



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 00857**

(22) Data de depozit: **01.09.2011**

(41) Data publicării cererii:  
**28.09.2012** BOPI nr. **9/2012**

(71) Solicitant:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLATARE PENTRU  
ȘTIINȚE BIOLOGICE BUCUREȘTI-  
CENTRUL DE CERCETĂRI BIOLOGICE,  
"STEJARUL" PIATRA NEAMȚ,  
STR. ALEXANDRU CEL BUN NR. 6,  
PIATRA NEAMȚ, NT, RO**

(72) Inventatori:  
• **GILLE ELVIRA, STR. PLEVNEI NR. 4,  
BL. F10, SC. C, AP. 51, PIATRA NEAMȚ,  
NT, RO;**  
• **TĂTĂRINGĂ GABRIELA,  
STR. CONDUCTELOR NR. 4, BL. 325,  
SC. B, AP. 1, IAȘI, IS, RO;**  
• **HÂNCIANU MONICA,  
STR. PROF. EMIL HONORIU NR. 16D, IAȘI,  
IS, RO;**

• **APROTOSOAIE ANA CLARA,  
ȘOS. NAȚIONALĂ NR. 76, BL. C4, SC. A,  
ET. 3, AP. 3, IAȘI, IS, RO;**  
• **STĂNESCU URSULA HELENA,  
STR. NICOLAE GANEA NR. 32A, BL. C2,  
AP. 1, IAȘI, IS, RO;**  
• **MIHĂILESCU ROXANA LAURA,  
STR. GEORGE COȘBUC NR. 8, BL. A7,  
SC. B, ET. 2, AP. 29, PIATRA NEAMȚ, NT,  
RO;**  
• **DĂNILĂ DOINA, STR. SOMEȘ NR. 22,  
PIATRA NEAMȚ, NT, RO;**  
• **DRUȚU ADINA CĂTĂLINA,  
STR. DUMBRAVA ROȘIE NR. 5, BL. 8,  
SC. C, AP. 41, ROMAN, NT, RO;**  
• **MIRON ANCA, ALEEA DOMENII NR. 23,  
IAȘI, IS, RO;**  
• **CIOANCĂ OANA,  
STR. PROF. EMIL HONORIU NR. 16D, IAȘI,  
IS, RO**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI DERMOPREPARAT CU  
ACȚIUNE CICATRIZANTĂ DIN ALLIUM CEPA L.**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un preparat dermocosmetic cu acțiune cicatrizantă din *Allium cepa L.*, și la un procedeu pentru obținerea acestuia. Conform invenției, preparatul dermocosmetic se prezintă sub forma unei emulsii de tip U/A, cu un conținut de 30% g/g extract fluid de ceapă, ce conține minimum 25 mg% flavonoide exprimate ca cvercetinol și 0,9 mg% acizi polifenol-carboxilici exprimați în acid cafeic. Procedeu de obținere a preparatului dermocosmetic constă în prepararea unui extract bioactiv din bulbi de ceapă

mărunțiți și macerați timp de 10 zile în etanol absolut, după care maceratul se filtrează și se concentrează la presiune redusă, până la obținerea unui extract cu un raport drog proaspăt: extract de 5:2 g/ml, și un conținut de flavonoide de 25 mg% și 0,9% acizi polifenol-carboxilici, extract care se încorporează în proporție de 30% într-o bază de unguent de tip emulsie U/A uzuală.

Revendicări: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE BREVET PATENTARE SI MARCA  
CUIA  
204 00817  
01.09.2014

**PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI DERMOPREPARAT CU ACȚIUNE  
CICATRIZANTĂ DIN *ALLIUM CEPA* L.**

Autori: Gille Elvira, Tătăringă Gabriela, Hâncianu Monica, Aprotosoaic Ana-Clara,  
Stănescu Ursula Helena, Mihăilescu Roxana Laura, Dănilă Doina, Druțu Adina Cătălina,  
Miron Anca, Cioancă Oana

**DESCRIEREA INVENȚIEI**

Inventia se refera la obtinerea unui produs fitoterapic cu utilizare in tratamentul unor afectiuni dermice in cadrul carora se urmareste o cicatrizare rapida si negrevata de aparitia cheloizilor. In mod normal, in cazul unor rani profunde sau pe suprafete extinse ca si in arsuri, procesul de cicatrizare al pielii este intarziat datorita formarii in exces a speciilor reactive de oxigen (SRO).

Este cunoscut ca speciile reactive ale oxigenului sunt responsabile si de aparitia altor stări patologice cum sunt afectiunile cardiovasculare, ateroscleroza, diabetul, cataracta, cancerul, bolile reumatice si ale sistemului imun, afectiunile neurodegenerative de tipul bolilor Parkinson si Alzheimer.

