unică sau o schemă cu doze multiple.

Un alt obiect al invenției este procedeul de preparare a extractului din invenție. Un astfel de procedeu cuprinde schematic următoarele etape:

- a) tocarea sau măcinarea, separat sau în amestec, a cel puțin două plante uscate unice pentru a obține pulberile corespunzătoare;
- b) amestecarea a cel puțin două pulberi diferite pentru a obține o compoziție din plante;
- c) adăugarea unui solvent de extracție la compoziția din plante menționată, pentru a obține un preparat lichid (sau extract) corespunzător;
- d) incubarea preparatului lichid menționat la temperatura camerei, pentru o perioadă cuprinsă între 5 și 15 minute;
- e) încălzirea respectivului preparat lichid, la o temperatură cuprinsă între 60 °C și 134 °C pentru o perioadă cuprinsă între 5 și 60 de minute; opțional
- f) centrifugarea, colectarea supernatantului și filtrarea supernatantului colectat; și, opțional
- g) concentrarea și/sau uscarea sau liofilizarea preparatului lichid obținut la etapa e) sau f).

În conformitate cu prezenta aplicație, cuvântul „liofilizat” se va referi atât la extractele liofilizate (deshidratate), cât și la extractele uscate în conformitate cu invenția.

Plantele uscate unice sunt produse comerciale care pot fi achiziționate ca parte a colecțiilor de plante uscate din farmacii sau fitofarmacii. Listele colecțiilor de plante uscate sunt disponibile la fiecare farmacie sau fitofarmacie aleasă, iar plantele uscate disponibile în astfel de colecții pot varia de la o țară la alta.

De exemplu, Belgia, Franța și Italia au decis în 2012 să își unească forțele pentru a elabora o listă comună de plante a căror utilizare ar putea fi permisă, cu condiția ca producătorii să îndeplinească cerințele de calitate ale legislației europene (Regulamentul CE 852/2004). Datorită muncii asidue a trei experți recunoscuți (Robert Anton, Luke Delmulle și Mauro Serafini), proiectul a dus la stabilirea unei liste de 1.029 de plante și 11 ciuperci (a se vedea lista BelFrit pe adresa:

http://www.economie.gouv.fr/files/files/directions_services/dgccrf/imgs/breve/2014/documents/harmonized_list_Section_A.pdf)

Invenția va fi descrisă în continuare prin referință la următoarele exemple care nu sunt limitative.

EXEMPLE

Lista plantelor utilizate în exemple

Plantele și părțile de plante din lista următoare au fost utilizate în diferitele exemple. Din motive de concizie, fiecare plantă este identificată printr-un cod utilizat în toate exemplele. Se indică, de asemenea, greutatea corespunzătoare la 200 ml (volumul lingurii calibrate) de pulbere de plante (Tabelul 0-1). Plantele uscate de calitate farmaceutică de la PA00 la PB12 au fost obținute de la „Pharmacie Fontgieve” (Clermont-Ferrand, Franța), iar plantele uscate de calitate farmaceutică de la PB13 la PD08 au fost obținute de la „Pharmacie St Herem” (Clermont-Ferrand, Franța). Atunci când se indică în exemplu, plantele au fost obținute și de la „Herboristerie Cailleau” (Chemille, Franța) sau de la Siccarapam (Aubiat, Franța).

Tabelul 0-1: Lista de plante cu codurile asociate și greutatea pulberilor uscate pentru o lingură calibrată

Cod plantă	Denumire botanică	Parte utilizată	Greutate (g)
PA00	<i>Sambucus nigra</i>	Floare	0,0684
PA01	<i>Plantago afra</i>	Semințe	0,1357
PA02	<i>Equisetum arvense</i>	Partea aeriană	0,0578
PA05	<i>Aloysia citrodora</i>	Frunză	0,0712
PA06	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Rădăcină	0,0774
PA07	<i>Camellia sinensis</i>	Frunză	0,07
PA08	<i>Solidago virg aurea</i>	Partea aeriană	0,0394
PA10	<i>Taraxacum officinale</i>	Rădăcină	0,0585
PA11	<i>Rheum palmatum</i>	Rădăcină și rizom	0,1016
PA12	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Frunză	0,0545
PA13	<i>Filipendula ulmaria</i>	Floare	0,095
PA14	<i>Satureja montana</i>	Frunză	0,0619
PA15	<i>Calendula officinalis</i>	Petală	0,0383
PB32	<i>Tabebuia impetiginosa</i>	Scoartă	0,0775
PB33	<i>Glechoma hederacea</i>	Partea aeriană	0,0601
PB35	<i>Cetraria islandica</i>	Partea aeriană	0,0776

PB36	<i>Rubus idaeus</i>	Frunză	0,0553
PB38	<i>Fraxinus excelsior</i>	Frunză	0,1241
PB39	<i>Lavandula angustifolia</i>	Floare	0,0207
PB41	<i>Cassia angustifolia</i>	Fruct	0,0568
PB42	<i>Fragaria vesca</i>	Frunză	0,0692
PB45	<i>Aspalathus linearis</i>	Frunză	0,0684
PB46	<i>Trigonella foenum - graecum</i>	Semințe	0,1342
PB47	<i>Foeniculum vulgare</i>	Fruct	0,0818
PB48	<i>Alkanna tinctoria</i>	Rădăcină	0,0606
PB49	<i>Mentha spicata</i>	Frunză	0,0694
PA16	<i>Salvia officinalis</i>	Frunză	0,0415
PA17	<i>Passiflora incarnata</i>	Partea aeriană	0,0423
PA18	<i>Plantago lanceolata</i>	Frunză	0,0626
PA19	<i>Tussilago farfara</i>	Inflorescență	0,0494
PA20	<i>Valeriana officinalis</i>	Rădăcină	0,1142
PA21	<i>Camellia sinensis</i>	Frunză	0,135
PA22	<i>Vitis vinifera var, tinctoria</i>	Frunză	0,0762
PA23	<i>Thymus vulgaris</i>	Frunză	0,0373
PA24	<i>Cassia angustifolia</i>	Frunză	0,0648
PA25	<i>Tilia cordata</i>	Alburn	0,0391
PA26	<i>Thymus serpyllum</i>	Partea aeriană	0,0442
PA27	<i>Tilia tomentosa</i>	Bractee	0,0775
PA28	<i>Rubus idaeus</i>	Frunză	0,0463
PA29	<i>Fucus vesiculosus</i>	Lamelă	0,1702
PA30	<i>Lavandula angustifolia</i>	Floare	0,0216
PA31	<i>Trigonella foenum- graecum</i>	Semințe	0,1043
PA32	<i>Lotus corniculatus</i>	Partea aeriană	0,0497
PA33	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	Scoartă	0,0814
PA34	<i>Viscum album</i>	Frunză	0,0783
PA35	<i>Fumaria officinalis</i>	Vârf înflorit	0,0661
PA36	<i>Humulus lupulus</i>	Fruct	0,0307
PA37	<i>Fraxinus excelsior</i>	Frunză	0,0647
PA38	<i>Cytisus scoparius</i>	Floare	0,0253
PA39	<i>Foeniculum vulgare</i>	Fruct	0,081
PA40	<i>Origanum majorana</i>	Frunză	0,0345
PA41	<i>Citrus aurantium var, dulcis</i>	Frunză	0,0574
PA44	<i>Hyssopus officinalis</i>	Vârf înflorit	0,0677
PA45	<i>Mentha * piperita</i>	Frunză	0,07
PA46	<i>Melissa officinalis</i>	Frunză	0,0747
PA47	<i>Fragaria vesca</i>	Întreaga plantă	0,0692
PA48	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fruct	0,0608
PA51	<i>Marrubium vulgare</i>	Partea aeriană	0,0457
PA52	<i>Malva sylvestris</i>	Floare	0,0355
PA53	<i>Citrus aurantium var, dulcis</i>	Petală	0,0851
PB55	<i>Eucalyptus globulus</i>	Frunză	0,0666
PB57	<i>Rosaxcentifolia</i>	Mugure	0,0819
PB58	<i>Solanum dulcamara</i>	Tulpină	0,0709
PB60	<i>Arbutus unedo</i>	Frunză	0,0891
PB61	<i>Borrigo officinalis</i>	Partea aeriană	0,0754
PB76	<i>Eleutherococcus senticosus</i>	Rădăcină	0,0571
PB77	<i>Cupressus sempervirens</i>	Nucă	0,0862
PB78	<i>Curcuma longa</i>	Rădăcină	0,0946
PB79	<i>Cuminum cymin urn</i>	Fruct	0,1109
PB81	<i>Salvia officinalis</i>	Frunză	0,0536
PB82	<i>Salix alba</i>	Scoartă	0,0522
PB83	<i>Saponaria officinalis</i>	Partea aeriană	0,0602
PB85	<i>Lythrum salicaria</i>	Partea aeriană	0,0581

PB86	<i>Citrus limon (L) Burn.f.</i>	Coajă	0,098
PB88	<i>Centella asiatica</i>	Partea aeriană	0,0685
PB92	<i>Plantago ovata</i>	Semințe	0,1266
PB97	<i>Agropyrum repens</i>	Rizom	0,0555
PB98	<i>Cichorium intybus</i>	Frunză	0,0715
PB99	<i>Potentilla anserina</i>	Frunză	0,0298
PC01	<i>Quercus robur</i>	Scoarță	0,06
PC02	<i>Chelidonium majus</i>	Partea aeriană	0,0608
PC04	<i>Prunus cerasus</i>	Peduncul	0,0199
PC06	<i>Asparagus officinalis</i>	Rădăcină	0,0812
PC08	<i>Medicago sativa</i>	Semințe	0,113
PC11	<i>Juglans regia</i>	Frunză	0,0641
PC12	<i>Olea europaea</i>	Frunză	0,0561
PC14	<i>Myrtus communis</i>	Frunză	0,0716
PC15	<i>Trifolium rubens</i>	Floare	0,0484
PC17	<i>Curcuma zedoaria</i>	Rizom	0,077
PC19	<i>Vitis vinifera var, tinctoria</i>	Frunză	0,0695
PC20	<i>Eugenia caryophyllus</i>	Cuișoare	0,0852
PC21	<i>Althaea officinalis</i>	Rădăcină	0,0642
PA55	<i>Ginkgo biloba</i>	Frunză	0,0701
PA57	<i>Lamium album</i>	Floare	0,0591
PA60	<i>Olea europaea</i>	Frunză	0,0572
PA61	<i>Ilex paraguariensis</i>	Frunză	0,0598
PA62	<i>Artemisia vulgaris</i>	Frunză	0,0447
PA67	<i>Epilobium parviflorum</i>	Partea aeriană	0,0549
PA69	<i>Chamomilla recutita</i>	Inflorescență	0,0399
PA70	<i>Sisymbrium officinale</i>	Partea aeriană	0,0334
PA72	<i>Asparagus officinalis</i>	Rădăcină	0,0523
PA73	<i>Pimpinella anisum</i>	Fruct	0,0993
PA74	<i>Ribes nigrum</i>	Fruct	0,0769
PA75	<i>Crataegus oxyacantha</i>	Vârf înflorit	0,0656
PA76	<i>Chamaemelum nobile</i>	Inflorescență	0,0193
PA79	<i>Eucalyptus globulus</i>	Frunză	0,0703
PA80	<i>Prunus cerasus</i>	Peduncul	0,0141
PA81	<i>Acorus calamus</i>	Rizom	0,0631
PA82	<i>Calluna vulgaris</i>	Floare	0,0493
PA83	<i>Papaver rhoeas</i>	Petală	0,0278
PA85	<i>Cuminum cyminum</i>	Fruct	0,102
PA86	<i>Centaurium erythraea</i>	Partea aeriană	0,0591
PA88	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Fruct	0,0939
PA89	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Frunză	0,0711
PA90	<i>Angelica archangelica</i>	Fruct	0,0388
PA92	<i>Borago officinalis</i>	Floare	0,067
PA93	<i>Alchemilla vulgaris</i>	Partea aeriană	0,0588
PA94	<i>Artemisia pontica</i>	Vârf înflorit	0,431
PA95	<i>Illicium verum</i>	Fruct	0,0793
PA96	<i>Chrysanthellum americanum</i>	Partea aeriană	0,0768
PA97	<i>Harpagophytum procumbens</i>	Rădăcină	0,0853
PA98	<i>Betula pendula</i>	Frunză	0,0633
PA99	<i>Plantago lanceolata</i>	Partea aeriană	0,0718
PBOO	<i>Agropyrum repens</i>	Rizom	0,0646
PBO1	<i>Carum carvi</i>	Fruct	0,1089
PBO2	<i>Buxus sempervirens</i>	Frunză	0,0631
PC22	<i>Alpinia officinarum</i>	Rizom	0,0658
PC23	<i>Ginkgo biloba</i>	Frunză	0,0775
PC24	<i>Panax ginseng</i>	Rădăcină lateral	0,1782
PC25	<i>Zingiber officinale</i>	Rizom	0,078

PC26	<i>Juniperus communis</i>	Fruct	0,0505
PC27	<i>Geranium robertianum</i>	Partea aeriană	0,0639
PC28	<i>Gentiana lutea</i>	Rădăcină	0,0992
PC29	<i>Rubia tinctorium</i>	Rădăcină	0,0868
PC32	<i>Jasminum officinale</i>	Floare	0,0616
PC33	<i>Combretum micranthum</i>	Frunză	0,0769
PC34	<i>Satureja montana</i>	Frunză	0,0715
PC35	<i>Cassia angustifolia</i>	Frunză	0,0881
PC36	<i>Verbena officinalis</i>	Partea aeriană	0,0603
PC37	<i>Lippia citrodora</i>	Frunză	0,0813
PC38	<i>Veronica officinalis</i>	complete	0,0781
PC41	<i>Calendula officinalis</i>	Petală	0,0523
PC42	<i>Sambucus nigra</i>	Scoarță	0,0593
PC45	<i>Solidago gigantea</i>	Partea aeriană	0,0612
PC49	<i>Tanacetum vulgare</i>	Partea aeriană	0,0577
PC50	<i>Galium odoratum</i>	Partea aeriană	0,041
PC51	<i>Rhamnusfrangula</i>	Scoarță	0,0726
PC52	<i>Betula alba</i>	Scoarță	0,0806
PC53	<i>Verbascum thapsus</i>	Scoarță	0,0435
PC54	<i>Peumus boldus</i>	Frunză	0,0695
PC55	<i>Centaurea cyanus</i>	Petală	0,0456
PC57	<i>Illicium verum</i>	Fruct	0,1027
PC58	<i>Inula helenium</i>	Rădăcină	0,0904
PC60	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Scoarță	0,1374
PC61	<i>Chamaemelum nobile</i>	Floare	0,0316
PC62	<i>Calamintha officinalis</i>	Partea aeriană	0,0726
PC63	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Frunză	0,088
PC64	<i>Ononis spinosa</i>	Rădăcină	0,0832
PC65	<i>Calluna vulgaris</i>	Floare	0,0446
PC66	<i>Morus nigra</i>	Frunză	0,1032
PB03	<i>Cichorium endivia</i>	Rădăcină	0,1513
PB04	<i>Rosa canina</i>	Fruct	0,1227
PB05	<i>Silybum marianum</i>	Partea aeriană	0,0502
PB06	<i>Asperula odorata</i>	Partea aeriană	0,062
PB07	<i>Desmodium adscendens</i>	Frunză	0,0493
PB08	<i>Combretum micranthum</i>	Frunză	0,0709
PB09	<i>Peumus boldus</i>	Foliolă	0,0574
PB10	<i>Rhamnusfrangula</i>	Scoarță	0,0682
PB11	<i>Arctium lappa</i>	Rădăcină	0,1166
PB12	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Frunză	0,122
PB13	<i>Cichorium intybus</i>	Rădăcină	0,0924
PB14	<i>Fragaria vesca</i>	Rizom	0,0529
PB15	<i>Citrus aurantium var, dulcis,</i>	Coajă	0,0817
PB16	<i>Elettaria cardamomum</i>	Fruct	0,0606
PB17	<i>Althaea officinalis</i>	Frunză	0,0302
PB18	<i>Malva sylvestris</i>	Frunză	0,0809
PB19	<i>Althaea officinalis</i>	Frunză	0,0322
PB20	<i>Tilia cordata</i>	Vârf înflorit	0,0596
PB22	<i>Betula pendula</i>	Frunză	0,0609
PB24	<i>Tilia cordata</i>	Alburn	0,0368
PB25	<i>Fucus vesiculosus</i>	lamina	0,1119
PB26	<i>Borago officinalis</i>	Floare	0,0342
PB27	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Fruct	0,1553
PB28	<i>Verbascum thapsus</i>	Floare	0,045
PB29	<i>Citrus aurantium</i>	Petală	0,0477
PB31	<i>Galega officinalis</i>	Partea aeriană	0,0678
PC67	<i>Hypericum perforatum</i>	Vârf înflorit	0,0829

PC68	<i>Achillea millefolium</i>	Vârf înflorit	0,0332
PC70	<i>Mentha x piperita</i>	Frunză	0,071
PC71	<i>Melissa officinalis</i>	Frunză	0,0847
PC72	<i>Cochlearia officinalis</i>	Floare	0,0497
PC73	<i>Malva sylvestris</i>	Floare	0,0615
PC74	<i>Cynara scolymus</i>	Frunză	0,0458
PC75	<i>Arnica montana</i>	Floare	0,0254
PC76	<i>Artemisia vulgaris</i>	Partea aeriană	0,0289
PC78	<i>Angelica archangelica</i>	Complet	0,0909
PC79	<i>Anethum graveolens</i>	Fruct	0,1335
PC82	<i>Ballota nigra</i>	Partea aeriană	0,0368
PC83	<i>Origanum majorana</i>	Frunză	0,0539
PC84	<i>Zea mays</i>	Stigma	0,0632
PC86	<i>Agrimonia eupatoria</i>	Partea aeriană	0,0721
PC88	<i>Levisticum officinale</i>	Partea aeriană	0,0848
PC94	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fruct	0,0686
PC97	<i>Hieracium pilosella</i>	Partea aeriană	0,0406
PC98	<i>Parietaria officinalis</i>	Partea aeriană	0,0349
PC99	<i>Passiflora incarnata</i>	Partea aeriană	0,0817
PDOO	<i>Rumex patientia</i>	Rădăcină	0,1208
PD02	<i>Petroselinum crispum</i>	Fruct	0,1084
PD05	<i>Urtica dioica</i>	Partea aeriană	0,0584
PD06	<i>Cola acuminata</i>	Nucă	0,1556
PD07	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Partea aeriană	0,0535
PD08	<i>Centaurea erythraea</i>	Partea aeriană	0,058

Metoda de preparare a compozițiilor din plante (metoda A)

Fiecare plantă uscată a fost măcinată cu ajutorul unei râșnițe de boabe de cafea (tip 8100, SEB, Franța). Pulberea obținută (pulbere de plante) a fost cernută cu o sită cu ochiuri de 2 mm și conservată în recipient de 60 ml (Labbox, Franța).

Amestecuri de diferite plante uscate măcinate (sau pulberi de plante) au fost preparate prin colectarea unui volum fix de pulbere de plante cu o lingură calibrată care permite colectarea a 200 µl de pulbere. Greutatea volumului colectat depinde de pulberea de plante specifică (a se vedea Tabelul 0-1).

Astfel de amestecuri de diferite plante uscate măcinate (sau pulberi de plante), precum și de plante uscate individuale vor fi denumite în continuare și „compoziții din plante”.

Metoda de preparare a extractelor din apă (denumite în această secțiune Exemple și „probe prelucrate”, „extracte” sau „amestecuri de extracte”) (Metoda B)

Astfel de compoziții din plante au fost introduse în tuburi Falcon de 50 ml (Falcon, SUA) și s-au adăugat 20 ml sau 40 ml (după cum se indică în exemple) de soluție de apă de izvor de calitate alimentară (Volvic, Franța) care conține 100 g/l de zaharoză de calitate alimentară (Daddy, Franța). Alegerea zaharozei de calitate alimentară și a apei în locul omologilor lor de calitate științifică a fost determinată de obiectivul de a obține o compoziție comestibilă care intră în categoria „aromelor” care pot fi consumate direct, în temeiul Regulamentului (CE) nr. 1334/2008 din 16 decembrie 2008 privind aromele și anumite ingrediente alimentare cu proprietăți aromatizante destinate utilizării în și pe produsele alimentare.

Fiecare tub Falcon conținând astfel de preparate lichide a fost agitat cu ajutorul unui mixer vortex (ThermoFisher, SUA) timp de 10 secunde, incubat la temperatura camerei timp de 10 minute și introdus într-o autoclavă (MED 12, JP Selecta, Spania) și supus unui ciclu de sterilizare de 20 de minute la 119 ° sau 121 °C, după cum se indică. După răcire, preparatul sterilizat a fost păstrat la -20 °C până la utilizare.

În ziua manipulării, preparatul a fost decongelat la 37 °C. Preparatul a fost centrifugat la 4000 rpm timp de 10 min (Multifuge 35-R, Heraeus, Germania) sau incubat la temperatura camerei pentru decantare (după cum se indică în exemple). 2 ml din supernatant au fost colectați cu o seringă de 10 ml și filtrați folosind filtre de 0,2 µm (Minisart Syringe Filters, Sartorius, Germania) și colectați într-o eprubetă Eppendorf de 2 ml. Preparatul sterilizat rămas este păstrat la -20 °C pentru utilizare ulterioară.

Probele astfel obținute vor fi denumite în continuare și „probe prelucrate” și vor fi identificate prin același nume sau cod dat compoziției de plante corespunzătoare [de exemplu, numele „Mix[2P]-1” va fi utilizat pentru a identifica o compoziție de plante și extractul corespunzător (sau proba prelucrată), pentru care se determină o activitate biologică].

Metoda de determinare a activității antimicrobiene și antibiofilm (metoda C)

Activitatea biologică a fiecărei probe prelucrate a fost determinată prin utilizarea tulpinilor indicate în fiecare experiment (sau exemplu). Pentru fiecare măsurătoare, fiecare bacterie stocată la -80°C pe crioperle (Technical Service, UK) este plasată pe o placă de agar TS (Bulion Triptic Soia, Sigma, SUA; Agar, Fisherbrand, SUA) și incubată la 37 °C peste noapte. Câteva colonii sunt colectate cu ajutorul unei anse de inoculare și suspendate în soluție salină. Se măsoară densitatea optică și se efectuează o diluție în bulion TS pentru a obține o concentrație de $2,10^{5.5}$ bacterii/ml pentru tulpinile *Staphylococcus aureus* și *Staphylococcus pseudintermedius*, $2,10^5$ bacterii/ml pentru *Staphylococcus epidermidis*.

Activitatea biologică a fiecărei probe prelucrate a fost măsurată pe plăci cu 96 de godeuri, utilizând tulpinile indicate în fiecare experiment (sau exemplu) și un martor fără bacterii. Fiecare godeu conține 190 ml de bulion TS inoculat cu $10^{5.5}$ bacterii/ml pentru tulpinile *Staphylococcus aureus* și *Staphylococcus pseudintermedius*, 10^5 bacterii/ml pentru *Staphylococcus epidermidis* (sau la concentrația indicată în exemple pentru toate celelalte specii) sau nicio bacterie pentru martor și probă prelucrată diluată sau martor negativ (soluție de zaharoză la 100 g/l fără nicio plantă) la concentrația finală 1:10, 1:20, 1:40 și 1:80 sau la 1:20, 1:63 și 1:200 (după cum se indică în exemple).

Fiecare placă a fost incubată timp de 17 ore la 37 °C într-un incubator (HettCube 400, Hettich, Germania).

Măsurătorile au fost efectuate pe baza analizei cu ajutorul software-ului ImageJ (NIH, SUA) (dar poate fi utilizat orice alt software echivalent) a imaginilor plăcilor obținute cu ajutorul unui scanner comercial de documente (V 220, Epson, Japonia). Imaginile plăcii poziționate pe zona de scanare sunt achiziționate la 600 dpi utilizând software-ul furnizat cu scannerul. Pentru fiecare placă, au fost obținute 3 imagini: prima, înainte de incubare (T0), a doua după 17 ore de incubare (Tf) și a treia după colorarea cu Crystal Violet (CV), astfel cum se descrie în „Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different Salmonella serotypes” (Agarwal, R.K. et al., International Food Research Journal 18(4):1493-1498, 2011).

Pentru fiecare godeu de interes, din prima, a doua și, respectiv, a treia imagine, au fost caracterizate regiuni circulare cu diametrul de 14, 14 și, respectiv, 76 pixeli, centrate în raport cu godeul, utilizând un macro ImageJ pentru a calcula, respectiv, media M1 și M2 a pixelilor cu 1% mai puțin intensi din regiune și media M3 a tuturor pixelilor din regiune. Turbiditatea soluției bacteriene din godeu a fost dedusă din M1 și M2 folosind o curbă de referință obținută într-un experiment independent în care media pixelilor cu 1% mai puțin intensi din regiune a fost măsurată din godeuri conținând soluții bacteriene cu turbiditate cunoscută. Densitatea optică a soluției Crystal Violet din godeu a fost dedusă din M3 folosind o curbă de referință obținută într-un experiment independent în care media pixelilor din regiunea cu diametrul de 76 pixeli a fost măsurată din godeuri conținând soluții Crystal Violet cu densitate optică cunoscută.

Pentru fiecare probă prelucrată și o anumită bacterie, CMI a fost determinată din cea mai mare diluție inhibitoare (HID) dintre cele 4 testate (1:10, 1:20, 1:40, 1:80) de probă prelucrată, care previne apariția creșterii vizibile în decurs de 17h. „0” a fost atribuit atunci când niciuna dintre diluțiile testate nu împiedică creșterea bacteriană.

Pentru fiecare godeu conținând probă prelucrată și o anumită bacterie, procentul de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor a fost stabilit în conformitate cu formula de mai jos:

$$\text{Inhibarea creșterii planctonice (\%)} = (1 - \text{Tf}(\text{probă prelucrată}) - \text{T0}(\text{probă prelucrată}) / \text{Tf}(\text{martor negativ}) - \text{T0}(\text{martor negativ})) * 100$$

unde Tf(probă prelucrată) este turbiditatea din a doua imagine a godeului probă, T0(probă prelucrată) este turbiditatea din prima imagine a aceluiasi godeu, Tf(martor negativ) este turbiditatea din a doua imagine a unui godeu care conține aceleași bacterii fără probă prelucrată, T0(martor negativ) este turbiditatea din prima imagine a aceluiasi godeu.

Pentru fiecare godeu care conține probă prelucrată și o anumită bacterie, procentul de inhibare a formării biofilmului (IBF) a fost stabilit în conformitate cu următoarea formulă:

$$\text{Inhibarea formării biofilmului (5)} = (1 - \text{CV}(\text{probă prelucrată}) - \text{CV}(\text{probă martor}) / \text{CV}(\text{martor negativ}) - \text{CV}(\text{probă martor})) * 100$$

unde CV(probă prelucrată) este OD din a treia imagine a godeului probă, CV(martor negativ) este OD din a treia imagine a unui godeu care conține aceleași bacterii fără probă prelucrată, CV(probă martor) este OD din a treia imagine a unui godeu care conține aceeași probă sau martorul negativ la aceeași diluție fără bacterii. O valoare negativă a IBF înseamnă că amestecul testat favorizează formarea biofilmului.

Exemplul 1

În acest exemplu sunt ilustrate activitățile antimicrobiene și antibiofilm simultane împotriva *Staphylococcus aureus* ale compoziției specificate de 2 plante din 3: *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Arctostaphylos uva-ursi*. Plantele uscate de calitate farmaceutică au fost obținute de la „Herboristerie Cailleau” (Chemille, Franța).

Pornind de la aceste trei pulberi de plante diferite, au fost preparate șase compoziții din plante în conformitate cu metoda A raportată anterior, al căror conținut este prezentat în Tabelul 1-1.

Tabelul 1-1: Compoziții din plante ale probelor prelucrate

Compoziții din plante	PA13 (nb lingură)	PA21 (nb lingură)	PB12 (nb lingură)
PA13	1		
PA21		1	
PB12			1
Mix[2P]-1	1	1	
Mix[2P]-2		1	1
Mix[2P]-3	1		1

5 După cum se arată în Tabelul 1-1, primele trei compoziții de plante conțin doar o singură pulbere de plantă, în timp ce ultimele trei compoziții conțin două din cele trei pulberi de plante diferite.

Pornind de la fiecare compoziție de plante raportată în Tabelul 1-1, probele prelucrate corespunzătoare au fost preparate în conformitate cu metoda B raportată anterior, utilizând 20 ml de apă conținând 100 g/l de zaharoză pentru extracția apei și incluzând etapa de centrifugare înainte de filtrare.

10 Procentul de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor și a formării de antibiofilm al probelor prelucrate din cele 2 amestecuri de plante și din plantele separate asociate din prezentul exemplu 1 la diluție 1:10 au fost determinate utilizând următoarele tulpini de *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923 și ATCC 29213, în conformitate cu metoda C raportată anterior și sunt prezentate în Tabelul 1-2.

Tabelul 1-2: inhibarea creșterii planctonice și a formării biofilmului (IBF) din proba prelucrată cu amestec de 2 plante și proba prelucrată cu o singură plantă la diluție 1:10

		PA13	PA21	Mix[2P]-1
ATCC 25923	Inhibarea creșterii planctonice	20%	26%	82%
	Inhibarea formării biofilmului	32%	44%	78%
		PA13	PA21	Mix[2P]-1
ATCC 29213	Inhibarea creșterii planctonice	16%	27%	100%
	Inhibarea formării biofilmului	33%	17%	85%
		PA21	PB12	Mix[2P]-2
ATCC 25923	Inhibarea creșterii planctonice	26%	17%	104%
	Inhibarea formării biofilmului	44%	51%	88%
ATCC 29213	Inhibarea creșterii planctonice	27%	8%	100%
	Inhibarea formării biofilmului	17%	28%	83%
		PA13	PB12	Mix[2P]-3

ATCC 25923	Inhibarea creșterii planctonice	20%	17%	82%
	Inhibarea formării biofilmului	32%	51%	93%
ATCC 29213	Inhibarea creșterii planctonice	16%	8%	66%
	Inhibarea formării biofilmului	33%	28%	78%

PA13, PA21 și PB12 au un efect antibiotic cunoscut. Inhibarea limitată a creșterii planctonice (< 27%) și a formării biofilmului (< 51%) au fost măsurate la diluția 1:10, în timp ce, cele 3 preparate aromatice din extractul de amestec din 2 plante prezintă efecte antimicrobiene (> 66%) și efecte antibiofilm (>78%) asupra ambelor tulpini testate, ATCC 25923 și ATCC 29213.

Pentru toate amestecurile (Mix[2P]-1, Mix[2P]-2, Mix[2P]-3), se observă un efect sinergic al celor 2 plante pentru efectele antimicrobiene asupra celor 2 tulpini testate.

Exemplul comparativ 1

Ca exemplu comparativ, ilustrăm activitatea unor probe prelucrate, care s-au dovedit a avea activități antimicrobiene și antibiofilm inexistente sau slabe împotriva *Staphylococcus aureus* și care au fost obținute din compoziții corespunzătoare pe bază de plante care conțin 2 pulberi de plante diferite.

Cinci probe prelucrate au fost preparate folosind 2 pulberi de plante suplimentare: PA74 (pulbere de fructe *Ribes nigrum*) și PC72 (pulbere de flori *Cochlearia officinalis*).

Pulberile unice de plante uscate au fost tratate după cum se descrie în exemplul 1 și s-au preparat cinci compoziții din plante după protocolul raportat în metoda A descrisă anterior. Aceste cinci compoziții din plante aveau conținutul raportat în Tabelul 1-3.

Tabelul 1-3: Compoziții pe bază de plante ale probelor prelucrate

Compoziții de plante	PA74 (nb lingură)	PC72 (nb lingură)	PA13 (nb lingură)	PA21 (nb lingură)
PA74	1			
PC72		1		
Mix 1	1	1		
Mix 2	1		1	
Mix 3		1		1

Fiecare compoziție de plante a fost tratată în conformitate cu protocolul prezentat în metoda B, pentru a obține proba prelucrată corespunzătoare, utilizând 20 ml de apă conținând 100 g/l de zaharoză pentru extracția apei și incluzând etapa de centrifugare înainte de filtrare.

Activitatea biologică a fiecărei probe prelucrate a fost determinată prin utilizarea următoarelor tulpini de *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923 și ATCC 29213, în conformitate cu metoda C descrisă anterior.

Procentul de creștere planctonică a bacteriilor și de inhibare a formării de antibiofilm al probelor prelucrate din cele 2 amestecuri de plante și din plantele separate asociate la diluție 1:10 sunt prezentate în Tabelul 1-4.

Tabelul 1-4: inhibarea creșterii planctonice și a formării biofilmului (IBF) ale probei prelucrate din amestecul de 2 plante și ale probei prelucrate din plantele separate la diluția 1:10

	PC72	PA74	Mix 1
ATCC 25923	-9%	0%	-3%
Inhibarea creșterii planctonice			

	Inhibarea formării biofilmului	12%	36%	24%
ATCC 29213	Inhibarea creșterii planctonice	-10%	-7%	-6%
	Inhibarea formării biofilmului	13%	5%	-2%
		PA13	PA74	Mix 2
ATCC 25923	Inhibarea creșterii planctonice	20%	0%	19%
	Inhibarea formării biofilmului	32%	36%	48%
ATCC 29213	Inhibarea creșterii planctonice	16%	-7%	13%
	Inhibarea formării biofilmului	33%	5%	37%
		PA21	PC72	Mix 3
ATCC 25923	Inhibarea creșterii planctonice	26%	-9%	25%
	Inhibarea formării biofilmului	44%	12%	51%
ATCC 29213	Inhibarea creșterii planctonice	27%	-10%	18%
	Inhibarea formării biofilmului	17%	13%	29%

PC72 și PA74 și amestecul 1 asociat nu au prezentat activitate antimicrobiană și activitate limitată de antibiofilm pe ambele tulpini testate la diluție 1:10. În niciun caz nu a fost observat niciun efect sinergic.

5 Pentru toate amestecurile care conțin PA13 și PA21 (amestecurile 2 și 3), nu s-a observat niciun efect sinergic pentru efectele antimicrobiene asupra celor 2 tulpini testate la diluție 1:10, atunci când astfel de amestecuri conțineau și PC72 sau PA74.

Este interesant de observat că atât *Ribes nigrum*, cât și *Cochlearia officinalis* erau cunoscute ca având efect antimicrobian.

10 Acest exemplu comparativ ilustrează faptul că nu orice combinație aleatorie între plante uscate unice cu activitate antimicrobiană și/sau antibiofilm cunoscută permite obținerea unui extract din apă în care se observă o activitate sinergică.

Exemplul 2

15 În acest exemplu ilustrăm activitățile antimicrobiene și antibiofilm simultane împotriva *Staphylococcus aureus* ale diferitelor extracte de apă obținute din compozițiile din plante care conțin 2 plante dintre cele 3 raportate în exemplul 1, atunci când aceste extracte de apă sunt preparate în conformitate cu metode diferite.

Plantele uscate de calitate farmaceutică au fost obținute de la „Herboristerie Cailleau” (Chemille, Franța).

20 Douăzeci de compoziții din plante, al căror conținut este raportat în Tabelul 2-1, au fost preparate în conformitate cu metoda A raportată anterior.

Tabelul 2-1: Compoziția pe bază de plante a probelor prelucrate

Compoziții din plante	PA13 (nb lingură)	PA21 (nb lingură)	PB12 (nb lingură)
-----------------------	-------------------	-------------------	-------------------

Amestecul 1		1	1
Compoziții din plante	PA13 (nb lingură)	PA21 (nb lingură)	PB12 (nb lingură)
Amestecul 2	1		1

Pentru fiecare compoziție din plante, s-au pregătit 20 de preparate lichide (apă) după cum urmează: Pulberile colectate au fost introduse în douăzeci de tuburi Falcon de 50 ml (Falcon, SUA). S-au adăugat 20 ml de soluție de apă de izvor de calitate alimentară (Volvic, Franța) conținând 0, 25, 50, 75 sau 100 g/l de zaharoză de calitate alimentară (Daddy, Franța) în 4 tuburi Falcon per condiție. Fiecare tub Falcon conținând astfel de preparate lichide a fost agitat cu ajutorul unui mixer vortex (ThermoFisher, SUA) timp de 10 secunde, incubat la temperatura camerei timp de 10 minute, apoi s-au aplicat 4 tratamente de încălzire diferite pentru fiecare condiție:

- Infuzie rece (fără încălzire înainte de centrifugare și filtrare):

după incubarea la temperatura camerei, preparatele au fost centrifugate la 4000 rpm timp de 10 minute (Multifuge 35-R, Heraeus, Germania), 2 ml din supernatant au fost colectați cu o seringă de 10 mL și filtrați folosind filtre de 0,2 mM (Minisart Syringe Filters, Sartorius, Germania) și colectați într-o eprubetă Eppendorf de 2 ml și păstrați la -20 ° C până la utilizare. În ziua manipulării, preparatul a fost decongelat la 37 °C.

- Încălzire la 60 °C timp de 30 de minute:

după incubarea la temperatura camerei, preparatele au fost introduse într-o autoclavă (VWR, SUA) și au fost supuse unui ciclu de 20 de minute la 60 °C. După răcire, preparatele tratate au fost centrifugate la 4000 rpm timp de 10 minute (Multifuge 35-R, Heraeus, Germania), 2 ml din supernatant au fost colectați cu o seringă de 10 ml și filtrați cu ajutorul filtrelor de 0,2 μM (Minisart Syringe Filters, Sartorius, Germania) și colectați într-o eprubetă Eppendorf de 2ml și păstrați la - 20 °C până la utilizare. În ziua manipulării, preparatul a fost decongelat la 37 °C.

