

Zastosowanie ekstraktów roślinnych z kory i drewna wierzby wiciowej (*Salix viminalis*) pozyskanych metodą ekstrakcji nadkrytycznej do wytwarzania preparatu w leczeniu pasożytoz ludzi i zwierząt.

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie ekstraktów roślinnych z kory i drewna wierzby wiciowej (*Salix viminalis*) pozyskanych metodą ekstrakcji nadkrytycznej ($scCO_2+H_2O$) do wytwarzania preparatu w leczeniu pasożytoz ludzi i zwierząt.

Choroby pasożytnicze stanowią poważny problem medyczny i weterynaryjny na całym świecie. Inwazje pasożytnicze zwierząt są przyczyną różnego rodzaju strat gospodarczych i ekonomicznych oraz powodują znaczne zagrożenie bezpieczeństwa żywnościowego. Współczesne leczenie pasożytoz u ludzi i zwierząt polega głównie na stosowaniu niewielkiej liczby syntetycznych leków przeciwpasożytniczych

Ograniczona ilość dostępnych chemioterapeutyków jest przyczyną rosnącej lekooporności pasożytów. Kolejnym poważnym problemem związanym z lekami syntetycznymi jest ich duża toksyczność. Alternatywą dla tych leków mogą stać się preparaty pochodzenia roślinnego. Przeciwpasożytnicze działanie ekstraktów roślinnych przypisywane jest wtórnym metabolitom roślinnym takim jak m.in. alkaloidy, terpenoidy oraz polifenole (taniny). Ekstrakty roślinne mogą stać się skutecznymi, mniej toksycznymi lekami przeciwpasożytniczymi [3,4,11,12,13].

Zgłaszający prowadzili badania mające na celu ocenę aktywności przeciwpasożytniczej ekstraktów roślinnych z kory i drewna wierzby wiciowej (*Salix viminalis*) pozyskanych metodą ekstrakcji nadkrytycznej ($scCO_2+H_2O$).

Wierzba (*Salix* L.) należy do rodziny wierzbowatych (*Salicaceae*). Wyciągi pozyskane z różnych gatunków wierzby wykazują działanie przeciwbólowe, przeciwzapalne oraz

przeciwgorączkowe. Surowcem wykorzystywanym w leczeniu jest najczęściej kora, gałązki oraz liście. Wierzba wiciowa (*Salix viminalis*) naturalnie występuje w Europie i wykorzystywana jest głównie w przemyśle [1,6,7,8,10].

W literaturze opisano aktywność przeciwpasożytniczą ekstraktów roślinnych pozyskanych z wierzby białej (*Salix alba*) oraz wierzby babilońskiej (*Salix babylonica*) [2,5,9]. Brak jest natomiast doniesień literaturowych, które wskazywałyby na potencjalną aktywność przeciwpasożytniczą badanych nadkrytycznych ekstraktów z wierzby wiciowej (*Salix viminalis*). Analiza literatury wykazała, że właściwości przeciwpasożytnicze ekstraktów roślinnych z kory i drewna wierzby wiciowej (*Salix viminalis*) pozyskanych metodą ekstrakcji nadkrytycznej ($scCO_2+H_2O$) nie były do tej pory badane. Zgłaszający po raz pierwszy wykazali znaczącą aktywność nicieniobójczą badanych nadkrytycznych ekstraktów roślinnych wobec saprofitycznych, wolnożyjących nicieni z rodzaju *Rhabditis sp.* należących do rodziny *Rhabditiae*.

Wzrastająca lekooporność pasożytów na dostępne komercyjnie leki powoduje konieczność poszukiwania nowych, skutecznych preparatów przeciwpasożytniczych.

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie nadkrytycznych ekstraktów roślinnych ($scCO_2+H_2O$) z kory i drewna wierzby wiciowej (*Salix viminalis*) do wytwarzania preparatu w leczeniu pasożytoz ludzi i zwierząt.

Zastosowanie według wynalazku polega na tym, że ekstrakty roślinne z kory i drewna wierzby wiciowej (*Salix viminalis*) pozyskane metodą ekstrakcji nadkrytycznej ($scCO_2+H_2O$) stosuje się do wytwarzania preparatu w postaci tabletek, granulek, kapsułek, drażetek, lingwetek.