Din acest motiv, astazi se folosesc in terapeutica o multitudine de formule care contin antioxidanti, in scopul contracararii excesului de SRO.

Este cunoscut ca antioxidantii naturali (acidul ascorbic, vitamina E, compusii fenolici, unii tioderivati) au capacitatea de a neutraliza efectele SRO si de a imbunatati functionarea sistemelor antioxidante endogene, enzimatic si neenzimatic.

Este cunoscut ca polifenolii vegetali (flavonoide, proantocianidoli, acizi polifenolcarboxilici) au capacitatea de a reduce formarea radicalilor liberi si de a neutraliza SRO (activitate de scavenger).

Toti polifenolii sunt agenti reductor. Ei pot neutraliza radicalii liberi, pot participa la regenerarea altor antioxidanti de tipul vitaminelor E sau C, protejand astfel constituintii celulari fata de stresul oxidativ [1,2].

Obtinerea unor extracte cu proprietati antioxidante din bulbii de *Allium cepa* L. a fost motivata de existenta in acest produs vegetal a unor grupe de principii active cunoscute in

literatura de specialitate pentru actiunea lor antioxidanta (flavonoide, acizi polifenolcarboxilici, compusi organici cu sulf, acid piruvic).

In cazul de fata, materialul vegetal folosit pentru extractie a fost reprezentat de bulbii maturi de *Allium cepa* L.(varietatea Wolska), curatati de tunicile externe uscate si maruntiti.

Conform datelor din literatura de specialitate, bulbii de ceapa contin o serie de flavonoide derivate de la cvercetol (cvercetol-3-O-glucozida, cvercetol-4'-O-beta-glucozida, cvercetol-3,4'-O-diglucozida si cvercetol-7,4'-O-diglucozida) si izoramnetol (izoramnetol-4'-glucozida, si izoramnetol-3,4'-diglucozida) [3,4,5,6], acizi polifenolcarboxilici, tioderivati, proteine si minerale, multe dintre ele cu actiune antioxidanta [7,8,9,10], precum si saponozide [11], care dezvoltă, la nivel vascular, un effect de inhibare a productiei de tromboxani precum si de PGE2 si PGD2.

Este cunoscut ca in produsul vegetal proaspat se gaseste de asemeni trans-(+)-S-(1-propenil)-L-cistein-sulfoxid, un isomer al alil-aliinei, considerat adevaratul principiu activ din ceapa. De asemeni, bulbii contin cicloaliina (pana la 2%), precum si cantitati reduse de metil- si propil-aliina. La zdrobirea tesutului, din compusii mentionati, se formeaza prin cataliza enzimatica esterii ai acidului tiosulfenic (cunoscuti sub denumirea de tiosulfinati) si sulfenil-disulfiti, cunoscuti sub denumirea de cepene. Alaturi de acestia se formeaza zwibelanii care din punct de vedere chimic sunt polisulfiti. Aceste substante joaca un rol important in dezvoltarea unor proprietati antibacteriene si fungicide, antiinflamatoare, importante in procesul de vindecare si cicatrizare a ranilor [12].

Procedeul de obtinere a unui preparat dermocosmetic conform inventiei propuse consta din extractia materialului vegetal maruntit cu alcool etilic 96° (in raport drog/extract 1:1), timp de zece zile. Solutia extractiva separata a fost concentrata sub presiune redusa pana la obtinerea unui extract fluid codificat EC1 (DER=5:2g/mL) care se prezinta sub forma unui lichid galben , opalescent, cu miros slab dar caracteristic de ceapa.

Extractul a fost analizat in vederea determinarii continutului in flavonoide, (30,43 mg echivalent cvercetol la 100mL extract) si acizi polifenolici (1,16 mg echivalent acid cafeic la 100mL extract), carora probabil le revine, in ceea mai mare masura, activitatea antioxidanta, implicate in procesul de cicatrizare.

Activitatea antioxidantă a extractului EC1 a fost evaluată prin măsurarea capacității de scavenger față de radicalul difenilpicrilhidrazil (DPPH) și față de peroxidul de hidrogen, precum și prin determinarea puterii reductoare.

Totodată, a fost testată acțiunea antimicrobiană a extractului față de o serie de microorganisme test, stabilind că EC1 este slab activ față de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* și *Sarcina lutea*.

În continuare au fost formulate un număr de trei preparate farmaceutice, semisolide, de uz topic.