- Încălzire la 119 °C timp de 20 de minute:

după incubarea la temperatura camerei, preparatele au fost introduse într-o autoclavă (VWR, SUA) și au fost supuse unui ciclu de sterilizare de 20 de minute la 119 °C. După răcire, preparatele tratate au fost păstrate la -20 °C până la utilizare. În ziua manipulării, preparatul a fost decongelat la 37 °C, centrifugat la 4000 rpm timp de 10 minute (Multifuge 35-R, Heraeus, Germania), 1 ml din supernatant a fost colectat cu o seringă de 10 ml și filtrat cu ajutorul unor filtre de 0,2 μM (Minisart Syringe Filters, Sartorius, Germania) și colectat într-o eprubetă Eppendorf de 2ml.

Aceste probe vor fi denumite în continuare „probe prelucrate”.

Activitatea biologică a fiecărei probe prelucrate a fost determinată utilizând tulpina *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, în conformitate cu metoda C descrisă anterior.

Procentul de creștere planctonică a bacteriilor din 20 de probe prelucrate, preparate pornind de la compozițiile din plante după fiecare dintre diferitele tratamente de încălzire prezentate anterior, la diluție 1:10, sunt prezentate în Tabelul 2-2.

Tabelul 2-2: Creșterea planctonică a bacteriei ATCC 25923 cu 20 de probe prelucrate la diluție 1:10, preparate pornind de la compozițiile din plante (Amestecul 1 și Amestecul 2 din tabelul 2-1)

Tratament la temperatură	Concentrație zaharoză (g/l)	Amestecul 1 probe prelucrate	Amestecul 2 probe prelucrate
Infuzie la rece	100	-4%	48%
	75	-3%	52%
	50	-4%	31%
	25	-4%	31%
	0	1%	0%
60 °C 30 min	100	0%	82%
	75	4%	83%
	50	1%	83%
	25	1%	86%

	0	-4%	16%
119 °C 20 min	100	103%	92%
	75	103%	91%
	50	70%	94%
	25	103%	99%
	0	96%	99%

Toate probele prelucrate preparate din Amestecul 1 au prezentat efecte antimicrobiene asupra ATCC 25923, numai după tratamentul termic la 119°, în timp ce Amestecul 2 a prezentat efecte antimicrobiene limitate (31-52% inhibare) după infuzia la rece pentru toate concentrațiile de zaharoză, cu excepția condiției fără zaharoză și după toate tratamentele termice testate (> 82% inhibare), cu excepția condiției fără adaos de zaharoză tratată la 60°C, pentru care proba prelucrată a prezentat doar 16% inhibare a creșterii planctonice. Tratamentele la temperatură au intensificat efectele antimicrobiene ale amestecului 2. Tratamentul optim la temperatură dintre tratamentele testate pentru Amestecul 1 și Amestecul 2 a fost de 119°C timp de 20 de minute.

Influența concentrației de zaharoză asupra efectului antimicrobian depinde de tratamentul la temperatură aplicat. Pentru amestecul 1 tratat la 119°C timp de 20 de minute, același efect antimicrobian a fost obținut cu 100, 75, 25 și 0 g/l de zaharoză, o activitate mai scăzută fiind observată cu 50 g/l. Pentru Amestecul 2, același efect antimicrobian a fost obținut indiferent de concentrația de zaharoză pentru tratamentul la temperatura de 119°C.

Procentul de inhibare a formării biofilmului (IBF) din 20 de probe prelucrate, preparate pornind de la compozițiile din plante după fiecare dintre diferitele tratamente de încălzire prezentate anterior, la diluție 1:10, sunt prezentate în Tabelul 2-3.

Tabelul 2-3: inhibarea formării biofilmului (IBF) al ATCC 25923 cu 20 de probe prelucrate la diluție 1:10 preparate pornind de la compozițiile din plante (Amestecul 1 și Amestecul 2 din Tabelul 2-1)

Tratament la temperatură	Concentrație zaharoză (g/l)	Amestecul 1 probe prelucrate	Amestecul 2 probe prelucrate	Tratament la temperatură	Concentrație zaharoză (g/l)	Amestecul 1 probe prelucrate	Amestecul 2 probe prelucrate
Infuzie la rece	100	34%	74%	119 °C 20 min	100	91%	89%
	75	29%	72%		75	91%	88%
	50	22%	60%		50	75%	89%
	25	30%	55%		25	92%	87%
	0	54%	50%		0	90%	89%
60 °C 30 min	100	48%	91%				
	75	34%	94%				
	50	26%	91%				
	25	26%	88%				
	0	48%	78%				

În toate condițiile testate, probele prelucrate au prezentat un anumit efect antibiofilm.

Pentru Amestecul 1, s-a observat o activitate limitată de antibiofilm pentru toate concentrațiile de zaharoză cu infuzie la rece și cu tratament la temperatura de 60 °C (între 22 și 55% din inhibare). S-a observat o activitate antibiofilm ridicată (> 90% inhibare) cu un tratament la temperatura de 119 °C pentru toate concentrațiile de zaharoză, cu excepția celei de 50 g/l, care a prezentat o inhibiție de 75%.

Pentru Amestecul 2, s-au obținut activități echivalente de antibiofilm indiferent de concentrațiile de zaharoză pentru tratamentele la temperaturi de 60 °C și 119 °C (> 77% inhibare). După infuzie la rece, Amestecul 2 a prezentat un efect antibiofilm mediu spre bun (de la 50% la 74% inhibare) în funcție de concentrațiile de zaharoză: cu cât concentrația de zaharoză a fost mai mare, cu atât preparatul a fost mai activ.

Exemplul 3

În acest exemplu ilustrăm activitățile antimicrobiene și antibiofilm simultane împotriva *Staphylococcus aureus* și *Staphylococcus epidermidis* a 12 amestecuri care conțin între 2 și 7 plante.

Plantele uscate de calitate farmaceutică au fost obținute de la „Herboristerie Cailleau” (Chemille, Franța).

Compozițiile din plante care conțin de la 2 la 7 pulberi de plante au fost preparate prin colectarea unui volum fix de pulbere de plante cu o lingură calibrată care permite colectarea a 200 μl de pulbere. Douăsprezece compoziții din plante au fost preparate după cum urmează (Tabelul 3-1) în conformitate cu metoda A descrisă anterior.

Tabelul 3-1: Compoziții din plante ale probelor prelucrate

Compoziții din plante	PA13 (nb lingură)	PA21 (nb lingură)	PB12 (nb lingură)	PA11 (nb lingură)	PA12 (nb lingură)	PA22 (nb lingură)	PA79 (nb lingură)
Mix[2P]-1	1	1					
Mix[2P]-2		1	1				
Mix[2P]-3	1		1				
Mix[3P]-1	1	1	1				
Mix[4P]-1	1	1	1	1			
Mix[4P]-2	1	1	1		1		
Mix[4P]-3	1	1	1			1	
Mix[5P]-1	1	1	1		1	1	
Mix[5P]-2	1	1	1	1		1	
Mix[5P]-3	1	1	1	1	1		
Mix[6P]-1	1	1	1	1	1	1	
Mix[7P]-1	1	1	1	1	1	1	1

Douăsprezece probe prelucrate corespunzătoare au fost preparate pornind de la fiecare compoziție din plante în conformitate cu metoda B descrisă anterior, utilizând 20 ml de apă conținând 100 g/l de zaharoză pentru extracția apei și incluzând etapa de centrifugare înainte de filtrare.

Activitatea biologică a probei prelucrate a fost determinată prin utilizarea următoarelor tulpini de *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923, ATCC 29213, NCTC 12493, ATCC 33591, ATCC 33592, ATCC 43300, ATCC 700698, ATCC 700699, ATCC 9144 și ATCC BAA-44 și următoarele tulpini de *Staphylococcus epidermidis*: ATCC 12228, ATCC 700296, ATCC 49461 și ATCC 14990, în conformitate cu metoda C descrisă anterior.

Concentrația inhibitorie minimă (CIM) observată la cele 12 probe prelucrate este prezentată în Tabelul 3-2 sub formă de HID, precum și eficacitatea medie asupra tuturor tulpinilor de *Staphylococcus aureus* și *Staphylococcus epidermidis*.

Tabelul 3-2: HID al celor 12 probe prelucrate pe 10 tulpini de *Staphylococcus aureus* și 4 tulpini de *Staphylococcus epidermidis*

		Mix[2P]-1	Mix[2P]-2	Mix[2P]-3	Mix[3P]-1	Mix[4P]-1	Mix[4P]-2	Mix[4P]-3	Mix[5P]-1	Mix[5P]-2	Mix[5P]-3	Mix[6P]-1	Mix[7P]-1
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	10	10	10	10	10	10	10	10	10	20	10	20
	ATCC 29213	10	10	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	NCTC 12493	10	10	10	10	10	20	20	20	20	20	20	10
	ATCC 33591	10	10	10	10	10	10	10	20	20	20	20	10
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 33592	10	10	10	10	10	10	10	20	20	20	10	20
	ATCC 43300	10	10	0	10	10	10	10	10	10	10	10	20
	ATCC 700698	10	10	10	10	10	10	10	20	20	20	10	20
	ATCC 700699	10	10	10	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	ATCC 9144	10	10	10	10	10	10	10	20	20	20	10	20
	ATCC BAA-44	10	10	10	10	10	20	20	20	20	20	20	20
	Medie	10,0	10,0	8,0	11,0	11,0	13,0	13,0	17,0	17,0	18,0	14,0	19,0
	ATCC 12228	10	10	10	20	20	20	20	20	20	20	20	40
	ATCC 700296	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	40
	ATCC 49461	10	10	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	ATCC 14990	10	20	10	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	Medie	12,5	15	15	20	20	20	20	20	20	20	20	30
Medie totală		10,7	11,4	10,0	13,6	13,6	15,0	15,0	17,9	17,9	18,6	15,7	22,1

- 5 Deoarece în acest Exemplu HID observate sunt în majoritatea cazurilor între 1:10 și 1:20, diluția 1:20 a fost aleasă ca diluție de referință pentru calcularea procentului de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor și a procentului de inhibare a formării biofilmului. Procentul de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor din cele 12 probe prelucrate la diluția 1:20 este prezentat în Tabelul 3-3, precum și eficacitatea medie asupra tuturor tulpinilor de *Staphylococcus aureus* și *Staphylococcus epidermidis*.

10

Tabelul 3-3: inhibarea creșterii planctonice a celor 12 probe prelucrate pe 10 tulpini de *Staphylococcus aureus* și 4 tulpini de *Staphylococcus epidermidis* la diluție 1:20

		Mix[2P]-1	Mix[2P]-2	Mix[2P]-3	Mix[3P]-1	Mix[4P]-1	Mix[4P]-2	Mix[4P]-3	Mix[5P]-1	Mix[5P]-2	Mix[5P]-3	Mix[6P]-1	Mix[7P]-1
	ATCC 25923	12%	12%	9%	11%	20%	11%	20%	34%	41%	35%	21%	96%

<i>S. aureus</i>	ATCC 29213	11%	11%	7%	11%	19%	11%	11%	33%	33%	33%	29%	45%
	NCTC 12493	19%	8%	5%	25%	21%	101%	97%	98%	108%	108%	96%	100%
	ATCC 33591	12%	8%	8%	12%	19%	16%	34%	104%	107%	111%	83%	98%
	ATCC 33592	19%	15%	12%	18%	26%	23%	26%	86%	105%	98%	38%	100%
	ATCC 43300	18%	11%	11%	15%	18%	18%	18%	33%	34%	37%	16%	97%
	ATCC 700698	11%	8%	8%	11%	11%	11%	16%	107%	97%	73%	40%	98%
	ATCC 700699	43%	36%	38%	87%	98%	99%	99%	100%	108%	112%	116%	98%
	ATCC 9144	12%	7%	8%	12%	24%	17%	24%	80%	97%	73%	43%	94%
	ATCC BAA-44	30%	11%	12%	32%	28%	83%	102%	100%	107%	110%	114%	103%
	Medie	19%	13%	12%	23%	28%	39%	45%	78%	84%	79%	60%	93%
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	49%	49%	66%	94%	99%	99%	98%	99%	99%	104%	114%	97%
	ATCC 700296	87%	83%	78%	94%	99%	99%	95%	101%	98%	102%	105%	92%
	ATCC 49461	68%	68%	70%	93%	101%	101%	97%	102%	102%	106%	112%	93%
	ATCC 14990	38%	71%	61%	92%	103%	100%	95%	102%	102%	106%	107%	93%
	Medie	61%	68%	69%	94%	100%	100%	96%	101%	100%	104%	109%	94%
Medie totală		31%	28%	28%	43%	49%	56%	59%	84%	88%	86%	74%	93%

Procentul de inhibare a formării biofilmului (IBF) al celor 12 probe prelucrate la diluția 1:20 este prezentat în Tabelul 3-4, precum și eficacitatea medie asupra tuturor tulpinilor de *Staphylococcus aureus* și *Staphylococcus epidermidis*. Eficacitatea medie a procentului de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor și de inhibare a formării biofilmului asupra tuturor tulpinilor testate este un bun indicator al eficacității antimicrobiene și antibiofilm asupra diferitelor tulpini bacteriene.

Tabelul 3-4: inhibarea formării biofilmului (IBF) a celor 12 probe prelucrate pe 10 tulpini de *Staphylococcus aureus* și 4 tulpini de *Staphylococcus epidermidis* la diluție 1:20

		Mix[2P]-1	Mix[2P]-2	Mix[2P]-3	Mix[3P]-1	Mix[4P]-1	Mix[4P]-2	Mix[4P]-3	Mix[5P]-1	Mix[5P]-2	Mix[5P]-3	Mix[6P]-1	Mix[7P]-1
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	37%	14%	22%	18%	29%	36%	35%	51%	41%	40%	38%	90%
	ATCC 29213	49%	12%	38%	27%	33%	38%	25%	35%	38%	34%	38%	41%
	NCTC 12493	49%	-6%	47%	36%	35%	88%	87%	92%	92%	89%	47%	93%
	ATCC 33591	38%	-21%	30%	16%	20%	25%	19%	92%	91%	89%	57%	93%
	ATCC 33592	51%	-10%	26%	25%	43%	47%	31%	60%	78%	70%	43%	91%
	ATCC 43300	33%	-19%	24%	2%	18%	26%	2%	-15%	-22%	-18%	-19%	68%
	ATCC 700698	27%	-8%	20%	10%	25%	23%	13%	62%	61%	39%	24%	88%
	ATCC 700699	61%	34%	63%	64%	79%	78%	86%	89%	87%	86%	87%	90%
	ATCC 9144	33%	-10%	22%	16%	21%	10%	16%	37%	59%	28%	0%	81%
	ATCC BAA-44	50%	22%	47%	40%	39%	48%	89%	92%	90%	87%	91%	93%
	Medie	43%	1%	34%	25%	34%	42%	40%	59%	62%	54%	41%	83%

S. epidermidis	ATCC 12228	62%	-32%	78%	84%	95%	92%	92%	92%	91%	93%	96%	96%
	ATCC 700296	61%	39%	78%	73%	85%	86%	84%	80%	75%	76%	79%	87%
	ATCC 49461	18%	15%	72%	84%	90%	90%	90%	88%	88%	86%	90%	94%
	ATCC 14990	68%	39%	68%	88%	94%	91%	92%	90%	90%	89%	91%	90%
	Medie	52%	15%	74%	82%	91%	90%	89%	87%	86%	86%	89%	92%
	Medie totală	45%	5%	45%	42%	50%	56%	54%	67%	69%	63%	54%	85%

5 Extractele amestecurilor de 2 plante au prezentat activitate antimicrobiană completă la diluția 1:10 pe cele 10 tulpini de *Staphylococcus aureus* testate, cu excepția Mix[2P]-3, care nu a prezentat activitate antimicrobiană la diluția testată pe 2 din cele 10 tulpini de *Staphylococcus aureus* testate (ATCC 29213 și ATCC 43300) (a se vedea tabelul 3-2).

10 Cele trei extracte din amestecuri de 2 plante au prezentat o activitate antimicrobiană diferită asupra celor 4 tulpini de *Staphylococcus epidermidis* testate. Mix[2P]-1 a avut o HID de 1:10 pe 3 tulpini (ATCC 12228, ATCC 49461 și ATCC 14990) și o HID de 1:20 pe tulpina ATCC 700296. Mix[2P]-2 a avut o HID de 1:10 pe 2 tulpini (ATCC 12228 și ATCC 49461) și o HID de 1:20 pe celelalte 2 tulpini (ATCC 700296 și ATCC 14990). În timp ce Mix[2P]-3 a avut o HID de 1:10 pe 2 tulpini (ATCC 12228 și ATCC 14990) și o HID de 1:20 pe celelalte 2 tulpini (ATCC 700296 și ATCC 49461) (a se vedea Tabelul 3-2).

15 Mix[3P]-1 obținut din cele 3 plante care sunt incluse în Mix[2P]-1, Mix[2P]-2 și Mix[2P]-3, a prezentat o activitate antimicrobiană mai largă decât cele 3 amestecuri de două plante (HID de 1:10 pe 9 tulpini de *Staphylococcus aureus* și HID de 1:20 pe ATCC 700699, HID de 1:20 pe cele 4 *Staphylococcus epidermidis* testate) (a se vedea Tabelul 3-2). Randamentul activității antimicrobiene este confirmat prin calcularea procentului de inhibare a creșterii planctonice a fiecărui amestec de plante (a se vedea Tabelul 3-3).

20 Trei plante diferite, PA11, PA12 și PA22, au fost adăugate la amestecul de 3 plante Mix[3P]-1 pentru a obține trei extracte din amestecuri de 4 plante, respectiv Mix[4P]-1, Mix[4P]-2 și Mix[4P]-3. Aceste extracte din amestecuri de 4 plante au prezentat aceeași HID sau o HID mai bună decât extractul din amestec de 3 plante Mix[3P]-1 (a se vedea Tabelul 3-2) și un procent mai mare de inhibare a creșterii planctonice: o medie de 28% până la 45% este obținută cu extracte din amestecuri de 4 plante pe cele 10 tulpini de *Staphylococcus aureus*, comparativ cu 23% cu extractul din amestec de 3 plante (a se vedea Tabelul 3-3). Acestea au prezentat, de asemenea, un procent mai mare de inhibare a formării biofilmului: o medie de 34% până la 42% este obținută cu extractele amestecurilor de 4 plante pe cele 10 tulpini de *Staphylococcus aureus*, comparativ cu 25% cu extractul amestecului de 3 plante (a se vedea Tabelul 3-4).

25 Au fost preparate amestecuri de 5 plante prin adăugarea a 2 plante printre cele 3 plante suplimentare selectate. Toate cele trei extracte din amestecuri de 5 plante au prezentat o activitate antimicrobiană și antibiofilm mai mare decât extractele din amestecuri de 4 plante (a se vedea Tabelele 3-2, 3-3 și 3-4).

30 Mix[6P]-1 constă în cele 6 plante care au fost utilizate pentru prepararea probelor prelucrate testate anterior. În mod interesant, extractul amestecului de 6 plante a prezentat o activitate antimicrobiană și antibiofilm mai redusă decât extractele amestecurilor de 5 plante, dar un efect antimicrobian mai mare și efecte antibiofilm mai mari sau echivalente decât extractele amestecurilor de 4 plante. Activitatea antimicrobiană și antibiofilm a fost recuperată și îmbunătățită prin adăugarea unei noi plante (PA79) (a se vedea Tabelele 3-2, 3-3 și 3-4).

35 Creșterea numărului de plante din amestecuri a permis prepararea extractelor de apă corespunzătoare cu activitate antimicrobiană și antibiofilm sporită și a crescut numărul de tulpini în care pot fi identificate una sau ambele activități.

Exemplul 4

40 În acest exemplu sunt ilustrate activitățile antimicrobiene și antibiofilm simultane împotriva *Staphylococcus aureus* ale 196 de extracte de apă obținute din compoziții din plante care includ cel puțin 2 plante dintre cele 3 plante descrise în Exemplul 1 și plante suplimentare pentru a forma amestecuri de 3 până la 10 plante.

Plantele uscate de calitate farmaceutică au fost obținute de la „Pharmacie Fontgieve” (Clermont-Ferrand, Franța, plantele PA00 la PB12) și „Pharmacie St Herem” (Clermont-Ferrand, Franța, plantele PB13 la PD08).

- 5 Cele 4 compoziții pe bază de plante de referință Mix[2P]-1, Mix[2P]-2, Mix[2P]-3, Mix[3P]-1 și cele 196 de compoziții noi pe bază de plante au fost preparate în conformitate cu metoda A descrisă anterior și aveau conținutul prezentat în Lista 4-1.

Lista 4-1: compoziții din plante ale probelor prelucrate

- Mix[2P]-1: PA13; PA21;
 Mix[2P]-2: PA21; PB12;
 10 Mix[2P]-3: PA13; PB12;
 Mix[3P]-1: PA13; PA21; PB12;
 Mix[3P]-2: PA11; PA13; PA21;
 Mix[3P]-3: PA21; PB12; PC63;
 Mix[3P]-4: PA13; PB12; PC63;
 15 Mix[3P]-5: PA13; PA21; PC63;
 Mix[3P]-6: PA13; PA21; PB12;
 Mix[3P]-7: PA21; PB12; PC29;
 Mix[3P]-8: PA13; PB12; PC29;
 Mix[3P]-9: PA13; PA21; PB12;
 20 Mix[4P]-1: PA11; PA13; PA21; PB12;
 Mix[4P]-2: PA12; PA13; PA21; PB12;
 Mix[4P]-3: PA13; PA21; PA22; PB12;
 Mix[4P]-4: PA11; PA13; PA21; PA22;
 Mix[4P]-5: PA13; PA21; PB12; PC63;
 25 Mix[4P]-6: PA11; PA12; PA21; PB12;
 Mix[4P]-7: PA11; PA12; PA13; PB12;
 Mix[4P]-8: PA11; PA13; PA21; PB12;
 Mix[4P]-9: PA12; PA13; PA21; PB12;
 Mix[4P]-10: PA13; PA21; PB12; PC29;
 30 Mix[5P]-1: PA12; PA13; PA21; PA22; PB12;
 Mix[5P]-2: PA11; PA13; PA21; PA22; PB12;
 Mix[5P]-3: PA11; PA12; PA13; PA21; PB12;
 Mix[5P]-4: PA11; PA12; PA21; PA22; PB12;
 Mix[5P]-5: PA11; PA12; PA13; PA22; PB12;
 35 Mix[5P]-6: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22;
 Mix[5P]-7: PA13; PA21; PA22; PB12; PC63;
 Mix[5P]-8: PA13; PA21; PB12; PC29; PC63;
 Mix[6P]-1: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12;
 Mix[6P]-2: PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PC63;
 40 Mix[6P]-3: PA11; PA13; PA21; PA22; PB12; PC63;
 Mix[6P]-4: PA11; PA12; PA13; PA21; PB12; PC63;
 Mix[6P]-5: PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PC63;
 Mix[6P]-6: PA11; PA13; PA21; PA22; PB12; PC63;
 Mix[6P]-7: PA11; PA12; PA21; PA22; PB12; PC63;
 45 Mix[6P]-8: PA11; PA12; PA13; PA22; PB12; PC63;
 Mix[6P]-9: PA11; PA12; PA13; PA21; PB12; PC63;
 Mix[6P]-10: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PC63;
 Mix[6P]-11: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12;
 Mix[7P]-1: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PA79;
 50 M[7P]-2: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PB49;
 M[7P]-3: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PC29;
 M[7P]-4: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PC63;
 M[9P]-11: PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC29; PC63;

M[9P]-12: PA11; PA13; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC29; PC63;
 M[9P]-13: PA11; PA12; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC29; PC63;
 M[9P]-14: PA11; PA12; PA13; PA22; PA79; PB12; PB49; PC29; PC63;
 M[9P]-15: PA11; PA12; PA13; PA21; PA79; PB12; PB49; PC29; PC63;
 5 M[9P]-16: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PB49; PC29; PC63;
 M[9P]-17: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB49; PC29; PC63;
 M[9P]-18: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB12; PC29; PC63;
 M[9P]-19: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC63;
 M[9P]-20: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC29;
 10 M[10P]-40: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA23; PA67; PB12; PC27; PC60;
 M[10P]-44: PA13; PA40; PA41; PA62; PA75; PB18; PC22; PC63; PC64; PD05;
 M[10P]-71: PA21; PA85; PB14; PB18; PB85; PC19; PC61; PC63; PD05; PD08;
 M[10P]-75: PA02; PA10; PA12; PA13; PA18; PA21; PA27; PA79; PB86; PC26;
 M[10P]-84: PA10; PA21; PA27; PB12; PB15; PC26; PC68; PD05; PD06; PD08;
 15 M[10P]-98: PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA21; PA27; PB16; PB18; PD06;
 M[10P]-102: PA12; PA13; PA19; PA21; PA41; PA79; PB10; PC26; PC61; PC64;
 M[10P]-103: PA13; PA17; PA21; PA24; PB08; PB49; PB85; PC15; PC29; PD05;
 M[10P]-105: PA10; PA11; PA12; PA18; PA19; PA21; PA22; PB12; PC63; PD08;
 M[10P]-109: PA10; PA12; PA13; PA21; PA27; PA75; PB14; PB16; PC45; PC63;
 20 M[10P]-112: PA08; PA13; PA15; PA17; PA18; PA21; PA27; PB18; PB41; PB81;
 M[10P]-115: PA13; PA20; PA21; PA22; PA62; PA79; PB08; PB19; PC15; PC61;
 M[10P]-119: PA11; PA13; PA14; PA24; PB12; PB41; PB49; PC51; PD06; PD08;
 M[10P]-123: PA10; PA13; PA15; PA20; PA21; PA75; PB12; PB18; PB49; PC63;
 M[10P]-124: PA08; PA13; PA21; PA24; PA27; PB08; PB41; PB49; PC64; PD05;
 25 M[10P]-125: PA13; PA14; PA19; PA21; PA75; PB12; PC15; PC26; PC61; PC63;
 M[10P]-129: PA08; PA12; PA18; PA21; PA41; PB08; PB85; PC63; PC64; PD08;
 M[10P]-130: PA12; PA13; PA21; PA24; PA27; PB10; PB41; PB49; PC15; PC61;
 M[10P]-132: PA12; PA20; PA21; PA24; PC15; PC26; PC61; PC63; PC64; PD08;
 M[10P]-134: PA21; PA22; PA24; PA27; PB10; PB12; PB49; PC15; PC29; PD05;
 30 M[10P]-136: PA10; PA11; PA12; PA13; PA18; PA21; PB16; PB18; PC26; PC29;
 M[10P]-140: PA13; PA15; PA21; PA24; PA62; PA79; PB10; PB12; PC63; PC64;
 M[10P]-142: PA11; PA12; PA13; PA19; PA21; PB12; PB85; PC15; PC26; PC64;
 M[10P]-144: PA13; PA15; PA21; PA24; PA75; PB49; PC51; PC61; PC64; PD05;
 M[10P]-145: PA12; PA13; PA17; PA20; PA21; PA79; PB08; PB16; PB85; PC63;
 35 M[10P]-148: PA10; PA13; PA20; PA24; PB08; PB12; PB49; PC26; PC51; PC64;
 M[10P]-149: PA13; PA14; PA15; PA19; PA21; PB08; PB10; PB41; PC15; PC61;
 M[10P]-150: PA10; PA12; PA13; PA14; PA21; PA62; PB10; PC26; PC64; PD06;
 M[10P]-151: PA10; PA13; PA21; PA22; PA24; PA41; PB49; PC15; PC61; PC63;
 M[10P]-152: PA11; PA12; PA13; PA15; PA21; PA27; PA75; PB12; PB49; PB85;
 40 M[10P]-154: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC29; PC63;
 M[10P]-156: PA15; PA21; PA22; PB10; PB85; PC26; PC29; PC61; PC63; PC64;
 M[10P]-157: PA11; PA13; PA15; PA19; PA21; PB18; PB41; PC15; PC51; PD08;
 M[10P]-158: PA10; PA17; PA21; PA24; PA27; PA41; PB49; PC26; PC61; PC63;
 M[10P]-160: PA10; PA12; PA13; PA15; PA18; PA20; PA21; PA24; PB12; PC26;
 45 M[10P]-162: PA12; PA13; PA21; PA27; PA79; PB12; PB16; PB18; PC63; PC64;
 M[10P]-164: PA12; PA13; PA15; PA19; PA21; PA27; PB08; PB12; PB49; PD05;
 M[10P]-165: PA13; PA15; PA22; PA75; PA79; PB12; PB18; PC15; PC26; PC29;
 M[10P]-167: PA12; PA13; PA75; PB08; PB12; PB85; PC15; PC51; PC61; PC63;
 M[10P]-168: PA11; PA13; PA17; PA21; PA27; PA62; PA79; PB16; PB49; PC64;
 50 M[10P]-169: PA12; PA17; PA21; PA24; PA75; PA79; PB10; PB12; PB85; PC15;
 M[10P]-170: PA11; PA13; PA15; PA20; PA21; PA22; PC26; PC29; PC63; PC64;
 M[10P]-172: PA13; PA20; PA21; PA75; PB10; PB12; PB18; PB49; PC29; PC61;
 M[10P]-173: PA10; PA12; PA13; PA14; PA19; PA20; PA21; PA79; PC15; PC63;

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

27

M[10P]-174: PA11; PA12; PA13; PA27; PA62; PB12; PB16; PB49; PB85; PC26;
M[10P]-175: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA75; PB10; PB49; PC15; PC63;
M[10P]-176: PA11; PA13; PA21; PA24; PA62; PB12; PC15; PC26; PC61; PC64;
M[10P]-178: PA11; PA14; PA15; PA18; PA19; PA21; PA22; PB16; PC15; PC63;
5 M[10P]-180: PA08; PA11; PA12; PA13; PA15; PA17; PA21; PA62; PB12; PC63;
M[10P]-181: PA13; PA19; PA21; PA22; PA79; PB08; PB10; PB18; PC15; PC29;
M[10P]-182: PA11; PA15; PA20; PA21; PA22; PA75; PB12; PC29; PC63; PC64;
M[10P]-183: PA11; PA12; PA13; PA27; PA79; PB16; PB18; PB49; PC15; PC63;
M[10P]-184: PA11; PA13; PA15; PA20; PA21; PA22; PA27; PA75; PB12; PC29;
10 M[10P]-186: PA11; PA15; PA19; PA20; PA21; PA22; PA27; PB10; PB12; PB85;
M[10P]-188: PA11; PA12; PA13; PA19; PA21; PA75; PA79; PB49; PC15; PC63;
M[10P]-190: PA11; PA13; PA21; PA22; PA27; PA75; PB10; PB12; PB49; PC63;
M[10P]-191: PA13; PA19; PA20; PA21; PA79; PB10; PB18; PB85; PC29; PC61;
M[10P]-192: PA12; PA13; PA19; PA21; PA27; PA75; PB12; PB49; PC63; PC64;
15 M[10P]-193: PA13; PA15; PA20; PA21; PA79; PB16; PC15; PC26; PC29; PC61;
M[10P]-194: PA11; PA17; PA21; PA22; PA27; PB12; PB49; PC15; PC63; PC64;
M[10P]-196: PA11; PA12; PA13; PA15; PA21; PA75; PB10; PB18; PC51; PC63;
M[10P]-197: PA11; PA12; PA13; PA15; PA21; PA24; PA79; PB49; PC61; PC64;
M[10P]-198: PA12; PA15; PA21; PA22; PB12; PB16; PB85; PC15; PC26; PC29;
20 M[10P]-199: PA11; PA12; PA13; PA15; PA21; PA75; PB12; PC15; PC63; PC64;
M[10P]-201: PA11; PA13; PA20; PA21; PA22; PA27; PA75; PB12; PB49; PC64;
M[10P]-202: PA11; PA21; PA75; PB10; PB12; PB61; PC26; PC29; PC42; PC63;
M[10P]-205: PA11; PA13; PA19; PA21; PA22; PA27; PA75; PB12; PB41; PC63;
M[10P]-207: PA11; PA13; PA21; PA75; PB10; PB12; PB41; PB51; PC45; PC63;
25 M[10P]-209: PA12; PA13; PA21; PA24; PA75; PB12; PB16; PB49; PB60; PC15;
M[10P]-210: PA13; PA15; PA20; PA22; PA27; PB08; PB10; PB12; PB18; PC63;
M[10P]-212: PA11; PA13; PA21; PA22; PA27; PA75; PB12; PB16; PC15; PC63;
M[10P]-214: PA11; PA12; PA15; PA21; PA22; PA75; PB12; PB49; PC15; PC61;
M[10P]-215: PA11; PA12; PA13; PA21; PA25; PB12; PC02; PC29; PC51; PC64;
30 M[10P]-216: PA11; PA12; PA13; PA21; PA27; PA75; PA85; PB18; PB49; PC49;
M[10P]-217: PA18; PA20; PA21; PA22; PA75; PB10; PB12; PB16; PB85; PC64;
M[10P]-218: PA10; PA13; PA15; PA20; PA22; PA27; PB18; PB49; PC51; PC63;
M[10P]-219: PA12; PA13; PA15; PA19; PA21; PA22; PA75; PB10; PB12; PC26;
M[10P]-220: PA11; PA12; PA13; PA19; PA21; PA22; PA27; PB12; PB49; PC63;
35 M[10P]-221: PA13; PA15; PA19; PA20; PA21; PA41; PA75; PB12; PC15; PC60;
M[10P]-222: PA05; PA13; PA21; PA22; PA75; PA79; PB49; PC26; PC29; PC63;
M[10P]-223: PA11; PA12; PA13; PA22; PA25; PA75; PB12; PB49; PC61; PC64;
M[10P]-225: PA12; PA13; PA21; PA27; PB10; PB12; PC29; PC63; PC64; PD08;
M[10P]-226: PA11; PA12; PA21; PA39; PA79; PB18; PB49; PB85; PC61; PC63;
40 M[10P]-227: PA11; PA12; PA15; PA20; PA21; PA22; PB12; PB42; PC15; PC26;
M[10P]-229: PA13; PA20; PA62; PA79; PB12; PB46; PB85; PC29; PC64; PD08;
M[10P]-230: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA75; PB10; PB12; PB58; PC61;
M[10P]-232: PA12; PA13; PA15; PA22; PA27; PA83; PB12; PB49; PC26; PC63;
M[10P]-235: PA12; PA13; PA15; PA20; PA21; PA22; PC29; PC51; PC63; PC65;
45 M[10P]-236: PA12; PA13; PA20; PA21; PA27; PA75; PB50; PB85; PC29; PC64;
M[10P]-237: PA11; PA13; PA15; PA21; PA27; PA75; PB10; PB12; PC63; PC70;
M[10P]-239: PA10; PA11; PA12; PA20; PA21; PB10; PB41; PB49; PC63; PD08;
M[10P]-240: PA11; PA12; PA15; PA21; PA27; PA79; PB46; PC29; PC51; PC63;
M[10P]-241: PA11; PA14; PA20; PA21; PA22; PA75; PB12; PB18; PC15; PC29;
50 M[10P]-242: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB18; PB49; PC51; PC63;
M[10P]-244: PA11; PA12; PA13; PA20; PA22; PA27; PB10; PB12; PC63; PC64;
M[10P]-246: PA11; PA12; PA13; PA21; PA61; PA79; PB10; PB12; PB18; PB85;
M[10P]-247: PA11; PA12; PA21; PA27; PB16; PB49; PC21; PC51; PC61; PC63;

- M[10P]-248: PA11; PA13; PA14; PA19; PA21; PA75; PA79; PB14; PB49; PC15;
M[10P]-250: PA11; PA12; PA15; PA20; PA21; PA41; PA75; PB49; PC26; PC63;
M[10P]-251: PA12; PA13; PA21; PA22; PA27; PA79; PB10; PB12; PB13; PB16;
M[10P]-252: PA11; PA13; PA20; PA21; PA44; PB08; PB12; PB18; PB88; PD06;
5 M[10P]-253: PA10; PA11; PA12; PA13; PA15; PA21; PA22; PA27; PA79; PC63;
M[10P]-255: PA11; PA13; PA21; PA75; PB12; PB18; PB49; PC15; PC26; PC63;
M[10P]-256: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA23; PA75; PA79; PC29; PC64;
M[10P]-257: PA13; PA20; PA21; PA27; PB12; PB49; PB83; PC29; PC63; PD00;
M[10P]-258: PA12; PA13; PA20; PA21; PA22; PA75; PB10; PB12; PC15; PC63;
10 M[10P]-262: PA11; PA12; PA21; PA31; PA75; PB49; PB85; PC61; PC63; PC64;
M[10P]-264: PA21; PA24; PA27; PA31; PA79; PB10; PB18; PB49; PC15; PC63;
M[10P]-267: PA11; PA12; PA21; PA22; PA75; PC29; PC51; PC52; PC61; PC63;
M[10P]-268: PA11; PA12; PA13; PA15; PA27; PA75; PB10; PB12; PB45; PC64;
M[10P]-269: PA13; PA20; PA21; PA22; PA79; PB10; PB11; PB49; PC61; PC63;
15 M[10P]-270: PA11; PA12; PA13; PA15; PA21; PA75; PB12; PB14; PB18; PC49;
M[10P]-271: PA11; PA13; PA20; PA22; PA27; PA45; PB08; PB12; PB49; PC64;
M[10P]-272: PA13; PA21; PA24; PA79; PB10; PB12; PB41; PC15; PC29; PC63;
M[10P]-273: PA11; PA15; PA21; PA22; PA27; PA75; PB12; PB14; PC64; PD00;
M[10P]-274: PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PB49; PC26; PC51; PC63; PC64;
20 M[10P]-278: PA13; PA15; PA21; PA22; PA75; PA79; PB10; PB12; PB49; PC63;
M[10P]-280: PA11; PA12; PA15; PA21; PB08; PB12; PB18; PB49; PB58; PC51;
M[10P]-281: PA11; PA12; PA20; PA21; PA22; PA27; PA29; PA75; PB16; PC63;
M[10P]-282: PA10; PA13; PA21; PA22; PA27; PA79; PB12; PC15; PC29; PC61;
M[10P]-284: PA11; PA13; PA20; PA21; PA22; PA27; PA95; PC15; PC29; PC63;
25 M[10P]-285: PA11; PA13; PA14; PA21; PA79; PB10; PB12; PB18; PB49; PB82;
M[10P]-286: PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA21; PA79; PC51; PC64; PC82;
M[10P]-287: PA12; PA13; PA19; PA20; PA75; PB10; PB12; PC26; PC63; PD08;
M[10P]-289: PA12; PA13; PA15; PA19; PA20; PA21; PB10; PB12; PC29; PC51;
M[10P]-290: PA11; PA12; PA13; PA22; PA27; PA75; PB85; PC29; PC63; PD07;
30 M[10P]-292: PA12; PA13; PA15; PA75; PA79; PB10; PB12; PC29; PC45; PC63;
M[10P]-293: PA00; PA11; PA12; PA13; PA21; PA27; PA75; PB18; PB85; PC26;
M[10P]-294: PA12; PA13; PA15; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC51; PC63;
M[10P]-296: PA11; PA13; PA15; PA17; PA21; PA62; PA79; PB10; PB12; PC63;
M[10P]-300: PA12; PA13; PA17; PA48; PB10; PB12; PB16; PC26; PC29; PC63;
35 M[10P]-301: PA11; PA12; PA13; PA20; PA21; PA75; PB08; PC15; PC35; PC51;
M[10P]-302: PA11; PA12; PA13; PA21; PA70; PB12; PB16; PB18; PC26; PC63;
M[10P]-303: PA11; PA12; PA15; PA21; PA75; PA79; PB10; PB12; PC29; PC64;
M[10P]-307: PA12; PA13; PA21; PB10; PB12; PB18; PB78; PC51; PC63; PD08;
M[10P]-308: PA17; PA21; PA22; PA27; PB12; PB49; PB85; PC15; PC26; PC29;
40 M[10P]-309: PA13; PA22; PA27; PA53; PA62; PA75; PB10; PC51; PC63; PD06;
M[10P]-311: PA12; PA15; PA19; PA21; PA79; PB12; PB49; PC26; PC63; PC83;
M[10P]-312: PA00; PA11; PA13; PA21; PA22; PA29; PA75; PB10; PB85; PC29;
M[10P]-313: PA13; PA15; PA21; PA22; PA27; PA75; PB49; PC51; PC61; PC63;
M[10P]-314: PA08; PA12; PA13; PA21; PB10; PB12; PB49; PC15; PC32; PC64;
45 M[10P]-315: PA11; PA13; PA21; PA47; PA75; PB16; PB83; PC15; PC51; PC63;
M[10P]-317: PA11; PA12; PA19; PA21; PA22; PA79; PB10; PB16; PC29; PC63;
M[10P]-319: PA12; PA13; PA22; PA75; PA79; PA98; PB08; PB10; PB85; PC63;
M[10P]-321: PA11; PA12; PA13; PA20; PA21; PA22; PB49; PB85; PC55; PC63.

