



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00929**

(22) Data de depozit: **03/12/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/09/2019** BOPI nr. **9/2019**

(41) Data publicării cererii:  
**30/10/2013** BOPI nr. **10/2013**

(73) Titular:  
• **LABORATOARELE MEDICA SRL,**  
*STR. FRASINULUI NR. 11, OTOPENI, IF,*  
*RO*

(72) Inventatori:  
• **ION RODICA-MARIANA,** *STR.VOILA NR.3,*  
*BL.59, ET.1, SC.3, AP.36, SECTOR 4,*  
*BUCUREȘTI, B, RO;*  
• **DONCEA SANDA-MARIA,**  
*ALEEA STĂNILĂ NR.6, BL.H 10, SC.B, ET.2,*  
*AP.29, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;*  
• **MORARU IONUȚ,** *STR. PETRICANI*  
*NR. 1R, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;*

• **STOICA RUSĂNDICA,**  
*ALEEA CPT. GH. DECUSEARA NR. 10A,*  
*BL. E2B, SC. 1, AP. 9, TECUCI, GL, RO;*  
• **BUNGHEZ IOANA RALUCA,**  
*CARTIERUL GHIOSEȘTI NR. 268,*  
*COMARNIC, PH, RO;*  
• **MORARU HORIA,**  
*STR. ARHITECT PETRE ANTONESCU*  
*NR. 8, BL. 26, AP. 16, SECTOR 2,*  
*BUCUREȘTI, B, RO;*  
• **OANCEA FLORIN,** *STR.PAȘCANI NR.5,*  
*BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,*  
*BUCUREȘTI, B, RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**WO 2006/014100 A1**

(54) **PROCEDEU DE VALORIFICARE COMPLEXĂ  
A INGREDIENTELOR ACTIVE BENEFICE DIN PLANTE  
CARE CONȚIN ALERGENI ȘI/SAU COMPUȘI TOXICI**



# RO 128904 B1

1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de valorificare complexă a ingredientelor  
active benefice din materialul vegetal provenit de la plante care conțin alergeni și/sau com-  
3 puși toxici, cum sunt cele din genul *Aloe* sau din specia *Phytolacca americana*, care implică  
extracția selectivă a unor ingrediente active, înainte și după inactivarea compușilor alergeni  
5 sau toxici, și eventuala suplimentare cu micro-elemente antioxidante, în special zinc, și prin  
care se obțin noi compoziții, cu siguranță ridicată pentru subiecții umani, utilizabile ca supli-  
7 mente alimentare sau pentru produse cosmetice/cosmoceutice.

Sunt cunoscute o serie de procedee prin care se obțin, din materialul vegetal provenit  
9 de la plante care conțin alergeni și/sau compuși toxici, cum sunt cele din genul *Aloe* sau din  
specia *Phytolacca americana*, compoziții utilizabile ca suplimente alimentare, aditivi alimen-  
11 tari sau pentru produse cosmetice/cosmoceutice. *Aloe* este un gen de plante aparținând  
familiei *Aloaceae* (www.ipni.org), perene, veșnic verzi și cu un metabolism monocot  
13 crassulacean acid (CAM). Ingredientele active din frunzele de *Aloe* includ antrachinone,  
carbohidrați, aminoacizi, acizi organici, minerale și microelemente, enzime, lectine și  
15 vitamine (a se vedea de exemplu trecerea în revistă **Liu et al., 2011, J. Med. Plants Res.**  
**5:1046-1052**). O parte din aceste ingrediente active determină, mai ales atunci când sunt  
17 ingerate, efecte alergice și chiar toxice la unii subiecți umani, ca, de exemplu, diaree,  
dezechilibru de electroliți, disfuncții renale, eriteme, dermatită de contact, fototoxicitate (a se  
19 vedea, de exemplu, trecerea în revistă **Boudreau și Beland, 2006, J. Environ. Sci. Health**  
**C. 24: 103-154**). *Phytolacca americana* este o specie de plante ierboase, perene, aparținând  
21 familiei *Phytolaccaceae*, cu utilizări terapeutice tradiționale multiple (a se vedea, de exemplu,  
trecerea în revistă **Ravikiran et al., 2011, 2:942-946**). Toate părțile plantei sunt toxice, cu  
23 excepția celor aeriene ale plantelor care cresc primăvara devreme. Ingredientele respon-  
sabile de acțiunea toxică sunt saponinele triterpenice toxice, ca, de exemplu,  
25 *phytolaccigenina* sau un mitogen de natură proteică, PWM. Ingestia de saponine toxice pro-  
voacă gastroenterite, în timp ce ingestia și absorbția prin rănilor superficiale ale pielii a PWM  
27 poate determina plasmocitoză, modificări mitotice ale sângelui periferic și alte anomalități  
hematologice (a se vedea, de exemplu, trecerea în revistă **Lewis și Smith, 1979, JAMA**  
29 **242: 2759-60**).

