



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2017 00677**

(22) Data de depozit: **18/09/2017**

(41) Data publicării cererii:  
**29/03/2019** BOPI nr. **3/2019**

(71) Solicitant:  
• **UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" -  
INSTITUTUL DE CERCETĂRI ÎN CHIMIE  
"RALUCA RIPAN",**  
*STR.MIHAIL KOGĂLNICEANU NR.1,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;*  
• **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI  
FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN  
CLUJ-NAPOCA, STR.EMIL ISAC NR.13,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:  
• **MOLDOVAN MARIOARA,**  
*STR. VIILE NADAȘEL NR. 52,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;*  
• **OPREAN RADU, STR.FĂNTÂNELE,**  
*NR.57, AP.88, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;*

• **SAPLONȚAI-POP ANIELA CRISTINA,**  
*STR.PĂDURII NR.4, AP.2, CLUJ-NAPOCA,  
CJ, RO;*  
• **PRODAN DOINA,**  
*STR. PROFESOR CIORTEA NR. 5, SC, 2,  
AP, 44, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;*  
• **SAROȘI LIANA CODRUȚA,**  
*STR. GURGHIU NR. 4, AP. 25,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;*  
• **SILAGHI DUMITRESCU LAURA,**  
*STR. FLORILOR NR. 101,  
COMUNA FLOREȘTI, CJ, RO;*  
• **CUC STANCA, STR. IOAN RUS NR. 102A,  
SC. 1, AP. 11, FLOREȘTI, CJ, RO;  
• **AGAPESCU CAMELIA,**  
*STR. ION AGÂRBICEANU NR. 15, PARTER,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO***

(54) **ANTIAGREGANTE PLACHETARE NATURISTE, PE BAZĂ  
DE EXTRACT DE ALLIUM CEPA L, UTILIZATE  
ÎN PREVENȚIA PRIMARĂ CARDIO-VASCULARĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o formulare solidă, sub formă încapsulată, cu efect antiagregant plachetar, utilizată în prevenția primară cardiovasculară. Formularea conform invenției este constituită, în procente masice, din 85...93% extract de *Allium cepa L*, soiul alb, stabilizat

cu 7...15% excipienți uzuali aleși dintre dioxid de siliciu, stearat de zinc, stearat de magneziu și carboximetilceluloză.

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).



## DESCRIEREA INVENȚIEI

Obiectivul actualului brevet îl constituie obținerea unei formulări solide, liofilizate, sub formă încapsulată, pe bază de extract de *Allium cepa* L., cu efect antiagrenat plachetar demonstrat, utilizat în prevenția primară cardiovasculară.

În paralel cu dezvoltarea vertiginosă a industriei de medicamente și preocuparea continuă pentru optimizarea calității acestora (stabilitate cât mai mare, biodisponibilitate ridicată, scăderea riscului apariției de reacții adverse și interacțiuni medicamentoase), se dezvoltă și industria produselor naturiste. O importanță deosebită este acordată încă din timpuri străvechi terapiei naturiste, principalele avantaje fiind disponibilitatea imediată, complianța ridicată din partea organismului și mai ales incidența redusă a reacțiilor adverse, toxice și alergice, comparativ cu produsele farmaceutice de sinteză. Dezavantajul major este datorat diferenței în cantitatea de substanță activă de interes, funcție de diverse variabile: soi, momentul plantării și al recoltării, condiții de depozitare, tipul extracției.

Deși antiagregantele plachetare de sinteză se situează printre cele mai utilizate medicamente de către specialistul cardiolog, există numeroase studii care atestă un efect similar, exercitat și de extracte obținute din diverse soiuri aparținând familiei *Alliaceae* (*Allium cepa*, *Allium sativum*, *Allium ampeloprasum*); acestea conțin compuși organosulfurici, cu efect de inhibiție a agregării plachetare, formați prin liza S-alk(en)il-L-cistein-sulfoxidului sub acțiunea enzimei specifice, aliinaza [1].

Mecanismul molecular de acțiune antiagregantă al *Alliaceaelor* este parțial elucidat, asumându-se efectului asupra metabolismului acidului arahidonic, cu impact asupra inhibării formării de tromboxan A<sub>2</sub> și leucotriene, compuși cu efecte vasoconstrictoare și protrombotice.

S-a constatat că în timpul secționării bulbului de *Allium cepa*, sulfoxizii de S-alk(en)il-L-cisteină sunt metabolizați sub acțiunea aliinazelor generând compuși tiosulfinați [2]. Aceștia sunt responsabili pe de o parte de aroma specifică a cepei, dar și de o parte semnificativă din activitatea antiplachetară [2-4]. Chiar dacă, calea de transformare a compușilor organosulfurici din *Allium cepa* a fost parțial elucidată, mecanismul prin care acești compuși inhibă agregarea plachetară este actualmente necunoscut [5].