50 Extracțele de apă corespunzătoare (sau probele prelucrate) ale acestor compoziții din plante au fost preparate în conformitate cu metoda B descrisă anterior, utilizând 20 ml de apă conținând 100 g/l de zaharoză pentru extracția apei și incluzând etapa de centrifugare înainte de filtrare.

Activitatea biologică a probei prelucrate a fost determinată prin utilizarea următoarelor tulpini de *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923, ATCC 49476, ATCC 6538, ATCC 51740, ATCC 29213 și ATCC

14775, cu următoarele diluții finale ale probelor prelucrate: 1:10, 1:20, 1:40 și 1:80 pentru probe prelucrate care conțin mai puțin de 10 linguri de pulbere vegetală (M[2P] până la M[9P]) sau 1:20, 1:63 și 1:200 pentru probe prelucrate care conțin 10 linguri de pulbere vegetală (M[10P]), în conformitate cu metoda C descrisă anterior.

- 5 Media procentului de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor și media procentului de inhibare a formării biofilmului pentru toate tulpinile testate pentru probele prelucrate obținute din cele 2 plante din Mix[2P]-1 la diluția 1:20 sunt prezentate în Tabelul 4-1.

Tabelul 4-1: media procentului de inhibare a creșterii planctonice și a procentului de inhibare a formării biofilmului pe cele 6 tulpini testate de *Staphylococcus aureus* pentru proba prelucrată pe baza Mix[2P]-1 la diluția 1:20

(A)

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[2P]-1	22%	36%
M[10P]-124	28%	47%
M[10P]-236	24%	50%
M[10P]-193	27%	54%
M[10P]-286	45%	38%
Mix[5P]-6	39%	45%
M[10P]-197	32%	55%
M[10P]-112	40%	49%
M[10P]-157	41%	52%
M[10P]-136	39%	55%
M[10P]-144	45%	52%
M[10P]-191	39%	57%
M[10P]-168	44%	53%
M[10P]-115	44%	54%
M[10P]-98	48%	51%
M[10P]-102	51%	54%
M[10P]-150	49%	59%
M[10P]-103	51%	58%
M[10P]-130	57%	61%
M[10P]-149	56%	63%
M[10P]-181	65%	70%

10

(B)

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[2P]-1	22%	36%
M[10P]-75	23%	40%
M[10P]-216	22%	41%
M[10P]-256	19%	47%

M[10P]-248	14%	48%
------------	-----	-----

(C)	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[2P]-1	22%	36%
Mix[3P]-2	27%	26%
Mix[4P]-4	27%	29%
M[10P]-293	28%	32%
M[10P]-301	28%	28%
M[10P]-312	40%	37%

S-a constatat că 20 de probe prelucrate obținute din compoziții din plante care conțin 5 sau 10 plante au o activitate antibiofilm și antimicrobiană mai mare decât extractul amestecului de referință Mix[2P]-1 (Tabelul 4-1 A). S-a constatat că patru extracte din amestecuri de 10 plante au o activitate antibiofilm mai mare și o activitate antimicrobiană echivalentă sau mai mică (Tabelul 4-1 B). S-a constatat că cinci probe prelucrate conținând 3, 4 sau 10 plante au o activitate antimicrobiană mai mare și o activitate antibiofilm echivalentă sau mai scăzută (Tabelul 4-1 C).

Media procentului de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor și media procentului de inhibare a formării biofilmului pentru toate tulpinile testate pentru probele prelucrate obținute din compozițiile din plante care conțin cele 2 plante de Mix[2P]-2 la diluția 1:20 sunt prezentate în Tabelul 4-2.

Tabelul 4-2: media procentului de inhibare a creșterii planctonice și a procentului de inhibare a formării biofilmului pe cele 6 tulpini de *Staphylococcus aureus* testate pentru proba prelucrată pe baza Mix[2P]-2 la diluția 1:20. (A) Extracte din amestecuri care prezintă o activitate antimicrobiană și antibiofilm mai mare. (B) Extracte din amestecuri care prezintă activitate antibiofilm și antimicrobiană echivalentă sau mai scăzută. (C) Extracte din amestecuri care prezintă activitate antimicrobiană și antibiofilm echivalentă sau mai scăzută.

(A)	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[2P]-2	12%	-3%
M[10P]-308	16%	13%
Mix[3P]-7	23%	9%
M[10P]-264	15%	29%
M[10P]-317	36%	9%
M[10P]-217	17%	28%
M[10P]-280	21%	27%
Mix[6P]-7	36%	16%
M[10P]-267	17%	36%
Mix[3P]-3	27%	28%
M[10P]-247	16%	40%
M[10P]-214	23%	33%
M[10P]-303	35%	22%
M[10P]-281	17%	42%

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

31

M[10P]-273	19%	41%
Mix[5P]-4	34%	27%
M[10P]-198	16%	46%
M[10P]-241	26%	38%
M[10P]-132	23%	41%
M[10P]-239	28%	44%
M[10P]-262	25%	48%
M[10P]-129	28%	46%
M[10P]-186	31%	44%
M[10P]-311	40%	38%
M[10P]-134	32%	48%
M[10P]-182	40%	44%
M[10P]-178	39%	45%
M[10P]-202	37%	50%
M[10P]-156	40%	48%
M[10P]-194	41%	49%
M[10P]-105	47%	44%
M[10P]-240	42%	61%
M[10P]-169	53%	57%
M[9P]-13	100%	86%

(B)	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[2P]-2	12%	-3%
M[10P]-84	9%	27%
M[10P]-158	12%	30%
M[10P]-071	11%	35%
M[10P]-227	12%	42%
M[10P]-250	11%	44%
M[10P]-226	13%	51%

(C)	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[2P]-2	12%	-3%
Mix[4P]-6	19%	-5%

S-a constatat că 33 de probe prelucrate obținute din compoziții din plante care conțin 3, 5, 9 sau 10 plante au o activitate antibiofilm și antimicrobiană mai mare decât extractul amestecului de referință Mix[2P]-2 (Tabelul 4-2 A). S-a constatat că șase extracte din amestecuri de 10 plante au o activitate antibiofilm mai mare și o activitate antimicrobiană echivalentă sau mai mică (Tabelul 4-2 B). S-a constatat că un extract din amestec de 4 plante are o activitate antimicrobiană mai mare și o activitate antibiofilm echivalentă (Tabelul 4-2 C).

Media procentului de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor și media procentului de inhibare a formării biofilmului asupra tuturor tulpinilor testate pentru probele prelucrate obținute din compozițiile din plante care conțin cele 2 plante din Mix[2P]-3 la diluția 1:20 sunt prezentate în Tabelul 4-3.

Tabelul 4-3: media procentului de inhibare a creșterii planctonice și a procentului de inhibare a formării biofilmului pe cele 6 tulpini de *Staphylococcus aureus* testate pentru proba prelucrată pe baza Mix[2P]-3 la diluția 1:20. (A) Extracte din amestecuri care prezintă o activitate antimicrobiană și antibiofilm mai mare. (B) Extracte din amestecuri care prezintă activitate antimicrobiană și activitate antibiofilm echivalentă sau mai scăzută.

(A)	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[2P]-3	12%	28%
M[10P]-44	15%	35%
M[10P]-271	13%	47%
M[10P]-218	19%	42%
M[10P]-268	16%	46%
Mix[3P]-4	17%	47%
M[10P]-210	22%	42%
M[10P]-165	22%	42%
Mix[5P]-5	29%	36%
M[10P]-287	34%	31%
M[10P]-148	28%	41%
M[10P]-290	31%	39%
M[10P]-229	15%	56%
M[6P]-8	34%	40%
M[10P]-319	38%	37%
M[10P]-244	21%	56%
M[10P]-223	23%	55%
M[10P]-232	25%	61%
M[10P]-119	42%	48%
M[10P]-183	39%	51%
M[10P]-292	47%	48%
M[10P]-174	47%	59%
M[10P]-167	80%	71%
M[9P]-14	90%	83%

(B)

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[2P]-3	12%	28%
Mix[4P]-7	17%	5%
Mix[3P]-8	19%	14%
M[10P]-300	20%	15%
M[10P]-309	33%	2%

S-a constatat că 23 de probe prelucrate obținute din compoziții din plante care conțin 3, 5, 9 sau 10 plante au o activitate antibiofilm și antimicrobiană mai mare decât extractul de amestec de referință Mix[2P]-3 (Tabelul 4-3 A). S-a constatat că patru probe prelucrate obținute din compoziții din plante care conțin 3, 4 sau 10 plante au o activitate antibiofilm mai mare și o activitate antimicrobiană echivalentă sau mai mică (Tabelul 4-3 B).

Media procentului de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor și media procentului de inhibare a formării biofilmului pentru toate tulpinile testate pentru probele prelucrate obținute din compozițiile din plante care conțin cele 3 plante din Mix[3P]-1 la diluția 1:20 sunt prezentate în Tabelul 4-4.

Tabelul 4-4: media procentului de inhibare a creșterii planctonice și a procentului de inhibare a formării biofilmului pe cele 6 tulpini de *Staphylococcus aureus* testate, pentru proba prelucrată pe baza Mix[3P]-1 la diluția 1:20. (A) Extracte din amestecuri care prezintă o activitate antimicrobiană și antibiofilm mai mare. (B) Extracte din amestecuri care prezintă activitate antibiofilm și activitate antimicrobiană echivalentă sau mai scăzută. (C) Extracte din amestecuri care prezintă activitate antimicrobiană și activitate antibiofilm echivalentă sau mai scăzută.

(A)

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[3P]-1	31%	15%
Mix[4P]-8	37%	20%
Mix[6P]-10	33%	25%
M[10P]-314	34%	24%
Mix[4P]-2	37%	22%
Mix[6P]-11	35%	27%
Mix[4P]-3	41%	24%
M[10P]-315	39%	27%
M[10P]-284	41%	31%
M[10P]-321	37%	39%
M[10P]-109	36%	43%
M[10P]-302	44%	35%
Mix[5P]-8	43%	40%
M[6P]-9	51%	35%
M[10P]-160	35%	52%
M[10P]-212	43%	45%

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

34

M[10P]-274	38%	51%
M[10P]-246	34%	56%
M[10P]-205	42%	48%
M[10P]-285	52%	39%
M[10P]-201	37%	54%
M[10P]-222	32%	59%
Mix[4P]-10	52%	40%
M[10P]-230	38%	54%
M[10P]-220	43%	50%
Mix[5P]-2	51%	42%
Mix[5P]-1	50%	44%
M[10P]-215	38%	55%
Mix[6P]-6	56%	38%
M[10P]-235	40%	54%
M[10P]-207	43%	53%
Mix[5P]-3	51%	48%

(B)	Inhibarea creșterii	
	planctonice	formării biofilmului
Mix[3P]-1	31%	15%
Mix[3P]-6	16%	20%
Mix[4P]-9	30%	21%
Mix[3P]-9	19%	23%
M[10P]-282	24%	26%
Mix[3P]-5	29%	36%
M[10P]-269	14%	37%
M[10P]-278	18%	40%
M[10P]-219	30%	42%
M[10P]-255	20%	43%
M[10P]-270	15%	43%
M[10P]-251	13%	44%
M[10P]-258	20%	44%
M[10P]-209	21%	45%
M[10P]-221	17%	49%
M[10P]-253	21%	49%
M[10P]-252	18%	50%
M[10P]-257	18%	51%

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

35

M[10P]-242	29%	54%
------------	-----	-----

(C)	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[3P]-1	31%	15%
Mix[4P]-1	37%	15%
M[10P]-313	38%	12%
M[10P]-307	58%	43%
M[10P]-289	60%	41%
M[10P]-272	40%	62%
M[10P]-184	48%	55%
M[10P]-151	48%	57%
M[10P]-123	51%	55%
M[6P]-1	60%	50%
M[6P]-5	61%	51%
M[7P]-3	61%	54%
M[10P]-192	57%	60%
M[10P]-164	58%	59%
M[7P]-1	62%	57%
M[10P]-296	63%	60%
M[6P]-4	73%	51%
Mix[5P]-7	64%	60%
M[6P]-2	68%	57%
M[10P]-225	60%	66%
M[10P]-188	65%	61%
Mix[4P]-5	61%	66%
M[10P]-125	66%	62%
M[10P]-173	65%	67%
M[10P]-237	69%	63%
M[7P]-3	71%	64%
M[10P]-294	71%	65%
M[10P]-199	70%	69%
M[10P]-142	71%	69%
Mix[6P]-3	72%	68%
M[10P]-145	72%	69%
M[10P]-180	72%	70%
M[10P]-140	72%	71%

M[10P]-162	73%	70%
M[10P]-176	74%	70%
M[10P]-172	72%	73%
M[10P]-152	71%	74%
M[10P]-40	77%	68%
M[7P]-4	72%	76%
M[10P]-170	80%	74%
M[10P]-196	78%	77%
M[10P]-190	82%	76%
M[10P]-154	80%	79%
M[10P]-175	84%	77%
M[9P]-20	93%	81%
M[9P]-17	95%	84%
M[9P]-19	95%	86%
M[9P]-11	96%	91%
M[9P]-18	98%	89%
M[9P]-12	103%	91%
M[9P]-15	106%	88%
M[9P]-16	106%	91%

S-a constatat că 80 de probe prelucrate obținute din compoziții din plante care conțin 4, 5, 6, 7, 9 sau 10 plante au o activitate antibiofilm și antimicrobiană mai mare decât extractul de amestec de referință Mix[3P]-1 (Tabelul 4-4 A). S-a constatat că 18 probe prelucrate obținute din compoziții din plante care conțineau 3, 4 sau 10 plante aveau o activitate antibiofilm mai mare și o activitate antimicrobiană echivalentă sau mai mică (Tabelul 4-4 B). S-a constatat că două probe prelucrate obținute din compoziții din plante cu 4 și 10 plante au o activitate antimicrobiană mai mare și o activitate antibiofilm echivalentă (Tabelul 4-4 C).

Exemplul comparativ 2

Ca exemplu comparativ, ilustrăm mai multe extracte din amestecuri de 3 sau 10 plante obținute din compoziții din plante care conțin o singură plantă dintre cele 3 plante din exemplul 1 (PA13, PA21, PB12), care s-au dovedit a avea activități antimicrobiene și de antibiofilm inexistente sau slabe împotriva *Staphylococcus aureus*.

Zece compoziții din plante, al căror conținut este raportat în Lista 4-8, au fost preparate în conformitate cu metoda A descrisă anterior.

Lista 4-8: compoziții din plante ale probelor prelucrate

M[3P]-31: PA21; PA05; PB06;

M[3P]-35: PA21; PA76; PB50;

M[3P]-37: PA21; PB06; PB50;

M[3P]-43: PB12; PA05; PC34;

M[3P]-45: PB12; PA76; PB50;

M[10P]-65: PA01; PA08; PA25; PA29; PA37; PB12; PB50; PC15; PC37; PD05;

M[10P]-70: PA10; PA16; PA21; PA25; PA37; PA75; PB18; PB45; PC04; PC57;

M[10P]-72: PA08; PA21; PA62; PA70; PA85; PB19; PB31; PB45; PB49; PC26;

M[10P]-89: PA10; PA13; PA18; PA19; PA37; PA41; PA75; PB49; PC21; PC67;

M[10P]-306: PA15; PA21; PA22; PA62; PA75; PB18; PB49; PB85; PC49; PC61;

Zece extracte de apă (sau probe prelucrate) au fost preparate pornind de la compozițiile din plante corespunzătoare.

Media procentului de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor și media procentului de inhibare a formării biofilmului asupra tuturor tulpinilor testate pentru astfel de probe prelucrate la diluție 1:20 au fost determinate în conformitate cu metoda C raportată anterior și sunt prezentate în Tabelul 4-5.

Tabelul 4-5: media procentului de inhibare a creșterii planctonice și eficacitatea procentului de inhibare a formării biofilmului asupra celor 6 tulpini testate de *Staphylococcus aureus* pentru probele prelucrate la diluția 1:20.

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[2P]-1	22%	36%
Mix[2P]-2	12%	-3%
Mix[2P]-3	12%	28%
M[3P]-45	-4%	-5%
M[3P]-35	0%	-8%
M[3P]-37	2%	-9%
M[3P]-31	2%	-9%
M[3P]-43	1%	-1%
M[10P]-72	3%	1%
M[10P]-70	1%	15%
M[10P]-306	10%	6%
M[10P]-65	3%	17%
M[10P]-89	10%	27%

Toate probele prelucrate testate, obținute din compoziții din plante compuse din 3 sau 10 plante, care includeau o plantă dintre cele 3 plante din exemplul 1 (PA13, PA21, PB12) au prezentat o activitate antimicrobiană mai scăzută decât cele trei extracte din amestecuri de 2 plante de referință Mix[2P]-1 (obținut din PA13 și PA21), Mix[2P]-2 (obținut din PA21 și PB12) și Mix[2P]-3 (obținut din PA13 și PB12) și o activitate antibiofilm mai scăzută decât Mix[2P]-1 și Mix[2P]-3.

Exemplul 5

În acest Exemplu, ilustrăm activitățile antimicrobiene și antibiofilm simultane împotriva *Staphylococcus aureus* ale 390 de extracte din amestecuri obținute din compoziții din plante care includ cel puțin 2 plante dintre cele 3 plante descrise în Exemplul 1 (cf. Tabelul 1-1) și plante suplimentare pentru a dezvolta amestecuri de 9 până la 20 de plante.

Plantele uscate de calitate farmaceutică au fost obținute de la „Pharmacie Fontgieve” (Clermont-Ferrand, Franța, plantele PA00 la PB12) și „Pharmacie St Herem” (Clermont-Ferrand, Franța, plantele PB13 la PD02).

Compozițiile din plante care conțin de la 9 la 20 de pulberi de plante au fost preparate în conformitate cu metoda A descrisă anterior.

S-au preparat cele 4 compoziții din plante de referință Mix[2P]-1, Mix[2P]-2, Mix[2P]-3, Mix[3P]-1 și 390 de compoziții noi pe bază de plante cu conținutul prezentat mai jos (Lista 5-3).

Lista 5-3: Compoziții din plante ale probelor prelucrate

Mix[2P]-1: PA13; PA21;

Mix[2P]-2: PA21; PB12;

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

38

Mix[2P]-3: PA13; PB12;
Mix[3P]-1: PA13; PA21; PB12;
M[09P]-1: PA13; PA14; PA20; PA21; PA23; PA67; PB12; PC27; PC60;
M[09P]-2: PA11; PA14; PA20; PA21; PA23; PA67; PB12; PC27; PC60;
5 M[09P]-3: PA11; PA13; PA20; PA21; PA23; PA67; PB12; PC27; PC60;
M[09P]-4: PA11; PA13; PA14; PA21; PA23; PA67; PB12; PC27; PC60;
M[09P]-6: PA11; PA13; PA14; PA20; PA23; PA67; PB12; PC27; PC60;
M[09P]-6: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA67; PB12; PC27; PC60;
M[09P]-7: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA23; PB12; PC27; PC60;
10 M[09P]-8: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA23; PA67; PC27; PC60;
M[09P]-9: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA23; PA67; PB12; PC60;
M[09P]-10: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA23; PA67; PB12; PC27;
M[09P]-21: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12;
M[10P]-41: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20;
15 M[10P]-303: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33;
M[11P]-1: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PA11;
M[11P]-2: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PA14;
M[11P]-3: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PA25;
M[11P]-4: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PA26;
20 M[11P]-5: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PA28;
M[11P]-6: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PA29;
M[11P]-7: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PA67;
M[11P]-8: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PA75;
M[11P]-9: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49;
25 M[11P]-10: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC60;
M[11P]-11: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33; PA39;
M[11P]-12: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13; PA21;
M[12P]-1: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33; PA39; PA22;
M[12P]-2: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13; PA21; PA29;
30 M[13P]-1: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33; PA39; PA22; PA20;
M[13P]-2: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13; PA21; PA29; PC20;
M[14P]-1: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33; PA39; PA22; PA20; PC26;
M[14P]-2: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13; PA21; PA29; PC20; PC49;
M[15P]-1: PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA21; PA23; PA26; PA33; PB08; PB12; PB60; PB88; PC12;
35 PC20;
M[15P]-5: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33; PA39; PA22; PA20; PC26;
PC20;
M[16P]-1: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PC11; PC12; PC20; PC51;
PC55; PC67;
40 M[16P]-2: PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33;
PC37; PC49;
M[16P]-3: PA11; PA12; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33;
PC37; PC49;
M[16P]-5: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33; PA39; PA22; PA20; PC26;
45 PC20; PA12;
M[16P]-6: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13; PA21; PA29; PC20; PC49;
PA14; PA14;
M[17P]-1: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20;
PC51; PC55; PC67;
50 M[17P]-2: PA11; PA12; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26;
PC33; PC37; PC49;
M[17P]-3: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26;
PC33; PC37; PC49;

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

39

M[17P]-5: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
M[17P]-4: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
5 M[17P]-6: PA10; PA11; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
M[17P]-8: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13; PA21; PA29; PC20; PC49; PA14; PA14; PA22;
M[17P]-9: PA13; PA13; PA13; PC49; PC37; PA11; PA20; PA22; PA12; PC26; PB60; PA39; PC33; PC20;
10 PA14; PA14; PA21;
M[18P]-1: PA10; PA11; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
M[18P]-2: PA11; PA11; PA12; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;
15 M[18P]-3: PA12; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;
M[18P]-4: PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;
M[18P]-5: PA11; PA12; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;
20 M[18P]-6: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;
M[18P]-7: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;
25 M[18P]-9: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;
M[18P]-9: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;
M[18P]-10: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;
30 M[18P]-11: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;
M[18P]-12: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;
35 M[18P]-13: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;
M[18P]-14: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC26; PC33; PC37; PC49;
M[18P]-15: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC33; PC37; PC49;
40 M[18P]-16: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC37; PC49;
M[18P]-17: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC49;
45 M[18P]-18: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37;
M[18P]-23: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
M[18P]-19: PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
50 M[18P]-20: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

40

M[18P]-21: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
M[18P]-22: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB60; PB88; PC12; PC20;
5 M[18P]-24: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
M[18P]-25: PA10; PA11; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
M[18P]-31: PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
10 M[18P]-33: PA11; PA11; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
M[18P]-34: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
15 M[18P]-34: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
M[18P]-35: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33; PA39; PA22; PA20; PC26; PC20; PA12; PA14; PA14;
M[18P]-36: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13; PA21; PA29; PC20; PC49; PA14; PA14; PA22; PA20;
20 M[18P]-37: PA13; PA13; PA13; PC49; PC37; PA11; PA20; PA22; PA12; PC26; PB60; PA39; PC33; PC20; PA14; PA14; PA21; PA29;
M[19P]-1: PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
25 M[19P]-2: PA11; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-3: PA11; PA13; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-4: PA11; PA13; PA14; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
30 M[19P]-5: PA11; PA13; PA14; PA20; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-6: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
35 M[19P]-7: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-8: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-9: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
40 M[19P]-10: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-11: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
45 M[19P]-12: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-13: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-14: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
50 M[19P]-15: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

41

M[19P]-16: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27;
PB33; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-17: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27;
PB33; PB60; PC20; PC49; PC60;
5 M[19P]-18: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27;
PB33; PB60; PB88; PC49; PC60;
M[19P]-19: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27;
PB33; PB60; PB88; PC20; PC60;
10 M[19P]-20: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27;
PB33; PB60; PB88; PC20; PC49;
M[19P]-21: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11;
PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
M[19P]-22: PA10; PA11; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33;
PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
15 M[19P]-23: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60;
PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;
M[19P]-24: PA11; PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60;
PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;
20 M[19P]-25: PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12;
PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-26: PA10; PA10; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12;
PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-27: PA10; PA10; PA11; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12;
PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
25 M[19P]-28: PA10; PA10; PA11; PA13; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12;
PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-29: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12;
PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-30: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12;
30 PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-31: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12;
PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-32: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12;
PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
35 M[19P]-33: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PB08; PB12;
PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-34: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB12;
PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-35: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08;
40 PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-36: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08;
PB12; PB12; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-37: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08;
PB12; PB12; PB60; PC12; PC20;
45 M[19P]-38: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08;
PB12; PB12; PB60; PB88; PC20;
M[19P]-39: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08;
PB12; PB12; PB60; PB88; PC12;
M[19P]-40: PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11;
50 PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
M[19P]-41: PA00; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11;
PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

42

M[19P]-42: PA00; PA10; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11;
PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
M[19P]-44: PA00; PA10; PA20; PA21; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11;
PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
5 M[19P]-45: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11;
PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
M[19P]-46: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11;
PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
10 M[19P]-47: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11;
PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
M[19P]-48: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11;
PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
M[19P]-49: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11;
PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
15 M[19P]-50: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11;
PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
M[19P]-51: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11;
PC11; PC20; PC51; PC55; PC67;
20 M[19P]-52: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11;
PC11; PC12; PC51; PC55; PC67;
M[19P]-53: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11;
PC11; PC12; PC20; PC55; PC67;
M[19P]-54: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11;
PC11; PC12; PC20; PC51; PC67;
25 M[19P]-55: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11;
PC11; PC12; PC20; PC51; PC55;
M[19P]-56: PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33;
PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
M[19P]-57: PA10; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33;
30 PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
M[19P]-58: PA10; PA11; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33;
PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
M[19P]-59: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33;
PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
35 M[19P]-60: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33;
PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
M[19P]-62: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33;
PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
M[19P]-62: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33;
40 PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
M[19P]-63: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33;
PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
M[19P]-64: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PB00; PB07; PB12; PB33;
PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
45 M[19P]-65: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB07; PB12; PB33;
PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
M[19P]-66: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB12; PB33;
PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
M[19P]-67: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB33;
50 PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
M[19P]-68: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12;
PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

43

M[19P]-69: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PC11; PC52; PC60; PC71;
M[19P]-70: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC52; PC60; PC71;
5 M[19P]-71: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC60; PC71;
M[19P]-72: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC71;
M[19P]-73: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60;
10 M[19P]-89: PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
M[19P]-91: PA11; PA11; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
15 M[19P]-92: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
M[19P]-93: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
M[19P]-93: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
20 M[19P]-95: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
M[19P]-96: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
25 M[19P]-96: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
M[19P]-98: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
M[19P]-100: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB38; PB60; PC37; PC52;
30 M[19P]-100: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB60; PC37; PC52;
M[19P]-101: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PC37; PC52;
35 M[19P]-102: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC52;
M[19P]-103: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37;
M[19P]-104: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33; PA39; PA22; PA20; PC26; PC20; PA12; PA14; PA14; PB60;
40 M[19P]-105: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13; PA21; PA29; PC20; PC49; PA14; PA14; PA22; PA20; PA12;
M[19P]-106: PA13; PA13; PA13; PC49; PC37; PA11; PA20; PA22; PA12; PC26; PB60; PA39; PC33; PC20; PA14; PA14; PA21; PA29; PB12;
45 M[20P]-29: PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA15; PA16; PA17; PA18; PA19; PA20; PA21; PA22; PA23; PA24; PA25; PA26; PA27; PA28; PA29;
M[20P]-240: PA21; PA24; PA26; PA33; PA37; PA39; PA67; PB00; PB10; PB12; PB26; PB28; PB33; PB82; PB88; PC20; PC21; PC52; PC60; PC97;
M[20P]-296: PA00; PA11; PA13; PA15; PA21; PA22; PA24; PA26; PA28; PA33; PA39; PA94; PB08; PB12; PB20; PB28; PB33; PB99; PC26; PC52;
50 M[20P]-297: PA10; PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA29; PA33; PA57; PA67; PA69; PB07; PB12; PB60; PC20; PC37; PC49; PC98;

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

44

M[20P]-335: PA00; PA10; PA11; PA21; PA26; PA27; PA31; PA34; PA67; PA69; PA81; PA89; PB01; PB10; PB12; PB25; PB58; PC11; PC86; PC97;
M[20P]-340: PA11; PA13; PA15; PA18; PA21; PA26; PA34; PA36; PA69; PA79; PA95; PB00; PB05; PB07; PB25; PB48; PB60; PC35; PC74; PC84;
5 M[20P]-349: PA10; PA11; PA13; PA16; PA20; PA33; PA69; PA94; PB07; PB08; PB12; PC01; PC27; PC28; PC49; PC50; PC53; PC55; PC60; PC67;
M[20P]-371: PA05; PA14; PA15; PA21; PA22; PA23; PA25; PA27; PA32; PA34; PA35; PA57; PA72; PA89; PB12; PB39; PB88; PC20; PC55; PC74;
M[20P]-374: PA06; PA13; PA21; PA24; PA25; PA26; PA27; PA57; PB12; PB24; PB28; PB29; PB35; PB38; PB61; PC11; PC37; PC54; PC74; PC86;
10 M[20P]-375: PA11; PA15; PA19; PA20; PA21; PA22; PA28; PA29; PA67; PA81; PB10; PB12; PB26; PB28; PC23; PC52; PC58; PC60; PC73; PC98;
M[20P]-377: PA07; PA10; PA11; PA13; PA14; PA21; PA22; PA24; PA29; PA32; PA33; PA35; PA57; PB10; PB28; PB36; PB82; PC49; PC52; PC94;
15 M[20P]-380: PA13; PA15; PA16; PA21; PA24; PA28; PA33; PA38; PA40; PA72; PB12; PB26; PB27; PB82; PC14; PC33; PC55; PC57; PC98;
M[20P]-382: PA00; PA12; PA13; PA16; PA21; PA24; PA25; PA26; PA28; PA29; PA35; PA57; PA75; PB33; PB88; PC14; PC24; PC36; PC58; PC66;
M[20P]-383: PA10; PA21; PA22; PA23; PA25; PA27; PA81; PA85; PB12; PB26; PB28; PB39; PB77; PB82; PC01; PC17; PC37; PC50; PC52; PC67;
20 M[20P]-386: PA13; PA14; PA28; PA29; PA33; PA35; PA40; PA57; PA67; PA79; PA88; PB00; PB01; PB07; PB12; PB33; PB77; PB85; PC50; PC66;
M[20P]-387: PA00; PA05; PA10; PA21; PA23; PA24; PA29; PA40; PA94; PA99; PB12; PB82; PB88; PB99; PC11; PC20; PC24; PC34; PC37; PC61;
25 M[20P]-388: PA12; PA13; PA14; PA15; PA20; PA21; PA26; PA29; PA35; PA40; PA67; PA89; PA98; PB12; PB33; PC01; PC14; PC58; PC68; PC88;
M[20P]-392: PA11; PA14; PA21; PA23; PA26; PA29; PA30; PA57; PA81; PA85; PA94; PB03; PB07; PB12; PB29; PC33; PC51; PC53; PC71; PC73;
M[20P]-396: PA05; PA14; PA15; PA17; PA21; PA28; PA29; PA35; PA37; PA39; PA40; PA69; PA72; PA89; PB10; PB12; PC34; PC67; PC71; PC97;
30 M[20P]-401: PA13; PA15; PA16; PA23; PA26; PA29; PA33; PA34; PA85; PB12; PB26; PB33; PC21; PC50; PC52; PC53; PC55; PC58; PC67; PC71;
M[20P]-403: PA13; PA14; PA20; PA22; PA24; PA26; PA33; PA35; PB08; PB12; PB26; PB33; PB50; PB61; PC21; PC27; PC37; PC52; PC54; PC58;
35 M[20P]-407: PA20; PA21; PA22; PA25; PA29; PA48; PA51; PA57; PA67; PA75; PA94; PB07; PB12; PC21; PC34; PC41; PC51; PC53; PC55; PC97;
M[20P]-408: PA11; PA12; PA13; PA15; PA16; PA20; PA21; PA22; PA25; PA26; PA27; PA28; PA29; PB10; PB26; PC20; PC21; PC24; PC25; PC58;
M[20P]-409: PA10; PA15; PA21; PA28; PA35; PA69; PA89; PA94; PA98; PB07; PB12; PB28; PB35; PB36; PC11; PC23; PC49; PC52; PC73; PC98;
40 M[20P]-416: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[20P]-418: PA10; PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA23; PA24; PA26; PA39; PB07; PB12; PB38; PC11; PC12; PC20; PC23; PC24; PC49; PC55;
45 M[20P]-420: PA10; PA14; PA21; PA22; PA23; PA29; PA30; PA33; PA37; PB01; PB12; PB26; PB33; PB99; PC20; PC21; PC36; PC37; PC73; PC98;
M[20P]-421: PA13; PA15; PA21; PA25; PA26; PA29; PA39; PA40; PA75; PA94; PB20; PB55; PB82; PC06; PC20; PC24; PC49; PC71; PC74; PC99;
M[20P]-422: PA10; PA11; PA13; PA18; PA21; PA23; PA25; PA29; PA33; PA57; PA70; PB01; PB07; PB12; PB88; PC11; PC27; PC33; PC55; PC97;
50 M[20P]-427: PA06; PA13; PA15; PA21; PA24; PA25; PA27; PA29; PA33; PA75; PA98; PB00; PB28; PB60; PC11; PC20; PC26; PC50; PC55; PC74;