Nadkrytyczne ekstrakty roślinne ($scCO_2+H_2O$) z kory i drewna wierzby wiciowej (*Salix viminalis*) wykazały silną aktywność przeciwpasożytniczą wobec nicieni z rodzaju *Rhabditis sp.*, co istotnie wielokrotnie wyższą od aktywności dostępnego leku komercyjnego - albendazol. Badane ekstrakty mogą znaleźć zastosowanie do wytwarzania nowych preparatów w terapii pasożytoz ludzi i zwierząt.

Przykłady wykonania wynalazku

W procesie ekstrakcji nadkrytycznej pozyskano ekstrakty roślinne z kory i drewna wierzby wiciowej (*Salix viminalis*). Przed ekstrakcją surowce zwilżano wodą (do około 40% wagowo) i pozostawiano na minimum 5 godzin w zamkniętym naczyniu w celu wyrównania wilgotności w całej próbce. Proces ekstrakcji nadkrytycznej

przeprowadzono z zastosowaniem dwutlenku węgla wykorzystując ciśnieniową instalację badawczą firmy SITEC. Otrzymane polarne ekstrakty rozpuszczone w wodzie odbierano w separatorze, odwirowywano i liofilizowano. Warunki przeprowadzanej ekstrakcji: temperatura równa 40°C, ciśnienie: 330 bar, zużycie dwutlenku węgla: 100 kg/kg materiału, wilgotność: zależna od próbki - od 8% do 10% wag.

Do oceny wpływu ekstraktów roślinnych otrzymanych w/w metodą z kory i drewna wierzby wiciowej (*Salix viminalis*) na rozwój i żywotność pasożytów wykorzystano wolnożyjące nicienie z rodzaju *Rhabditis sp.*. Hodowlę i ocenę żywotności nicieni z rodzaju *Rhabditis sp.* przeprowadzono zgodnie z patentem nr 232918. Całe ujawnienie tego wynalazku winno być potraktowane jako odsyłacz literaturowy dla niniejszego zgłoszenia i jest włączone do opisu przez odniesienie. W 6-dołkowych płytkach przeznaczonych do hodowli *in vitro* na agarowej pożywce stałej przez 5 dni w temperaturze pokojowej, w celu uzyskania wszystkich form rozwojowych. Następnie nicienie wmywano z agarowego podłoża stałego przy pomocy 0,6% NaCl i nanoszono na nowe sterylne płytki 24-dołkowe w celu prowadzenia hodowli na podłożu płynnym. Do hodowli na podłożu płynnym dodawano badane ekstrakty roślinne w postaci homogennej zawiesiny uzyskanej z użyciem homogenizatora ultradźwiękowego (producent: Hielscher Ultrasound Technology) oraz dostępny komercyjnie lek - albendazol (kontrola dodatnia).

Przykład:

Do przygotowanej hodowli na podłożu płynnym prowadzonej w sterylnych 24-dołkowych płytkach dodawano badane ekstrakty nadkrytyczne ($scCO_2+H_2O$) pozyskane z kory i drewna wierzby wiciowej (*Salix viminalis*). Ekstrakty przygotowywano z różnych surowców w następującej konfiguracji: kora, drewno oraz kora+drewno. Każdy ekstrakt badano w następujących stężeniach: 0,11 mg/ml; 0,22 mg/ml; 1,11 mg/ml; 3,33 mg/ml oraz 5,56 mg/ml. Podczas eksperymentu prowadzono także kontrolę negatywną z 0,6% NaCl i z 60% glicerolem oraz kontrolę pozytywną - albendazol. Nicienie poddane działaniu badanym ekstraktom obserwowano w mikroskopie optycznym i stereoskopowym pod kątem zaburzeń ich rozwoju (żywotność, ruchliwość, uszkodzenia, deformacje). W celu określenia ilości osobników żywych i martwych hodowlę płynną barwiono błękitem metylenowym i liczono w specjalnych komorach Bürkera.

W tabeli 1 przedstawiono porównanie aktywności nicieniobójczej badanych ekstraktów roślinnych z wierzby wiciowej (*Salix viminalis*) pozyskanych metodą ekstrakcji nadkrytycznej i dostępnego leku komercyjnego.