Transformarea compușilor organosulfurici din *Allium cepa* are loc pornind de la SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> până la obținerea compușilor tiosulfinați [4, 6]. În acest context, atenția anumitor studii [8] a fost îndreptată spre standardizarea condițiilor de extracție, înainte de testarea agregometrică a activității antiplachetare. În timpul unui studiu pilot, cercetătorii au notat că activitatea antiplachetară crește dacă extractul de *Allium cepa* este păstrat la temperatura camerei o perioadă

de timp [9]. Extractul proaspăt preparat, care este păstrat mai puțin de 2 minute la temperatura camerei duce dimpotrivă, la un răspuns pro-agregant asupra plasmii sanguine umane. Această observație sugerează prezența unor compuși pro-agreganți în extractul de *Allium cepa*, prealabil formării tiosulfinaților [9]. Extractul tisular proaspăt conține mitocondrii intacte și rupte, ceea ce denotă prezența ADP-ului (și ATP-ului), element important în activarea plachetelor [10].

Efectele *in vitro* ale extractului de *Allium cepa* au fost examinate urmărindu-se metabolismul acidului arahidonic (AA) din plachetele sanguine. Se știe extractul de *Allium cepa* este responsabil de activitatea de inhibiție a agregării plachetare indusă de acidul arahidonic sau de ADP. În anul 2004 s-a demonstrat pentru prima dată prezența unui compus inhibitor al sintezei tromboxanului, prezent în cantitate semnificativă într-un produs alimentar foarte utilizat, încercându-se purificarea acestuia prin cromatografie pe strat subțire (TLC) [11].

S-a demonstrat că acest extract induce modificări importante în procesul de formare al metaboliților acidului arahidonic: sinteza tromboxanului B<sub>2</sub> (TxB<sub>2</sub>) a fost aproape complet suprimată, fără o scădere semnificativă a formării hidroxiacizilor grași totali [11].

Extractul pare să reducă deasemenea și formarea TxA<sub>2</sub> și a produșilor rezultați pe calea lipooxigenazei din acidul arahidonic exogen; cu toate că nu inhibă și încorporarea AA în fosfolipidele plachetare, extractul exercită în schimb un efect inhibitor asupra metaboliților AA, acționând la un pas după eliberarea acestuia. La concentrații ale extractului care determină inhibarea formării AA (inductor al agregării plachetare), s-a observat doar o inhibare parțială a agregării în prezența ADP-ului și epinefrinei. Rezultatele sugerează că efectul antiagregant plachetar al extractului de *Allium cepa* este mediat de efectele sale inhibitorii asupra metabolizării acidului arachidonic, cu inhibarea formării de TxA<sub>2</sub> [3].

La ora actuală nu există preocupări de cercetare în țară în domeniul obținerii extractelor de *Allium cepa* cu conținut de compuși tiosulfinați, folosiți pentru efectul antiagregant plachetar. Marea majoritate a cercetărilor întreprinse pe plan național abordează studii legate de comparația între diferite antiagregante de sinteză și mai puțin studii comparative cu produsele naturiste. O altă utilitate este lărgirea seriei produselor naturiste cu proprietăți antiagregante care ar putea fi comercializate prin standardizarea obținerii extractului de *Allium cepa* și stabilizarea acestuia cu diverși excipienți.

Testele efectuate inițial în cadrul cercetării noastre [12-13] identifică prin studii *ex vivo* extractul din soiul alb de *Allium cepa* ca având efectul antiagregant plachetar cel mai important, cu un conținut ridicat de compuși tiosulfinați.

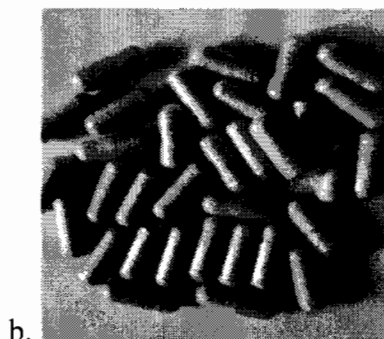
Ulterior am obținut extractul solid din soiul menționat, stabilizat cu excipienți, liofilizat și am procedat la caracterizarea acestuia prin studii chimico-analitice. În etapa următoare am considerat absolut necesară testarea efectului formulărilor obținute asupra viabilității celulare, prin utilizarea testelor *in vitro*, pentru a identifica formularea cu efectul citotoxic minim.

