



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00929

(22) Data de depozit: 03.12.2012

(41) Data publicării cererii:
30.10.2013 BOPI nr. 10/2013

(71) Solicitant:
• 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.H10, 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

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

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de valorificare complexă a ingredientelor active benefice, din material vegetal provenit de la plante care conțin alergeni și/sau compuși toxici, cum sunt cele din genul *Aloe* sau din specia *Phytolacca americana*, utilizabile ca suplimente alimentare sau pentru produse cosmetice/ cosmaceutice. Procedeu conform invenției constă în următoarele etape: extracția materialului vegetal cu o soluție hidroalcoolică 40...46% etanol și 60...54% apă timp de 10 zile, separarea resturilor de material vegetal de extractul hidroalcoolic, calcinarea resturilor de material vegetal separate de la extracție la temperatura de 800...1000°C, macerarea cenușii rezultate din material

vegetal extras 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 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 extract hidroalcoolic cu macerat de cenușă, agitare timp de 4 h la temperatura de 20...25°C, și separarea excesului de ZnO nereacționat, prin centrifugare la 4000xg.

Revendicări: 1

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).



PROCEDEU DE VALORIFICARE COMPLEXĂ A INGREDIENTELOR ACTIVE BENEFICE DIN PLANTE CARE CONTIN ALERGENI SI/SAU COMPUȘI TOXICI

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 compuși 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 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 suplimente alimentare sau pentru produse cosmetice / cosmoceutice.

Sunt cunoscute o serie de procedee prin care se obțin, 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*, compoziții utilizabile ca suplimente alimentare, aditivi alimentari 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 crassulacean acid (CAM). Ingredientele active din frunzele de *Aloe* includ antrachinone, carbohidrați, amino acizi, acizi organici, minerale și microelemente, enzime, lectine și vitamine (a se vedea de ex. 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 ingerate, efecte alergice și chiar toxice la unii subiecți umani, ca de ex. diaree, dezechilibru de electroliți, disfuncții renale, eriteme, dermatită de contact, fototoxicitate (a se vedea de ex. 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 familiei *Phytolaccaceae*, cu utilizări terapeutice tradiționale multiple (a se vedea de ex. trecerea în revistă Ravikiran *et al.*, 2011, 2:942-946). Toate părțile plantei sunt toxice, cu excepția părților aeriene ale plantelor care cresc primăvara devreme. Ingredientele responsabile de acțiunea toxică sunt saponinele triterpenice toxice, ca de ex. phytolaccigenina sau un mitogen de natură proteică, PWM. Ingestia de saponine toxice provoacă gastroenterite, în timp ce ingestia și absorbția prin rănile superficiale ale pielii a PWM poate determina plasmocitoză, modificări mitotice ale sângelui periferic și alte anomalități hematologice (a se vedea de ex. trecerea în revistă Lewis și Smith, 1979, *JAMA* 242: 2759–60).

Extractele hidroalcoolice 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*, s-au dovedit a fi sigure, menținând un nivel semnificativ al efectelor benefice. Extracția hidroalcoolică a materialului vegetal este selectivă pentru ingredientele active benefice, ingredientele care produc alergii și/sau fenomene de toxicitate nefiind extrase sau fiind foarte puțin extrase. Cererea de brevet WO2006/014100 A1 se referă la o compoziție care include extract hidroalcoolic de *Phytolacca americana*, împreună cu extract hidro-alcoolic 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 *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 cu o soluție etanol - apă 60...80% v/v, prin macerare timp de 15 ...20 zile la temperaturi cuprinse între 22 și 35°C.

Ilaiyaraja *et al.*, 2010, J. Herb. Med. Toxicol, 4:197-206, descriu efectele anti-ulcerative și anti-bacteriene ale extractului hidro-alcoolic de *Aloe*, care nu a prezentat efecte secundare pentru animalele de experiență. Salehi *et al.*, 2011, J. Paramed. Sci., 2:59-63, prezintă efectele antidepresive ale administrării pe termen lung ale extractului hidro-alcoolic de *Aloe*, care nu a prezentat efecte secundare pentru animalele de experiență nici în cazul acestei administrări îndelungate.