Extractele hidroalcoolice din materialul vegetal provenit de la plante care conțin  
31 alergeni și/sau compuși toxici, cum sunt cele din genul *Aloe* sau din specia *Phytolacca*  
*americana*, s-au dovedit a fi sigure, menținând un nivel semnificativ al efectelor benefice.  
33 Extracția hidroalcoolică a materialului vegetal este selectivă pentru ingredientele active  
benefice, ingredientele care produc alergii și/sau fenomene de toxicitate nefiind extrase sau  
35 fiind foarte puțin extrase. Cererea de brevet **WO 2006/014100 A1** se referă la o compoziție  
care include extract hidroalcoolic de *Phytolacca americana*, împreună cu extract hidroalcoolic  
37 de *Alnus acuminata* și gudron de cărbune, pentru tratarea psoriazisului în toate formele sale  
patologice. Invenția descrie și un procedeu de obținere a extractului hidroalcoolic de  
39 *Phytolacca americana*, în care materialul vegetal este în prealabil spălat cu o soluție salină  
de 10...20% NaCl, de preferat 15%, timp de 30...60 min, de preferat 45 min, tocat și extras  
41 cu o soluție etanol - apă 60...80% v/v, prin macerare timp de 15...20 zile la temperaturi  
cuprinse între 22...35°C.

43 **Ilaiyaraja et al., 2010, J. Herb. Med. Toxicol, 4:197-206**, descriu efectele antiulcera-  
tive și antibacteriene ale extractului hidroalcoolic de *Aloe*, care nu a prezentat efecte secun-  
45 dare pentru animalele de experiență. Salehi et al., 2011, J. Paramed. Sci., 2:59-63, prezintă  
efectele antidepresive ale administrării pe termen lung ale extractului hidroalcoolic de *Aloe*,  
47 care nu a prezentat efecte secundare pentru animalele de experiență nici în cazul acestei  
administrări îndelungate.

# RO 128904 B1

Dezavantajele acestor compoziții pe bază de extracte hidroalcoolice rezultă din incompleta valorificare a tuturor ingredientelor active care există în materialul vegetal inițial, fiind o consecință a procedurii de obținere prin extracție selectivă. De exemplu, în cazul plantelor de Aloe, microelementele reprezintă ingrediente active cu o semnificativă acțiune hipoglicemiantă - a se vedea, de exemplu, lucrarea **Rajasekaran et al., 2005, Biol. Trace Elem. Res., 108:185-195**. Aceste microelemente sunt extrase în cantități limitate în soluțiile hidro-alcoolice. În extractele hidroalcoolice există un potențial semnificativ de chelatare a microelementelor, cu creșterea biodisponibilității acestora. Microelementele cu biodisponibilitate crescută prin chelatare ar avea o acțiune fiziologic completară acțiunii compușilor chelatanți - ca, de exemplu, completarea acțiunii antioxidante a polifenolilor de către microelemente antioxidante, ca zincul.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a descrie un procedeu de valorificare complexă a ingredientelor active benefice din materialul vegetal provenit de la plante care conțin alergeni și/sau compuși toxici, cum sunt cele din genul Aloe sau din specia *Phytolacca americana*, prin extracția selectivă a unor ingrediente active, înainte și după inactivarea compușilor alergeni sau toxici.