Efectul antiagregant plachetar al formulării prezentate în actualul brevet a fost demonstrat printr-un studiu clinic, prospectiv, prin care am urmărit cuantificarea efectului antiagregant plachetar al formulării pe bază de extract de *Allium cepa*; studiul a fost unul comparativ, care a vizat comparația efectului antiagregant plachetar cu agentul antiplachetar de sinteză corespunzător (cu același mecanism de acțiune).

#### **Se dau în continuare câteva exemple nelimitative de realizare a invenției.**

**Exemplul 1.** S-a utilizat soiul de *Allium cepa* - alb de Ungaria cultivat pe sol din regiunea Maramureș; s-a obținut extractul lichid de *Allium cepa* prin procesul de triturare, centrifugare și recuperare supernatant. S-a obținut proba lichidă finală prin încorporarea excipienților: 92.25% extract de *Allium cepa*, 3.14% dioxid de siliciu, 4.61% stearat de zinc. Aceasta este supusă ulterior procesului de de înghețare (-20°C) și liofilizare, cu obținerea probei finale, care va fi păstrată la exicator până la încapsulare.

Sterilizarea formulării/pulberii se face din start prin procesul de liofilizare. Aceasta este încapsulată cu ajutorul unui dispozitiv de încapsulare manual, procedeu care are loc sub lampa UV, pentru a asigura o încapsulare în condiții sterile. Se utilizează capsule vegetale 100%, compuse din celuloză, dimensiunea "00". Capsulele se păstrează în recipiente din material plastic, închise ermetic.



b.

**Figura 1.** Capsulele obținute.

**Exemplul 2.** Din același soi de *Allium cepa*, se obține identic ca la exemplul 1, proba lichidă finală prin încorporarea excipienților: 91.51% extract de *Allium cepa*, 2.65% dioxid de siliciu, 8.84% carboximetilceluloză. Aceasta este supusă ulterior procesului de de înghețare (-20°C) și liofilizare, cu obținerea probei finale, care va fi păstrată la exicator până la încapsulare. Pentru procesul de încapsulare, păstrare și depozitare se procedează identic cu cele de la exemplul 1.

**Exemplul 3.** Din același soi de *Allium cepa*, se obține identic ca la exemplul 1, proba lichidă finală prin încorporarea excipienților: 85.11% extract de *Allium cepa*, 3.19% dioxid de siliciu, 8.51% stearat de zinc, 3.19% gelatină. Aceasta este supusă ulterior procesului de de înghețare (-20°C) și liofilizare, cu obținerea probei finale, care va fi păstrată la exicator până la încapsulare.

Pentru procesul de încapsulare, păstrare și depozitare se procedează identic cu exemplul 1.

**Exemplul 4.** Din același soi de *Allium cepa*, se obține identic ca la exemplul 1, proba lichidă finală prin încorporarea excipienților: 92.26 % extract de *Allium cepa*, 3.14% dioxid de siliciu, 4.6% stearat de magneziu. Aceasta este supusă ulterior procesului de de înghețare (-20°C) și liofilizare, cu obținerea probei finale, care va fi păstrată la exicator până la încapsulare.

Pentru procesul de încapsulare, păstrare și depozitare se procedează identic cu exemplul 1.

**Exemplul 5.** Din același soi de *Allium cepa*, se obține identic ca la exemplul 1, proba lichidă finală prin încorporarea excipienților: 87 % extract de *Allium cepa*, 7.31% dioxid de siliciu, 2.93% stearat de magneziu, 2.75% gelatină. Aceasta este supusă ulterior procesului de de înghețare (-20°C) și liofilizare, cu obținerea probei finale, care va fi păstrată la exicator până la încapsulare.

Pentru procesul de încapsulare, păstrare și depozitare se procedează identic cu exemplul 1.

## REVENDICĂRI

1. Formulare încapsulată pe bază de extract de *Allium cepa* L., destinată în prevenția primară a patologiei cardiovasculare tromboembolice. Formularea prezentată are efect antiagregant plachetar demonstrat. Compoziția acestei formulări include extract de *Allium cepa* L., soiul alb, cu efectul antiagregant plachetar cel mai ridicat stabilizat cu excipienți.
2. Compoziția formulării cu efect antiagregant plachetar, conform actualului brevet, include extract de *Allium cepa* L., soiul alb (85-93%) stabilizat cu excipienți: dioxid de siliciu, stearat de zinc, stearat de magneziu, carboximetilceluloză (7-15%).