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

45

M[20P]-429: PA11; PA19; PA21; PA23; PA26; PA33; PA40; PA75; PB00; PB03; PB12; PB60; PC11; PC21;
PC24; PC26; PC36; PC37; PC68; PC98;
M[20P]-430: PA00; PA07; PA13; PA23; PA26; PA27; PA34; PA40; PA75; PB07; PB12; PB18; PB28; PB88;
PC20; PC41; PC66; PC67; PC71; PC97;
5 M[20P]-431: PA00; PA06; PA11; PA12; PA13; PA15; PA18; PA21; PA22; PA25; PA28; PA33; PA81; PB09;
PB32; PB33; PB38; PC11; PC33; PC52;
M[20P]-432: PA12; PA14; PA19; PA21; PA24; PA26; PA33; PA67; PB05; PB09; PB12; PB28; PB32; PB46;
PB60; PC20; PC49; PC58; PC71; PC73;
M[20P]-435: PA10; PA13; PA14; PA15; PA21; PA28; PA33; PA40; PA55; PA57; PB07; PB12; PB58; PB88;
10 PB99; PC12; PC21; PC29; PC66; PC67;
M[20P]-439: PA10; PA13; PA16; PA21; PA24; PA27; PA29; PA34; PA40; PA60; PA75; PB12; PB27; PB35;
PB38; PC25; PC26; PC36; PC51; PC55;
M[20P]-443: PA00; PA10; PA13; PA15; PA17; PA20; PA29; PA33; PA35; PA40; PB07; PB12; PB26; PB27;
PB82; PC12; PC24; PC50; PC60; PD02;
15 M[20P]-444: PA11; PA13; PA14; PA18; PA21; PA24; PA28; PA39; PA40; PA57; PA60; PA67; PA88; PB20;
PB85; PB88; PC06; PC52; PC57; PC58;
M[20P]-445: PA11; PA13; PA17; PA20; PA21; PA29; PA30; PA33; PA35; PA40; PA57; PB00; PB12; PB28;
PB60; PC11; PC20; PC35; PC50; PC51;
M[20P]-446: PA13; PA15; PA16; PA21; PA22; PA23; PA25; PA26; PA27; PA29; PA39; PA67; PA75; PB12;
20 PB26; PB27; PC36; PC49; PC60; PC98;
M[20P]-447: PA11; PA13; PA17; PA19; PA24; PA28; PA30; PA33; PA39; PA40; PA57; PA92; PB07; PB08;
PB12; PB33; PB61; PB85; PC58; PC94;
M[20P]-449: PA10; PA11; PA13; PA14; PA15; PA20; PA21; PA24; PA28; PA40; PA67; PA75; PA95; PB12;
PB20; PB35; PC14; PC20; PC52; PC60;
25 M[20P]-453: PA10; PA13; PA15; PA18; PA21; PA25; PA29; PA34; PA35; PA67; PA93; PB06; PB07; PB09;
PB12; PB20; PB26; PB35; PB99; PC55;
M[20P]-455: PA00; PA00; PA11; PA11; PA13; PA14; PA18; PA20; PA25; PA28; PA33; PA70; PA75; PB00;
PB12; PC20; PC23; PC26; PC67; PC67;
M[20P]-456: PA14; PA21; PA33; PA34; PA39; PB00; PB07; PB07; PB12; PB27; PB28; PB38; PB88; PC20;
30 PC23; PC26; PC49; PC58; PC67; PC71;
M[20P]-457: PA00; PA10; PA11; PA12; PA13; PA13; PA14; PA29; PA29; PA57; PA67; PB02; PB07; PB09;
PB12; PB38; PC11; PC60; PC97; PC98;
M[20P]-458: PA10; PA11; PA11; PA13; PA13; PA18; PA21; PA26; PA33; PA57; PA75; PA98; PB12; PB33;
PB33; PB38; PB82; PC20; PC55; PC73;
35 M[20P]-459: PA00; PA06; PA21; PA26; PA26; PA29; PA33; PA75; PB10; PB10; PB12; PB18; PB32; PB85;
PC20; PC24; PC49; PC55; PC66; PC98;
M[20P]-461: PA06; PA21; PA29; PA29; PA33; PA33; PA39; PA57; PA67; PB07; PB07; PB12; PB26; PB32;
PB32; PB85; PC20; PC27; PC52; PC58;
M[20P]-465: PA11; PA11; PA13; PA16; PA21; PA22; PA27; PA29; PA33; PA69; PB07; PB26; PB28; PB32;
40 PB77; PB88; PB88; PC23; PC60; PC73;
M[20P]-467: PA00; PA06; PA21; PA21; PA23; PA26; PA33; PA33; PA40; PA67; PB12; PB38; PB88; PC11;
PC23; PC23; PC27; PC55; PC71; PC97;
M[20P]-469: PA00; PA12; PA13; PA13; PA13; PA21; PA29; PA33; PA33; PA34; PA57; PB07; PC11; PC11;
PC20; PC23; PC23; PC55; PC74; PC97;
45 M[20P]-470: PA13; PA14; PA21; PA21; PA22; PA23; PA24; PA24; PA27; PA29; PA33; PA67; PA75; PB07;
PB07; PB33; PB33; PB77; PC37; PC52;
M[20P]-472: PA10; PA10; PA11; PA13; PA21; PA25; PA25; PA28; PA33; PA39; PB07; PB12; PB88; PC12;
PC12; PC20; PC20; PC24; PC55; PC71;
M[20P]-474: PA00; PA13; PA20; PA21; PA26; PA28; PA29; PA33; PA57; PA67; PA81; PA81; PA98; PB02;
50 PB12; PB38; PB60; PB88; PC11; PC20;
M[20P]-475: PA11; PA12; PA12; PA13; PA28; PA28; PA29; PA29; PA32; PA52; PA52; PA75; PA81; PB12;
PB20; PB33; PB60; PC21; PC49; PC51;

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

46

M[20P]-478: PA15; PA16; PA21; PA21; PA21; PA23; PA25; PA32; PA34; PA39; PB12; PB77; PB85; PB88;
PB88; PB88; PB88; PC11; PC33; PC37;
M[20P]-479: PA10; PA11; PA13; PA13; PA18; PA20; PA21; PA28; PA32; PA40; PA67; PA69; PB07; PB07;
PB10; PB12; PB20; PC55; PC60; PC98;
5 M[20P]-480: PA00; PA06; PA13; PA22; PA23; PA26; PA26; PA27; PA29; PA40; PA81; PB07; PB10; PB10;
PB12; PB12; PB18; PB32; PC49; PC71;
M[20P]-481: PA11; PA13; PA26; PA29; PA29; PA35; PA69; PA75; PA75; PB02; PB12; PB33; PC20; PC23;
PC23; PC37; PC41; PC50; PC52; PC98;
M[20P]-482: PA06; PA10; PA11; PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA25; PA26; PA28;
10 PA39; PA67; PB12; PC11; PC24; PC74;
M[20P]-484: PA11; PA13; PA23; PA28; PA29; PA29; PA35; PA39; PA40; PA60; PA75; PA98; PB02; PB12;
PB38; PB38; PB82; PC20; PC35; PC50;
M[20P]-485: PA13; PA14; PA14; PA21; PA21; PA26; PA26; PA26; PA26; PA29; PA29; PA52; PA57;
PB00; PC11; PC11; PC21; PC51; PC67;
15 M[20P]-486: PA11; PA13; PA23; PA24; PA35; PA35; PA35; PA69; PA69; PA75; PB07; PB12; PB27; PC20;
PC20; PC21; PC23; PC50; PC55; PC73;
M[20P]-490: PA10; PA11; PA11; PA14; PA21; PA24; PA26; PA26; PA39; PA40; PA69; PA75; PB00; PB01;
PB12; PB12; PB18; PB28; PB60; PC20;
M[20P]-493: PA06; PA14; PA20; PA21; PA21; PA28; PA29; PA33; PA69; PA81; PA98; PB12; PB38; PB60;
20 PC11; PC12; PC49; PC55; PC71; PD02;
M[20P]-494: PA06; PA10; PA11; PA11; PA13; PA13; PA15; PA23; PA26; PA35; PB01; PB12; PB60; PC12;
PC20; PC37; PC41; PC49; PC49; PC52;
M[20P]-495: PA10; PA10; PA13; PA14; PA18; PA20; PA21; PA26; PA29; PA29; PA57; PB02; PC11; PC11;
PC20; PC20; PC24; PC33; PC49; PC49;
25 M[20P]-496: PA00; PA18; PA21; PA24; PA26; PA27; PA29; PA39; PA39; PA52; PA69; PA70; PA98; PB00;
PB02; PB12; PC12; PC24; PC55; PC67;
M[20P]-497: PA11; PA11; PA13; PA13; PA15; PA21; PA23; PA24; PA25; PA26; PA28; PA39; PA52; PA67;
PB00; PB12; PB27; PB28; PC12; PC37;
M[20P]-499: PA13; PA21; PA21; PA21; PA29; PA30; PA69; PA75; PB07; PB07; PB07; PB60; PC20; PC20;
30 PC21; PC37; PC37; PC49; PC55; PD02;
M[20P]-503: PA06; PA06; PA10; PA10; PA13; PA13; PA20; PA21; PA25; PA26; PA29; PA33; PA39; PA70;
PB28; PC11; PC20; PC23; PC49; PC97;
M[20P]-506: PA11; PA16; PA21; PA23; PA29; PA39; PA57; PB12; PB27; PB32; PB88; PB88; PB88; PC12;
PC20; PC21; PC37; PC71; PD02; PD02;
35 M[20P]-510: PA13; PA21; PA25; PA26; PA27; PA33; PA39; PA40; PA69; PA81; PB01; PB28; PB60; PB85;
PB88; PC27; PC41; PC41; PC50; PC55;
M[20P]-514: PA11; PA12; PA13; PA13; PA21; PA21; PA28; PA29; PA33; PA35; PA39; PA40; PA40; PA67;
PA67; PB12; PC14; PC20; PC41; PC55;
M[20P]-516: PA07; PA10; PA13; PA14; PA17; PA21; PA28; PA29; PA39; PA40; PA40; PA69; PB07; PB12;
40 PC21; PC21; PC27; PC37; PD02; PD02;
M[20P]-520: PA11; PA11; PA12; PA13; PA14; PA15; PA29; PA33; PA33; PA57; PA67; PA70; PA98; PB12;
PC20; PC23; PC33; PC52; PC55; PD02;
M[20P]-523: PA10; PA11; PA18; PA20; PA21; PA33; PA39; PA67; PA67; PA69; PB07; PB12; PB28; PB88;
PB88; PC21; PC33; PC35; PC49; PC50;
45 M[20P]-524: PA00; PA11; PA11; PA12; PA13; PA20; PA29; PA40; PB07; PB12; PB28; PB38; PB60; PB60;
PB77; PC20; PC20; PC49; PC49; PC98;
M[20P]-525: PA11; PA11; PA13; PA15; PA21; PA26; PA26; PA27; PA28; PA29; PA29; PA30; PA40; PA52;
PA75; PB07; PB07; PC11; PC33; PC37;
M[20P]-527: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08;
50 PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
M[20P]-532: PA14; PA20; PA20; PA21; PA22; PA25; PA26; PA27; PA28; PA29; PA33; PA40; PA75; PB00;
PB12; PB12; PB60; PB85; PC12; PC51;

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

47

M[20P]-533: PA13; PA21; PA26; PA27; PA27; PA28; PA32; PA60; PA70; PA75; PB18; PB32; PB38; PC23;
PC41; PC50; PC50; PC51; PC52; PC97;
M[20P]-535: PA11; PA21; PA26; PA28; PA29; PA29; PA29; PA34; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB33;
PB60; PC20; PC20; PC51; PC55; PC67;
5 M[20P]-536: PA00; PA10; PA11; PA12; PA12; PA13; PA14; PA23; PA29; PA29; PA35; PA40; PA81; PB07;
PB07; PB12; PB27; PB33; PB60; PC20;
M[20P]-538: PA21; PA23; PA25; PA26; PA27; PA28; PA75; PB07; PB12; PB27; PB32; PB88; PC11; PC11;
PC12; PC20; PC33; PC49; PC55; PC97;
M[20P]-541: PA10; PA11; PA13; PA20; PA24; PA28; PA29; PA67; PA70; PB10; PB12; PB77; PC20; PC20;
10 PC23; PC41; PC51; PC52; PC52; PC97;
M[20P]-548: PA10; PA13; PA14; PA14; PA22; PA27; PA27; PA28; PA29; PA29; PA33; PA39; PB10; PB12;
PB60; PB88; PC20; PC37; PC50; PC55;
M[20P]-551: PA12; PA13; PA13; PA20; PA22; PA23; PA24; PA24; PA26; PA33; PA33; PA39; PA67; PB07;
PB07; PB12; PB33; PC20; PC55; PC98;
15 M[20P]-552: PA06; PA11; PA11; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA21; PA21; PA24; PA35; PB00; PB02;
PB12; PB60; PB60; PC12; PC21; PC98;
M[20P]-555: PA00; PA10; PA11; PA18; PA20; PA20; PA21; PA25; PA26; PA26; PA39; PA39; PA39; PA89;
PB12; PB12; PC20; PC20; PC49; PC74;
M[20P]-557: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11;
20 PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
M[20P]-559: PA00; PA11; PA12; PA13; PA20; PA22; PA24; PA25; PA25; PA26; PA28; PA57; PA70; PA70;
PB07; PB12; PB88; PB88; PC11; PC60;
M[20P]-560: PA10; PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA25; PA28; PA28; PA29; PA67; PB12; PB38;
PB60; PC24; PC35; PC41; PC51; PC97;
25 M[20P]-563: PA12; PA13; PA20; PA20; PA21; PA24; PA25; PA25; PA29; PA29; PA33; PA81; PB33; PB60;
PB60; PB88; PB88; PB88; PC11; PC41;
M[20P]-564: PA07; PA13; PA13; PA21; PA26; PA37; PA39; PA67; PA67; PB02; PB07; PB07; PB12; PB12;
PB28; PC12; PC37; PC97; PC97; PC97;
M[20P]-565: PA07; PA11; PA13; PA20; PA29; PA29; PA32; PA75; PA95; PA98; PB02; PB12; PB32; PB33;
30 PB60; PB85; PC20; PC24; PC35; PC41;
M[20P]-567: PA10; PA13; PA14; PA16; PA21; PA26; PA28; PA75; PA81; PB07; PB07; PB12; PB88; PC23;
PC24; PC24; PC33; PC52; PC55; PC67;
M[20P]-569: PA13; PA14; PA21; PA26; PA27; PA39; PA57; PA67; PB02; PB07; PB12; PB28; PC12; PC21;
PC49; PC55; PC55; PC67; PC67; PC98;
35 M[20P]-572: PA13; PA14; PA21; PA27; PA29; PA33; PA67; PA69; PA79; PB00; PB01; PB12; PB33; PB38;
PC37; PC41; PC49; PC51; PC55; PD02;
M[20P]-573: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12;
PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
M[20P]-574: PA13; PA21; PA22; PA23; PA25; PA29; PA35; PA67; PB01; PB12; PB12; PB35; PB88; PC24;
40 PC37; PC37; PC51; PC52; PC52; PC66;
M[20P]-575: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12;
PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
M[20P]-576: PA11; PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12;
PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;
45 M[20P]-577: PA06; PA13; PA13; PA14; PA22; PA22; PA23; PA26; PA28; PA69; PA70; PB07; PB12; PB12;
PB32; PC12; PC20; PC24; PC24; PC98;
M[20P]-579: PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA26; PA26; PA28; PA57; PA81; PB02; PB07; PB12; PC11;
PC12; PC20; PC51; PC55; PD02; PD02;
M[20P]-580: PA00; PA11; PA12; PA13; PA20; PA21; PA21; PA25; PA26; PA26; PA33; PA75; PA75; PA75;
50 PB28; PB88; PC20; PC76; PC98; PC98;
M[20P]-581: PA10; PA11; PA13; PA21; PA22; PA25; PA29; PA67; PB07; PB60; PB88; PB88; PC20; PC21;
PC24; PC37; PC41; PC55; PC66; PC98;

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

48

M[20P]-582: PA10; PA11; PA12; PA13; PA20; PA21; PA23; PA25; PA39; PA75; PB07; PB07; PB38; PB38;
PB60; PB60; PC20; PC24; PC41; PC66;
M[20P]-583: PA11; PA13; PA14; PA23; PA25; PA25; PA26; PA26; PA28; PA67; PB12; PB18; PB88; PC24;
PC24; PC37; PC41; PC49; PC55; PC60;
5 M[20P]-584: PA00; PA14; PA21; PA26; PA26; PA28; PA39; PA39; PA67; PA75; PB12; PB12; PB27; PB33;
PB60; PC11; PC41; PC49; PC55; PC97;
M[20P]-588: PA07; PA13; PA14; PA21; PA26; PA26; PA26; PA26; PA32; PA67; PA67; PA75; PB12; PB27;
PB33; PB60; PC20; PC20; PC23; PC24;
M[20P]-589: PA13; PA13; PA22; PA25; PA25; PA27; PA29; PA29; PA35; PA39; PA52; PA75; PB12; PB32;
10 PB38; PB85; PB88; PC11; PC23; PC98;
M[20P]-590: PA11; PA13; PA13; PA14; PA25; PA29; PA33; PA35; PA35; PA35; PA39; PB02; PB12; PC11;
PC20; PC20; PC21; PC27; PC55; PC55;
M[20P]-592: PA10; PA10; PA11; PA11; PA13; PA14; PA21; PA21; PA26; PA26; PA27; PA29; PA30; PA75;
PB07; PB07; PB12; PB38; PC20; PC24;
15 M[20P]-594: PA13; PA21; PA21; PA23; PA27; PA28; PA39; PA60; PA69; PA70; PB02; PB09; PB12;
PB12; PB88; PC24; PC49; PC97; PC98;
M[20P]-595: PA11; PA13; PA22; PA23; PA25; PA28; PA28; PA28; PA29; PA29; PA39; PA67; PA69; PB12;
PB60; PC12; PC20; PC24; PC49; PC55;
M[20P]-596: PA11; PA11; PA13; PA13; PA14; PA21; PA22; PA23; PA26; PA26; PA67; PB12; PB60; PC11;
20 PC20; PC20; PC37; PC50; PC55; PC60;
M[20P]-599: PA13; PA13; PA14; PA16; PA26; PA29; PA75; PA75; PB07; PB12; PB60; PB60; PB60; PB60;
PC12; PC20; PC20; PC37; PC37; PC52;
M[20P]-601: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA23; PA26; PA29; PA29; PA35; PB02; PB10; PB12; PB33;
PC20; PC21; PC41; PC49; PC60; PC67;
25 M[20P]-602: PA00; PA10; PA10; PA14; PA14; PA14; PA21; PA25; PA26; PA29; PA29; PB07; PB07; PB07;
PB12; PB12; PC20; PC52; PC55; PD02;
M[20P]-603: PA11; PA13; PA16; PA20; PA21; PA23; PA23; PA26; PA26; PA28; PA33; PA39; PA39; PA67;
PB60; PB60; PC20; PC23; PC49; PC55;
M[20P]-604: PA10; PA13; PA14; PA14; PA18; PA21; PA22; PA23; PA26; PA28; PA28; PA29; PB12; PB33;
30 PC11; PC11; PC51; PC51; PC60; PC71;
M[20P]-605: PA11; PA11; PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA20; PA25; PA29; PA39; PA39; PA69; PA81;
PB07; PB12; PB88; PC20; PC41; PC55;
M[20P]-607: PA10; PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA22; PA22; PA26; PA33; PA35; PA75; PA75; PA81;
PB12; PB88; PC20; PC49; PC55; PC97;
35 M[20P]-608: PA00; PA13; PA13; PA13; PA18; PA26; PA27; PA29; PA35; PA57; PA69; PA75; PA98; PB12;
PB60; PC11; PC20; PC20; PC55; PC60;
M[20P]-609: PA11; PA14; PA21; PA22; PA23; PA26; PA34; PA52; PA67; PA69; PA69; PB07; PB12; PB12;
PB27; PB77; PC12; PC20; PC55; PC97;
M[20P]-612: PA11; PA13; PA14; PA14; PA14; PA21; PA22; PA23; PA52; PA81; PB00; PB07; PB12; PB33;
40 PB38; PB60; PC12; PC24; PC33; PC37;
M[20P]-613: PA10; PA13; PA13; PA14; PA21; PA21; PA22; PA23; PA26; PA28; PA28; PA29; PB12; PB12;
PB27; PB60; PC20; PC21; PC21; PC60;
M[20P]-616: PA13; PA26; PA28; PA29; PA39; PA57; PA67; PB07; PB12; PB38; PB60; PB77; PB77; PB88;
PC33; PC49; PC52; PC52; PC98; PC98;
45 M[20P]-618: PA11; PA12; PA13; PA13; PA14; PA20; PA21; PA22; PA23; PA26; PA29; PA67; PA79; PB88;
PC11; PC20; PC20; PC37; PC41; PC55;
M[20P]-620: PA12; PA13; PA20; PA22; PA22; PA23; PA26; PA26; PA28; PA39; PA69; PA95; PB12; PB60;
PB77; PC20; PC21; PC52; PC60; PC98;
M[20P]-621: PA10; PA13; PA14; PA24; PA24; PA26; PA27; PA29; PA32; PA35; PA67; PB12; PB12; PB12;
50 PB27; PB33; PB33; PB38; PB38; PB38;
M[20P]-622: PA10; PA12; PA14; PA14; PA15; PA20; PA21; PA26; PA27; PA32; PA40; PB10; PB12; PB12;
PB88; PC20; PC20; PC21; PC52; PC60;

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

49

M[20P]-623: PA10; PA11; PA13; PA14; PA20; PA24; PA25; PA26; PA26; PA28; PA39; PA81; PB09; PB12; PB28; PB88; PC24; PC41; PC52; PC98;
M[20P]-626: PA11; PA11; PA13; PA13; PA20; PA21; PA21; PA25; PA27; PA27; PA28; PA39; PA39; PA40; PA57; PB12; PB60; PC20; PC37; PC41;
5 M[20P]-631: PA10; PA13; PA20; PA21; PA21; PA23; PA23; PA26; PA29; PA39; PA39; PA67; PB10; PB38; PB60; PC11; PC20; PC37; PC49; PC66;
M[20P]-632: PA10; PA11; PA18; PA21; PA22; PA23; PA28; PA29; PA33; PA34; PA69; PB07; PB12; PB60; PC20; PC20; PC20; PC37; PC41; PC55;
M[20P]-633: PA10; PA11; PA11; PA13; PA20; PA34; PA39; PB00; PB07; PB12; PB12; PB60; PB88; PB88; 10 PC11; PC12; PC23; PC35; PC49; PC52;
M[20P]-634: PA13; PA13; PA13; PA21; PA22; PA22; PA25; PA25; PA28; PA28; PA29; PA67; PA81; PB00; PB12; PB12; PB27; PB33; PC11; PC98;
M[20P]-635: PA00; PA14; PA17; PA20; PA21; PA23; PA26; PA27; PA75; PA81; PB00; PB12; PB82; PC11; PC20; PC26; PC51; PC52; PC55; PC71;
15 M[20P]-638: PA00; PA14; PA17; PA21; PA22; PA24; PA28; PA33; PA52; PA57; PA75; PB00; PB07; PB12; PB28; PB88; PC20; PC37; PC41; PC97;
M[20P]-649: PA06; PA10; PA11; PA12; PA13; PA15; PA16; PA20; PA24; PA30; PA33; PA98; PB10; PB12; PB28; PB32; PB60; PC11; PC20; PC66;
M[20P]-654: PA00; PA11; PA15; PA20; PA21; PA26; PA32; PA34; PA35; PA39; PA57; PB10; PB12; PB18; 20 PC11; PC20; PC21; PC50; PC55; PC66;
M[20P]-655: PA11; PA13; PA14; PA20; PA22; PA26; PA28; PA30; PA40; PA52; PA57; PA81; PB12; PB32; PB85; PC41; PC50; PC55; PC66; PC71;
M[20P]-658: PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA15; PA17; PA20; PA21; PA28; PA29; PA52; PA67; PB10; PB12; PB18; PB60; PC20; PC41; PC66;
25 M[20P]-659: PA00; PA11; PA21; PA22; PA24; PA26; PA27; PA28; PA29; PA33; PA35; PA81; PB07; PB12; PB18; PB28; PB85; PC37; PC49; PC74;
M[20P]-663: PA06; PA13; PA20; PA25; PA26; PA27; PA28; PA40; PA67; PA81; PB00; PB12; PB18; PB33; PB61; PC20; PC24; PC37; PC41; PC52;
M[20P]-666: PA06; PA13; PA21; PA23; PA27; PA28; PA30; PA40; PA75; PB00; PB07; PB10; PB12; PB18; 30 PB28; PB33; PC20; PC49; PC52; PC71;
M[20P]-668: PA10; PA16; PA17; PA21; PA24; PA27; PA28; PA33; PA40; PA57; PA75; PA79; PB07; PB08; PB12; PB33; PB88; PC20; PC35; PC97;
M[20P]-670: PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA23; PA27; PA28; PA35; PA39; PA67; PA79; PA81; PA89; PB10; PB12; PB18; PC20; PC21; PC51;
35 M[20P]-678: PA06; PA11; PA12; PA13; PA21; PA23; PA29; PA35; PA39; PA40; PB00; PB07; PB10; PB12; PB33; PB60; PB77; PC11; PC67; PC76;
M[20P]-681: PA07; PA10; PA11; PA21; PA24; PA26; PA30; PA35; PA39; PA57; PA75; PB07; PB12; PB28; PB88; PC11; PC49; PC55; PC58; PC66;
M[20P]-686: PA00; PA10; PA13; PA22; PA24; PA27; PA28; PA33; PA39; PA40; PA69; PB12; PB32; PB38; 40 PB85; PB88; PC20; PC55; PC60; PC66;
M[20P]-692: PA07; PA10; PA13; PA21; PA22; PA26; PA34; PA39; PA40; PA81; PB12; PB18; PB32; PB33; PB88; PC35; PC37; PC52; PC55; PC76;
M[20P]-694: PA07; PA11; PA13; PA14; PA15; PA16; PA21; PA27; PA28; PA29; PA35; PA39; PA40; PA75; PB12; PB33; PB88; PC50; PC51; PC52;
45 M[20P]-697: PA00; PA13; PA16; PA19; PA21; PA22; PA25; PA27; PA28; PA39; PA79; PA81; PB00; PB12; PB32; PB60; PB99; PC51; PC58; PC76;
M[20P]-703: PA00; PA13; PA14; PA15; PA24; PA26; PA33; PA35; PA52; PA75; PA81; PB07; PB12; PB28; PB85; PC20; PC21; PC35; PC41; PD02;
M[20P]-705: PA11; PA13; PA30; PA33; PA40; PA67; PA75; PB07; PB12; PB28; PB35; PB88; PC20; PC21; 50 PC24; PC35; PC37; PC41; PC50; PC55;
M[20P]-708: PA07; PA13; PA23; PA25; PA27; PA29; PA30; PA33; PA52; PA57; PA75; PB00; PB08; PB12; PB38; PB60; PB77; PC50; PC76; PD02;

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

50

M[20P]-709: PA11; PA13; PA17; PA20; PA21; PA23; PA26; PA27; PA28; PA40; PA69; PA81; PA92; PB00; PB07; PB12; PC20; PC41; PC52; PC66;
M[20P]-712: PA12; PA13; PA15; PA20; PA22; PA26; PA27; PA29; PA35; PA52; PA81; PB07; PB10; PB12; PB33; PB88; PC11; PC20; PC41; PC52;
5 M[20P]-714: PA07; PA10; PA11; PA16; PA21; PA26; PA33; PA40; PA67; PA81; PA98; PB00; PB07; PB12; PB28; PC11; PC41; PC49; PC50; PC98;
M[20P]-716: PA11; PA13; PA15; PA19; PA22; PA26; PA33; PA37; PA39; PA57; PB07; PB12; PB28; PB33; PB88; PB99; PC14; PC23; PC35; PC67;
M[20P]-718: PA12; PA13; PA15; PA16; PA20; PA22; PA25; PA26; PA39; PA40; PA92; PB07; PB12; PB27; PB35; PB38; PB99; PC11; PC27; PC41;
10 M[20P]-721: PA19; PA20; PA21; PA24; PA25; PA27; PA29; PA30; PA55; PA57; PB12; PB32; PB58; PB60; PB88; PB99; PC41; PC50; PC60; PC67;
M[20P]-723: PA12; PA13; PA16; PA17; PA21; PA28; PA29; PA33; PA34; PA40; PA60; PA89; PB28; PB60; PB61; PC14; PC24; PC41; PC51; PC74;
15 M[20P]-724: PA13; PA23; PA25; PA35; PA57; PA67; PB07; PB12; PB32; PB33; PB88; PB99; PC12; PC20; PC23; PC49; PC50; PC66; PC94;
M[20P]-725: PA00; PA13; PA14; PA20; PA22; PA25; PA26; PA28; PA33; PA40; PA57; PA81; PB12; PB16; PB33; PB88; PC11; PC24; PC51; PC74;
M[20P]-733: PA11; PA13; PA15; PA21; PA28; PA30; PA33; PA40; PB12; PB32; PB33; PB99; PC11; PC12; PC20; PC60; PC73; PC74; PC94; PD02;
20 M[20P]-737: PA00; PA11; PA13; PA15; PA17; PA21; PA24; PA28; PA29; PA30; PA67; PB07; PB27; PB28; PB77; PC20; PC21; PC41; PC51; PC94;
M[20P]-740: PA11; PA13; PA14; PA15; PA22; PA23; PA28; PA33; PA39; PA57; PA75; PA89; PB02; PB12; PB28; PB33; PC12; PC21; PC24; PC55;
25 M[20P]-745: PA11; PA21; PA22; PA24; PA26; PA27; PA28; PA29; PA57; PA89; PB07; PB12; PB28; PB33; PC08; PC11; PC41; PC66; PC67; PC98;
M[20P]-746: PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA33; PA39; PA40; PA81; PB06; PB07; PB12; PB32; PB60; PC20; PC21; PC24; PC37; PC50; PC55;
M[20P]-748: PA11; PA13; PA14; PA17; PA23; PA26; PA32; PA57; PA60; PA81; PB07; PB12; PB28; PB32; PB33; PB85; PB99; PC20; PC21; PC35;
30 M[20P]-752: PA11; PA13; PA18; PA26; PA28; PA29; PA33; PA35; PA39; PA67; PA75; PB07; PB12; PB32; PB88; PB99; PC12; PC50; PC54; PC62;
M[20P]-753: PA11; PA12; PA13; PA14; PA15; PA29; PA32; PA40; PA57; PA81; PB00; PB12; PB33; PB60; PC20; PC21; PC49; PC52; PC66; PD02;
35 M[20P]-757: PA11; PA13; PA21; PA22; PA23; PA27; PA34; PA35; PA40; PA57; PA67; PB10; PB12; PB22; PB58; PC11; PC14; PC23; PC55; PC98;
M[20P]-758: PA10; PA11; PA13; PA20; PA21; PA23; PA28; PA29; PA30; PA40; PA69; PA75; PA81; PB12; PC06; PC20; PC41; PC52; PC57; PC74;
M[20P]-764: PA11; PA13; PA22; PA29; PA35; PA40; PA57; PA73; PA75; PA81; PB08; PB12; PB33; PB82; PC11; PC20; PC21; PC29; PC41; PC52;
40 M[20P]-765: PA10; PA11; PA13; PA15; PA26; PA27; PA30; PA35; PA40; PA89; PB12; PB22; PB58; PB60; PC34; PC37; PC55; PC58; PC67; PD02;
M[20P]-766: PA11; PA13; PA17; PA22; PA24; PA25; PA29; PA30; PA33; PA34; PA35; PA81; PA92; PB00; PB12; PB82; PC24; PC50; PC74; PC97;
45 M[20P]-767: PA11; PA21; PA22; PA28; PA29; PA33; PA37; PB12; PB60; PB85; PB88; PB99; PC14; PC20; PC21; PC41; PC51; PC55; PC57; PC98;
M[20P]-771: PA10; PA11; PA13; PA14; PA22; PA26; PA27; PA28; PA29; PA35; PA86; PA89; PB07; PB12; PB28; PB88; PB99; PC12; PC21; PC50;
M[20P]-777: PA11; PA14; PA15; PA20; PA21; PA24; PA25; PA28; PA29; PA33; PA75; PB12; PB85; PB99; PC21; PC51; PC55; PC62; PC67; PD02;
50 M[20P]-779: PA15; PA19; PA20; PA21; PA22; PA23; PA24; PA25; PA29; PA30; PA57; PA67; PA75; PA89; PB07; PB12; PB32; PC20; PC51; PC74;

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

51

M[20P]-781: PA10; PA15; PA21; PA22; PA39; PA57; PA75; PB08; PB09; PB12; PB28; PB35; PB58; PB60; PC12; PC33; PC37; PC66; PC67; PC74;
M[20P]-782: PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA26; PA30; PA75; PA89; PA92; PB05; PB07; PB12; PB32; PB82; PB99; PC51; PC58; PC73;
5 M[20P]-785: PA16; PA17; PA21; PA28; PA29; PA30; PA32; PA33; PA55; PB07; PB12; PB77; PB85; PB88; PB99; PC12; PC20; PC35; PC67; PC98;
M[20P]-786: PA11; PA13; PA14; PA18; PA19; PA21; PA22; PA27; PA28; PA29; PA33; PA40; PA52; PA57; PA81; PB28; PC11; PC20; PC21; PC50;
M[20P]-787: PA10; PA11; PA13; PA22; PA23; PA35; PB07; PB12; PB22; PB85; PB99; PC11; PC20; PC41; PC49; PC52; PC53; PC55; PC73; PD02;
10 M[20P]-789: PA10; PA11; PA13; PA22; PA23; PA27; PA40; PA57; PA75; PA81; PB07; PB12; PB27; PB60; PB88; PC11; PC20; PC23; PC35; PC41;
M[20P]-791: PA10; PA11; PA13; PA15; PA21; PA33; PA35; PA40; PA57; PA69; PA85; PA98; PA99; PB07; PB12; PB20; PB99; PC12; PC20; PC58;
15 M[20P]-793: PA11; PA13; PA14; PA15; PA19; PA26; PA29; PA55; PA67; PA89; PB12; PB33; PB88; PC14; PC20; PC21; PC34; PC37; PC67; PC97;
M[20P]-794: PA21; PA23; PA28; PA29; PA34; PA35; PA57; PA75; PA81; PB07; PB12; PB18; PB32; PB58; PC11; PC14; PC41; PC55; PC62; PC74;
M[20P]-795: PA10; PA13; PA20; PA23; PA27; PA29; PA57; PA60; PA69; PB00; PB07; PB12; PB18; PB32; PB85; PB88; PC20; PC66; PC74; PD02;
20 M[20P]-803: PA11; PA13; PA15; PA22; PA25; PA26; PA29; PA30; PA33; PA40; PA75; PB07; PB12; PB28; PC21; PC23; PC34; PC55; PC71; PC73;
M[20P]-804: PA11; PA12; PA13; PA20; PA22; PA23; PA30; PA33; PA34; PA79; PB12; PB18; PB58; PB60; PB85; PB88; PC20; PC50; PC67; PC68;
25 M[20P]-806: PA06; PA10; PA11; PA13; PA19; PA20; PA21; PA23; PA25; PA28; PA52; PA73; PA75; PA98; PB12; PB33; PB82; PB85; PB88; PC11;
M[20P]-816: PA11; PA13; PA19; PA25; PA28; PA29; PA33; PA57; PA81; PA89; PB00; PB10; PB12; PB26; PB28; PB99; PC11; PC12; PC76; PC97;
M[20P]-819: PA10; PA11; PA13; PA15; PA26; PA34; PA60; PA81; PA92; PB07; PB12; PB38; PB85; PC01; PC14; PC20; PC52; PC58; PC66; PC67;
30 M[20P]-823: PA00; PA11; PA12; PA13; PA14; PA17; PA27; PA29; PA40; PA60; PA75; PA79; PA89; PB07; PB12; PB99; PC20; PC52; PC66; PC71;
M[20P]-830: PA13; PA20; PA25; PA26; PA28; PA40; PA75; PA89; PB00; PB07; PB12; PB32; PB88; PC06; PC12; PC20; PC41; PC52; PC76; PC98;
35 M[20P]-831: PA11; PA15; PA21; PA25; PA33; PB12; PB28; PB32; PB33; PB38; PB60; PB77; PB88; PC20; PC23; PC35; PC37; PC49; PC58; PC66;
M[20P]-841: PA10; PA11; PA13; PA18; PA22; PA28; PA29; PA30; PA35; PA40; PA55; PA75; PB07; PB12; PB28; PB32; PB33; PC41; PC49; PC60;
M[20P]-844: PA11; PA15; PA21; PA24; PA26; PA29; PA33; PA40; PA69; PA81; PA98; PB12; PB28; PB61; PC49; PC67; PC71; PC73; PC74; PD02;
40 M[20P]-845: PA11; PA13; PA14; PA15; PA21; PA30; PA34; PA39; PA60; PA79; PA81; PA89; PB07; PB18; PC14; PC20; PC21; PC34; PC68; PC97;
M[20P]-846: PA11; PA13; PA25; PA27; PA29; PA32; PA33; PA35; PA37; PA39; PA40; PB08; PB12; PB33; PB88; PC24; PC41; PC52; PC58; PC62;
45 M[20P]-847: PA10; PA19; PA20; PA21; PA28; PA29; PA30; PA67; PA75; PA89; PB00; PB12; PB28; PB33; PB60; PC12; PC55; PC73; PC74; PD02;
M[20P]-848: PA07; PA11; PA13; PA15; PA20; PA22; PA26; PA27; PA30; PA40; PA69; PA75; PB12; PB32; PB85; PB88; PC34; PC37; PC66; PC68;
M[20P]-849: PA00; PA13; PA25; PA27; PA28; PA29; PA34; PA40; PA57; PA81; PB00; PB12; PB18; PB77; PC20; PC24; PC35; PC41; PC50; PC51;
50 M[20P]-852: PA00; PA11; PA13; PA15; PA19; PA22; PA26; PA35; PA89; PB00; PB12; PB58; PB77; PC12; PC20; PC29; PC62; PC71; PC94; PC98;

M[20P]-853: PA00; PA11; PA21; PA24; PA25; PA33; PA57; PA60; PB07; PB12; PB28; PB32; PB60; PB82; PB88; PC24; PC41; PC50; PC51; PC58;

M[20P]-857: PA00; PA11; PA13; PA26; PA28; PA75; PA76; PA79; PB12; PB28; PB60; PB88; PC11; PC12; PC20; PC37; PC50; PC52; PC67; PD02;

5 M[20P]-873: PA10; PA13; PA26; PA27; PA30; PA34; PA85; PA98; PB05; PB07; PB12; PB28; PB29; PB32; PB60; PC14; PC20; PC26; PC41; PC76;

M[20P]-880: PA11; PA13; PA17; PA20; PA22; PA24; PA26; PA27; PA29; PA38; PA57; PB07; PB12; PB20; PB29; PB97; PC24; PC37; PC51; PC71;

10 M[20P]-888: PA10; PA12; PA15; PA16; PA21; PA27; PA28; PA33; PA44; PB00; PB12; PB13; PB27; PC11; PC20; PC51; PC58; PC73; PC75; PD02;

M[20P]-890: PA00; PA11; PA13; PA15; PA16; PA25; PA34; PA75; PA82; PA86; PB00; PB12; PB16; PB27; PB33; PC20; PC49; PC50; PC57; PC98;

M[20P]-894: PA12; PA18; PA21; PA24; PA26; PA27; PA34; PA57; PA67; PA82; PB01; PB12; PB33; PB76; PB98; PB99; PC11; PC24; PC33; PC83;

15 M[20P]-902: PA12; PA13; PA21; PA26; PA29; PA39; PA40; PA57; PA96; PB00; PB07; PB12; PB27; PC20; PC50; PC53; PC61; PC62; PC75; PC94;

M[20P]-904: PA06; PA13; PA20; PA23; PA25; PA27; PA35; PA46; PA52; PA60; PA81; PA90; PA97; PB03; PB12; PB57; PB99; PC20; PC52; PC73;

20 M[20P]-907: PA00; PA07; PA14; PA21; PA24; PA25; PA45; PA75; PA83; PA97; PB12; PB26; PB32; PB60; PB92; PC06; PC20; PC35; PC37; PD02;

M[20P]-909: PA12; PA14; PA20; PA21; PA29; PA39; PA72; PA93; PB12; PB22; PB28; PB32; PC21; PC23; PC24; PC41; PC52; PC73; PC79; PD02.