Formulele topice au fost testate pe soareci albi masculi pentru urmărirea evoluției în timp a cicatrizării inciziilor, lezarea cutanată efectuându-se prin practicarea unor incizii superficiale, de circa doi cm, cu ajutorul unui bisturiu, în condiții de aseptie. Rezultatele cele mai bune s-au obținut cu unguentul de tip emulsie U/A.

#### **Inventia prezinta prezinta urmatoarele avantaje:**

-Preparatul contribuie la diversificarea gamei de produse utilizate în terapia afecțiunilor neuroimunocutanate cu un produs natural, de origine vegetală, care poate fi administrat în scop dermocosmetic, în tratamentul ranilor provocate mecanic sau prin arsuri;

-produsul are o toxicitate redusă;

-se utilizează o materie primă vegetală accesibilă, bulbi fiind obținuți din culturile de ceapă;

-tehnologia are un număr redus de faze, este nepoluantă, nu rezultă deseuri toxice și ape reziduale.

#### **Exemple de realizare a invenției**

Se da, în continuare, un exemplu de realizare a extractului EC1 și a celei mai eficiente formule de unguent, în ceea ce privește acțiunea cicatrizantă.

### **Obtinerea extractului EC1**

Produsul vegetal maruntit se introduce in recipientul de extractie (acoperit), lasandu-se timp de 18 ore, dupa care se adauga alcool etilic 96 de grade si se lasa la macerat timp de zece zile. Dupa epuizarea perioadei de macerare, filtratul, completat cu solvent pana la obtinerea unui raport drog/extract (DER) de 1:1 g/mL, se concentreaza la rotavapor, sub presiune redusa. Se obtine, astfel, extractul lichid EC1, pentru care DER = 5:2 g/mL. Concentratia alcoolica scazuta a extractului EC1 face ca acesta sa fie mai bine tolerat si mai usor de inclus intr-o baza de unguent.

Flavonoidele se determina prin tratarea extractului cu solutie de clorura de aluminiu, cand se formeaza complexi interni, colorati in galben intens, a caror absorbanta se determina la lungimea de unda de 430 nm, exprimarea facandu-se in mg cvercetol echivalent /100mL extract [13].

### **Determinarea cantitativa a acizilor polifenolcarboxilici**

Acizii polifenolici prezenti in extractul analizat, formeaza cu acidul fosfowolframic in mediu alcalin (carbonat de sodiu) o coloratie albastra; absorbanta amestecului de reactivi s-a masurat la lungimea de unda de 660nm, exprimarea facandu-se in mg acid cafeic echivalent/100mL EC1.

EC1 trebuie sa contina minimum 25 mg echivalent cvercetol/100mL extract si minimum 0,9 mg acid cafeic la 100 mL extract.

### **Obtinerea dermopreparatului si testarea actiunii cicatrizante**

Formula propusa este un unguent de tip emulsie U/A, in care extractul EC1 a fost inclus in proportie de 30% (m/m).

Faza uleioasa a fost constituita din 23,5 g alcool cetilic, 8,2 g parafina lichida, 5 g vaselina, 3,3 g polisorbit 80, emulsifierea facandu-se cu 25g solutie conservanta. Alaturi de EC1, ca principii active, hidratante si cicatrizante, s-au mai inclus in formula de brevetat 4 g uree si 1 g alantoina [14].

Testarea activitatii cicatrizante realizata pe soareci albi, masculi, cu greutatea cuprinsa intre 20-25 g a respectat cerintele CE privind experimentele cu animalele de laborator. Au fost

constituite loturi a cate 8 animale cu acces liber la apa si hrana. Animalele anesteziate cu eter etilic si epilate in regiunea dorso-lombara au fost supuse, in conditii de asepsie, unei incizari superficiale de circa 2 cm cu ajutorul unui bisturiu. Lungimea inciziei a fost masurata cu ajutorul unui subler imediat dupa realizarea acesteia (ziua 0) si apoi in ziua a doua, a patra si a sasea. Animalele de experienta au fost impartite in trei loturi: lotul martor netratat, lotul martor tratat cu unguentul cu EC1, lotul martor tratat cu baza de unguent.

Incepand din a doua zi dupa efectuarea inciziei, lotului tratat cu unguent cu extract i s-a aplicat, local, o data pe zi, dimineata, 50 mg preparat pe locul afectat, iar lotului martor pozitiv, 50 mg baza de unguent.

Evaluarea rezultatelor s-a efectuat urmarind mai multi parametri, si anume: evolutia inciziei pe perioada experimentului, aparitia unor posibile infectii, evidentierea unor manifestari anormale ale animalelor pe perioada tratamentului. La lotul martor netratat, dupa sase zile de la incizare a parut o contractie a leziunii de 11,79%, de 24% pentru lotul martor pozitiv, tratat cu baza de unguent, si de 30,04% la cel tratat cu unguentul EC1.