Procedeu conform invenției constă în următoarele etape:

- spălarea, uscarea la etuvă la 105°C timp de 4 h și măcinarea fină a materialului vegetal;

- extracția materialului vegetal cu o soluție hidroalcoolică 40...46% etanol ÷ 60...54% apă, procente de volum, la temperatura 20...25°C, într-un vas de sticlă, prevăzut cu capac, timp de 10 zile, în raport de 3...8 părți material vegetal la 92,5...93,5 părți soluție hidroalcoolică și separarea resturilor de material vegetal de extractul hidro-alcoolic;

- calcinarea resturilor de material vegetal separate de la extracție la temperatura de 800...1000°C;

- macerarea cenușii rezultate din materialul vegetal cu extractul hidro-alcoolic timp de 24 h la temperatura 20...25°C;

- separarea prin filtrare a extractului hidroalcoolic cu microelemente din cenușă chelatare în polifenoli și corectarea pH la valoarea 7,0 cu HCl 1N;

- eventuala suplimentare a extractului cu zinc, prin adăugare de oxid de zinc insolubil, în raport de 0,1...0,17 părți ZnO la 92,5...93,5 părți în extract hidroalcoolic cu macerat de cenușă, agitare timp de 4 h la temperatura 20...25°C și separarea excesului de ZnO nereacționat prin centrifugare la 4000 x g timp de 20 min, la temperatura de 20...25°C.

Avantajele procedurii conform invenției sunt:

- valorifică ingredientele active din materialul vegetal, atât pe cele care se extrag selectiv din materialul vegetal prin macerare în soluția hidroalcoolică, cât și micro-elementele din cenușa materialului extras, care sunt chelatare de compușii polifenolici;

- asigură o complementaritate pentru acțiunea fiziologică antioxidantă a ingredientele active extrase în maceratul hidroalcoolic, respectiv polifenolii, și a micro-elementelor precum zincul, extrase selectiv prin chelatare din cenușă;

- reduce riscul prezenței ingredientelor alergene sau toxice, care nu sunt extrase sau sunt foarte puțin extrase în soluția hidroalcoolică și sunt inactivate prin calcinare în materialul vegetal extras;

- elimină cea mai mare parte din eventualele ingrediente alergene sau toxice, în special proteine, eventual extrase în urme soluția hidroalcoolică inițială, prin adsorbție pe particulele de cenușă rezultată prin calcinarea materialului de material vegetal separat de la extracție.

# RO 128904 B1

1 Prezenta invenție se ilustrează prin următoarele exemple:

## Exemplul 1

3 Materialul vegetal, frunze de *Aloe vera*, se spală cu apă timp de 3...4 min la tempera-  
tura de 20...25°C, se usucă la etuvă la 105°C timp de 4 h și se macină până la  
5 60 mesh/0,25 mm, 7...8 g din materialul vegetal uscat și măcinat de *Aloe vera* sunt supuse  
extracției prin macerare cu 100 ml soluție hidroalcoolică 40...46% etanol ÷ 60...54% apă (pro-  
7 cente de volum), respectiv 92,5...93,5 g, la temperatura 20...25°C, într-un vas de sticlă, pre-  
văzut cu capac, timp de 10 zile. Se separă prin filtrare soluția hidroalcoolică, care are un pH  
9 de 5,0, iar pulberea de plante rămasă în urma extracției se trece cantitativ într-un creuzet de  
porțelan și este supusă calcinării la temperatura de 800...1000°C, până la masă constantă.  
11 Cenușa obținută este adusă cantitativ peste soluția hidroalcoolică. Amestecul cenușă -  
extract hidroalcoolic este lăsat 24 h la macerat și se separă prin filtrare cenușa care nu a fost  
13 solubilizată, pH-ul filtratului crește la valori de peste 10 și este corectat la pH 7,0 cu HCl 1N.

În compoziția E1 rezultată, se determină conținutul total de polifenoli cu reactiv Folin-  
15 Ciocâlteu (Singleton et al., 1999, Methods Enzymol. 299, 152-178). 20 ml de probă se  
amestecă cu 6,5 ml de apă deionizată, 0,5 ml de reactiv nediluat Folin-Ciocâlteu (Sigma-  
17 Aldrich, St. Louis, Mo, SUA) și 3 ml de 10% soluție de carbonat de sodiu anhidru (Sigma-  
Aldrich). Amestecul este menținut în incubator cu agitare timp de 30 min la 40°C, după care  
19 se determină densitatea optică la 750 nm. Rezultatele sunt exprimate pe baza unei curbe  
etalon construite cu acid galic, fiind raportate în miligrame echivalent acid galic per gram de  
21 extract (mg GAE / g extract). Analiza sunt efectuate cel puțin în triplicat. Compoziția E1  
rezultată conține 8,27 mg/g polifenoli totali.