25 Notă: dacă în listele anterioare și în următoarele liste analoge un cod al unei plante apare de mai multe ori în aceeași compoziție din plante, înseamnă că s-a utilizat mai mult de o lingură calibrată din planta uscată măcinată corespunzătoare.

Pornind de la compozițiile din plante enumerate în Lista 6-3, extractele de apă corespunzătoare (sau probele prelucrate) au fost preparate în conformitate cu metoda B descrisă anterior, utilizând 40 ml de apă conținând 100 g/l de zaharoză pentru extracția apei și incluzând etapa de decantare înainte de filtrare.

30 Activitatea biologică a fiecărei probe prelucrate a fost determinată în conformitate cu metoda C descrisă anterior prin utilizarea următoarelor tulpini de *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923, ATCC 49476, ATCC 6538, ATCC 51740, ATCC 29213 și ATCC 14775, cu următoarele diluții finale ale probelor prelucrate: 1:20, 1:63 și 1:200.

35 Media procentului de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor și media procentului de inhibare a formării biofilmului pentru toate tulpinile testate pentru probele prelucrate obținute din compozițiile din plante care includ cele 2 plante din Mix[2P]-1 la diluția 1:20 sunt prezentate în Tabelul 5-1.

40 **Tabelul 5-1: media procentului de inhibare a creșterii planctonice și a procentului de inhibare a formării biofilmului pe cele 6 tulpini de *Staphylococcus aureus* testate pentru proba prelucrată pe baza Mix[2P]-1 la diluția 1:20. (A) Extracte din amestecuri care prezintă o activitate antimicrobiană și antibiofilm mai mare. (B) Extracte din amestecuri care prezintă activitate antibiofilm și activitate antimicrobiană echivalentă sau mai scăzută. (C) Extracte din amestecuri care prezintă activitate antimicrobiană și activitate antibiofilm echivalentă sau mai scăzută**

(A)	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[2P]-1	22%	36%
M[20P]-563	26%	40%
M[20P]-495	25%	43%
M[20P]-631	27%	42%
M[20P]-465	24%	50%

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

53

(A)	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
M[20P]-408	26%	50%
M[09P]-8	31%	48%
M[19P]-13	31%	50%
M[18P]-12	40%	50%
M[20P]-581	40%	50%
M[20P]-469	40%	55%
M[20P]-485	43%	52%
M[20P]-427	37%	66%
M[20P]-582	51%	54%
M[20P]-431	44%	65%
M[20P]-618	54%	57%
M[20P]-580	61%	59%
M[20P]-421	53%	70%
M[20P]-499	60%	67%
M[20P]-525	86%	77%
M[20P]-29	105%	93%

(B)	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[2P]-11	22%	36%
M[20P]-723	11%	40%
M[20P]-786	20%	40%
M[20P]-737	22%	40%
M[20P]-340	11%	40%
M[20P]-382	13%	41%
M[20P]-444	18%	42%
M[20P]-603	12%	42%
M[20P]-470	19%	42%
M[20P]-503	12%	46%
M[19P]-67	18%	49%
M[20P]-533	21%	50%
M[20P]-845	16%	51%
M[20P]-377	21%	51%
M[20P]-510	7%	55%

(C)

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[2P]-1	22%	36%
M[17P]-9	27%	29%
M[18P]-37	29%	36%

S-a constatat că 20 de probe prelucrate obținute din compoziții din plante care conțin 9, 18, 19 sau 20 de plante au o activitate antibiofilm și antimicrobiană mai mare decât extractul din amestecul de referință Mix[2P]-1 (Tabelul 5-1 A). S-a constatat că 14 extracte din amestecuri de 20 de plante au o activitate antibiofilm mai mare și o activitate antimicrobiană echivalentă sau mai mică (Tabelul 5-1 B). S-a constatat că două probe prelucrate obținute din compoziții din plante care conțin 17 și 18 plante au o activitate antimicrobiană mai mare și o activitate antibiofilm echivalentă sau mai scăzută (tabelul 5-1 C).

Media procentului de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor și media procentului de inhibare a formării biofilmului pentru toate tulpinile testate pentru probele prelucrate obținute din compozițiile din plante care includ cele 2 plante din Mix[2P]-2 la diluție 1:20 sunt prezentate în Tabelul 5-2.

Tabelul 5-2: media procentului de inhibare a creșterii planctonice și a procentului de inhibare a formării biofilmului pe cele 6 tulpini de *Staphylococcus aureus* testate pentru proba prelucrată pe baza Mix[2P]-2 la diluția 1:20. (A) Extracte din amestecuri care prezintă o activitate antimicrobiană și antibiofilm mai mare. (B) Extracte din amestecuri care prezintă activitate antimicrobiană și antibiofilm echivalentă sau mai scăzută.

(A)

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[2P]-2	12%	3%
M[17P]-5	17%	17%
M[20P]-654	16%	20%
M[16P]-1	14%	22%
M[17P]-1	16%	22%
M[20P]-779	14%	29%
M[20P]-746	15%	28%
M[20P]-635	17%	26%
M[20P]-844	15%	29%
M[20P]-831	17%	31%
M[20P]-894	18%	30%
M[20P]-888	23%	25%
M[20P]-407	19%	31%
M[20P]-907	21%	31%
M[20P]-335	19%	33%
M[20P]-714	17%	35%
M[20P]-668	15%	38%

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

55

M[20P]-584	14%	39%
M[20P]-777	16%	37%
M[20P]-853	20%	34%
M[20P]-785	16%	39%
M[20P]-622	21%	34%
M[09P]-2	17%	39%
M[19P]-46	18%	37%
M[20P]-387	13%	43%
M[20P]-767	18%	39%
M[18P]-23	24%	33%
M[20P]-745	20%	37%
M[20P]-478	22%	36%
M[19P]-45	16%	42%
M[19P]-49	19%	40%
M[20P]-467	17%	42%
M[20P]-396	21%	38%
M[20P]-392	17%	42%
M[19P]-44	20%	42%
M[19P]-41	23%	40%
M[19P]-48	18%	46%
M[19P]-47	17%	46%
M[20P]-490	20%	44%
M[19P]-21	29%	35%
M[20P]-632	24%	40%
M[19P]-54	19%	45%
M[20P]-461	19%	46%
M[19P]-42	24%	41%
M[20P]-506	17%	49%
M[19P]-55	21%	46%
M[20P]-459	26%	42%
M[20P]-375	19%	52%
M[19P]-2	26%	49%
M[19P]-40	28%	48%
M[20P]-523	28%	51%
M[20P]-420	34%	56%
M[20P]-429	36%	59%
M[20P]-535	45%	55%

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

56

M[20P]-532	42%	60%
------------	-----	-----

(B)	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[2P]-2	12%	-3%
M[20P]-638	11%	13%
M[20P]-794	6%	16%
M[20P]-909	0%	19%
M[20P]-538	8%	22%
M[20P]-781	6%	24%
M[19P]-27	7%	26%
M[20P]-681	11%	24%
M[16P]-3	8%	28%
M[20P]-721	2%	28%
M[20P]-493	7%	28%
M[17P]-6	9%	29%
M[20P]-659	10%	30%
M[20P]-409	10%	30%
M[20P]-602	4%	31%
M[20P]-456	9%	31%
M[20P]-383	5%	32%
M[20P]-847	13%	33%
M[20P]-496	6%	34%
M[19P]-51	10%	34%
M[20P]-371	7%	36%
M[20P]-609	12%	36%
M[19P]-52	9%	36%
M[19P]-50	12%	36%
M[18P]-24	11%	36%
M[19P]-53	10%	40%
M[20P]-432	54%	72%
M[20P]-555	68%	65%
M[20P]-240	67%	78%
M[20P]-557	86%	78%

S-a constatat că 58 de probe prelucrate obținute din compoziții din plante care conțin 9, 16, 17, 18, 19 sau 20 de plante au o activitate antibiofilm și antimicrobiană mai mare decât extractul de amestec de referință Mix[2P]-2 (Tabelul 5-2 A). S-a constatat că 25 de probe prelucrate obținute din compoziții pe bază de plante care conțin 16, 17, 19 sau 20 de plante au o activitate antibiofilm mai mare și o activitate antimicrobiană echivalentă sau mai mică (Tabelul 5-2 B).

Media procentului de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor și media procentului de inhibare a formării biofilmului, pentru toate tulpinile testate din probele prelucrate obținute din compozițiile din plante care includ cele 2 plante din Mix[2P]-3 la diluția 1:20 sunt prezentate în Tabelul 5-3.

Tabelul 5-3: Media procentului de inhibare a creșterii planctonice și a procentului de inhibare a formării biofilmului asupra celor 6 tulpini testate de *Staphylococcus aureus* pentru proba prelucrată pe baza Mix[2P]-3 la diluția 1:20. (A) Extracte din amestecuri care prezintă o activitate antimicrobiană și antibiofilm mai mare. (B) Extracte din amestecuri care prezintă activitate antimicrobiană și antibiofilm echivalentă sau mai scăzută.

(A)	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[2P]-3	12%	28%
M[20P]-649	16%	29%
M[20P]-857	15%	32%
M[20P]-703	13%	36%
M[20P]-486	15%	35%
M[20P]-766	13%	37%
M[20P]-789	14%	36%
M[20P]-725	14%	37%
M[20P]-536	20%	32%
M[20P]-753	14%	38%
M[20P]-401	14%	38%
M[20P]-765	14%	38%
M[20P]-848	14%	39%
M[20P]-782	14%	40%
M[20P]-589	15%	39%
M[20P]-607	14%	40%
M[20P]-541	20%	34%
M[20P]-447	15%	39%
M[20P]-601	17%	38%
M[20P]-494	13%	43%
M[20P]-787	15%	40%
M[20P]-748	15%	41%
M[09P]-6	15%	41%

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

58

M[20P]-480	18%	38%
M[20P]-633	15%	41%
M[20P]-849	14%	42%
M[20P]-793	16%	42%
M[18P]-9	17%	41%
M[20P]-852	13%	45%
M[20P]-819	20%	39%
M[20P]-655	15%	44%
M[20P]-455	15%	44%
M[20P]-846	16%	44%
M[20P]-481	18%	41%
M[20P]-484	17%	42%
M[20P]-590	26%	34%
M[20P]-890	19%	42%
M[20P]-670	21%	40%
M[20P]-705	23%	39%
M[20P]-816	22%	39%
M[19P]-91	15%	48%
M[20P]-457	22%	43%
M[20P]-551	24%	41%
M[19P]-100	16%	50%
M[20P]-583	23%	43%
M[20P]-823	22%	44%
M[19P]-100	16%	50%
M[19P]-98	17%	50%
M[19P]-101	14%	54%
M[19P]-93	14%	53%
M[19P]-102	13%	54%
M[19P]-5	19%	49%
M[19P]-89	17%	51%
M[19P]-103	13%	55%
M[19P]-96	18%	52%
M[20P]-475	25%	45%
M[20P]-548	30%	42%

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

59

M[19P]-96	19%	53%
M[20P]-605	22%	50%
M[20P]-577	29%	44%
M[20P]-482	27%	46%
M[19P]-95	19%	55%
M[20P]-904	21%	55%
M[20P]-559	32%	47%
M[20P]-430	29%	71%
M[20P]-520	62%	67%
M[20P]-579	75%	66%
M[20P]-560	72%	70%
M[20P]-565	73%	73%
M[20P]-524	81%	79%
M[20P]-575	85%	76%

(B)	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[2P]-3	12%	28%
M[20P]-599	11%	32%
M[20P]-621	10%	32%
M[20P]-740	12%	33%
M[20P]-830	7%	33%
M[20P]-623	12%	34%
M[20P]-708	8%	35%
M[20P]-880	12%	35%
M[20P]-716	8%	35%
M[20P]-803	4%	36%
M[20P]-686	13%	36%
M[20P]-663	5%	36%
M[20P]-873	7%	36%
M[20P]-608	10%	37%
M[20P]-752	10%	37%
M[20P]-443	8%	37%
M[19P]-30	3%	37%
M[20P]-712	12%	37%
M[20P]-616	7%	38%

M[20P]-724	4%	38%
M[20P]-795	11%	38%
M[20P]-403	13%	38%
M[20P]-595	7%	38%
M[20P]-771	9%	39%
M[20P]-718	5%	39%
M[20P]-620	12%	39%
M[20P]-841	6%	40%
M[20P]-804	8%	40%
M[20P]-386	6%	41%
M[20P]-764	11%	42%
M[18P]-33	11%	42%
M[20P]-349	9%	43%
M[19P]-92	10%	46%
M[18P]-34	11%	47%
M[19P]-93	12%	50%
M[18P]-31	12%	51%
M[18P]-34	12%	51%
M[19P]-62	10%	56%

S-a constatat că 70 de probe prelucrate obținute din compoziții din plante care conțin 9, 19 sau 20 de plante au o activitate antibiofilm și antimicrobiană mai mare decât extractul de amestec de referință Mix[2P]-3 (Tabelul 5-3 A). S-a constatat că 37 de probe prelucrate care conțin între 18 și 20 de plante au o activitate antibiofilm mai ridicată și o activitate antimicrobiană echivalentă sau mai scăzută (Tabelul 5-3 B).

Media procentului de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor și media procentului de inhibare a formării biofilmului pentru toate tulpinile testate din probele prelucrate, obținute din compozițiile din plante care includ cele 3 plante din Mix[3P]-1 la diluție 1:20, sunt prezentate în Tabelul 5-4.

Tabelul 5-4: Media procentului de inhibare a creșterii planctonice și a procentului de inhibare a formării biofilmului asupra celor 6 tulpini testate de *Staphylococcus aureus* pentru proba prelucrat pe baza Mix[3P]-1 la diluția 1:20. (A) Extracte din amestecuri care prezintă o activitate antimicrobiană și antibiofilm mai mare. (B) Extracte din amestecuri care prezintă activitate antimicrobiană și antibiofilm echivalentă sau mai scăzută.

(A)	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[3P]-1	31%	15%
M[18P]-2	35%	42%
M[16P]-5	36%	41%
M[14P]-2	34%	44%
M[16P]-6	35%	44%
M[09P]-9	33%	47%
M[09P]-1	34%	45%

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

61

M[18P]-7	35%	45%
M[17P]-3	36%	44%
M[09P]-7	35%	49%
M[20P]-594	40%	46%
M[09P]-6	37%	51%
M[20P]-658	45%	43%
M[19P]-3	34%	54%
M[18P]-11	40%	49%
M[19P]-104	43%	46%
M[09P]-3	46%	44%
M[09P]-4	46%	45%
M[19P]-19	34%	57%
M[18P]-13	42%	50%
M[18P]-10	43%	49%
M[18P]-9	42%	51%
M[18P]-17	45%	51%
M[20P]-634	43%	56%
M[20P]-596	44%	55%
M[18P]-15	47%	52%
M[20P]-449	47%	56%
M[09P]-10	54%	50%
M[20P]-588	48%	56%
M[20P]-458	50%	56%
M[19P]-105	49%	56%
M[13P]-2	51%	56%
M[19P]-11	43%	67%
M[18P]-16	54%	59%
M[20P]-569	55%	60%
M[20P]-296	52%	62%
M[18P]-18	56%	61%
M[20P]-516	61%	68%
M[20P]-592	70%	71%
M[20P]-626	71%	71%
M[19P]-23	72%	72%
M[20P]-497	72%	77%
M[20P]-572	74%	78%
M[20P]-574	76%	79%
M[20P]-527	76%	80%

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

62

M[20P]-297	83%	81%
M[20P]-422	81%	83%
M[20P]-564	86%	82%
M[20P]-418	98%	87%
M[20P]-416	99%	89%
M[20P]-576	104%	86%
M[20P]-573	104%	93%

(B)	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[3P]-1	31%	15%
M[20P]-692	11%	22%
M[20P]-612	6%	25%
M[18P]-22	4%	27%
M[20P]-388	9%	27%
M[20P]-380	12%	28%
M[11P]-12	22%	29%
M[19P]-33	8%	30%
M[19P]-35	6%	30%
M[17P]-2	12%	30%
M[20P]-678	10%	31%
M[19P]-22	17%	31%
M[20P]-552	16%	32%
M[17P]-4	9%	32%
M[20P]-806	12%	32%
M[12P]-1	19%	33%
M[14P]-1	18%	33%
M[19P]-28	6%	33%
M[12P]-2	22%	34%
M[18P]-1	16%	34%
M[19P]-36	6%	34%
M[20P]-479	23%	34%
M[15P]-1	23%	34%
M[09P]-21	22%	34%
M[20P]-446	10%	34%
M[19P]-34	7%	34%
M[19P]-106	29%	35%
M[10P]-41	8%	35%

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

63

M[13P]-1	22%	35%
M[18P]-5	18%	35%
M[19P]-39	-1%	35%
M[11P]-3	12%	35%
M[20P]-439	19%	36%
M[11P]-2	13%	36%
M[18P]-20	6%	36%
M[20P]-757	18%	36%
M[10P]-303	25%	36%
M[11P]-11	29%	37%
M[11P]-6	9%	37%
M[19P]-37	5%	37%
M[18P]-19	10%	37%
M[18P]-4	29%	37%
M[18P]-35	27%	37%
M[18P]-25	11%	37%
M[11P]-5	10%	38%
M[20P]-694	20%	38%
M[11P]-8	10%	38%
M[11P]-9	11%	38%
M[20P]-733	12%	38%
M[11P]-7	10%	38%
M[19P]-31	6%	38%
M[19P]-32	4%	38%
M[19P]-29	6%	38%
M[18P]-6	22%	38%
M[20P]-374	2%	38%
M[P]-4	12%	39%
M[20P]-791	13%	39%
M[20P]-758	15%	39%
M[19P]-26	6%	39%
M[20P]-697	17%	39%
M[19P]-38	4%	40%
M[19P]-24	28%	40%
M[16P]-2	24%	40%
M[18P]-21	9%	40%
M[15P]-5	29%	40%
M[17P]-8	30%	40%

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

64

M[20P]-613	8%	41%
M[18P]-14	27%	41%
M[20P]-604	14%	41%
M[11P]-1	17%	41%
M[18P]-36	29%	41%
M[18P]-3	23%	42%
M[20P]-453	5%	42%
M[19P]-25	9%	42%
M[20P]-709	18%	42%
M[20P]-474	16%	45%
M[20P]-666	22%	45%
M[20P]-902	21%	46%
M[20P]-435	15%	46%
M[20P]-567	30%	47%
M[19P]-4	24%	47%
M[19P]-16	18%	47%
M[19P]-59	10%	48%
M[19P]-17	23%	48%
M[19P]-58	20%	49%
M[19P]-60	13%	49%
M[19P]-15	27%	50%
M[11P]-10	31%	50%
M[19P]-14	27%	50%
M[19P]-6	32%	51%
M[20P]-445	21%	51%
M[19P]-8	30%	51%
M[19P]-18	21%	52%
M[19P]-9	29%	52%
M[19P]-7	30%	52%
M[19P]-10	29%	52%
M[19P]-68	23%	53%
M[19P]-63	16%	53%
M[19P]-69	22%	53%
M[19P]-1	26%	54%
M[19P]-66	24%	54%
M[19P]-12	26%	54%
M[20P]-472	27%	54%
M[19P]-20	31%	54%

M[19P]-70	19%	55%
M[19P]-62	17%	56%
M[19P]-57	21%	56%
M[19P]-65	27%	57%
M[19P]-73	18%	57%
M[20P]-514	30%	58%
M[19P]-56	24%	58%
M[19P]-64	27%	59%
M[19P]-72	20%	60%
M[19P]-71	19%	61%

S-a constatat că 51 de probe prelucrate obținute din compoziții din plante care conțin 9, 16, 17, 18, 19 sau 20 de plante au o activitate antibiofilm și antimicrobiană mai mare decât extractul de amestec de referință Mix[3P]-1 (Tabelul 5-4 A). S-a constatat că 113 probe prelucrate care conțineau între 9 și 20 de plante aveau o activitate antibiofilm mai mare și o activitate antimicrobiană echivalentă sau mai mică (Tabelul 5-4 B).

Exemplul comparativ 3

Ca exemplu comparativ, raportăm mai multe extracte din amestecuri de 20 de plante care conțin o singură plantă dintre cele 3 plante din exemplul 1 (PA13, PA21, PB12), care s-au dovedit a avea activități antimicrobiene și antibiofilm inexistente sau slabe împotriva *Staphylococcus aureus*.

Zece compoziții din plante având conținutul raportat în Lista 5-8 au fost preparate în conformitate cu metoda A descrisă anterior.

Lista 5-8: compoziții din plante din probe prelucrate

M[20P]-39: PB00; PB01; PB02; PB03; PB04; PB05; PB06; PB07; PB08; PB09; PB10; PB11; PB12; PB13; PB14; PB15; PB16; PB17; PB18; PB19;

M[20P]-239: PA00; PA05; PA21; PA23; PA26; PA33; PA39; PA60; PA85; PB00; PB06; PB32; PB79; PC02; PC26; PC34; PC38; PC62; PC78; PCS4;

M[20P]-337: PA00; PA10; PA11; PA15; PA18; PA21; PA22; PA24; PA26; PA28; PA52; PA94; PA98; PB10; PB20; PB26; PB29; PB82; PC67; PC97;

M[20P]-362: PA21; PA23; PA25; PA33; PA37; PA57; PA69; PA81; PA92; PB16; PB25; PB26; PB28; PB29; PB78; PC20; PC21; PC71; PC83; PD02;

M[20P]-364: PA15; PA21; PA25; PA28; PA39; PA75; PA80; PA85; PA89; PA98; PB01; PB06; PB24; PB28; PB35; PC24; PC25; PC57; PC75; PCS2;

M[20P]-540: PA06; PA10; PA12; PA14; PA20; PA21; PA26; PA27; PA27; PA57; PA57; PA57; PA69; PB07; PB82; PC11; PC20; PC23; PC55; PC98;

M[20P]-647: PA10; PA11; PA24; PA26; PA28; PA33; PA35; PA40; PA57; PA69; PB00; PB07; PB12; PB28; PB33; PB38; PB60; PC55; PC67; PC97;

M[20P]-652: PA00; PA07; PA13; PA15; PA16; PA23; PA26; PA28; PA33; PA39; PA57; PA92; PB28; PB38; PC20; PC21; PC52; PC55; PC74; PC97;

M[20P]-862: PA11; PA15; PA18; PA21; PA25; PA27; PA28; PA29; PA35; PA38; PA52; PA86; PA89; PA92; PB07; PB28; PB88; PC11; PC55; PC98;

M[20P]-872: PA13; PA14; PA16; PA28; PA29; PA30; PA33; PA35; PA39; PA81; PA90; PA92; PB00; PB32; PC12; PC34; PC37; PC67; PC97; PD02.

Zece extracte din apă (sau probe prelucrate) au fost preparate din compozițiile corespunzătoare din plante, conform metodei B descrise anterior, utilizând 40 ml de apă conținând 100 g/l de zaharoză pentru extracția din apă și incluzând etapa de decantare înainte de filtrare.

Pentru fiecare probă prelucrată, activitatea biologică a fost determinată în conformitate cu metoda C descrisă anterior, cu următoarele diluții finale ale probelor prelucrate: 1:20, 1:63 și 1:200.

Media procentului de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor și media procentului de inhibare a formării biofilmului pentru toate tulpinile testate din probele prelucrate la diluția 1:20 sunt prezentate în Tabelul 5-5.

Tabelul 5-5: media procentului de inhibare a creșterii planctonice și a procentului de inhibare a formării biofilmului asupra celor 6 tulpini testate de *Staphylococcus aureus* pentru probele prelucrate la diluția 1:20.

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[2P]-1	22%	36%
Mix[2P]-2	12%	-3%
Mix[2P]-3	12%	28%
M[20P]-362	-1%	-6%
M[20P]-364	-5%	6%
M[20P]-039	1%	6%
M[20P]-862	5%	2%
M[20P]-337	0%	9%
M[20P]-872	2%	11%
M[20P]-540	5%	10%
M[20P]-652	9%	7%
M[20P]-239	9%	7%
M[20P]-647	9%	9%

Toate probele prelucrate testate, obținute din compoziții din plante care conțin 20 de plante, inclusiv o singură plantă dintre cele 3 plante din exemplul 1 (PA13, PA21, PB12), au prezentat o activitate antimicrobiană mai scăzută decât cele trei extracte din amestecuri de 2 plante de referință Mix[2P]-1 (obținute din PA13 și PA21), Mix[2P]-2 (obținute din PA21 și PB12) și Mix[2P]-3 (obținute din PA13 și PB12) și o activitate antibiofilm mai scăzută decât Mix[2P]-1 și Mix[2P]-3.

Exemplul 6

În acest exemplu, raportăm activitățile antimicrobiene și antibiofilm simultane împotriva *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* și *Staphylococcus pseudintermedius* a 2 probe prelucrate alese dintre cele mai bune amestecuri descrise în Exemplele 4 și 5.

Plantele uscate de calitate farmaceutică au fost obținute de la „Pharmacie Fontgieve” (Clermont-Ferrand, Franța) și „Pharmacie St Herem” (Clermont-Ferrand, Franța).

Două preparate din plante conținând pulberile de plante uscate raportate în Tabelul 6-1 de mai jos au fost preparate în conformitate cu metoda A descrisă anterior.

Tabelul 6-1

Compoziții din plante	M[20P]-576	M[10P]-154
Planta 1	2 lingurițe de PA11	1 linguriță de PA11
Planta 2	1 linguriță de PA12	1 linguriță de PA12
Planta 3	3 lingurițe de PA13	1 linguriță de PA13
Planta 4	2 lingurițe de PA14	1 linguriță de PA21

Planta 5	1 linguriță de PA20	1 linguriță de PA22
Planta 6	1 linguriță de PA21	1 linguriță de PA79
Planta 7	1 linguriță de PA22	1 linguriță de PB12
Planta 8	1 linguriță de PA29	1 linguriță de PB49
Planta 9	1 linguriță de PA39	1 linguriță de PC29
Planta 10	1 linguriță de PB12	1 linguriță de PC63
Planta 11	1 linguriță de PB60	
Planta 12	1 linguriță de PC20	
Planta 13	1 linguriță de PC26	
Planta 14	1 linguriță de PC33	
Planta 15	1 linguriță de PC37	
Planta 16	1 linguriță de PC49	

Pornind de la astfel de compoziții din plante, s-au preparat 2 extracte din apă corespunzătoare (sau probe prelucrate), în conformitate cu metoda B descrisă anterior, utilizând 40 ml pentru M[20P]-576 și 20 ml pentru M[10P]-154 de apă conținând 100g/l de zaharoză pentru extracția apei și incluzând etapa de centrifugare înainte de filtrare.

Activitatea biologică a probelor prelucrate a fost determinată în conformitate cu metoda C descrisă anterior prin utilizarea următoarelor tulpini:

– Tulpini de *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923, ATCC 49476, ATCC 6538, ATCC 51740, ATCC 29213, ATCC 14775, NCTC 12493, ATCC 33591, ATCC 33592, ATCC 43300, ATCC 700698, ATCC 700699, ATCC 9144 și ATCC BAA-44

– Tulpini de *Staphylococcus epidermidis*: ATCC 14990, ATCC 12228, ATCC 700296, ATCC 49134 și ATCC 49461

– Tulpina *Staphylococcus pseudintermedius*: ATCC 49444

Concentrația inhibitorie minimă (CIM), observată cu cele 2 probe prelucrate, este prezentată în Tabelul 6-2 sub formă de HID, precum și eficacitatea medie asupra tuturor tulpinilor de *Staphylococcus aureus* și *Staphylococcus epidermidis*.

Tabelul 6-2: HID ale celor 2 probe prelucrate pe 14 tulpini de *Staphylococcus aureus*, 5 tulpini de *Staphylococcus epidermidis* și 1 tulpină de *Staphylococcus pseudintermedius*

		M[10P]-154	M[20P]-576
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	20	20
	ATCC 49476	40	40
	ATCC 6538	10	10
	ATCC 51740	20	40
	ATCC 29213	20	20
	ATCC 14775	20	20
	NCTC 12493	40	40
	ATCC 33591	20	40
	ATCC 33592	20	40

	ATCC 43300	20	40
	ATCC 700698	20	20
	ATCC 700699	40	20
	ATCC 9144	20	20
	ATCC BAA-44	40	20
	Medie	25	28
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 14990	40	20
	ATCC 12228	40	20
	ATCC 700296	40	20
	ATCC 49461	40	20
	ATCC 49134	80	80
	Medie	48	32
<i>S. pseudintermedius</i>	ATCC 49444	40	40
	Medie totală	32	30

M[10P]-154 și M[20P]-576 au prezentat activitate antimicrobiană completă asupra tuturor tulpinilor de *Staphylococcus aureus* și *Staphylococcus epidermidis* testate. M[10P]-154 a prezentat activitate antimicrobiană completă la 1:80 asupra unei tulpini de *Staphylococcus epidermidis*, la 1:40 asupra a 4 tulpini de *Staphylococcus aureus*, 4 *Staphylococcus epidermidis* și asupra tulpinii testate de *Staphylococcus pseudintermedius*, la 1:20 asupra a 9 tulpini de *Staphylococcus aureus* și la 1:10 asupra unei tulpini de *Staphylococcus aureus*.

M[20P]-576 a prezentat activitate antimicrobiană completă la 1:80 asupra unei tulpini de *Staphylococcus epidermidis*, la 1:40 asupra a 6 tulpini de *Staphylococcus aureus* și asupra tulpinii testate de *Staphylococcus pseudintermedius*, la 1:20 asupra a 7 tulpini de *Staphylococcus aureus* și 4 tulpini de *Staphylococcus epidermidis* și la 1:10 asupra unei tulpini de *Staphylococcus aureus*.

Procentul de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor și procentul de inhibare a formării biofilmului (IBF) al celor 2 probe prelucrate la diluția 1:20 sunt prezentate în Tabelul 6-3, precum și eficacitatea medie asupra tuturor tulpinilor de *Staphylococcus aureus* și *Staphylococcus epidermidis*.

Tabelul 6-3: inhibarea creșterii planctonice și inhibarea formării biofilmului (IBF) ale celor 2 probe prelucrate asupra a 14 tulpini de *Staphylococcus aureus*, 5 tulpini de *Staphylococcus epidermidis* și asupra unei tulpini de *Staphylococcus pseudintermedius* la diluție 1:20

		Inhibarea creșterii planctonice		Inhibarea formării biofilmului (IBF)	
		M[10P]-154	M[20P]-576	M[10P]-154	M[20P]-576
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	96%	99%	90%	88%
	ATCC 49476	93%	109%	93%	95%
	ATCC 6538	49%	56%	45%	60%
	ATCC 51740	91%	106%	89%	96%
	ATCC 29213	94%	105%	91%	92%
	ATCC 14775	90%	105%	88%	90%

	NCTC 12493	99%	113%	93%	92%
	ATCC 33591	95%	113%	91%	93%
	ATCC 33592	97%	107%	91%	93%
	ATCC 43300	94%	110%	90%	92%
	ATCC 700698	92%	113%	89%	91%
	ATCC 700699	88%	95%	98%	96%
	ATCC 9144	82%	91%	88%	84%
	ATCC BAA-44	90%	101%	93%	94%
	Medie	89%	102%	88%	90%
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 14990	90%	101%	91%	90%
	ATCC 12228	90%	101%	93%	91%
	ATCC 700296	86%	90%	81%	82%
	ATCC 49461	90%	99%	93%	85%
	ATCC 49134	89%	96%	96%	90%
	Medie	89%	98%	91%	88%
<i>S. pseudintermedius</i>	ATCC 49444	92%	103%	95%	93%
	Medie totală	89%	101%	89%	89%

La o diluție de 1:20, M[10P]-154 a prezentat o inhibare medie de 88% a formării biofilmului asupra tuturor tulpinilor de *Staphylococcus aureus* testate, în timp ce M[20P]-576 a prezentat o medie de 90%. Cele două amestecuri au prezentat o activitate antimicrobiană mai scăzută asupra unei tulpini: ATCC 6538 (45% pentru M[10P]-154, 60% pentru M[20P]-576). M[10P]-154 a prezentat o inhibare medie de 91% a creșterii planctonice asupra tuturor tulpinilor de *Staphylococcus epidermidis* testate, în timp ce M[20P]-576 a prezentat o medie de 88% (cf. Tabelului 6-3). Cele două amestecuri au prezentat un procent de inhibare mai mare, respectiv 95% (M[10P]-154) și 93% (M[20P]-576) asupra *Staphylococcus pseudintermedius* testat. Astfel, M[10P]-154 și M[20P]-576 au demonstrat activitate antibiofilm asupra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* și *Staphylococcus pseudintermedius* la diluție 1:20.

Exemplul 7

Soluția de Mix[20C]-576 (descrișă în exemplul 6) utilizată pentru următoarele formulări a fost preparată în conformitate cu metodele A și B descrise anterior, cu excepția etapei de filtrare, care în acest exemplu se realizează prin filtrare, prin aspirație cu o pâlnie Büchner umplută cu un strat de bumbac hidrofîl gros de 5 cm. Pentru claritate, această soluție filtrată prin bumbac va fi denumită SK576 în exemplul următor.

Un unguent și două creme care urmează să fie utilizate pentru aplicații locale au fost preparate cu o metodă de emulsionare după cum urmează:

- Faza A și faza B au fost preparate prin amestecarea cu agitare orbitală în două pahare separate a următoarelor ingrediente:

	Faza A	Faza B
--	--------	--------

Unguent	- 73,8 g de ulei de migdale organic (Hyteck, „Aroma Zone™”, Franța) - 18,5 g de ceară de albine organică (Hyteck, „Aroma Zone™”, Franța) - 9,7 g de unt de shea organic (Hyteck, „Aroma Zone™”, Franța) - 1,0 ml de tocoferol natural (Hyteck, „Aroma Zone™”, Franța)	- 29,6 g de SK576, preparat în conformitate cu exemplul 6 - 13,5 g de glicerină organică (The Naissance Trading & Innovation, „Naissance™”, Marea Britanie) - 2,7 g de acid ascorbic (Hyteck „Aroma Zone™”, Franța)
Crema 1	- 30,4g de ulei de migdale organic (Hyteck, „Aroma Zone™”, Franța): - 8,3 g de Olivem® 1000 bio (Hyteck, „Aroma Zone™”, Franța) - 3,1 g de mentol (Hyteck, „Aroma Zone™”, Franța) - 1,0 ml de tocoferol natural (Hyteck, „Aroma Zone™”, Franța)	- 51,5 g de SK576, preparat în conformitate cu exemplul 6 - 14,9 g de glicerină organică (The Naissance Trading & Innovation „Naissance™”, Marea Britanie)
Crema 2	- 14,9g de ulei de migdale organic (Hyteck „Aroma Zone™”, Franța): - 11,8 g de Olivem® 1000 organic (Hyteck „Aroma Zone™”, Franța) - 5,1 g de unt de shea bio (Hyteck „Aroma Zone™”, Franța) - 1,0 ml de tocoferol natural (Hyteck „Aroma Zone™”, Franța)	- 160,0 g de SK576, preparat în conformitate cu exemplul 6 - 10 g de glicerină organică (The Naissance Trading & Innovation, „Naissance™”, Marea Britanie)

- Cele două pahare au fost încălzite la 70 °C, folosind o baie de apă caldă și au fost menținute la 70 °C timp de 10 min., pentru a evita cristalizarea cerii de albine.

- Faza B a fost apoi turnată încet în faza A, menținând paharul în baia de apă caldă și cu agitare constantă, cu ajutorul unui mixer mecanic cu imersie (Moulinex "Infyniforce_hand blender", Franța).

- Paharul care conține amestecul de Faze A și B a fost apoi scos din baia de apă caldă și unguentul a fost format cu ajutorul unui „blender pentru maioneză” cu imersie (Moulinex "Infyniforce_hand blender", Franța).

Un gel care urmează să fie utilizat pentru aplicații locale a fost preparat prin

- filtrarea a 20,6 g de SK576, pe un filtru de seringă hidrofil (0,22 mm).

- adăugarea a 0,75 g de pulbere de xantan (Hyteck „Aroma Zone™”, Franța) și 0,25 g de acid ascorbic (Hyteck „Aroma Zone™”, Franța) la soluția filtrată și amestecarea cu o spatulă timp de 5-10 min, astfel încât să prindă formă.

O soluție de pulverizare care urmează să fie utilizată pentru aplicații locale a fost preparată prin:

- amestecarea a 5,5 g de SK576 cu 11,9 g de etanol absolut (Sigma-Aldrich, Franța) într-un pahar de 20 ml care a fost păstrat la frigider la 5 °C timp de 3 ore.

- plasarea paharului cu amestecul rece într-o baie de apă cu gheață și adăugarea ușoară a 0,7 g de Kolliphor® P-407 (Sigma-Aldrich, Franța) sub agitare cu o bară magnetică și un agitator.

- după 30 de minute de agitare în baie de apă cu gheață, soluția a fost umplută într-un pulverizator de reactivi (CAMAG, Elveția) pentru administrare.

Protocolul fiecăruia dintre aceste cinci preparate poate fi ușor adaptat la diferite volume de preparat prin păstrarea aceleiași cantități relative din fiecare ingredient.

Exemplul 8

Activitatea biologică a unui extract de apă al invenției la un model de șoarece de infecție letală cu *Staphylococcus aureus*

Introducere

Tulpina *S. aureus* Newman a fost izolată în 1952 dintr-o infecție la om și a fost utilizată pe scară largă în modelele animale de infecții stafilococice, datorită fenotipului său robust de virulență.

Șoarecii femele OF1 au fost utilizați pe scară largă pentru a studia patogeniza indusă de *Staphylococcus aureus*. Primele lucrări privind patogeniza infecțiilor cu *Staphylococcus aureus* au utilizat calea intraperitoneală de provocare pentru a infecta și trata șoarecii, datorită ușurinței sale tehnice.