Dezavantajele acestor compoziții pe bază de extracte hidro-alcoolice 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 ex. în cazul plantelor de *Aloe* microelementele reprezintă ingrediente active cu o semnificativă acțiune hipoglicemiantă – a se vedea de ex. 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. Micro-elementele cu biodisponibilitate crescută prin chelatare ar avea o acțiune fiziologic completară acțiunii compușilor chelatanți – ca de ex. completarea acțiunii anti-oxidante a polifenolilor de către micro-elemente 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.

Procedeul conform invenției constă în următoarele etape;

- Spălarea, uscarea la etuvă la 105°C timp de 4 ore și măcinarea fină a materialului vegetal;
- Extracția materialului vegetal cu o soluție hidroalcoolică 40 - 46% etanol ÷ 60 - 54% apa, 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 ore la temperatura 20...25°C;
- Separarea prin filtrare a extractului hidroalcoolic cu microelemente din cenușă chelate 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 ore la temperatura 20...25°C și separarea excesului de ZnO nereacționat prin centrifugare la 4000xg timp de 20 minute, 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 chelate de compușii polifenolici;
- Asigură o complementaritate pentru acțiunea fiziologică anti-oxidante, ale ingredientele active extrase în maceratul hidroalcoolic, respectiv polifenolii și ale 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 hidro-alcoolică și sunt inactivate prin calcinare în materialul vegetal extras;
- Elimină cea mai mare parte din eventualele ingredientele alergene sau toxice, în special proteine, eventual extrase în urme soluția hidro-alcoolică inițială,



prin adsorbție pe particulele de cenușă rezultată prin calcinarea materialului de material vegetal separat de la extracție.

Prezenta invenție se ilustrează prin următoarele exemple.

Exemplul 1. Materialul vegetal, frunze de *Aloe vera*, se spală cu apă timp de 3...4 min la temperatura de 20...25°C, se usucă la etuvă la 105°C timp de 4 ore și se macină până la 60 mesh / 0,25 mm. 7..8 grame din material vegetal uscat și măcinat de *Aloe vera* sunt supuse extracției prin macerare cu 100 ml soluție hidroalcoolică 40 - 46% etanol ÷ 60 - 54% apa (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 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. Cenușa obținută este adusă cantitativ peste soluția hidroalcoolică. Amestecul cenușă – extract hidro-alcoolic este lăsat 24 ore la macerat și se separă prin filtrare cenușa care nu a fost 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-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999, *Methods Enzymol.* 299, 152-178). 20 ml proba se amestecă cu 6,5 ml de apă deionizată, 0,5 ml de reactiv nediluat Folin-Ciocalteu (Sigma-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 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 extract (mg GAE / g extract). Analiza sunt efectuate cel puțin în triplicat. Compoziția E1, rezultată conține 8,27 mg/g polifenoli totali.

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 Clara CA, SUA); coloana Kromasil 100-5 C18 (150mm x 4,6 mm x 5 μm); temperatura coloanei 25°C; Faza mobilă: A - 0,1% acid formic; B – metanol ; debit 0,7 ml/min; volum de 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 ferulic 1,907mg/l.

Se face o extracție fracționată a compoziției E1 pe coloană de silicagel, trecând de 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 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-WAX, 30 m x 0,25 mm, grosime film 0,25 μ m. Parametrii de lucru: temperatura injector: 250°C; temperatura sursa: 250°C; temperatura liniei de transfer: 280°C; temperatura coloana: 70 °C pentru 2 minute, crește cu 7 °C/min la 230 °C și sta timp de 20 minute; Energia de ionizare: 70eV; Volum de injecție: 2 μ l; Run time: 44 min. Se pune în evidență existența glicolilor, 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 de extractele de *Aloe* (după Boudreau și Beland, 2006, J. Environ. Sci. Health C. 24: 103–154).