## BIBLIOGRAFIE

- [1] Wangenstein H., Samuelsen A. B., Malterud K. E. (2004) *Antioxidant activity in extracts from coriander*, Food Chemistry 88, 293-297.
- [2] Malterud K. E., Farbrot T. L., Huse A. E., Sund R. B. (1993) *Antioxidant and Radical Scavenging Effects of Anthraquinones and Anthrones*, Pharmacology 47, 77-85.
- [3] Ioku K., Aoyama Y., Tokuno A., Terao J., Nakatani N., Takei Y. (2001) *Various cooking methods and the flavonoid content in onion*, J. Nutr. Sci. Vitaminol 47, 78-83.
- [4] Lachman J., Pronek D., Hejtmankova A., Dudjak J., Pivec V., Faitová K. (2003) *Total polyphenol and main flavonoid antioxidants in different onion (Allium cepa L.) varieties*, Horticultural Science 30, 142-147.
- [5] Price K. R., Rhodes M. J. C. (1997) *Analysis of the Major Flavonol Glycosides Present in Four Varieties of Onion (Allium cepa) and Changes in Composition Resulting from Autolysis*, Journal of the Science of Food and Agriculture 74, 331-339.
- [6] Perez-Gregorio R. M., Garcia-Falcon M. S., Simal-Gandara J., Rodrigues A. S., Almeida D. P. F. (2010) *Identification and quantification of flavonoids in traditional cultivars of red and white onions at harvest*, Journal of Food Composition and Analysis 23, 592-598.
- [7] Block, E. (1992) *The Organosulfur Chemistry of the Genus Allium – Implications for the Organic Chemistry of Sulfur*, Angewandte Chemie International Edition in English 31, 1135-1178.
- [8] Breu W., Dorsch, W. (1994) *Allium cepa L.(onion): chemistry, analysis and pharmacology*, Economic and Medicinal Plant Research 6, 116-116.
- [9] Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B., and Smith, B. (2002) *Onions - A global benefit to health*, Phytotherapy Research 16, 603-615.
- [10] Lutomski J., *Components and biological properties of some Allium species*, Institute of Medicinal plants, Poznan, 1987, 10-16.
- [11] Lanzotti, V. (2005) *Bioactive saponins from Allium and Aster Plants*, Phytochemistry Reviews 4, 95-110.
- [12] Stănescu U., Miron A., Hăncianu M., Aprotosoae C., *Plante medicinale de la A la Z*, Vol.1, Ed. „Gr.T.Popa” Iași, 2004, 18-20.
- [13] Tataringa G., Hanceanu M., Aprotosoae C., Poiata A., Vasilescu M., Gafitanu E. (2005) *Caracterizarea fitochimica si microbiologica a doua extracte de Allium cepa L. in vederea includerii in dermopreparate*, Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi 109, 406-410.
- [14] Tătăringă, Gabriela (2006) *Cercetări privind caracterizarea fizico-chimică și farmacologică a unor extracte de Allium cepa*, teză de doctorat, Universitatea de Medicină și Farmacie “Gr.T.Popa” Iași.

**PROCEDEU DE OBȚINERE A UNUI DERMOPREPARAT CU ACȚIUNE  
CICATRIZANTĂ DIN *ALLIUM CEPA* L.**

Autori: Gille Elvira, Tătăringă Gabriela, Hăncianu Monica, Aprotosoiaie Ana-Clara,  
Stănescu Ursula Helena, Mihăilescu Roxana Laura, Dănilă Doina, Druțu Adina Cătălina,  
Miron Anca, Cioancă Oana

**REVENDICĂRI**

1. Produs dermocosmetic utilizat în scopul cicatrizării corecte a ranilor produse pe cale mecanică sau prin arsuri la nivelul pielii; **se caracterizează prin aceea că** este un unguent de tip U/A cu un conținut de 30% extract fluid de ceapă. Extractul fluid de ceapă, EC1, trebuie să conțină minimum 25mg flavonoide exprimate în cvercitol și 0,9mg% acizi polifenolcarboxilici exprimați în acid cafeic.

2. Procedeu de obținere a produsului dermocosmetic definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** extractul bioactiv se obține din bulbi de ceapă mărunțiți, macerați timp de 10 zile cu etanol absolut. Maceratul separat se concentrează sub presiune redusă pentru îndepărtarea solventului organic, până când se obține EC1, pentru care DER=5:2 g/g. Extractul se încorporează în baza de unguent de tip U/A.