- 5 la șoarecii femele OF1 infectați cu doza letală de *Staphylococcus aureus* Newman. Tratamentul a fost administrat pe cale orală, conform schemei Q1Dx10, cu 2 zile înainte de infecție, până la 7 zile după infecție. Monitorizarea mortalității a fost efectuată din Z0 până în Z15.

Vehiculul a fost utilizat ca martor negativ.

Material și metode

10 Substanța de testare și martorii

Substanța de testare: extractul de apă M[20C] 576 (obținut pornind de la 120 g/l de compoziție din plante, preparat după cum se descrie în exemplul 6). A fost furnizată în 11 flacoane conținând câte 1,200 ml de extracte de apă. A fost depozitată la -20 °C.

Vehicul: soluție apoasă de zaharoză 10%. Aceasta va fi depozitată la -20 °C.

- 15 *Tulpina bacteriană:* Tulpina *Staphylococcus* Newman (furnizată de Dr. T. Foster, Trinity College, Dublin, Irlanda, lot nr. 14156, LST4).

Achiziționarea și încarcerarea animalelor

Douăzeci (20) de șoareci femele Crl:OF1 (exogame), în vârstă de 6 săptămâni, au fost achiziționate de la Charles River (L'Arbresle, Franța).

- 20 Unitatea de îngrijire a animalelor a fost autorizată de ministerele franceze ale agriculturii și cercetării (numărul convenției B35-288-1). Experimentele pe animale au fost efectuate în conformitate cu orientările etice ale experimentelor pe animale (Principes d'ethique de l'experimentation animale, Directive n°86/609 CEE du 24 Nov. 1986, Decret n°87/848 du 19 Oct. 1987, Arrete d'Application du 19 Avril 1988).

- 25 Animalele au fost menținute în camere „A2” în condiții controlate de temperatură ($22 \pm 3^\circ\text{C}$), umiditate ($50 \pm 20\%$), foto-perioadă (12h lumină/12h întuneric), schimb de aer și presiune scăzută. Sistemul de tratare a aerului este programat pentru 14 schimburi de aer pe oră, fără recirculare.

Hrana și apa au fost furnizate la discreție, fiind plasate în capacul metalic din partea superioară a cuștii.

Tratament și plan experimental

Pregătirea bacteriilor – Amplificarea bacteriilor pentru testul de provocare

- 30 O fiolă de bacterii a fost decongelată și 100 ml de substanță de inoculare au fost cultivați în 50 ml de bulion triptic de soia (TSB, Ref. 43592 sau 22902, Sigma). Bacteriile au fost incubate la 37 °C, timp de 20 de ore, sub agitare la 110 rpm pe un agitator orizontal. Suspensia bacteriană va fi diluată la 1/20 (100 μl + 1,9 ml de TSB) și densitatea optică va fi citită la 680 nm (O.D.680 nm).

- 35 Apoi, 10 ml de bacterii au fost centrifugate la 5.200 rpm (3400 g) timp de 10 min la 4 °C. Supernatantul a fost aruncat iar bacteriile au fost solubilizate în 10 ml de DPBS (Ref. BE17-512F, Lonza, Franța). Suspensia bacteriană (C0) a fost diluată la 1/20 (100 μl + 1,9 ml de DPBS) și se va măsura O.D.680 nm.

O.D.680 nm măsurată înainte și după centrifugare trebuie să fie similară.

Concentrația de UFC/ml a soluției de bacterii a fost calculată după cum urmează:

$\text{UFC/ml} = (\text{O.D. 680 nm} \times 20 \text{ (factor de diluție)}) \times 6,5.108 \text{ (UFC/U.D.O.)}$

- 40 *Preparat de mucină*

Mucina (Sigma, Franța) a fost preparată la 20%, cu 14-16 zile înainte de tratament, conform descrierii de mai jos:

- 45 DPBS (soluție salină tamponată cu fosfat Dulbecco) a fost preîncălzită la 56 °C și % din volumul final a fost transferat într-un mixer, apoi mucina porcine va fi adăugată și amestecată. Mixerul a fost spălat cu volumul rămas de DPBS. Apoi, soluția de mucină 20% a fost transferată într-un flacon Erlenmayer și a fost incubată la 37 °C, sub agitare timp de 1 oră și 30 de minute. % din soluția de mucină 20% a fost transferat într-o sticlă sterilă. ¼ din soluția rămasă a fost depozitat separat. Apoi, soluțiile % și ¼ au fost sterilizate în autoclavă. Soluția sterilă de mucină porcine 20% a fost depozitată la +4 °C.

- 50 Cu o zi înainte de infectare, pH-ul % de soluție de mucină 20% a fost ajustat la 7,4 prin adăugarea de NaOH 30% filtrat. Dacă a fost necesar, o parte din ¼ din soluția rămasă a fost utilizată pentru ajustarea pH-ului.

Prepararea bacteriilor

Conform rezultatelor O.D. 680 nm, bacteriile (C0) au fost diluate în DPBS pentru a atinge concentrația de $6,8 \times 10^7$ UFC/ml. Aceste suspensii au fost apoi diluate la $\frac{1}{2}$ în 20% mucină porcină pentru a obține concentrația LD80 de $3,4 \times 10^7$ UFC/ml în PBS-10% mucină porcină. Suspensia utilizată pentru tratament a fost introdusă într-o eprubetă care conținea perle de sticlă sterile (4 mm, Ref. 068502, Dutscher, Franța).

5 Suspensia nu a fost agitată prin turbionare, ci amestecată prin răsturnarea eprubetelor. Bacteriile au fost plasate pe gheață înainte de tratamente și au fost menținute pe gheață în timpul tratamentului.

Determinarea CFU

Pentru a determina concentrația exactă a suspensiei bacteriene înainte și după inocularea la animale, suspensia bacteriană a fost diluată în diluții seriale de 10 ori în DPBS-0,5% Tween 20 (Sigma, Franța), așa cum este descris în Tabelul 8-1, în godeuri adânci (50 μ l de bacterii + 450 μ l de DPBS-0,5% Tween 20). Apoi, 6 x 50 μ l din diluțiile bacteriene 3, 4, 5 și 6 au fost însămânțate pe placa cu agar triptic de soia (agar triptic de soia, Sigma) și lăsate la 37 °C peste noapte. Coloniile au fost numărate pentru a determina UFC (unități formatoare de colonii) reale ale substanțelor de inoculare.

15 Numerotarea a fost realizată pe picăturile (50 μ l) care conțin între 20 și 100 de colonii. Casetele în gri corespund diluțiilor însămânțate pe plăci.

Tabelul 8-1: Diluții ale suspensiei bacteriene pentru a determina UFC (viabilitatea) reale ale substanțelor de inoculare. Casetele cu gri corespund diluțiilor însămânțate pe plăci.

Suspensia bacteriană peste noapte în PBS	Diluții					
	1	2	3	4	5	6
	1/10	1/100	1/10 ³	1/10 ⁴	1/10 ⁵	1/10 ⁶
De exemplu, concentrația inițială: 3,4x10 ⁷ CFU/ml	3,4x10 ⁶	3,4x10 ⁵	34000	3400	340	34
Număr de colonii / 50 μ l (1 picătură)	1,7x10 ⁵	1,7x10 ⁴	1,7x10 ³	170	17	1,7

Randomizarea

20 Înainte de experiment (Z-2), 20 de șoareci femele OFI sănătoase au fost randomizate în 2 grupuri de 10 șoareci/grup în funcție de criteriile de greutate corporală, astfel încât greutatea corporală medie a grupurilor să nu fie statistic diferită.

Tratamente

25 Tratamentele au fost efectuate din Z-2 până în Z7 (Z0: ziua inoculării bacteriilor) prin administrare orală (PO). Inocularea bacteriilor s-a făcut prin injectare intraperitoneală (IP).

Inoculare

În Z0, șoarecii au fost inoculați cu suspensie bacteriană. Fiecare inoculare a constat într-o injecție intraperitoneală de 500 μ l de suspensie la $3,4 \times 10^7$ UFC / ml ($1,7 \times 10^7$ UFC / șoarece).

Design experimental

30 Animalele au fost tratate prin administrare orală cu substanța de test din Z-2 până în Z7. În Z0, tratamentele au fost efectuate la 1h după inocularea bacteriilor.

Grupurile experimentale vor fi definite conform descrierii de mai jos și rezumate în Tabelul 8-2.

- Cei 10 șoareci din grupul 1 vor fi tratați din Z-2 până în Z7 cu vehiculul prin administrare orală, în conformitate cu regimul de tratament Q1DX10.

35 - Cei 10 șoareci din grupul 2 vor fi tratați din Z-2 până în Z7 cu substanța de test prin administrare orală, în conformitate cu regimul de tratament Q1DX10.

Tabelul 8-2: Design experimental

Grupuri	Număr șoareci	Substanța de test	Calea de administrare	Volum de administrare	Regim de tratament	Model bacterian
---------	------------------	----------------------	--------------------------	--------------------------	-----------------------	-----------------

1		Vehicul				
2	10	Substanța de test	PO	10 ml/kg	Q1DX10 (din Z-2 până în Z7)	IP <i>Staphylococcus aureus</i> Newman letal (3.4×10^7 UFC/ml) 500 μ l

Monitorizarea animalelor

Din Z0 până în Z1, șoarecii au fost observați de două ori pe zi pentru mortalitate.

Din Z2 până în Z15, șoarecii au fost observați o dată pe zi pentru mortalitate.

- 5 Greutatea corporală a șoarecilor a fost înregistrată de două ori pe săptămână, până la sfârșitul experimentului.

Observațiile clinice detaliate (modificări ale pielii, blănii, ochilor, membranelor mucoase, apariția secrețiilor și excrețiilor, funcția respiratorie, modificări ale mersului, posturii) au fost monitorizate de două ori pe săptămână, după cum se descrie în Tabelul 8-3 de mai jos, de exemplu. Descrierea acestei liste nu este exhaustivă și a fost completată de alte observații, dacă a fost necesar.

10

Tabelul 8-3 Observații clinice/ parametri

Parametri	Descriere	Parametri	Descriere	Parametri	Descriere
Mobilitate/ Mers	Staționar	Comportament	Temător	Blană	Normală
	Redus		Normal		Țepoasă
	Normal		Agresiv		Pierdere
	Excesiv		Încetinită		Colorată
Postură	Normal	Respirație	Normală		Nu este cazul
	Culcată		Rapidă		Normale
Paralizie	Nu		Neregulată		Anormale (nas)
	Dreapta față	Ochi	Normali	Membrane mucoase	Anormale
	Stânga față		Cu lacrimi		(gură)
	Dreapta spate		Închiși		Anormale
	Stânga spate	Piele	Normală	Excreții	(nas/gură)
	Dreapta		Roșeață		Puține
	Stânga		Pete		Normale
	Față		Leziuni		Abundente
	Spate		Hematom		Uscat

Sacrificarea șoarecilor

- 15 În Z15, șoarecii supraviețuitori au fost sacrificați prin exsanguinare, urmată de dislocare cervicală, dacă era necesar. Nu a fost efectuată nicio autopsie.

Rezultate

Analiza supraviețuirii șoarecilor a arătat rezultatele raportate în Tabelele 8-4 și 8-5 următoare.

Tabelul 8-4 Numărul de șoareci supraviețuitori pe zi

Număr de șoareci supraviețuitori pe zi									
Grupuri	N Z0	N Z1	N Z2	N Z3	N Z4	N Z5	N Z6	N Z7	N Z8
Grupul 1 (Vehicul, PO, Q1Dx10, 10 ml/kg)	10	6	6	5	5	3	2	NA	0
Grupul 2 (TS pur, PO, Q1Dx10, 10 ml/kg)	10	6	6	6	6	6	4	NA	3

Tabelul 8-5 Procentul de șoareci supraviețuitori pe zi

Procent de supraviețuire									
Grupuri	N Z0	N Z1	N Z2	N Z3	N Z4	N Z5	N Z6	N Z7	N Z8
Grupul 1 (Vehicul, PO, Q1Dx10, 10 ml/kg)	100%	60%	60%	50%	50%	30%	20%	NA	0%
Grupul 2 (TS pur, PO, Q1Dx10, 10 ml/kg)	100%	60%	60%	60%	60%	60%	40%	NA	30%
NA= Nu este disponibil									

- 5 Tratamentul a permis reducerea mortalității șoarecilor de la 100% la 70%. Acest studiu pe animale a arătat astfel că activitățile antimicrobiene și antibiofilm revendicate, observate *in vitro*, se traduc într-un efect terapeutic, atunci când extractul de apă al invenției este administrat pe cale orală animalelor.

Exemplul 9

- 10 În acest exemplu sunt ilustrate activitățile antimicrobiene și antibiofilm simultane împotriva *Staphylococcus aureus* ale compoziției divulgate din 2 plante din 3: *Filipendula ulmoric* PA13, *Camellia sinensis* PA21, *Arctostaphylos uva-ursi* PB12 și cel puțin 1 plantă din 3: *Eugenia caryophyllus* PC20, *Vitis vinifera* var. *tintorial* PA22, *Desmodium adscendens* PB07. Plantele uscate de calitate farmaceutică au fost obținute de la „Herboristerie Cailleau” (Chemille, Franța).

Pornind de la aceste trei pulberi de plante diferite, s-au preparat șase compoziții din plante, în conformitate cu metoda A raportată anterior.

Lista 9-1 : compoziții din plante ale probelor prelucrate

- 15 M[02P]-064: PA13; PA21;
M[03P]-050: PA13; PA21; PC20;
M[03P]-053: PA13; PA21; PB07;
M[03P]-056: PA13; PA21; PA22;
20 M[02P]-065: PA13; PB12;
M[03P]-051: PA13; PB12; PC20;
M[03P]-054: PA13; PB12; PB07;
M[03P]-057: PA13; PB12; PA22;
M[02P]-066: PA21; PB12;
25 M[03P]-052: PA21; PB12; PC20;
M[03P]-055: PA21; PB12; PB07;
M[03P]-058: PA21; PB12; PA22;
M[03P]-059: PA13; PB12; PA21;
M[04P]-025: PA13; PB12; PA21; PC20;
30 M[04P]-026: PA13; PB12; PA21; PB07;
M[04P]-027: PA13; PB12; PA21; PA22.

Pornind de la compozițiile din plante enumerate în Lista 6-3, s-au preparat extracte de apă corespunzătoare (sau probe prelucrate), în conformitate cu metoda B descrisă anterior, utilizând 40 ml de apă conținând 100 g/l de zaharoză pentru extracția apei și incluzând etapa de decantare înainte de filtrare.

- 5 Activitatea biologică a fiecărei probe prelucrate a fost determinată în conformitate cu metoda C descrisă anterior, prin utilizarea următoarelor tulpini de *Staphylococcus aureus*: ATCC 6538, cu următoarele diluții finale ale probelor prelucrate: 1:5 pentru inhibarea formării biofilmului și 1:10 pentru inhibarea creșterii. Rețineți că inhibarea creșterii este aproape de 100% pentru fiecare amestec la diluția 1:5, iar inhibarea formării biofilmului este aproape de 0% pentru toate amestecurile la diluția 1:10.

- 10 Procentul de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor și procentul de inhibare a formării biofilmului pentru toate tulpinile testate ale probelor prelucrate obținute din diferitele compoziții din plante sunt raportate în Tabelul 9-1 de mai jos.

Tabelul 9-1: Media procentului de inhibare a creșterii planctonice și a procentului de inhibare a formării biofilmului asupra tulpinii ATCC® 6538™ de *Staphylococcus aureus* pentru proba prelucrată pe baza compozițiilor din Lista 9-1. Probele prelucrate au fost folosite la o diluție de 1:10 pentru testele de inhibare a creșterii planctonice și la o diluție de 1:5 pentru inhibarea formării biofilmului.

(A)

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[02P]-064	47%	34%
M[03P]-050	70%	56%
M[03P]-053	55%	35%
M[03P]-056	56%	38%

(B)

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[02P]-065	42%	15%
M[03P]-051	59%	36%
M[03P]-054	54%	22%
M[03P]-057	54%	34%

(C)

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[02P]-066	40%	23%
M[03P]-052	53%	28%
M[03P]-055	59%	27%
M[03P]-058	60%	33%

(D)

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
Mix[02P]-059	59%	87%

M[03P]-025	69%	90%
M[03P]-026	64%	90%
M[03P]-027	64%	89%

(A) enumeră extracte obținute din compoziții din plante care conțin PA13 și PA21, în care adăugarea unuia dintre PC20, PB07 și PA22 îmbunătățește activitatea; (B) enumeră extracte obținute din compoziții din plante care conțin PA13 și PB12, în care adăugarea unuia dintre PC20, PB07 și PA22 îmbunătățește activitatea; (C) enumeră extractele obținute din compoziții din plante care conțin PA13, PA21 și PB12, în care adăugarea unuia dintre PC20, PB07 și PA22 îmbunătățește activitatea; (D) enumeră extractele obținute din compoziții din plante care conțin PA13 și PA21, în care adăugarea unuia dintre PC20, PB07 și PA22 îmbunătățește activitatea.

Exemplul 10

În acest exemplu, ilustrăm activitățile antimicrobiene și antibiofilm simultane împotriva *Staphylococcus aureus* ale unui număr de 324 de amestecuri de extracte obținute din compozițiile din plante dezvăluite, care cuprind 2 plante din 3: *Filipendula ulmoric* (PA13), *Camellia sinensis* (PA21), *Arctostaphylos uva-ursi* (PB12) și cel puțin 1 plantă din 3: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera var. tinctorial* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07).

Pentru amestecurile de la M[20C]-2083 la M[20C]-20798, plantele uscate de calitate farmaceutică au fost obținute de la „Herboristerie Cailleau” (Chemille, Franța). Pentru amestecurile de la M[20C]-2805 la M[20C]-2957, plantele uscate de calitate farmaceutică au fost obținute de la „Pharmacie Fontgieve” (Clermont-Ferrand, Franța, plantele PA00 la PB12) și „Pharmacie St Herem” (Clermont-Ferrand, Franța, plantele PB13 la PD02).

Compozițiile din plante care conțin de la 3 la 20 de pulberi de plante au fost preparate în conformitate cu metoda A descrisă anterior.

Pornind de la compozițiile din plante, extractele de apă corespunzătoare (sau probele prelucrate) au fost preparate în conformitate cu metoda B descrisă anterior, utilizând 40 ml de apă conținând 100 g/l de zaharoză pentru extracția apei și incluzând etapa de decantare înainte de filtrare.

Activitatea biologică a fiecărei probe prelucrate a fost determinată în conformitate cu metoda C descrisă anterior, prin utilizarea următoarelor tulpini de *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923, ATCC 49476, ATCC 6538, ATCC 51740, ATCC 29213 și ATCC 14775, cu diluțiile finale 1:20 ale probelor prelucrate.

Media procentului de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor și media procentului de inhibare a formării biofilmului pentru toate tulpinile testate din probele prelucrate obținute din următoarele compoziții din plante din, respectiv, Lista 10-1, Lista 10-2, Lista 10-3 și Lista 10-4 este prezentată în, respectiv, Tabelul 10-1, Tabelul 10-2, Tabelul 10-3 și Tabelul 10-4. În fiecare set, s-a constatat că extractele obținute din compozițiile din plante care conțin mai mult de 3 sau 4 plante prezintă o inhibare a creșterii planctonice sau o inhibare a formării biofilmului (sau ambele inhibări) mai mare decât oricare dintre amestecurile care conțin doar 3 sau 4 plante.

Lista 10-1: Extracte din compoziții din plante care conțin 2 plante din 3: *Filipendula ulmaria* (PA13), *Camellia sinensis* (PA21) și cel puțin una din 3: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera var. tinctorial* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07):

M[03P]-050: PA13; PA21; PC20;

M[03P]-053: PA13; PA21; PB07;

M[03P]-056: PA13; PA21; PA22;

M[20C]-2808: PA11; PA12; PA13; PA13; PA18; PA21; PA23; PA24; PA28; PA69; PB07; PB88; PC23; PC24; PC49; PC52; PC55 (2 linguri); PC60; PC97; M[20C]-2820: PA10; PA11 (2 linguri); PA12; PA13; PA14; PA18; PA20; PA21; PA25; PA29; PA33; PA35; PA67; PA75; PB07; PB60; PC33; PC35; PC55 ;

M[20C]-2821: PA11; PA13 (2 linguri); PA19; PA20; PA21; PA22; PA25; PA29; PA33; PA35; PA75; PB07; PB36; PC20; PC33 (2 linguri); PC49; PC55; PC97; M[20C]-2826: PA11; PA13 (2 linguri); PA20; PA21; PA24; PA25; PA29; PA33; PA34; PA35; PA52; PA70; PA75; PB07; PC11; PC21; PC33; PC37; PC74;

M[20C]-2827: PA10; PA11; PA13 (2 linguri); PA20; PA21; PA25; PA26; PA29; PA33; PA35; PA57; PA75; PB02; PB07; PB28; PC11; PC23; PC33; PC49;

- M[20C]-2830: PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA18; PA21; PA22; PA25; PA29; PA32; PA34; PA67; PB07; PB60; PB88; PC33; PC35; PC55; PC98;
- M[20C]-2831: PA13; PA13; PA19; PA21; PA22; PA22; PA25; PA29; PA32; PA34; PB07; PB36; PB88; PC20; PC33; PC33; PC49; PC55; PC97; PC98;
- 5 M[20C]-2833: PA1D; PA11; PA13; PA14; PA21; PA22; PA24; PA25; PA26; PA29; PA32; PA34; PB33; PB88; PB88; PC12; PC23; PC27; PC33; PC98;
- M[20C]-2836: PA13; PA13; PA21; PA22; PA24; PA25; PA29; PA32; PA34; PA34; PA52; PA70; PB07; PB88; PC11; PC21; PC33; PC37; PC74; PC98;
- M[20C]-2837: PA10; PA13 (2 linguri); PA21; PA22; PA25; PA26; PA29; PA32; PA34; PA57; PB02; PB07; PB28; PB88; PC11; PC23; PC33; PC49; PC98;
- 10 M[20C]-2838: PA12; PA13 (2 linguri); PA18; PA21; PA21; PA22; PA24; PA25; PA29; PA32; PA34; PB88; PC23; PC33; PC49; PC52; PC55; PC97; PC98;
- M[20C]-2839: PA13 (2 linguri); PA14; PA21; PA22; PA25; PA25; PA26; PA29; PA32; PA34; PA39; PA52; PA57; PB33; PB88; PC33; PC71; PC97; PC98;
- 15 M[20C]-2858: PA12; PA13; PA18; PA20; PA21; PA23; PA24; PA24; PA67; PB07; PB28; PB33; PC12; PC20; PC21; PC23; PC49; PC52; PC55; PC97;
- M[20C]-2861: PA13; PA19; PA21; PA22 (2 linguri); PB07; PB28; PB36; PB60; PC11; PC20; PC20; PC23; PC33; PC49; PC55 (2 linguri); PC60; PC74; PC97; M[20C]-2866: PA13; PA21; PA22; PA24; PA34; PA52; PA70; PB07; PB28; PB60; PC11 (2 linguri); PC20; PC21; PC23; PC37; PC55; PC60; PC74 (2 linguri);
- 20 M[20C]-2867: PA10; PA13; PA21; PA22; PA26; PA57; PB02; PB07; PB28; PB28; PB60; PC11 (2 linguri); PC20; PC23; PC23; PC49; PC55; PC60; PC74;
- M[20C]-2868: PA12; PA13; PA18; PA21; PA21; PA22; PA24; PB28; PB60; PC11; PC20; PC23 (2 linguri); PC49; PC52; PC55 (2 linguri); PC60; PC74; PC97; M[20C]-2869: PA13; PA14; PA21; PA22; PA25; PA26; PA39; PA52; PA57; PB28; PB33; PB60; PC11; PC20; PC23; PC55; PC60; PC71; PC74; PC97;
- 25 M[20C]-2871: PA10; PA11; PA13; PA19; PA21; PA22; PA35; PA57; PB07; PB07; PB36; PB77; PC20 (2 linguri); PC23; PC33; PC49; PC55; PC71; PC97;
- M[20C]-2876: PA10; PA11; PA13; PA21; PA24; PA34; PA35; PA52; PA57; PA70; PB07 (2 linguri); PB77; PC11; PC20; PC21; PC23; PC37; PC71; PC74;
- M[20C]-2877: PA10; PA10; PA11; PA13; PA21; PA26; PA35; PA57; PA57; PB02; PB07; PB28; PB77; PC11; PC20; PC23 (2 linguri); PC49; PC71; M[20C]-2878: PA10; PA11; PA12; PA13; PA18; PA21; PA21; PA24; PA35; PA57; PB07; PB77; PC20; PC23; PC23; PC49; PC52; PC55; PC71; PC97;
- 30 M[20C]-2879: PA10; PA11; PA13; PA14; PA21; PA25; PA26; PA35; PA39; PA52; PA57 (2 linguri); PB07; PB33; PB77; PC20; PC23; PC71 (2 linguri); PC97; M[20C]-2889: PA10; PA12; PA13; PA14; PA18; PA21; PA26; PA26; PA28; PA29; PA33; PA39; PA75; PB36; PC20; PC52; PC55 (2 linguri); PC60; M[20C]-2894: PA11 (2 linguri); PA13; PA21; PA28; PA39; PA39; PA70; PB02; PB02; PB07; PB99 (2 linguri); PC14; PC20; PC49; PC71; PC97; PC98;
- 35 M[20C]-2944: PA10; PA11 (2 linguri); PA13; PA14; PA21; PA28; PA39; PA70; PB02; PB07; PB27; PB99; PC11; PC20; PC23; PC67; PC71; PC97; PC98;
- M[20C]-2954: PA11; PA12; PA13; PA14; PA21; PA23; PA28; PA33; PA39; PA70; PB01; PB02; PB07; PB99; PC20; PC27; PC52; PC71; PC97; PC98.
- 40

Tabelul 10-1: media procentului de inhibare a creșterii planctonice și a procentului de inhibare a formării biofilmului pe cele 6 tulpini de *Staphylococcus aureus* testate pentru proba prelucrată pe baza extractelor din Lista 10-1 la diluția 1:20

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
M[03C]-050	41%	31%
M[03C]-053	37%	23%
M[03C]-056	34%	21%
M[20C]-2808	66%	30%

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
M[20C]-2820	54%	27%
M[20C]-2821	53%	24%
M[20C]-2826	56%	25%
M[20C]-2827	51%	26%
M[20C]-2830	56%	37%
M[20C]-2831	64%	31%
M[20C]-2833	80%	39%
M[20C]-2836	59%	25%
M[20C]-2837	58%	25%
M[20C]-2838	70%	30%
M[20C]-2839	56%	30%

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
M[20C]-2858	58%	32%
M[20C]-2861	58%	31%
M[20C]-2866	57%	43%
M[20C]-2867	62%	32%
M[20C]-2868	74%	36%
M[20C]-2869	85%	45%
M[20C]-2871	63%	26%
M[20C]-2876	66%	28%
M[20C]-2877	81%	43%
M[20C]-2878	65%	28%
M[20C]-2879	58%	28%
M[20C]-2889	62%	41%
M[20C]-2894	55%	29%
M[20C]-2944	68%	16%
M[20C]-2954	75%	27%

Lista 10-2: extracte din compoziții din plante care conțin *Filipendula ulmaria* (PA13), *Arctostaphylos uva-ursi* (PB12) și cel puțin una din 3: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera var. tinctoria* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07):

M[03C]-051: PA13; PB12; PC20;

M[03C]-054: PA13; PB12; PB07;

M[03C]-057: PA13; PB12; PA22;

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

79

- M[20C]-2083: PA02; PA13; PA28 (2 linguri); PA31; PA36; PA40; PA79; PA93; PB01; PB12; PB17; PB18; PB31; PB51; PB77; PC20; PC58; PC64; PC66;
- M[20C]-2084: PA13; PA28; PA31; PA36; PA61; PA76; PA76; PA79; PA82; PB01; PB10; PB12; PB17; PB31; PB57; PC20; PC36; PC41; PC64; PC66;
- 5 M[20C]-2085: PA12; PA13; PA14; PA28; PA30; PA31; PA36; PA79; PA94; PB00; PB01; PB08; PB12; PB17; PB31; PC02; PC14; PC20; PC64; PC66;
- M[20C]-2090: PA08; PA13; PA20; PA23; PA26; PA32; PA46; PA52; PA57; PA79; PA95; PB10; PB12; PB33; PB76; PB82; PC08; PC20; PC21; PD00;
- 10 M[20C]-2091: PA08; PA13; PA26; PA52; PA57; PA72; PA79; PA88; PA92; PA95; PB12; PB60; PB76; PB83; PC08; PC11; PC20; PC26; PC68; PD00;
- M[20C]-2092: PA08; PA13; PA17; PA26; PA52; PA53; PA57; PA79; PA95; PB06; PB12; PB50; PB76; PC08; PC20; PC20; PC27; PC97; PD00; PD02;
- M[20C]-2100: PA13; PA20; PA23; PA32; PA41; PA46; PA53; PA79; PA80; PA90; PB08; PB10; PB12; PB33; PB82; PB85; PC20; PC21; PC28; PC75;
- 15 M[20C]-2102: PA13; PA17; PA41; PA53; PA79; PA80; PA90; PB06; PB08; PB12; PB50; PB85; PC20; PC20; PC27; PC28; PC75; PC97; PD02;
- M[20C]-2104: PA13; PA41; PA53; PA61; PA76; PA76; PA79; PA80; PA82; PA90; PB08; PB10; PB12; PB57; PB85; PC20; PC28; PC36; PC41; PC75;
- M[20C]-2105: PA12; PA13; PA14; PA30; PA41; PA53; PA79; PA80; PA90; PA94; PB00; PB08; PB08; PB12; PB85; PC02; PC14; PC20; PC28; PC75;
- 20 M[20C]-2110: PA00; PA10; PA13; PA20; PA23; PA25; PA30; PA32; PA46; PA52; PA79; PB05; PB10; PB12; PB33; PB82; PC01; PC20; PC21; PD07;
- M[20C]-2111: PA00; PA10; PA13; PA25; PA30; PA52; PA72; PA79; PA88; PA92; PB05; PB12; PB60; PB83; PC01; PC11; PC20; PC26; PC68; PD07;
- 25 M[20C]-2120: PA11; PA13; PA16; PA20; PA23; PA32; PA44; PA46; PA60; PA67; PA73; PA79; PB10; PB12; PB33; PB48; PB82; PC17; PC20; PC21;
- M[20C]-2122: PA11; PA13; PA16; PA17; PA44; PA53; PA60; PA67; PA73; PA79; PB06; PB12; PB48; PB50; PC17; PC20; PC20; PC27; PC97; PD02;
- M[20C]-2131: PA05; PA13; PA18; PA37; PASS; PA72; PA72; PA79; PA88; PA92; PA97; PB04; PB12; PB60; PB83; PC11; PC20; PC26; PC35; PC68;
- 30 M[20C]-2135: PA05; PA12; PA13; PA14; PA18; PA30; PA37; PA55; PA72; PA79; PA94; PA97; PB00; PB04; PB08; PB12; PC02; PC14; PC20; PC35;
- M[20C]-2137: PA05; PA13; PA18; PA27; PA37; PA46; PA55; PA72; PA79; PA82; PA97; PB00; PB04; PB11; PB12; PC20; PC35; PC45; PC52; PC67;
- 35 M[20C]-2140: PA13; PA14; PA20; PA23; PA32; PA37; PA46; PA79; PA85; PB10; PB12; PB33; PB49; PB82; PB98; PC20; PC21; PC55; PC62; PC98;
- M[20C]-2141: PA13; PA14; PA37; PA72; PA79; PA85; PA88; PA92; PB12; PB49; PB60; PB83; PB98; PC11; PC20; PC26; PC55; PC62; PC68; PC98;
- M[20C]-2142: PA13; PA14; PA17; PA37; PA53; PA79; PA85; PB06; PB12; PB49; PB50; PB98; PC20; PC20; PC27; PC55; PC62; PC97; PC98; PD02;
- 40 M[20C]-2143: PA02; PA13; PA14; PA28; PA37; PA40; PA79; PA85; PA93; PB12; PB18; PB49; PB51; PB77; PB98; PC20; PC55; PC58; PC62; PC98;
- M[20C]-2144: PA13; PA14; PA37; PA61; PA76; PA76; PA79; PA82; PA85; PB10; PB12; PB49; PB57; PB98; PC20; PC36; PC41; PC55; PC62; PC98;
- 45 M[20C]-2150: PA13; PA20; PA23; PA31; PA32; PA46; PA60; PA74; PA79; PB03; PB10; PB12; PB33; PB82; PC20; PC21; PC29; PC37; PC60; PC86;
- M[20C]-2151: PA13; PA31; PA60; PA72; PA74; PA79; PA88; PA92; PB03; PB12; PB60; PB83; PC11; PC20; PC26; PC29; PC37; PC60; PC68; PC86;
- M[20C]-2152: PA13; PA17; PA31; PA53; PA60; PA74; PA79; PB03; PB06; PB12; PB50; PC20; PC20; PC27; PC29; PC37; PC60; PC86; PC97; PD02;
- 50 M[20C]-2153: PA02; PA13; PA28; PA31; PA40; PA60; PA74; PA79; PA93; PB03; PB12; PB18; PB51; PB77; PC20; PC29; PC37; PC58; PC60; PC86;

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

80

M[20C]-2154: PA13; PA31; PA60; PA61; PA74; PA76; PA76; PA79; PA82; PB03; PB10; PB12; PB57; PC20; PC29; PC36; PC37; PC41; PC60; PC86;
M[20C]-2155: PA12; PA13; PA14; PA30; PA31; PA60; PA74; PA79; PA94; PB00; PB03; PB08; PB12; PC02; PC14; PC20; PC29; PC37; PC60; PC86;
5 M[20C]-2163: PA06; PA13; PA17; PA20; PA23; PA72; PA79; PA80; PA92; PB01; PB03; PB10; PB12; PB33; PB57; PB82; PC20; PC62; PC86; PC97;
M[20C]-2164: PA13; PA17; PA20; PA41; PA79; PA80; PA86; PA92; PB03; PB10; PB12; PC20; PC26; PC27; PC29; PC55; PC60; PC62; PC86; PC97;
10 M[20C]-2214: PA13; PA37; PA41; PA79; PA86; PB00; PB10; PB12; PB49; PB82; PC20; PC26; PC27; PC29; PC55; PC60; PC62; PC66; PC86;
M[20C]-2234: PA13; PA41; PA79; PA85; PA86; PB12; PB31; PB50; PB77; PC14; PC20; PC26; PC27; PC29; PC55; PC55; PC60; PC62; PC98;
M[20C]-2241: PA10; PA13; PA14; PA23; PA36; PA37; PA46; PA79; PB00; PB10; PB11; PB12; PB17; PB57; PC20; PC27; PC29; PC37; PC64; PC68;
15 M[20C]-2242: PA13; PA14; PA17; PA23; PA36; PA37; PA60; PA61; PA76; PA79; PA82; PB00; PB06; PB12; PB49; PC20; PC27; PC29; PC68; PC98;
M[20C]-2243: PA13; PA14; PA23; PA36; PA37; PA52; PA53; PA73; PA79; PA92; PB00; PB01; PB12; PB18; PB60; PC20; PC20; PC27; PC29; PC68;
M[20C]-2248: PA13; PA14 (2 linguri); PA23; PA25; PA36; PA36; PA37; PA46; PA79; PA85; PB00; PB12; PC02; PC20; PC27; PC29; PC29; PC55; PC68;
20 M[20C]-2249: PA10; PA13; PA14; PA23; PA36; PA37; PA53; PA74; PA79; PA92; PB00; PB12; PC20; PC27; PC29; PC62; PC67; PC68; PC86; PC97;
M[20C]-2250: PA13; PA23; PA37; PA76; PA79; PB10; PB12; PB33; PB50; PB82; PB82; PB85; PB98; PC01; PC11; PC20; PC45; PC55; PC60; PD02;
25 M[20C]-2253: PA13; PA37; PA52; PA53; PA73; PA79; PA92; PB01; PB10; PB12; PB18; PB33; PB50; PB60; PB82; PB85; PC01; PC20; PC20; PC45;
M[20C]-2254: PA11; PA13; PA17; PA27; PA37; PA79; PB00; PB10; PB12; PB33; PB50; PB82; PB83; PB85; PB92; PB98; PC01; PC20; PC27; PC45;
M[20C]-2255: PA13; PA36; PA37; PA53; PA72; PA79; PA80; PB03; PB10; PB12; PB33; PB49; PB50; PB82; PB82; PB85; PC01; PC20; PC45; PC68;
30 M[20C]-2256: PA13; PA23; PA37; PA53; PA61; PA79; PA85; PB10; PB12; PB33; PB50; PB60; PB82; PB85; PC01; PC11; PC20; PC29; PC45; PD02;
M[20C]-2257: PA13; PA37; PA37; PA60; PA72; PA79; PB10; PB12; PB33; PB49; PB50; PB82; PB85; PC01; PC08; PC20; PC45; PC68; PC98; PD02;
35 M[20C]-2258: PA13; PA14; PA25; PA36; PA37; PA46; PA79; PA85; PB10; PB12; PB33; PB50; PB82; PB85; PC01; PC02; PC20; PC29; PC45; PC55;
M[20C]-2259: PA10; PA13; PA37; PA53; PA74; PA79; PA92; PB10; PB12; PB33; PB50; PB82; PB85; PC01; PC20; PC45; PC62; PC67; PC86; PC97;
M[20C]-2261: PA10; PA13; PA23; PA36; PA37; PA46; PA53; PA73; PA79; PA97; PB10; PB11; PB12; PB17; PB57; PC20; PC26; PC29; PC37; PC64;
40 M[20C]-2278: PA10; PA13; PA14; PA25; PA28; PA30; PA36; PA37; PA41; PA46; PA79; PA85; PB12; PB50; PB60; PC02; PC20; PC29; PC55; PC66;
M[20C]-2281: PA10; PA13; PA17; PA46; PA52; PA79; PA82; PA92; PA96; PB10; PB11; PB12; PB17; PB57; PB98; PC20; PC36; PC37; PC64; PC86;
45 M[20C]-2321: PA13; PA46; PA53; PA79; PA82; PA92; PB03; PB10; PB11; PB12; PB83; PB85; PC20; PC20; PC21; PC55; PC60; PC86; PC97; PD02;
M[20C]-2406: PA13; PA37; PA46; PA53; PA79; PA85; PB01; PB05; PB10; PB11; PB12; PB17; PB49; PB98; PC20; PC36; PC37; PC45; PC58; PC67;
M[20C]-2420: PA10; PA13; PA14; PA36; PA46; PA79; PB10; PB10; PB11; PB11; PB12; PB17; PB17; PB33; PB82; PC20; PC54; PC55; PC68; PC98;
50 M[20C]-2441: PA00; PA13; PA14; PA17; PA17; PA37; PA37; PA46; PA74; PA79; PB00; PB03; PB10; PB12; PB49; PC08; PC20; PC35; PC62; PC86;