23 Polifenolii și flavonele din compoziția E1 se analizează și prin cromatografie de înaltă  
presiune, în următoarele condiții de lucru: echipament Agilent HPLC 1100 (Agilent, Santa  
25 Clara CA, SUA); coloana Kromasil 100-5 C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 um); temperatura  
coloanei 25°C; faza mobilă: A - 0,1% acid formic; B - metanol; debit 0,7 ml/min; volum de  
27 injecție 20 μl; detecție 270, 320 și 350 nm. Această compoziție E1 conține: acid gentisic  
0,695...1,110 mg/l, acid cafeic 0,349...0,698 mg/l, acid para-cumaric 10,442 mg/l și acid  
29 ferulic 1,907mg/l.

Se face o extracție fracționată a compoziției E1 pe coloană de silicagel, trecând de  
31 la un solvent nepolar (cloroform) la unul mediu polar (acetat de etil), până la un solvent  
puternic polar (metanol). Se analizează prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de  
33 masă (GC-MS) fracțiile mediu-polare (în acetat de etil), în următoarele condiții de lucru: Gaz  
cromatograf GC/MS Triple Quad Agilent Technologies (Agilent); Coloană cromatografică: DB-  
35 -WAX, 30 m x 0,25 mm, grosime film 0,25 μm. Parametrii de lucru: temperatura injector  
- 250°C; temperatura sursă - 250°C; temperatura liniei de transfer - 280°C; temperatura  
37 coloană - 70°C pentru 2 min, crește cu 7°C/min la 230°C și stă timp de 20 min; Energia de  
ionizare 70 eV; Volum de injecție 2 μl; Run time 44 min. Se pune în evidență existența glicoli-  
39 lor, etil esterilor ai acizilor grași, glicerinei, ftalaților de acizi grași. Nu se pun în evidență în  
compoziția E1 compuși antrachinonici implicați în reacțiile adverse produse subiecților umani  
41 de extractele de Aloe (după Boudreau și Beland, 2006, J. Environ. Sci. Health C. 24: 103-154).

Se determină activitatea antioxidantă a compoziției E1, prin metoda cu 2,2-difenil-1-  
43 picrilhidrazil (DPPH) ce permite formarea unui compus de hidrazină incolor (DPPH-H) (Diouf  
et al., 2009, Food Chem. 113:897-902). Compoziția se diluează cu metanol cu concentrația  
45 10 mg/ml, în intervalul de 10...0,078 mg/ml, 3 ml de soluție de DPPH (Sigma-Aldrich,  
20 mg/l) sunt adăugați la soluția de probă și vortexați energetic pentru 30 s. Amestecul este  
47 păstrat la temperatura camerei, la întuneric, timp de 30 min, înainte de măsurarea absorban-  
tei la 517 nm. Activitatea este determinată prin compararea absorbantei cu cea a martorului

# RO 128904 B1

(100%), care conține DPPH singur. Concentrația radicalilor liberi din fiecare tinctură a fost exprimată ca fiind concentrația de extract care reduce 50% din DPPH (IC50). Activitate antioxidantă a compoziției E1 este de 60%.

## Exemplul 2

Materialul vegetal, tulpini de *Phytolacca americana*, se spală cu o soluție salină de 20% NaCl, timp de 30 min la temperatura de 20...25°C, se usucă la etuvă la 105°C timp de 4 h și se macină până la 60 mesh/0,25 mm 3...4 g din material vegetal uscat și măcinat de *Phytolacca americana* sunt supuse extracției prin macerare cu 100 ml soluție hidroalcoolică 40...46% etanol ÷ 60...54% apă (procente de volum), respectiv 92,5...93,5 g, la temperatura 20...25°C, într-un vas de sticlă, prevăzut cu capac, timp de 10 zile. Se separă prin filtrare soluția hidroalcoolică, care are un pH de 4,5, iar pulberea de plante rămasă în urma extracției se trece cantitativ într-un creuzet de porțelan și este supusă calcinării la temperatura de 800...1000°C, până la masa constantă. Cenușa obținută este adusă cantitativ peste soluția hidroalcoolică. Amestecul cenușă - extract hidroalcoolic este lăsat 24 h la macerat și se separă prin filtrare cenușă care nu a fost solubilizată, iar pH-ul filtratului crește la valori de peste 10 și este corectat la pH 7,0 cu HCl 1N.