Se determină activitatea anti-oxidantă a compoziției E1, prin metoda cu 2,2-difenil-1-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 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 energic pentru 30 s. Amestecul este păstrat la temperatura camerei, la întuneric timp de 30 minute înainte de măsurarea absorbției la 517 nm. Activitatea este determinată prin compararea absorbției cu cea a martorului (100%), care conține DPPH singur. Concentrația radicalilor liberi din fiecare tinctura a fost exprimată ca și 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 ore și se macină până la 60 mesh / 0,25 mm. 3..4 grame din material vegetal uscat și măcinat de *Phytolacca americana* sunt supuse extracției prin macerare cu 100 ml soluție hidroalcoolică 40 - 46% etanol ÷ 60 - 54% apa (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 masă constantă. Cenușa obținută este adusă cantitativ peste soluția hidro-alcoolică. Amestecul cenușă – extract hidro-alcoolic este lăsat 24 ore la macerat și se separă prin filtrare cenușa



care nu a fost solubilizată. 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 aceși 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 hidro-alcoolică. Amestecul se agită timp de 4 ore la temperatura 20...25°C. Se separă excesul de ZnO nereacționat prin centrifugare la 4000xg timp de 20 minute, 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.

Tab. 1. Conținutul de zinc (% s.u.) din compozițiile realizate.

Planta	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 procedurii propus 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, ATCC, Manassas, VA, SUA) au fost înșămânțate și menținute pe mediu F12K (ATCC), suplimentat cu 10% ser fetal

bovin și 1% antibiotice, în atmosferă îmbogățită în CO₂ și la 37°C. Fiecare test s-a realizat în triplicat. S-a lucrat pe plăci cu 96 de godeuri, cu fund plat și aderență redusă a celulelor (Nunc[®], Sigma-Aldrich). În fiecare godeu s-au depus 200 μl de mediu de cultură F12K suplimentat cu 10% ser fetal bovin și 1% antibiotice și 2x10⁴ celule CCL-61. S-a incubat peste noapte în atmosferă îmbogățită în CO₂ și la 37°C. A doua zi celulele s-au centrifugat, s-a sifonat supernatantul și s-a înlocuit cu 200 μl de soluție 20 mg/ml din compozițiile E1-E4 în mediu de cultură F12K suplimentat cu 10% ser fetal bovin și 1% antibiotice. S-a lucrat față de un martor în care mediul de cultură s-a înlocuit cu 200 μl de soluție 20 mg/ml 46% etanol și un martor crescut pe mediu de cultură F12K suplimentat cu 10% ser fetal bovin și 1% antibiotice nemodificat. După o perioadă de incubare de 24 ore în atmosferă îmbogățită în CO₂ și la 37°C și de expunere a celulelor CCL-61 la diferitele compoziții E1-E4 s-a estimat acțiunea citotoxică prin folosirea testelor Roșu Neutral (Borenfreund și Puerner, 1985, Toxicol. Lett., 24:119-124) și Tetrazoliu (MTT) (Borenfreund *et al.*, 1988, Toxicol. in vitro, 2:1-6). Datele au fost prelucrate prin analiza varianței, cu trei repetiții și doi factori variabili (concentrația extractului și testul toxicologic), folosind testul de corelație Pearson pentru a determina diferențele între metodele de determinare a citotoxicității (Statistica 10, StatSoft, Tulsa, OK, SUA). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2 de mai jos.

Tab. 2. Procentul absorbției față de martorul cu mediu nemodificat în biotestele de citotoxicitate.

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

Compozițiile E1-E4 rezultate prin aplicarea procedurii conform invenției nu manifestă practic citotoxicitate în biotestele pe celulele din ovar de hamster efectuate, reducerea absorbției fiind practic la nivelul martorului cu etanol 46%. Diferențele constatate pentru compoziția E4 din *Phytolacca americana* în testul Roșu Neutral sunt la limita relevanței statistice. Nivelul de citotoxicitate, inclusiv cele pentru compoziția E4, care are o 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).



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 ore și măcinarea fină a materialului vegetal; extracția materialului vegetal cu o soluție hidroalcoolică 40 - 46% etanol ÷ 60 - 54% apa, 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 hidroalcoolic; calcinarea resturilor de material vegetal separate de la extracția hidroalcoolică, la temperatura de 800...1000°C; macerarea cenușii rezultate din materialul vegetal cu extractul hidro-alcoolic timp de 24 ore la temperatura 20...25°C; separarea prin filtrare a extractului hidroalcoolic cu microelemente din cenușă chelutate 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 extract hidroalcoolic cu macerat de cenușă, agitare timp de 4 ore la temperatura 20...25°C și separarea excesului de ZnO nereacționat prin centrifugare la 4000xg timp de 20 minute, la temperatura de 20...25°C.



A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized loop followed by a vertical stroke and a small hook at the bottom.