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

81

M[20C]-2443: PA00; PA13; PA14; PA14; PA17; PA36; PA37; PA79; PB00; PB01; PB10; PB12; PC02; PC08; PC11; PC20; PC29; PC62; PC67; PC86;
M[20C]-2449: PA00; PA13; PA14; PA17; PA36; PA37; PA60; PA79; PA85; PB00; PB10; PB12; PB82; PB98; PC08; PC20; PC29; PC62; PC86; PC98;
5 M[20C]-2451: PA10; PA13; PA17; PA23; PA37; PA46; PA74; PA76; PA79; PB00; PB03; PB08; PB10; PB12; PB49; PB49; PC20; PC35; PC97; PC98;
M[20C]-2460: PA08; PA13; PA14; PA36; PA36; PA46; PA79; PB10; PB11; PB12; PB17; PB17; PB98; PC20; PC36; PC54; PC62; PC68; PC68; PC86;
M[20C]-2488: PA10; PA13; PA37; PA46; PA53; PA74; PA79; PA82; PB00; PB00; PB12; PB49; PC20; PC29;
10 PC37; PC45; PC54; PC74; PC86; PC98;
M[20C]-2545: PA00; PA08; PA10; PA13; PA46; PA73; PA76; PA79; PA90; PB01; PB08; PB10; PB12; PB17; PB33; PB33; PC20; PC55; PC68; PD02;
M[20C]-2551: PA13; PA14; PA16; PA27; PA36; PA79; PA82; PA92; PA95; PB10; PB12; PB57; PB85; PC11; PC20; PC29; PC29; PC54; PC64; PC98;
15 M[20C]-2553: PA13; PA16; PA23; PA60; PA79; PA82; PA95; PB00; PB10; PB10; PB12; PB33; PB49; PB50; PB85; PC02; PC11; PC20; PC29; PC98;
M[20C]-2555: PA00; PA10; PA13; PA16; PA79; PA82; PA90; PA95; PB08; PB10; PB10; PB12; PB33; PB85; PC11; PC20; PC29; PC68; PC98; PD02;
M[20C]-2580: PA10; PA13; PA25; PA37; PA40; PA46; PA79; PB11; PB12; PB33; PB49; PB82; PB85; PB98;
20 PC20; PC29; PC29; PC36; PC45; PC97;
M[20C]-2589: PA13; PA14; PA17; PA40; PA46; PA79; PA80; PB11; PB12; PB33; PB49; PB85; PB98; PC20; PC26; PC29; PC37; PC86; PC97; PD02;
M[20C]-2622: PA13; PA25; PA36; PA36; PA37; PA46; PA46; PA79; PA82; PB12; PB49; PB82; PC20; PC20; PC54; PC55; PC64; PC68; PC86; PC98;
25 M[20C]-2627: PA13; PA14; PA36; PA46; PA76; PA79; PA80; PA96; PB12; PB49; PB49; PC20; PC20; PC45; PC54; PC55; PC64; PC97; PC98; PC98;
M[20C]-2641: PA05; PA13; PA16; PA27; PA36; PA37; PA41; PA79; PA96; PB05; PB10; PB12; PB82; PB85; PB98; PC11; PC20; PC54; PC68; PD02;
M[20C]-2651: PA13; PA36; PA41; PA46; PA79; PA92; PB00; PB01; PB05; PB12; PB33; PB82; PB82; PB85;
30 PB98; PC20; PC54; PC55; PC86; PD02;
M[20C]-2654: PA13; PA36; PA46; PA79; PA92; PB00; PB00; PB01; PB08; PB11; PB12; PB33; PB82; PC01; PC20; PC55; PC55; PC64; PC86; PC86;
M[20C]-2717: PA13; PA14; PA46; PA79; PB00; PB10; PB12; PB49; PB50; PB77; PB85; PB85; PC02; PC20; PC29; PC64; PC64; PC68; PC98; PD02;
35 M[20C]-2728: PA05; PA13; PA16; PA30; PA46; PA60; PA61; PA79; PA85; PB04; PB10; PB12; PB49; PB82; PB82; PB85; PB98; PC11; PC20; PC37;
M[20C]-2730: PA13; PA36; PA37; PA46; PA61; PA79; PA82; PA85; PB00; PB12; PB17; PB33; PB82; PB85; PC01; PC02; PC20; PC29; PC64; PC98;
M[20C]-2738: PA05; PA13; PA37; PA46; PA61; PA61; PA79; PA85; PB10; PB12; PB82; PB82; PB85; PB85; PB98; PC02; PC20; PC29; PC37; PC64;
40 M[20C]-2788: PA00; PA05; PA13; PA27; PA46; PA61; PA79; PA82; PB00; PB10; PB12; PB82; PB85; PB85; PB98; PC20; PC37; PC37; PC58; PC97;
M[20C]-2805: PA11; PA13; PA13; PA14; PA22; PA23; PA28; PA33; PA35; PA69; PB07; PB12; PB38; PB88; PB88; PC20; PC24; PC55; PC55; PC60;
45 M[20C]-2812: PA11; PA11; PA13; PA20; PA23; PA29; PA30; PA83; PA98; PB02; PB12; PB27; PB38; PC11; PC11; PC20; PC23; PC37; PC51; PC60;
M[20C]-2815: PA11; PA13; PA14; PA22; PA23; PA29; PA33; PA35; PA98; PB02; PB12; PB27; PB38; PB38; PB88; PC11; PC20; PC23; PC37; PC55;
M[20C]-2840: PA10; PA11; PA12 (2 linguri); PA13; PA14; PA18; PA28; PA33; PA67; PA67; PB07 (2 linguri); PB12; PB60; PC23; PC35; PC37; PC55; PC67;
50 M[20C]-2841: PA12; PA13 (2 linguri); PA19; PA22; PA28; PA33; PA67; PB07 (2 linguri); PB12; PB36; PC20; PC23; PC33; PC37; PC49; PC55; PC67; PC97;

- M[20C]-2842: PA11; PA12; PA13 (2 linguri); PA20; PA28; PA30; PA33; PA67; PA83; PB07; PB12 (2 linguri); PC11; PC20; PC23; PC37; PC51; PC60; PC67;
- M[20C]-2843: PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA24; PA26; PA28; PA33; PA67; PB07; PB12; PB33; PB88; PC12; PC23; PC23; PC27; PC37; PC67;
- 5 M[20C]-2844: PA12; PA13; PA13; PA15; PA18; PA20; PA28; PA32; PA33; PA67 (2 linguri); PB07; PB12; PB12; PC20; PC23; PC37; PC49; PC55; PC67;
- M[20C]-2845: PA12; PA13 (2 linguri); PA14; PA22; PA28; PA33; PA33; PA35; PA67; PB07; PB12 (2 linguri); PB38; PB88; PC20; PC23; PC37; PC55; PC67;
- 10 M[20C]-2847: PA10; PA12; PA13 (2 linguri); PA26; PA28; PA33; PA57; PA67; PB02; PB07; PB07; PB12; PB28; PC11; PC23; PC23; PC37; PC49; PC67;
- M[20C]-2849: PA12; PA13 (2 linguri); PA14; PA25; PA26; PA28; PA33; PA39; PA52; PA57; PA67; PB07; PB12; PB33; PC23; PC37; PC67; PC71; PC97;
- M[20C]-2852: PA11; PA13; PA20 (2 linguri); PA23; PA24; PA30; PA67; PA83; PB07; PB12; PB28; PB33; PC11; PC12; PC20; PC20; PC21; PC51; PC60;
- 15 M[20C]-2854: PA13; PA15; PA18; PA20 (2 linguri); PA23; PA24; PA32; PA67 (2 linguri); PB07; PB12; PB28; PB33; PC12; PC20 (2 linguri); PC21; PC49; PC55; M[20C]-2855: PA13; PA14; PA20; PA22; PA23; PA24; PA33; PA35; PA67; PB07; PB12; PB28; PB33; PB38; PB88; PC12; PC20; PC21; PC55;
- M[20C]-2893: PA00; PA06; PA11; PA12; PA13; PA23; PA26; PA28; PA33; PA39; PB02; PB07 (2 linguri); PB12; PB99; PC14; PC20; PC49; PC98; PD02;
- 20 M[20C]-2897: PA11 (2 linguri); PA13; PA14; PA24; PA29; PA39; PA83; PB02; PB07; PB12; PB60; PB99; PC11; PC14; PC20; PC20; PC49; PC51; PC98;
- M[20C]-2930: PA11; PA13; PA14; PA23; PA26; PA28; PA33; PA35; PA83; PB12; PB28; PB33; PB38; PB77; PB88; PC20; PC23; PC37; PC60; PC60;
- M[20C]-2933: PA00; PA06; PA11; PA12; PA13; PA14; PA23; PA26; PA28 (2 linguri); PA33; PA33; PB07; PB12; PB12; PB28; PB38; PB77; PC60; PD02;
- 25 M[20C]-2935: PA10; PA11; PA13; PA14; PA28; PA29; PA33; PA57; PA67; PB07; PB12; PB28 (2 linguri); PB38; PB77; PB77; PC11; PC20; PC52; PC60;
- M[20C]-2936: PA11 (2 linguri); PA13; PA14; PA18; PA28; PA33; PA57; PA67; PB02; PB12; PB28; PB38 (2 linguri); PC11; PC20; PC27; PC52; PC60;
- 30 M[20C]-2937: PA11; PA11; PA13; PA14 (3 linguri); PA28; PA29; PA33; PA83; PB12 (2 linguri); PB28; PB38; PB60; PB77; PC11; PC20; PC51; PC60;
- M[20C]-2939: PA10; PA11; PA12; PA13 (2 linguri); PA14; PA18; PA26; PA28; PA33 (2 linguri); PA39; PB12; PB28; PB38; PB77; PC20; PC52; PC55; PC60;
- M[20C]-2943: PA00; PA06; PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA23; PA26; PA28; PA33; PB07 (2 linguri); PB12; PB27; PC11; PC20; PC23; PC67; PD02;
- 35 M[20C]-2947: PA10; PA11 (2 linguri); PA13; PA14 (2 linguri); PA24; PA29; PA83; PB07; PB12; PB27; PB60; PC11 (2 linguri); PC20 (2 linguri); PC23; PC51; PC67; M[20C]-2953: PA00; PA06; PA12 (2 linguri); PA13; PA14; PA23 (2 linguri); PA26; PA28; PA33 (2 linguri); PB01; PB07 (2 linguri); PB12; PC20; PC27; PC52; PD02; M[20C]-2957: PA11; PA12; PA13; PA14 (2 linguri); PA23; PA24; PA29; PA33; PA83; PB01; PB07; PB12; PB60; PC11; PC20 (2 linguri); PC27; PC51; PC52.
- 40

Tabelul 10-2: media procentului de inhibare a creșterii planctonice și a procentului de inhibare a formării biofilmului asupra celor 6 tulpini testate de *Staphylococcus aureus* pentru proba prelucrată pe baza amestecurilor din Lista 10-2 la diluția 1:20

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
M[03C]-051	37%	24%
M[03C]-054	30%	13%
M[03C]-057	27%	22%
M[20C]-2083	84%	55%
M[20C]-2084	72%	40%

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

83

M[20C]-2085	70%	45%
M[20C]-2090	57%	46%
M[20C]-2091	66%	35%
M[20C]-2092	71%	43%
M[20C]-2100	56%	40%
M[20C]-2102	53%	41%
M[20C]-2104	60%	43%
M[20C]-2105	81%	55%
M[20C]-2110	59%	43%
M[20C]-2111	63%	46%
M[20C]-2120	66%	28%
M[20C]-2122	72%	37%
M[20C]-2131	54%	37%
M[20C]-2135	59%	40%
M[20C]-2137	78%	50%
M[20C]-2140	60%	35%
M[20C]-2141	56%	40%
M[20C]-2142	61%	34%
M[20C]-2143	77%	37%
M[20C]-2144	74%	39%
M[20C]-2150	65%	27%
M[20C]-2151	61%	34%
M[20C]-2152	66%	32%
M[20C]-2153	82%	50%
M[20C]-2154	67%	26%
M[20C]-2155	63%	32%
M[20C]-2163	61%	40%
M[20C]-2164	70%	35%
M[20C]-2214	76%	37%
M[20C]-2234	56%	31%
M[20C]-2241	60%	40%
M[20C]-2242	59%	33%
M[20C]-2243	63%	38%
M[20C]-2248	84%	49%
M[20C]-2249	63%	36%
M[20C]-2250	58%	36%
M[20C]-2253	76%	37%
M[20C]-2254	55%	25%
M[20C]-2255	60%	29%
M[20C]-2256	58%	30%
M[20C]-2257	59%	25%
M[20C]-2258	81%	39%
M[20C]-2259	60%	29%

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

84

M[20C]-2261	52%	25%
M[20C]-2278	53%	25%
M[20C]-2281	56%	26%

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
M[20C]-2321	55%	30%
M[20C]-2406	58%	31%
M[20C]-2420	55%	34%
M[20C]-2441	52%	36%
M[20C]-2443	58%	33%
M[20C]-2449	55%	32%
M[20C]-2451	53%	28%
M[20C]-2460	54%	37%
M[20C]-2488	54%	27%
M[20C]-2545	52%	29%
M[20C]-2551	52%	29%
M[20C]-2553	52%	27%
M[20C]-2555	58%	39%
M[20C]-2580	58%	44%
M[20C]-2589	56%	35%
M[20C]-2622	57%	40%
M[20C]-2627	58%	39%
M[20C]-2641	53%	36%
M[20C]-2651	53%	33%
M[20C]-2654	53%	35%
M[20C]-2717	55%	30%
M[20C]-2728	56%	24%
M[20C]-2730	55%	27%
M[20C]-2738	52%	26%
M[20C]-2788	56%	25%
M[20C]-2805	71%	25%
M[20C]-2812	54%	31%
M[20C]-2815	52%	29%
M[20C]-2840	55%	31%
M[20C]-2841	51%	31%
M[20C]-2842	53%	35%
M[20C]-2843	58%	34%
M[20C]-2844	76%	42%
M[20C]-2845	46%	33%
M[20C]-2847	61%	41%
M[20C]-2849	76%	32%

M[20C]-2852	77%	32%
M[20C]-2854	57%	27%
M[20C]-2855	66%	35%
M[20C]-2893	61%	37%
M[20C]-2897	66%	36%
M[20C]-2930	81%	52%
M[20C]-2933	60%	32%
M[20C]-2935	65%	34%
M[20C]-2936	68%	41%
M[20C]-2937	78%	41%
M[20C]-2939	77%	44%
M[20C]-2943	67%	29%
M[20C]-2947	71%	40%
M[20C]-2953	66%	38%
M[20C]-2957	71%	45%

Lista 10-3: compoziții din plante pentru probe prelucrate care conțin: *Camellia sinensis* (PA21), *Arctostaphylos uva-ursi* (PB12) și cel puțin una din 3: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera* var. *tintorial* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07):

- 5 M[03C]-052: PA21; PB12; PC20;
M[03C]-055: PA21; PB12; PB07;
M[03C]-058: PA21; PB12; PA22;
M[20C]-2888: PA14; PA15; PA18; PA21; PA21; PA23; PA26; PA28; PA28; PA29; PA39; PA57; PA75; PB07;
PB12; PB36; PC11; PC55; PC55; PC60;
- 10 M[20C]-2913: PA00; PA06; PA12; PA21; PA23; PA26; PA26; PA27; PA28; PA33; PB07; PB07; PB12 (2 linguri); PB33; PC20; PC24; PC41; PC71; PD02;
M[20C]-2918: PA15; PA18; PA21 (2 linguri); PA23; PA26; PA27; PA28; PA57; PB07 (2 linguri); PB12 (2 linguri); PB33; PC11; PC20; PC24; PC41; PC55; PC71;
M[20C]-2920: PA20; PA21; PA23; PA26; PA28; PA35; PA35; PA67; PA83; PB12; PB33; PB88; PC12; PC20;
- 15 PC23; PC37; PC37; PC60 (2 linguri); PC74; M[20C]-2923: PA00; PA06; PA12; PA20; PA21; PA23; PA26; PA28 (2 linguri); PA33; PA35; PA67; PB07; PB12 (2 linguri); PC12; PC37; PC60; PC74; PD02; M[20C]-2928: PA15; PA18; PA20; PA21 (2 linguri); PA23; PA28 (2 linguri); PA35; PA57; PA67; PB07; PB12 (2 linguri); PC11; PC12; PC37; PC55; PC60; PC74; M[20C]-2887: PA11; PA14; PA14; PA21; PA24; PA26; PA28; PA29 (2 linguri); PA39; PA75; PA83; PB12; PB36; PB60; PC11; PC20; PC51; PC55; PC60;
- 20 M[20C]-2914: PA11; PA21 (2 linguri); PA26; PA27; PA28; PA39; PA70; PB02; PB07; PB12; PB33; PB99; PC20; PC24; PC41; PC71 (2 linguri); PC97; PC98; M[20C]-2915: PA10; PA21; PA26; PA27; PA29; PA57; PA67; PB07 (2 linguri); PB12; PB28; PB33; PB77; PC11; PC20 (2 linguri); PC24; PC41; PC52; PC71; M[20C]-2916: PA11; PA18; PA21; PA26; PA27; PA57; PA67; PB02; PB07; PB12; PB33; PB38; PC11; PC20; PC20;
- 25 PC24; PC27; PC41; PC52; PC71;
M[20C]-2917: PA11; PA14; PA21; PA24; PA26; PA27; PA29; PA83; PB07; PB12 (2 linguri); PB33; PB60; PC11; PC20 (2 linguri); PC24; PC41; PC51; PC71;
M[20C]-2925: PA10; PA20; PA21; PA28; PA29; PA35; PA57; PA67 (2 linguri); PB07; PB12; PB28; PB77; PC11; PC12; PC20; PC37; PC52; PC60; PC74;
- 30 M[20C]-2926: PA11; PA18; PA20; PA21; PA28; PA35; PA57; PA67 (2 linguri); PB02; PB12; PB38; PC11; PC12; PC20; PC27; PC37; PC52; PC60; PC74;
M[20C]-2927: PA11; PA14; PA20; PA21; PA24; PA28; PA29; PA35; PA67; PA83; PB12; PB12; PB60; PC11; PC12; PC20; PC37; PC51; PC60; PC74;

M[20C]-2910: PA21; PA23; PA26 (2 linguri); PA27; PA35; PA83; PB07; PB12; PB33 (2 linguri); PB88; PC20 (2 linguri); PC23; PC24; PC37; PC41; PC60; PC71.

Tabelul 10-3: media procentului de inhibare a creșterii planctonice și a procentului de inhibare a formării biofilmului asupra celor 6 tulpini testate de *Staphylococcus aureus* pentru proba prelucrată pe baza amestecurilor din Lista 10-2 la diluția 1:20

5

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
M[03C]-052	31%	13%
M[03C]-055	29%	10%
M[03C]-058	31%	18%
M[20C]-2888	48%	27%
M[20C]-2913	46%	37%
M[20C]-2918	46%	32%
M[20C]-2920	54%	30%
M[20C]-2923	51%	28%
M[20C]-2928	46%	32%

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
M[20C]-2887	46%	8%
M[20C]-2914	29%	38%
M[20C]-2915	30%	35%
M[20C]-2916	39%	40%
M[20C]-2917	40%	41%
M[20C]-2925	41%	36%
M[20C]-2926	47%	36%
M[20C]-2927	41%	41%
M[20C]-2910	46%	39%

Lista 10-4: extracte din compoziții din plante care conțin: *Filipendula ulmaria* (PA13), *Camellia sinensis* (PA21), *Arctostaphylos uva-ursi* (PB12) și cel puțin una din 3: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera* var. *tintorial* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07):

10

M[04C]-025: PA13; PA21; PB12; PC20;
M[04C]-026: PA13; PA21; PB12; PB07;
M[04C]-027: PA13; PA21; PB12; PA22;

- M[20C]-2898: PA11; PA13; PA15; PA18; PA21; PA23; PA28; PA39; PA57; PB02; PB07 (2 linguri); PB07; PB12; PB99; PC11; PC14; PC20; PC49; PC55; PC98;
- M[20C]-2900: PA10; PA11; PA13; PA21; PA23; PA25; PA26; PA35; PA69; PA83; PB12; PB32; PB33; PB88; PC20 (2 linguri); PC23; PC37; PC55; PC60; M[20C]-2903: PA00; PA06; PA10; PA11; PA12; PA13; PA21; PA23; PA25; PA26; PA28; PA33; PA69; PB07; PB12 (2 linguri); PB32; PC20; PC55; PD02; M[20C]-2908: PA10; PA11; PA13; PA15; PA18; PA21 (2 linguri); PA23; PA25; PA28; PA57; PA69; PB07; PB12 (2 linguri); PB32; PC11; PC20; PC55 (2 linguri);
- M[20C]-2938: PA11; PA13; PA14; PA15; PA18; PA21; PA23; PA28 (2 linguri); PA33; PA57; PB07; PB12 (2 linguri); PB28; PB38; PB77; PC11; PC55; PC60;
- M[20C]-2948: PA10; PA11; PA13; PA14; PA15; PA18; PA21; PA23; PA28; PA57; PB07 (2 linguri); PB12; PB27; PC11 (2 linguri); PC20; PC23; PC55; PC67; M[20C]-2951: PA12; PA13 (2 linguri); PA14; PA21; PA23; PA24; PA33; PA39; PA67; PB01; PB07; PB12; PB77; PC20; PC27; PC33; PC49; PC52; PC60;
- M[20C]-2952: PA12; PA13 (2 linguri); PA14; PA21; PA23; PA25; PA26; PA33; PA37; PA67; PB01; PB07 (2 linguri); PB12; PC20; PC27; PC49; PC52; PC71;
- M[20C]-2958: PA12; PA13; PA14; PA15; PA18; PA21; PA23 (2 linguri); PA28; PA33; PA57; PB01; PB07 (2 linguri); PB12; PC11; PC20; PC27; PC52; PC55;
- M[20C]-2822: PA11 (2 linguri); PA13 (2 linguri); PA20 (2 linguri); PA21; PA25; PA29; PA30; PA33; PA35; PA75; PA83; PB12; PC11; PC20; PC33; PC51; PC60;
- M[20C]-2824: PA11; PA13 (2 linguri); PA15; PA18; PA20 (2 linguri); PA21; PA25; PA29; PA32; PA33; PA35; PA67; PA75; PB12; PC20; PC33; PC49; PC55;
- M[20C]-2825: PA11; PA13 (2 linguri); PA14; PA20; PA21; PA22; PA25; PA29; PA33 (2 linguri); PA35 (2 linguri); PA75; PB12; PB38; PB88; PC20; PC33; PC55;
- M[20C]-2834: PA13 (2 linguri); PA15; PA18; PA20; PA21; PA22; PA25; PA29; PA32 (2 linguri); PA34; PA67; PB12; PB88; PC20; PC33; PC49; PC55; PC98;
- M[20C]-2835: PA13 (2 linguri); PA14; PA21; PA22 (2 linguri); PA25; PA29; PA32; PA33; PA34; PA35; PB12; PB38; PB88 (2 linguri); PC20; PC33; PC55; PC98; M[20C]-2848: PA12 (2 linguri); PA13 (2 linguri); PA18; PA21; PA24; PA28; PA33; PA67; PB07; PB12; PC23 (2 linguri); PC37; PC49; PC52; PC55; PC67; PC97; M[20C]-2862: PA11; PA13; PA20; PA21; PA22; PA30; PA83; PB12; PB28; PB60; PC11 (2 linguri); PC20 (2 linguri); PC23; PC51; PC55; PC60 (2 linguri); PC74; M[20C]-2864: PA13; PA15; PA18; PA20; PA21; PA22; PA32; PA67; PB12; PB28; PB60; PC11; PC20 (2 linguri); PC23; PC49; PC55 (2 linguri); PC60; PC74; M[20C]-2865: PA13; PA14; PA21; PA22 (2 linguri); PA33; PA35; PB12; PB28; PB38; PB60; PB88; PC11; PC20 (2 linguri); PC23; PC55 (2 linguri); PC60; PC74; M[20C]-2872: PA10; PA11 (2 linguri); PA13; PA20; PA21; PA30; PA35; PA57; PA83; PB07; PB12; PB77; PC11; PC20 (2 linguri); PC23; PC51; PC60; PC71; M[20C]-2874: PA10; PA11; PA13; PA15; PA18; PA20; PA21; PA32; PA35; PA57; PA67; PB07; PB12; PB77; PC20 (2 linguri); PC23; PC49; PC55; PC71; M[20C]-2875: A10; A11; A13; A14; A21; A22; A33; A35; A35; A57; B07; B12; B38; B77; B88; C20 (2 linguri); C23; C55; C71;
- M[20C]-2882: PA13; PA14; PA21 (2 linguri); PA25; PA26 (2 linguri); PA28; PA29; PA37; PA39; PA67; PA75; PB07; PB12; PB36; PC49; PC55; PC60; PC71;
- M[20C]-2891: PA11; PA13 (2 linguri); PA21; PA24; PA39; PA39; PA67; PB02; PB07; PB12; PB77; PB99; PC14; PC20; PC33; PC49 (2 linguri); PC60; PC98; M[20C]-2892: PA11; PA13 (2 linguri); PA21; PA25; PA26; PA37; PA39; PA67; PB02; PB07 (2 linguri); PB12; PB99; PC14; PC20; PC49 (2 linguri); PC71; PC98; M[20C]-2901: PA10; PA11; PA13 (2 linguri); PA21 (2 linguri); PA24; PA25; PA39; PA67; PA69; PB12 (2 linguri); PB32; PB77; PC20; PC33; PC49; PC55; PC60;
- M[20C]-2902: PA10; PA11; PA13 (2 linguri); PA21 (2 linguri); PA25 (2 linguri); PA26; PA37; PA67; PA69; PB07; PB12 (2 linguri); PB32; PC20; PC49; PC55; PC71; M[20C]-2904: PA10; PA11 (2 linguri); PA13; PA21 (2 linguri); PA25; PA28; PA39; PA69; PA70; PB02; PB12; PB32; PB99; PC20; PC55; PC71; PC97; PC98;
- M[20C]-2905: PA10 (2 linguri); PA11; PA13; PA21; PA25; PA29; PA57; PA67; PA69; PB07; PB12; PB28; PB32; PB77; PC11; PC20 (2 linguri); PC52; PC55; M[20C]-2906: PA10; PA11 (2 linguri); PA13; PA18; PA21; PA25; PA57; PA67; PA69; PB02; PB12; PB32; PB38; PC11; PC20 (2 linguri); PC27; PC52; PC55; M[20C]-2907: PA10; PA11 (2 linguri); PA13; PA14; PA21; PA24; PA25; PA29; PA69; PA83; PB12 (2 linguri); PB32; PB60; PC11; PC20 (2 linguri); PC51; PC55; M[20C]-2909: A10 (2 linguri); A11; A12; A13 (2 linguri); A18; A21; A25; A26; A33; A39; A69; B12; B32; C20 (2 linguri); C52; C55 (2 linguri); M[20C]-2911: PA13; PA21

(2 linguri); PA24; PA26; PA27; PA39; PA67; PB07; PB12 (2 linguri); PB33; PB77; PC20; PC24; PC33; PC41; PC49; PC60; PC71;

M[20C]-2912: PA13; A21 (2 linguri); PA25; PA26 (2 linguri); PA27; PA37; PA67; PB07 (2linguri);PB12 (2 linguri); PB33; PC20; PC24; PC41; PC49; PC71 (2 linguri); M[20C]-2919: PA10; PA12; PA13; PA18; PA21; PA26 (2 linguri); PA27; PA33; PA39; PB07; PB12; PB33; PC20 (2 linguri); PC24; PC41; PC52; PC55; PC71; M[20C]-2922: PA13; PA20; PA21 (2 linguri); PA25; PA26; PA28; PA35; PA37; PA67 (2 linguri); PB07; PB12 (2 linguri); PC12; PC37; PC49; PC60; PC71; PC74; M[20C]-2929: PA10; PA12; PA13; PA18; PA20; PA21; PA26; PA28; PA33; PA35; PA39; PA67; PB12; PC12; PC20; PC37; PC52; PC55; PC60; PC74;

M[20C]-2932: PA11; PA13 (2 linguri); PA14; PA21; PA25; PA26; PA28; PA33; PA37; PA67; PB07; PB12 (2 linguri); PB28; PB38; PB77; PC49; PC60; PC71;

M[20C]-2941: PA10; PA11; PA13 (2 linguri); PA14; PA21; PA24; PA39; PA67; PB07; PB12; PB27; PB77; PC11; PC20; PC23; PC33; PC49; PC60; PC67;

M[20C]-2942: PA10; PA11; PA13 (2 linguri); PA14; PA21; PA25; PA26; PA37; PA67; PB07 (2 linguri); PB12; PB27; PC11; PC20; PC23; PC49; PC67; PC71;

Tabelul 10-4: media procentului de inhibare a creșterii planctonice și a procentului de inhibare a formării biofilmului pe cele 6 tulpini testate de *Staphylococcus aureus* pentru proba prelucrat[pe baza amestecurilor din Lista 10-4 la diluția 1:20

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
M[04C]-025	57%	18%
M[04C]-026	48%	16%
M104CJ-027	49%	18%
M[20C]-2898	60%	21%
M[20C]-2900	78%	32%
M[20C]-2903	48%	28%
M[20C]-2908	54%	15%
M[20C]-2938	70%	26%
M[20C]-2948	56%	22%
M[20C]-2951	47%	17%
M[20C]-2952	60%	19%
M[20C]-2958	53%	31%
M[20C]-2822	46%	38%
M[20C]-2824	60%	32%
M[20C]-2825	76%	38%
M[20C]-2834	55%	27%
M[20C]-2835	64%	29%
M[20C]-2848	52%	29%
M[20C]-2862	46%	31%
M[20C]-2864	51%	29%
M[20C]-2865	56%	43%

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
M[20C]-2872	59%	36%
M[20C]-2874	78%	39%
M[20C]-2875	83%	47%
M[20C]-2882	61%	28%
M[20C]-2891	70%	27%
M[20C]-2892	76%	39%
M[20C]-2901	59%	29%
M[20C]-2902	51%	30%
M[20C]-2904	62%	24%
M[20C]-2905	55%	37%
M[20C]-2906	59%	37%
M[20C]-2907	75%	41%
M[20C]-2909	82%	49%
M[20C]-2911	55%	30%
M[20C]-2912	59%	29%
M[20C]-2919	75%	48%
M[20C]-2922	63%	32%
M[20C]-2929	54%	30%
M[20C]-2932	73%	39%
M[20C]-2941	63%	48%
M[20C]-2942	56%	34%

Exemplul comparativ 4

Ca exemplu comparativ, raportăm mai multe extracte de compoziții din plante care conțin doar 1 plantă din 3: *Filipendula ulmoric* (PA13), *Camellia sinensis* (PA21), *Arctostaphylos uva-ursi* (PB12) și doar 1 plantă din 3: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera* var. *tinctoria* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07).

S-au preparat 5 compoziții din plante cu conținutul raportat în Lista 10-5 în conformitate cu metoda 1 descrisă anterior.

Lista 10-5 extracte din compoziții din plante care conțin următoarele plante

M[20P]-318: PA15; PA21; PA34; PA35; PA82; PA83; PA85; PA92; PA96; PB03; PB07; PB26; PB30; PB36; PB79; PC11; PC49; PC91; PC92; PD10;

M[20P]-329: PA10; PA28; PA34; PA36; PA55; PA72; PA83; PA85; PA91; PB03; PB12; PB16; PB28; PB35; PB49; PB92; PC20; PC23; PC64; PC85;

M[20P]-333: PA04; PA05; PA13; PA16; PA22; PA39; PA51; PA55; PA57; PA72; PA82; PA92; PA98; PB05; PB20; PB36; PB43; PB74; PB77; PC37;

M[20P]-362: PA21; PA23; PA25; PA33; PA37; PA57; PA69; PA81; PA92; PB16; PB25; PB26; PB28; PB29; PB78; PC20; PC21; PC71; PC83; PD02;

M[20P]-513: PA12; PA14; PA14; PA20; PA20; PA21; PA22; PA33; PA35; PA52; PA57; PA69; PB00; PB32; PB38; PC24; PC37; PC52; PC55; PC67;

Compozițiile din plante care conțin 20 de pulberi de plante au fost preparate în conformitate cu metoda A descrisă anterior.

Pornind de la compozițiile din plante, extractele de apă corespunzătoare (sau probele prelucrate) au fost preparate în conformitate cu metoda B descrisă anterior, utilizând 40 ml de apă conținând 100 g/l de zaharoză pentru extracția apei și incluzând etapa de decantare înainte de filtrare.

- 5 Activitatea biologică a fiecărei probe prelucrate a fost determinată în conformitate cu metoda C descrisă anterior prin utilizarea următoarelor tulpini de *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923, ATCC 49476, ATCC 6538, ATCC 51740, ATCC 29213 și ATCC 14775, cu diluțiile finale 1:20 ale probelor prelucrate.

- 10 Media procentului de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor și media procentului de inhibare a formării biofilmului pentru toate tulpinile testate pentru probele prelucrate obținute din compozițiile din plante din Lista 10-4 sunt prezentate în Tabelul 10-5. Fiecare procent reprezintă media a 2 măsurători efectuate în aceeași condiție în două godeuri diferite. Procentele negative reflectă promovarea creșterii și promovarea biofilmului, în locul inhibării dorite. Se apreciază că astfel de extracte prezintă o inhibare foarte slabă, dacă nu chiar deloc, în comparație cu extractele din exemplul 10.

- 15 **Tabelul 10-5: procentul mediu de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor și procentul mediu de inhibare a formării biofilmului pentru toate tulpinile testate pentru probele prelucrate obținute din compozițiile din plante din Lista 10-4**

	Inhibarea creșterii planctonice	Inhibarea formării biofilmului
M[20C]-318	-10%	0%
M[20C]-329	12%	9%
M[20C]-333	3%	18%
M[20C]-362	22%	3%
M[20C]-513	-21%	21%

Exemplul 11

- 20 În acest exemplu, ilustrăm activitățile antimicrobiene împotriva a 14 specii microbiene diferite, descrise în Tabelul 11-1, a 10 amestecuri de extracte obținute din compozițiile din plante prezentate în Lista 11-1, care cuprind cel puțin 2 plante din 3: *Filipendula ulmoric* (PA13), *Camellia sinensis* (PA21), *Arctostaphylos uva-ursi* (PB12) și cel puțin 1 plantă din 3: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera* var. *tinctorial* (PA22) și *Desmodium adscendens* (PB07).

Tabelul 11-1: specii și tulpini microbiene utilizate în exemplul 11

Denumire completă tulpină	Cod tulpină	Concentrația substanței de inoculare (bacterii/ml)
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> (MRSA) ATCC® 33592™	B-A49	2,10 ^{5,5}
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC® 14990™	B-A08	2,10 ⁵
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> ATCC® 49444™	B-A09	2,10 ⁵
<i>Candida albicans</i> ATCC® 60193™	B-A61	2,10 ^{6,5}
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 11775™	B-A67	2,10 ^{5,5}
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 13883™	B-A68	2,10 ^{5,5}
<i>Listeria innocua</i> ATCC® 33090™	B-A69	2,10 ^{5,5}
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 19115™	B-A70	2,10 ^{5,5}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853™	B-A71	2,10 ^{5,5}

<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis</i> ATCC® 13076™	B-A72	2,10 ^{5,5}
<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium</i> ATCC® 13311™	B-A73	2,10 ^{5,5}
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 27336™	B-A75	2,10 ^{5,5}
<i>Streptococcus equi subsp. zooepidemicus</i> ATCC® 43079™	B-A77	2,10 ^{5,5}
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC® BAA-1323™	B-B26	2,10 ^{6,5}

Lista 11-1: extracte din compoziții din plante care conțin: *Filipendula ulmaria* (PA13), *Camellia sinensis* (PA21) și cel puțin una din 3: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera var. tinctoria* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07) utilizate în Exemplul 11:

- 5 M[20P]-297: PA10; PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA29; PA33; PA57; PA67; PA69; PB07; PB12; PB60; PC20; PC37; PC49; PC98;
M[20P]-416: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[20P]-418: PA10; PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA23; PA24; PA26; PA39; PB07; PB12; PB38; PC11;
10 PC12; PC20; PC23; PC24; PC49; PC55;
M[20P]-527: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26 (3 linguri); PA33; PB08; PB12 (2 linguri); PB60; PB88; PC12; PC20;
M[20P]-557: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12 (4 linguri); PC11 (2 linguri); PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
15 M[20P]-573: PA10; PA11; PA13 (3 linguri); PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
M[20P]-576: PA11 (2 linguri); PA12; PA13 (3 linguri); PA14 (2 linguri); PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;
M[19P]-576: PA11 (2 linguri); PA12; PA13 (3 linguri); PA14 (2 linguri); PA20; PA21; PA22; PA29; PA39;
20 PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37;
M[5P]-1: PA12; PA13; PA21; PA22; PB12;
M[5P]-2: PA11; PA13; PA21; PA22; PB12;

Pentru amestecurile M[5P]-1, M[5P]-2 și M[19P]-576, plantele uscate de calitate farmaceutică au fost obținute de la „Herboristerie Cailleau” (Chemille, Franța). Pentru celelalte amestecuri, plantele uscate de calitate farmaceutică au fost obținute de la „Pharmacie Fontgieve” (Clermont-Ferrand, Franța, plantele PA00 la PB12) și „Pharmacie St Herem” (Clermont-Ferrand, Franța, plantele PB13 la PD02).