În compoziția rezultată E2 se efectuează analize conform metodelor deja descrise în exemplul 1. Compoziția E2 conține o cantitate mare de polifenoli, 13,70 mg/g echivalent de acid galic. Analiza HPL relevă că acești polifenoli sunt: acid gentisic 2,869 mg/l, acid clorogenic 0,687...0,850 mg/l, acid cafeic 0,390...0,581 mg/l și rutin 7,139 mg/l. Analiza GC-MS pune în evidență existența glicolilor, etil esterilor ai acizilor grași, glicerinei, ftalaților de acizi grași. Analizele nu pun în evidență în compoziția E1 saponinele triterpenice, responsabile de efectele toxice ale materialului vegetal din *Phytolacca americana* (conform Lewis și Smith, 1979, JAMA 242: 2759-60). Activitatea antioxidantă este de 62%.

## Exemplul 3

Compozițiile E1 și E2, obținute conform procedeelelor descrise în exemplul 1 și, respectiv, 2 sunt suplimentate cu zinc. Peste 100 ml compoziție E1 sau E2, respectiv 92,5...93,5 g, se adaugă 100...170 mg oxid de zinc insolubil în soluția hidroalcoolică. Amestecul se agită timp de 4 h la temperatura 20...25°C. Se separă excesul de ZnO nereacționat prin centrifugare la 4000 x g timp de 20 min, la temperatura de 20...25°C. Supernatantul se păstrează în sticle brune, ferite de lumină și temperaturi ridicate. Zincul din compozițiile E3 (din E1) și E4 (din E2) astfel obținute este determinat prin tehnica spectrometriei de emisie atomică în plasmă cuplată inductiv (ICP-AES). Rezultate sunt prezentate în tabelul 1:

Tabelul 1

Conținutul de zinc (% s.u.) din compozițiile realizate

Plantă	Zn (% s.u)		
	Extract hidroalcoolic	Compoziții cf. ex. 1 și ex. 2 (+ cenușă)	Compoziții cf. ex. 3 (+ ZnO)
<i>Aloe vera</i>	0,4	0,5478	12,92
<i>Phytolacca americana</i>	0,8728	1,32	88,96

## Exemplul 4

S-a testat citotoxicitatea compozițiilor E1-E4, obținute conform procedeelelor propuse de invenție, într-un biotest pe celule de ovar de hamster. Acest biotest este considerat relevant pentru siguranța extractelor de plante medicinale (Maria et al., 1997, J. Ethnopharmacol., 57:183-187). Celulele stoc din ovar de hamster chinezesc (CHO-K1, ATCC CCL-61,