Tabela 1

Porównanie aktywności nicieniobójczej badanych ekstraktów nadkrytycznych i dostępnego leku komercyjnego		Aktywność nicieniobójcza (mg/mL) po 24 godzinnej ekspozycji - LC ₅₀
Ekstrakty nadkrytyczne	Surowiec	
	kora	0,36
	drewno	0,92
	kora+drewno	1,46
Lek komercyjny (kontrola pozytywna)	Albendazol	19,24

Na Fot. 1 Przykładowy obraz hodowli *in vitro* nicieni z rodzaju *Rhabditis sp.* prowadzonej przez 24 godzin na podłożu płynnym po ekspozycji na badany ekstrakt roślinny z wierzby wiciowej (*Salix viminalis*) pozyskany metodą ekstrakcji nadkrytycznej.



Literatura:

1. EMA European Union herbal monograph on *Salix* (various species including *S. purpurea* L., *S. daphnoides* Vill., *S. fragilis* L.), cortex; London, 2017. Available online: https://www.ema.europa.eu/documents/herbalmonograph/final-european-union-herbal-monograph-salix-various-species-including-s-purpurea-l-sdaphnoides-vill_en.pdf.
2. Hernandez P. M., Salem A., Elghandour M., et al., Anthelmintic effects of *Salix babylonica* L. and *Leucaena leucocephala* Lam. extracts in growing lambs, *Trop Anim Health Prod* 2014, 46:173–178.
3. Kancherla N, Dhakshinamoothi A, Chitra K, Komaram RB. Preliminary Analysis of Phytoconstituents and Evaluation of Anthelmintic Property of *Cayratia auriculata* (In Vitro). *Maedica (Buchar)*. 2019;14(4):350-356.
4. Kumarasingha R, Preston S, Yeo TC, et al. Anthelmintic activity of selected ethno-medicinal plant extracts on parasitic stages of *Haemonchus contortus*. *Parasit Vectors*. 2016, 1;9:187.
5. Mupeyo B., Barry T.N., Pomroy W.E., Ramírez-Restrepo C.A., López-Villalobos N., Pernthaner A.: Effects of feeding willow (*Salix* spp.) upon death of established parasites and parasite fecundity. *Animal Feed Science and Technology* 2011, 164, 8–20.
6. Pobłocka-Olech, L.; Krauze-Baranowska, M.; Glód, D.; Kawiak, A.; Łojkowska, E. Chromatographic analysis of simple phenols in some species from the genus *Salix*. *Phytochem. Anal.* 2010, 21, 463–469.
7. Pobłocka-Olech, L.; van Nederkassel, A.-M.; Vander Heyden, Y.; Krauze-Baranowska, M.; Glód, D.; Baczek, T. Chromatographic analysis of salicylic compounds in different species of the genus *Salix*. *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 2958–2966.
8. Ramos PAB, Moreirinha C, Silva S, Costa EM, Veiga M, et al. The Health-Promoting Potential of *Salix* spp. Bark Polar Extracts: Key Insights on Phenolic Composition and In Vitro Bioactivity and Biocompatibility. *Antioxidants (Basel)*. 2019, 30;8(12). pii: E609.
9. Santhi V. S., Salamea L., Dvash L., et al., Ethanolic extracts of *Inula viscosa*, *Salix alba* and *Quercus calliprinos*, negatively affect the development of the entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora* – A model to compare gastro-intestinal nematodes developmental effect, *Journal of Invertebrate Pathology* 2017, 145: 39-44.

10. Setty, A.R.; Sigal, L.H. Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: Mechanisms of action, efficacy, and side effects. *Semin. Arthritis Rheum.* 2005, 34, 773–784.
11. Tariq KA, Tantry MA. Preliminary Studies on Plants with Anthelmintic Properties in Kashmir—The North-West Temperate Himalayan Region of India. *Chinese Medicine*, 2012, 3, 106-112
12. Tolochko K.V., Vyshnevskaya L.I.: Scientific justification of anthelmintic medicines based on medicinal plant material. *International Journal of Green Pharmacy* 2017, 11, 3, 154–159.
13. Williams A. R., Ropiak H. M., Fryganas C., et al., Assessment of the anthelmintic activity of medicinal plant extracts and purified condensed tannins against free-living and parasitic stages of *Oesophagostomum dentatum*, *Parasit Vectors*. 2014, 7: 518.