Toate compozițiile din 20 de plante au fost preparate în conformitate cu metoda A descrisă anterior.

Pornind de la compozițiile din plante, extractele de apă corespunzătoare (sau probele prelucrate) au fost preparate în conformitate cu metoda B descrisă anterior, utilizând 40 ml de apă conținând 100 g/l de zaharoză pentru extracția apei și incluzând etapa de decantare înainte de filtrare.

Compozițiile din plante M[19P]-576, M[5P]-1 și M[5P]-2 au fost preparate prin cântărirea fiecărei plante uscate după cum se indică în Tabelul 11-2.

Tabelul 11-2: greutatea plantei uscate (mg) utilizate în compozițiile din plante M[19P]-576, M[5P]-1 și M[5P]-2 utilizate în Exemplul 11

	PA11	PA12	PA13	PA14	PA20	PA21	PA22	PA29	PA39	PB12	PB60	PC20	PC26	PC33	PC37
M[19P]-576	409	145	573	316	277	271	207	380	207	247	206	236	198	187	154
M[5P]-1		903	1574			2237	1263			2022					
M[5P]-2	756		720			1027	577			925					

Pornind de la compozițiile din plante, extractele de apă corespunzătoare (sau probele prelucrate) au fost preparate în conformitate cu metoda B descrisă anterior, utilizând, respectiv, 30 ml, 40 ml și 40 ml de apă fără zaharoză cu, respectiv, M[19P]-576, M[5P]-1 și M[5P]2, pentru extracția apei și incluzând etapa de decantare înainte de filtrare.

- 5 Activitatea biologică a fiecărei probe prelucrate a fost determinată în conformitate cu metoda C descrisă anterior prin utilizarea următoarelor tulpini la diluțiile finale indicate ale probelor prelucrate este prezentată în Tabelul 11-3.

Media procentului de inhibare a creșterii planctonice microbiene este prezentată în Tabelul 11-3.

- 10 **Tabelul 11-3: procentul de inhibare a creșterii planctonice pe cele 14 tulpini microbiene testate pentru proba prelucrată din compoziția prezentată în Lista 11-1**

	M [20C]- 297	M [20C]- 416	M [20C]- 418	M [20C]- 527	M [20C]- 557	M [20C]- 573	M [20C]- 576	M [19C]- 576	M [5P]-1	M [5P]-2
Diluție	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:20	1:20	1:20
B-A49	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
B-A08	100%	99%	100%	100%	100%	98%	98%	100%	100%	100%
B-A09	89%	97%	98%	99%	99%	100%	100%	100%	100%	100%
B-A61	25%	69%	36%	45%	51%	55%	90%	ND	ND	ND
B-A67	45%	52%	59%	66%	62%	52%	39%	34%	55%	38%
B-A68	100%	97%	100%	100%	100%	94%	92%	100%	100%	100%
B-A69	-1%	21%	21%	38%	30%	30%	-1%	38%	100%	38%
B-A70	39%	52%	53%	74%	54%	57%	32%	34%	100%	40%
B-A71	63%	71%	69%	75%	75%	82%	71%	42%	100%	55%
B-A72	47%	53%	59%	63%	58%	58%	32%	39%	62%	42%
B-A73	59%	59%	59%	71%	12%	58%	32%	42%	100%	45%
B-A75	51%	52%	63%	71%	63%	57%	31%	ND	ND	ND
B-A77	40%	47%	64%	68%	59%	58%	40%	100%	100%	100%
B-B26	58%	64%	72%	70%	74%	42%	93%	ND	ND	ND

Observație: „ND” înseamnă nedeterminat

Exemplul 12

- 15 În acest exemplu, sunt ilustrate activitățile antimicrobiene ale unui amestec de plante în care etapa de extracție a fost realizată cu solvenții neapoși acetona, acetat de etil, etanol, utilizați singuri sau ca amestecuri binare, după cum se indică în Tabelul 12-1. Este furnizată o comparație cu apa.

Tabelul 12-1: compoziția amestecurilor binare utilizate în exemplul 12 pentru extracția neapoasă

A)	Denumire solvent binar	Raport acetonă - etanol	B)	Denumire solvent binar	Raport acetat de etil - etanol	C)	Denumire solvent binar	Raport acetat de etil - acetonă
	AC9ET1	90/10		EA9ET1	90/10		EA9AC1	90/10
	AC8ET2	80/20		EA8ET2	80/20		EA8AC2	80/20
	AC7ET3	70/30		EA7ET3	70/30		EA7AC3	70/30
	AC6ET4	60/40		EA6ET4	60/40		EA6AC4	60/40
	AC5ET5	50/50		EA5ET5	50/50		EA5AC5	50/50
	AC4ET6	40/60		EA4ET6	40/60		EA4AC6	40/60
	AC3ET7	30/70		EA3ET7	30/70		EA3AC7	30/70
	AC2ET8	20/80		EA2ET8	20/80		EA2AC8	20/80
	AC1ET9	10/90		EA1ET9	10/90		EA1AC9	10/90

Amestecul de plante uscate M[20P]-576 a fost compus în conformitate cu Tabelul 12-2 și introdus într-un flacon de 500 ml și amestecat bine prin răsturnare și rostogolire manuală. Plantele uscate au fost obținute de la „Herboristerie Cailleau” (Chemille, Franța), cu excepția PC49 care a fost obținut de la Siccarapam (Aubiat, Franța).

Tabelul 12-2: lista plantelor uscate care intră în compoziția M[20P]-576 utilizată în Exemplul 12

Plantă uscată	PA11	PA12	PA13	PA14	PA20	PA21	PA22	PA29	PA39	PB12	PB60	PC20	PC26	PC33	PC37	PC49
Greutate (g)	29,7	10,5	41,5	22,9	19,8	19,9	15,0	27,5	15,0	17,8	15,0	17,1	14,4	13,6	11,3	9,3

Pentru fiecare solvent testat, 5 g de amestec de plante uscate au fost introduse într-un flacon colorat de 100 ml (Schott, Germania) cu o bară magnetică și s-au adăugat 50 ml de solvent. Suspensia lichidă a fost agitată cu un agitator magnetic (RO 15P IKA, Germania), la viteză maximă timp de 48 de ore, la temperatura camerei. Fiecare suspensie/soluție a fost filtrată prin gravitație cu ajutorul unui filtru pliabil de 250 mm (J025106, Prats Dumas, Franța), pe o pâlnie de sticlă (Schott, Germania) plasată într-un balon de evaporare. Balonul care conține lichidul care a traversat filtrul se plasează pe un dispozitiv rotativ de evaporare în vid (Rotavapor® R205 + controler de vid V800, Büchi, Elveția) și evaporarea se efectuează la 35 °C, cu vid reglat sub punctul de ebuliție al solventului, până la evaporarea întregului solvent. Materialul rămas este cântărit și dizolvat în DMSO (Acros organic, SUA) qsp 10 g/l, pentru a forma amestecul extras.

Două extracte din apă au fost preparate în conformitate cu metoda B descrisă anterior, în care lingurile de plante uscate au fost înlocuite cu 2 g din amestecul de plante uscate M[20P]-576 din Exemplul 12, folosind 40 ml de apă pentru extracția apei și incluzând etapa de decantare înainte de filtrare. Conținutul de reziduuri uscate al unuia dintre extractele amestecului de plante a fost determinat prin cântărirea reziduului de liofilizare obținut cu un dispozitiv de liofilizare (FreeZone™ 2.5, Labconco SUA, cu RZ6 Vacuubrand, Germania) al extractului congelat.

Aceste conținuturi de reziduuri uscate au fost utilizate pentru a deduce activitățile specifice ale diferitelor extracte.

Activitatea biologică a fiecărui amestec extras a fost determinată în conformitate cu metoda C descrisă anterior prin utilizarea tulpinilor indicate în Tabelul 12-3, unde diluția amestecului extras a fost: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160. Concentrația minimă inhibitorie (CMI) a fost notată prin observarea vizuală a godeurilor ca fiind cea mai mică concentrație la care nu se observă creștere.

Tabelul 12-3: lista tulpinilor bacteriene utilizate în exemplul 12

<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
NCTC 12493™	B-A47	ATCC® 12228™	B-A22
ATCC® 33591™	B-A48	ATCC® 700296™	B-A23
ATCC® 33592™	B-A49	ATCC® 49461™	B-A24
NCTC 43300™	B-A51	ATCC® 14990™	B-A08

Rezultatele sunt compilate în Tabelele 12-4 pentru diferiți solvenți.

Tabelul 12-4: CMI în mg/L al amestecurilor extrase folosind: A) acetonă, acetat de etanol, etanol și apă ca solvent; B) proporții diferite de acetonă și etanol ca solvent binar, așa cum se indică în tabelul 12-2-A; C) proporții diferite de acetat de etanol și etanol ca solvent binar, așa cum se indică în tabelul 12-2-B; și D) folosind proporții diferite de acetat de etanol și acetonă ca solvent binar, așa cum se indică în tabelul 12-2-C.

A)	Acetonă	Etanol-acetat	Etanol	Apă					
B-A47	500	500	500	725					
B-A48	500	500	500	725					
B-A49	500	500	500	725					
B-A51	500	500	500	725					
B-A22	250	250	250	363					
B-A23	250	250	250	363					

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

97

B-A24	250	250	250	363					
B-A08	250	250	250	725					

AC9ET1	AC8ET2	AC7ET3	AC6ET4	AC5ET5	AC4ET6	AC3ET7	AC2ET8	AC1ET9	
500	500	500	500	500	500	500	500	500	
250	250	250	250	250	500	500	500	500	
AC9ET1	AC8ET2	AC7ET3	AC6ET4	AC5ET5	AC4ET6	AC3ET7	AC2ET8	AC1ET9	
B-A49	250	250	250	250	250	500	500	500	500
B-A51	500	500	500	500	500	500	500	500	500
B-A22	250	250	250	250	250	250	250	250	250
B-A23	250	125	125	125	125	250	250	250	250
B-A24	250	250	250	250	250	250	250	250	250
B-A08	250	250	250	250	250	250	250	250	250
C)	EA9ET1	EA8ET2	EA7ET3	EA6ET4	EA5ET5	EA4ET6	EA3ET7	EA2ET8	EA1ET9
B-A47	500	500	500	500	500	500	500	500	500
B-A48	250	250	250	250	250	500	500	500	500
B-A49	250	250	250	250	250	500	500	500	500
B-A51	250	500	500	500	500	500	500	500	500
B-A22	250	250	250	250	250	250	250	250	250
B-A23	250	250	250	250	250	250	250	250	250
B-A24	250	250	250	250	250	250	250	250	250
B-A08	250	250	250	250	250	250	250	250	250
D)	EA9AC1	EA8AC2	EA7AC3	EA6AC4	EA5AC5	EA4AC6	EA3AC7	EA2AC8	EA1AC9

B-A47	500	500	500	500	500	500	500	500	500
B-A48	500	500	500	500	500	500	500	500	500
B-A49	500	500	500	500	500	500	500	500	500
B-A51	500	500	500	500	500	500	500	500	500
B-A22	500	250	250	250	250	250	250	250	250
B-A23	500	250	250	250	250	250	250	250	250
B-A24	500	250	250	250	250	250	250	250	250
B-A08	500	500	250	250	250	250	250	250	250

Exemplul 13

În acest exemplu, ilustrăm activitățile antimicrobiene ale unui amestec de plante preparat în conformitate cu metoda B descrisă anterior, în care carbohidratul adăugat este ales dintre zaharoză, dextroză, maltoză și galactoză.

Amestecul de plante uscate M[19P]-576, M[5P]-1 și M[5P]-2 a fost compus în conformitate cu Tabelul 13-1 și introdus într-un flacon de 500 ml și amestecat bine prin răsturnare și rostogolire manuală. Plantele uscate au fost obținute de la „Herboristerie Cailleau” (Chemille, Franța), cu excepția PC49 care a fost obținut de la Siccarapam (Aubiat, Franța).

Tabelul 13-1: lista de plante uscate care compun: A) amestecul M[20P]-576, B) amestecul M[5P]-1 și C), amestecul M[5P]-2 utilizat în exemplul 13

A)

Plantă uscată	PA11	PA12	PA13	PA14	PA20	PA21	PA22	PA29	PA39	PB12	PB60	PC20	PC26	PC33	PC37	PC49
Greutate (g)	29,7	10,5	41,5	22,9	19,8	19,9	15,0	27,5	15,0	17,8	15,0	17,1	14,4	13,6	11,3	9,3

Plantă uscată	PA12	PA13	PA21	PA22	PB12
Greutate (g)	34.1	59.2	84.1	47.5	75.8

Plantă uscată	PA11	PA13	PA21	PA22	PB12
Greutate (g)	56.9	54	76.9	43.4	69.4

Pentru fiecare amestec de plante uscate, extractele au fost preparate în conformitate cu metoda B descrisă anterior, în care lingurile de plante uscate au fost înlocuite cu 2 g din amestecul de plante din Exemplul 13, folosind 40 ml de apă și cantitățile de carbohidrați indicate în Tabelul 13-3 pentru extracția cu apă și incluzând etapa de decantare înainte de filtrare.

5 Conținutul de reziduuri uscate al amestecurilor de plante fără carbohidrați a fost determinat separat, prin cântărirea reziduului de liofilizare obținut cu un dispozitiv de liofilizare (FreeZone™ 2.5, Labconco SUA, cu RZ6 Vacuubrand, Germania) dintr-un extract congelat de 40 ml preparat în conformitate cu metoda B descrisă anterior, în care lingurile de plante uscate au fost înlocuite cu 2 g din amestecul de plante din Exemplul 13, folosind 40 ml de apă pentru extracția cu apă și incluzând etapa de decantare înainte de filtrare. Aceste conținuturi de reziduuri
10 uscate au fost utilizate pentru a deduce activitățile specifice ale diferitelor extracte, atunci când carbohidratul este considerat un adjuvant și nu este considerat parte a ingredientului activ.

Activitatea biologică a fiecărui amestec extras a fost determinată în conformitate cu metoda C descrisă anterior prin utilizarea tulpinilor indicate în Tabelul 13-2, unde diluția amestecului extras a fost: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160. Concentrația minimă inhibitorii (CMI) a fost notată prin observarea vizuală a godeurilor ca fiind cea mai
15 mică concentrație la care nu se observă creștere.

Tabelul 13-2: Lista tulpinilor bacteriene utilizate în Exemplul 13

<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
NCTC 12493™	B-A47	ATCC® 12228™	B-A22
ATCC® 33591™	B-A48	ATCC® 700296™	B-A23
ATCC® 33592™	B-A49	ATCC® 49461™	B-A24
NCTC 43300™	B-A51	ATCC® 14990™	B-A08

Rezultatele sunt compilate în Tabelele 13-4.

MD/EP 3534926 T2 2024.10.31

[illegible]

Exemplul 14

În acest exemplu, ilustrăm îmbunătățirea activității antimicrobiene a extractului de amestec de plante M[20P]-576 față de antibioticele utilizate în mod obișnuit.

5 Tabelul 14-1: specii și tulpini bacteriene utilizate în Exemplul 14

Denumirea completă a tulpinii	Codul tulpinii
Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC® 25923™	B-A17
Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC® 29213™	B-A21

10 Lista 14-1: Compoziții pe bază de plante ale probei prelucrate utilizate în Exemplul 14:

M[19P]-576: PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37.

Plantele uscate de calitate farmaceutică au fost obținute de la „Herboristerie Cailleau” (Chemille, Franța).

Compozițiile din plante M[19P]-576 au fost preparate prin cântărirea fiecărei plante uscate după cum se indică în Tabelul 14-2.

5

Tabelul 14-2: greutatea plantei uscate (mg) utilizate în compozițiile din plante M [19P]-576

	PA11	PA12	PA13	PA14	PA20	PA21	PA22	PA29	PA39	PB12	PB60	PC20	PC26	PC33	PC37
M[19P]-576	409	145	573	316	277	271	207	380	207	247	206	236	198	187	154

Pornind de la compoziția din plante, extractele de apă corespunzătoare (sau probele prelucrate) au fost preparate în conformitate cu metoda B descrisă anterior, folosind 2,06 g din compoziția pe bază de plante de mai sus cu 40 ml apă cu 100 g/l zaharoză pentru extracția apei și incluzând etapa de decantare înainte de filtrare. Într-un preparat independent de extract din apă fără zaharoză, s-a măsurat că 2,06 g/40 ml de compoziție din plante corespunde la 14,5 g/l, după cum se deduce din greutatea extractului liofilizat uscat din plante.

Activitatea biologică a fiecărei probe prelucrate a fost determinată în conformitate cu metoda C descrisă anterior, prin utilizarea următoarelor tulpini la diluțiile finale indicate ale probelor prelucrate și este prezentată în Tabelul 14-3. În Exemplul 14 se calculează creșterea bacteriană în prezența antibioticului și/sau a amestecului de plante în raport cu creșterea în absența atât a antibioticului, cât și a extractului de amestec de plante.

Media procentului de inhibare a creșterii planctonice a bacteriilor este prezentată în Tabelul 14-3.

Trebuie reținut faptul că prezența extractului din plante M[19P]-576 are trei efecte la concentrația utilizată: 1) reduce creșterea bacteriană la o concentrație scăzută și în absența antibioticului, 2) reduce creșterea bacteriană indusă de concentrația scăzută de antibiotic în raport cu creșterea în absența antibioticelor și 3) reduce concentrația minimă inhibitoare (CMI) a vancomicinei pentru B-A17 și respectiv a ampicilinei și penicilinei pentru B-A21, la o concentrație a M[19P]-576 începând cu 90,6 mg/ml, 181,3 mg/ml și respectiv 90,6 mg/ml.

Tabelul 14-3: creșterea planctonică în prezența diferitelor concentrații de extract și concentrații de antibiotic în raport cu creșterea bacteriană atât în absența extractului, cât și a antibioticului, pe două tulpini diferite

Concentrația antibioticului (μg/ml)														
		M[19P]-576 (μg/ml)	Tulpină											
			0	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50	125	250	500	1000	2000	4000
Ampicilină	B-A17	0	100%	176%	176%	148%	131%	112%	2%	0%	0%	0%	0%	-1%
		90,6	57%	64%	76%	75%	58%	18%	1%	0%	0%	0%	0%	0%
		181,3	54%	52%	53%	52%	31%	7%	-4%	-4%	-4%	-4%	-5%	-1%
	B-A21	0	100%	153%	132%	131%	132%	116%	150%	113%	112%	106%	-1%	0%
		90,6	64%	108%	83%	82%	82%	74%	83%	75%	83%	0%	0%	0%
		181,3	42%	44%	63%	70%	69%	70%	62%	62%	61%	-2%	-3%	-2%
	B-A17	0	100%	137%	138%	3%	1%	0%	-1%	0%	0%	0%	0%	0%
		90,6	53%	39%	25%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
		181,3	51%	23%	5%	-3%	-3%	-3%	-3%	-2%	-3%	-4%	-4%	-2%
Penicilină	B-A17	0	100%	135%	116%	115%	113%	108%	106%	101%	0%	0%	0%	0%
		90,6	65%	104%	83%	83%	84%	80%	74%	26%	0%	0%	0%	0%
		181,3	44%	62%	43%	70%	61%	60%	45%	-3%	-3%	-3%	-3%	-3%
	B-A21	0	100%	135%	118%	114%	117%	115%	116%	118%	128%	117%	0%	0%
		90,6	62%	65%	66%	65%	74%	70%	67%	66%	63%	0%	0%	0%
		181,3	42%	40%	41%	53%	55%	55%	54%	46%	47%	-3%	-3%	-2%
	B-A17	0	100%	118%	117%	113%	117%	110%	102%	102%	102%	0%	0%	0%
		90,6	45%	102%	82%	88%	77%	76%	77%	74%	67%	0%	0%	0%
		181,3	58%	48%	63%	57%	60%	57%	41%	57%	32%	-2%	-3%	0%

Exemplul 15

În acest exemplu, ilustrăm modul de adaptare a temperaturii în metoda B pentru a face față constrângerilor industriale.

Plantele uscate de calitate organică au fost obținute de la „Herboristerie Cailleau” (Chemille, Franța).

Compozițiile din plante M[5P]-1 au fost preparate prin cântărirea fiecărei plante, uscate după cum se indică în Tabelul 15-1.

Tabelul 15-1: greutatea plantei uscate (mg) utilizate în compozițiile din plante M[5P]-1

	PA12	PA13	PA21	PA22	PB12
M[5P]-1	395.2	688.8	978.9	552.5	884.6

Un prim extract M[5P]-1-A a fost preparat prin încorporarea a 120 g de compoziție din plante în 600 ml de apă conținută într-un pahar de 2 l (Schott, Germania). Un al doilea extract M[5P]-1-B a fost preparat prin introducerea a 120 g din compoziția din plante într-un sac de bumbac de calitate organică de 25x30 cm (Ecobags, SUA), iar punga umplută a fost introdusă în 600 ml de apă conținută într-un pahar de laborator de 2 l (Schott, Germania). Un al treilea extract M[5P]-1-C a fost preparat prin introducerea de două ori a 60 g din compoziția din plante într-un sac de bumbac de calitate organică de 25x30 cm (Ecobags, SUA), iar cele două pungi umplute au fost introduse în 600 ml de apă conținută într-un singur pahar de 2 l (Schott, Germania). Fiecare preparat, respectiv M[5P]-1-A, M[5P]-1-B și M[5P]-1-C, a fost lăsat la macerat timp de 3 ore la temperatura camerei și apoi a fost introdus împreună cu paharul într-o autoclavă (VWR Vapour Line Eco 25, SUA) timp de 30 de minute la, 121 °C, 121 °C și respectiv 134 °C. Pentru fiecare dintre M[5P]-1-B și M[5P]-1-C, sacii de bumbac au fost presați cu ajutorul unei prese de fructe de 5 l acționată manual (Brouwland, Belgia), iar lichidul recuperat a fost pus înapoi în paharul de 2 l. Fiecare pahar a fost lăsat la decantare, iar cantitatea necesară de lichid supernatant a fost utilizată pentru măsurarea activității biologice.

Tabelul 15-2: Speciile și tulpinile bacteriene utilizate în Exemplul 15

Denumirea completă a tulpinii	Codul tulpinii
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> ATCC® 25923™	B-A17
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> ATCC® 29213™	B-A21
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> ATCC® 33592™	B-A49

Activitatea biologică a fiecărei probe prelucrate a fost determinată în conformitate cu metoda C descrisă anterior prin utilizarea tulpinilor enumerate în Tabelul 15-2 la diluții finale de 1:40, 1:80, 1:160 și 1:320. Diluția corespunzătoare concentrației minime inhibitorii (CMI) a fost notată prin observarea vizuală a godeurilor ca fiind cea mai mică concentrație la care nu se observă creștere și este prezentată în Tabelul 15-3.

Tabelul 15-3: diluția corespunzătoare concentrației inhibitorii minime (CMI) a extractelor realizate cu diferite detalii industriale și temperatură

	M[5P]-1-A la 121 °	M[5P]-1-B la 121 °	M[5P]-1-C la 134 °C
B-A17	1/80	1/40	1/80
B-A21	1/80	1/40	1/80
B-A49	1/80	1/40	1/160

Trebuie reținut faptul că introducerea sacului de bumbac pentru a facilita procesul industrial a redus ușor activitatea extractului, în comparație cu procesul nesatisfăcător fără sac. Creșterea temperaturii autoclavei în timpul fazei de extracție la cald a permis recuperarea întregii activități.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A1-99/20289
- Petko Denev ET AL: "Antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities of herb extracts", Acta biochimica Polonica, 1 January 2014 (2014-01-01), page 359, XP055356035, Poland Retrieved from the Internet: URL:http://www.actabp.pl/pdf/2_2014/359.pdf f

- YAM T S ET AL: "MICROBIOLOGICAL ACTIVITY OF WHOLE AND FRACTIONATED CRUDE EXTRACTS OF TEA (CAMELLIA SINENSIS), AND OF TEA COMPONENTS", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 152, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 169-174, XP009069370, ISSN: 0378-1097, DOI: 10.1111/J.1574-6968.1997.TB10424.X
- WO-A2-2009/031041
- M. SHIMIZU ET AL: "Marked Potentiation of Activity of beta -Lactams against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus by Corilagin", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 45, no. 11, 1 November 2001 (2001-11-01), pages 3198-3201, XP055356006, ISSN: 0066-4804, DOI: 10.1128/AAC.45.11.3198-3201.2001
- US-A1- 2015 056 255
- AZWANIDA NN: "A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation", MEDICINAL & AROMATIC PLANTS, vol. 04, no. 03, 1 January 2015 (2015-01-01), XP055357964, DOI: 10.4172/2167-0412.1000196
- WAKSMAN SA ET AL: "Strain Specificity and Production of Antibiotic Substances: V. Strain Resistance of Bacteria to Antibiotic Substances, Especially to Streptomycin", PNAS, vol. 31, no. 6, 1 June 1945 (1945-06-01), pages 157-164, XP055358211, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.31.6.157

(57) Revendicări:

1. Extract dintr-o compoziție din plante, care cuprinde cel puțin două plante uscate selectate dintre *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* și *Arctostaphylos uva-ursi* și cel puțin o plantă selectată dintre *Vitis vinifera* var. *tinctoria*, *Eugenia caryophyllus* și *Desmodium adscendens*.

2. Extractul conform revendicării 1, în care compoziția din plante mai cuprinde una sau mai multe plante uscate suplimentare selectate dintre: *Achillea millefolium*, *Acorus calamus*, *Agrimonia eupatoria*, *Agropyrum repens*, *Alchemilla vulgaris*, *Alkanna tinctoria*, *Althaea officinalis*, *Anethum graveolens*, *Angelica archangelica*, *Arbutus unedo*, *Arnica montana*, *Artemisia pontica*, *Artemisia vulgaris*, *Asparagus officinalis*, *Asperula odorata*, *Betula pendula*, *Borrigo officinalis*, *Buxus sempervirens*, *Calamintha officinalis*, *Calendula officinalis*, *Calluna vulgaris*, *Carum carvi*, *Cassia angustifolia*, *Centaurea cyanus*, *Centaureum erythraea*, *Centella asiatica*, *Cetraria islandica*, *Chamaemelum nobile*, *Chamomilla recutita*, *Chrysanthellum americanum*, *Cichorium endivia*, *Cichorium intybus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Citrus aurantium*, *Combretum micranthum*, *Crataegus oxyacantha*, *Cuminum cyminum*, *Cupressus sempervirens*, *Curcuma zedoaria*, *Cynara scolymus*, *Cytisus scoparius*, *Desmodium adscendens*, *Elettaria cardamomum*, *Eleutherococcus senticosus*, *Epilobium parviflorum*, *Erysimum officinale*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Eupatorium cannabinum*, *Foeniculum vulgare*, *Fraxinus excelsior*, *Fucus vesiculosus*, *Fumaric officinalis*, *Galium odoratum*, *Gentiana lutea*, *Geranium robertianum*, *Ginkgo biloba*, *Glechoma hederacea*, *Glycyrrhiza glabra*, *Handroanthus impetiginosus*, *Harpagophytum procumbens*, *Hieracium pilosella*, *Humulus lupulus*, *Hypericum perforatum*, *Hyssopus officinalis*, *Illicium verum*, *Inula helenium*, *Juglans regia*, *Juniperus communis*, *Lamium album*, *Lavandula angustifolia*, *Levisticum officinale*, *Lippia citriodora*, *Lotus corniculatus*, *Lythrum salicaria*, *Malva sylvestris*, *Marrubium vulgare*, *Medicago sativa*, *Melissa officinalis*, *Mentha 3 piperita*, *Morus nigra*, *Myrtus communis*, *Olea europaea*, *Origanum majorana*, *Panax ginseng*, *Papaver rhoeas*, *Parietaria officinalis*, *Passiflora incarnata*, *Petroselinum crispum*, *Peumus boldus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pimpinella anisum*, *Plantago lanceolata*, *Plantago ovata*, *Potentilla anserina*, *Quercus robur*, *Rhamnus franqula*, *Rheum palmatum*, *Rosa centifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Rubia tinctorum*, *Rubus idaeus*, *Salix alba*, *Salvia officinalis*, *Sambucus nigra*, *Satureja montana*, *Silybum marianum*, *Solanum dulcamara*, *Tabebuia impetiginosa*, *Tanacetum vulgare*, *Taraxacum officinalis*, *Thymus serpyllum*, *Thymus vulgaris*, *Tilia tomentosa*, *Tilia cordata*, *Trigonella foenum-graecum*, *Tussilago farfara*, *Vaccinium myrtillus*, *Valeriana officinalis*, *Verbascum thapsus*, *Verbena officinalis*, *Viscum album*, *Zea mays* și *Zingiber officinale*.

3. Extract conform oricăreia dintre revendicările anterioare, în care compoziția din plante cuprinde de la trei la șapte plante uscate, selectate dintre: *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Desmodium adscendens*,

Eugenic caryophyllus și *Eucalyptus globulus*, dintre care cel puțin două dintre aceste plante sunt selectate dintre *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* și *Arctostaphylos uva-ursi* și cel puțin una dintre aceste plante este selectată dintre *Vitis vinifera tinctoria*, *Desmodium adscendens* și *Eugenic caryophyllus*.

4. Extractul conform revendicărilor 1-2, în care compoziția din plante cuprinde următoarele plante uscate: *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria* și *Arctostaphylos uva-ursi*.

5. Extractul conform revendicărilor 1-2, în care compoziția din plante cuprinde următoarele plante uscate: *Rheum palmatum*, *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria* și *Arctostaphylos uva-ursi*.

6. Extractul conform revendicărilor 1-2, în care compoziția din plante cuprinde următoarele plante uscate: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Eugenia caryophyllus* și *Arctostaphylos uva-ursi*.

7. Extractul conform revendicărilor 1-2, în care compoziția din plante cuprinde următoarele plante uscate: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Eucalyptus globulus*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Mentha spicata* și *Rubia tinctorum*.

8. Extractul conform revendicărilor 1-2, în care compoziția din plante cuprinde cel puțin paisprezece sau cincisprezece plante uscate selectate dintre următoarele șaisprezece: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Satureja montana*, *Valeriana officinalis*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Fucus vesiculosus*, *Foeniculum vulgare*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Arbutus unedo*, *Eugenia caryophyllus*, *Juniperus communis*, *Combretum micranthum*, *Lippia citrodora* și *Tanacetum vulgare*.

9. Extractul conform revendicărilor 1-2, în care compoziția din plante cuprinde următoarele plante uscate: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Satureja montana*, *Valeriana officinalis*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Fucus vesiculosus*, *Foeniculum vulgare*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Arbutus unedo*, *Eugenia caryophyllus*, *Juniperus communis*, *Combretum micranthum* și *Lippia citrodora*.

10. Extractul conform revendicărilor 1-2, în care compoziția din plante cuprinde următoarele plante uscate: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Satureja montana*, *Valeriana officinalis*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Fucus vesiculosus*, *Foeniculum vulgare*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Arbutus unedo*, *Eugenia caryophyllus*, *Juniperus communis*, *Combretum micranthum*, *Lippia citrodora* și *Tanacetum vulgare*.

11. Un liofilizat al extractului conform oricăreia dintre revendicările 1-10.

12. Un supliment alimentar, o compoziție nutraceutică, farmaceutică, veterinară sau cosmetică sau un aliment funcțional sau un aditiv alimentar care cuprinde extractul conform oricăreia dintre revendicările 1-10 sau liofilizatul din revendicarea 11, ca ingredient activ, împreună cu cel puțin un excipient.

13. Suplimentul alimentar, compoziția nutraceutică, farmaceutică, veterinară sau cosmetică, alimentul funcțional sau aditivul alimentar conform revendicării 12, formulat pentru administrare orală sau locală.

14. Utilizarea extractului, conform oricăreia dintre revendicările 1-10 sau a liofilizatului conform revendicării 11 ca agent antimicrobian și/sau antibiofilm.

15. Extractul conform oricăreia dintre revendicările 1-10, liofilizatul din revendicarea 11 sau compoziția farmaceutică sau veterinară conform revendicărilor 12 sau 13, pentru utilizare ca agent antimicrobian și/sau antibiofilm în tratamentul sau prevenirea infecțiilor microbiene.

16. Extractul, liofilizatul sau compoziția farmaceutică sau veterinară pentru utilizare conform revendicării 15, în care infecțiile sunt cauzate de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Candida* sau *Staphylococcus*.

17. Extractul, liofilizatul sau compoziția farmaceutică sau veterinară pentru utilizare conform revendicării 15, în care infecțiile sunt cauzate de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* sau *Staphylococcus pseudintermedius*.

18. Un procedeu de preparare a extractului, conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 10, care cuprinde a) tocarea sau măcinarea separat sau în amestec a cel puțin două plante uscate unice pentru a obține pulberile vegetale corespunzătoare; b) amestecarea a cel puțin două pulberi vegetale diferite, pentru a obține o compoziție din plante; c) adăugarea unui solvent de extracție la compoziția din plante menționată, pentru a obține un preparat lichid (sau extract) corespunzător; d) incubarea respectivului preparat lichid la temperatura camerei pentru o perioadă cuprinsă între 5 și 15 minute și e) încălzirea respectivului preparat lichid la o temperatură cuprinsă între 60 °C și 134 °C pentru o perioadă cuprinsă între 5 și 60 de minute; opțional f) centrifugarea, colectarea supernatantului și filtrarea supernatantului colectat; și, opțional, g) concentrarea și/sau uscarea sau liofilizarea preparatului lichid obținut în etapa e) sau f).

19. Un procedeu conform revendicării 18, în care solventul de extracție este apa.

20. Un procedeu conform revendicării 19, în care apa adăugată în etapa (c) cuprinde un zahăr, dizolvat la o concentrație care variază de la 1 la 100 g/l, opțional de la 50 la 75 g/l.

21. O compoziție pe bază de plante care cuprinde cel puțin două plante uscate selectate dintre *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* și *Arctostaphylos uva-ursi* și cel puțin o plantă selectată dintre *Vitis vinifera* var. *tinctoria*, *Eugenia caryophyllus* și *Desmodium adscendens*.

22. Compoziția pe bază de plante conform revendicării 21, care mai cuprinde una sau mai multe plante uscate suplimentare selectate dintre: *Achillea millefolium*, *Acorus calamus*, *Agrimonia eupatoria*, *Agropyrum repens*, *Alchemilla vulgaris*, *Alkanna tinctoria*, *Althaea officinalis*, *Anethum graveolens*, *Angelica archangelica*, *Arbutus unedo*, *Arnica montana*, *Artemisia pontica*, *Artemisia vulgaris*, *Asparagus officinalis*, *Asperula odorata*, *Betula pendula*, *Borrigo officinalis*, *Buxus sempervirens*, *Calamintha officinalis*, *Calendula officinalis*, *Calluna vulgaris*, *Carum carvi*, *Cassia angustifolia*, *Centaurea cyanus*, *Centaureum erythraea*, *Centella asiatica*, *Cetraria islandica*, *Chamaemelum nobile*, *Chamomilla recutita*, *Chrysanthellum americanum*, *Cichorium endivia*, *Cichorium intybus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Citrus aurantium*, *Combretum micranthum*, *Crataegus oxyacantha*, *Cuminum cyminum*, *Cupressus sempervirens*, *Curcuma zedoaria*, *Cynara scolymus*, *Cytisus scoparius*, *Desmodium adscendens*, *Elettaria cardamomum*, *Eleutherococcus senticosus*, *Epilobium parviflorum*, *Erysimum officinale*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Eupatorium cannabinum*, *Foeniculum vulgare*, *Fraxinus excelsior*, *Fucus vesiculosus*, *Fumaria officinalis*, *Galium odoratum*, *Gentiana lutea*, *Geranium robertianum*, *Ginkgo biloba*, *Glechoma hederacea*, *Glycyrrhiza glabra*, *Handroanthus impetiginosus*, *Harpagophytum procumbens*, *Hieracium pilosella*, *Humulus lupulus*, *Hypericum perforatum*, *Hyssopus officinalis*, *Illicium verum*, *Inula helenium*, *Juglans regia*, *Juniperus communis*, *Lamium album*, *Lavandula angustifolia*, *Levisticum officinale*, *Lippia citriodora*, *Lotus corniculatus*, *Lythrum salicaria*, *Malva sylvestris*, *Marrubium vulgare*, *Medicago sativa*, *Melissa officinalis*, *Mentha x piperita*, *Morus nigra*, *Myrtus communis*, *Olea europaea*, *Origanum majorana*, *Panax ginseng*, *Papaver rhoeas*, *Parietaria officinalis*, *Passiflora incarnata*, *Petroselinum crispum*, *Peumus boldus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pimpinella anisum*, *Plantago lanceolata*, *Plantago ovata*, *Potentilla anserina*, *Quercus robur*, *Rhamnus frangula*, *Rheum palmatum*, *Rosa centifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Rubia tinctorum*, *Rubus idaeus*, *Salix alba*, *Salvia officinalis*, *Sambucus nigra*, *Satureja montana*, *Silybum marianum*, *Solanum dulcamara*, *Tabebuia impetiginosa*, *Tanacetum vulgare*, *Taraxacum officinalis*, *Thymus serpyllum*, *Thymus vulgaris*, *Tilia tomentosa*, *Tilia cordata*, *Trigonella foenum-graecum*, *Tussilago farfara*, *Vaccinium myrtillus*, *Valeriana officinalis*, *Verbascum thapsus*, *Verbena officinalis*, *Viscum album*, *Vitis vinifera* var. *tinctoria*, *Zea mays* și *Zingiber officinale*.

23. Un procedeu de preparare a suplimentului alimentar, a compoziției nutraceutice, farmaceutice, veterinare sau cosmetice, a alimentului funcțional sau a aditivului alimentar conform revendicărilor 12 sau 13, care include amestecarea extractului conform oricăreia dintre revendicările 1-10 sau a liofilizatului, conform revendicării 11 cu cel puțin un excipient.