# RO 128904 B1

1 ATCC, Manassas, VA, SUA) au fost însămânțate și menținute pe mediu F12K (ATCC),  
2 suplimentat cu 10% ser fetal bovin și 1% antibiotice, în atmosferă îmbogățită în CO<sub>2</sub> și la  
3 37°C. Fiecare test s-a realizat în triplicat. S-a lucrat pe plăci cu 96 de godeuri, cu fund plat  
4 și aderență redusă a celulelor (Nune<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich). În fiecare godeu s-au depus 200 μl  
5 de mediu de cultură F12K suplimentat cu 10% ser fetal bovin și 1% antibiotice și 2 x 10<sup>4</sup>  
6 celule CCL-61. S-a incubat peste noapte în atmosferă îmbogățită în CO<sub>2</sub>, la 37°C. A doua  
7 zi, celulele s-au centrifugat, supernatantul s-a sifonat și s-a înlocuit cu 200 μl de soluție  
8 20 mg/ml din compozițiile E1-E4, în mediu de cultură F12K suplimentat cu 10% ser fetal  
9 bovin și 1% antibiotice. S-a lucrat față de un martor în care mediul de cultură s-a înlocuit cu  
10 200 μl de soluție 20 mg/ml 46% etanol și un martor crescut pe mediu de cultură F12K supli-  
11 mentat cu 10% ser fetal bovin și 1% antibiotice nemodificat. După o perioadă de incubare  
12 de 24 h în atmosferă îmbogățită în CO<sub>2</sub>, la 37°C, și de expunere a celulelor CCL-61 la  
13 diferitele compoziții E1-E4, s-a estimat acțiunea citotoxică prin folosirea testelor Roșu Neutral  
14 (Borenfreund și Puerner, 1985, Toxicol. Lett., 24:119-124) și Tetrzoliu (MTT) (Borenfreund  
15 et al., 1988, Toxicol. *in vitro*, 2:1-6). Datele au fost prelucrate prin analiza variantei, cu trei  
16 repetiții și doi factori variabili (concentrația extractului și testul toxicologic), folosind testul de  
17 corelație Pearson pentru a determina diferențele între metodele de determinare a cito-  
18 toxicității (Statistica 10, StatSoft, Tulsa, OK, SUA). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2  
19 de mai jos:

21 *Tabelul 2*

22 *Procentul absorbantei față de martorul cu mediu nemodificat în biotestele de citotoxicitate*

23 Variantă experimentală	Roșu neutral	Tetrzoliu (MTT)
24 E1, 20 mg/ml	87,66 ± 3,35	90,33 ± 2,60
25 E2, 20 mg/ml	83,33 ± 1,58	87,33 ± 1,65
26 E3, 20 mg/ml	86,33 ± 2,08	91,00 ± 3,25
27 E4, 20 mg/ml	80,00 ± 2,33	86,66 ± 2,60
28 Etanol 46% 20 mg/ml	88,33 ± 2,46	92,33 ± 2,23

29  
30 Compozițiile E1-E4 rezultate prin aplicarea procedurii conform invenției nu  
31 manifestă practic citotoxicitate în biotestele pe celulele din ovar de hamster efectuate,  
32 reducerea absorbantei fiind practic la nivelul martorului cu etanol 46%. Diferențele constatate  
33 pentru compoziția E4 din *Phytolacca americana* în testul Roșu Neutral sunt la limita  
34 relevanței statistice. Nivelul de citotoxicitate, inclusiv cele pentru compoziția E4, care are o  
35 mare încărcare de zinc, este similar cu cel al unor altele raportate în literatură ca fiind  
sigure pentru subiecții umani (Maria et al., 1997, J. Ethnopharmacol., 57:183-187).

# RO 128904 B1

## Revendicare

1

Procedeu de valorificare complexă a ingredientelor active benefice din materialul vegetal provenit de la plante care conțin alergeni și/sau compuși toxici, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: spălarea, uscarea la etuvă la 105°C timp de 4 h și măcinarea fină a materialului vegetal provenit din *Aloe vera* și *Phytolacca americana*; extracția materialului vegetal cu o soluție hidroalcoolică 40...46% etanol ÷ 60...54% apă, procente de volum, la temperatura 20...25°C, într-un vas de sticlă, prevăzut cu capac, timp de 10 zile, în raport de 3...8 părți în greutate material vegetal la 92,5...93,5 părți în greutate soluție hidroalcoolică, și separarea resturilor de material vegetal de extractul hidro-alcoolic; calcinarea resturilor de material vegetal separate de la extracția hidroalcoolică, la temperatura de 800...1000°C; macerarea cenușii rezultate din materialul vegetal cu extractul hidroalcoolic timp de 24 h, la temperatura 20...25°C; separarea prin filtrare a extractului hidroalcoolic cu microelemente din cenușă chelate în polifenoli și corectarea pH-ului la valoarea 7,0 cu HCl 1N; eventuala suplimentare a extractului cu zinc, prin adăugare de oxid de zinc insolubil, în raport de 0,1...0,17 părți în greutate ZnO la 92,5...93,5 părți în greutate extract hidroalcoolic cu macerat de cenușă, agitare timp de 4 h, la temperatura 20...25°C, și separarea excesului de ZnO nereacționat prin centrifugare la 4000 x g timp de 20 min, la temperatura de 20...25°C.

19



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 375/2019