



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 01033**

(22) Data de depozit: **03/12/2018**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/09/2021** BOPI nr. **9/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/08/2019 BOPI nr. **8/2019**

(73) Titular:

- **HOFIGAL EXPORT - IMPORT S.A.**,
INTRAREA SERELOR NR.2, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
- **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE CAROL DAVILA**,
STR.DIONISIE LUPU, NR.37, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- **IVOPOL MARIA**, BDUL.DECEBAL, NR.13,
BL.S15, SC.2, AP.42, ET.7, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
- **NIȚULESCU GEORGIANA**,
ȘOS.OLTENIȚEI, NR.40-44, BL.6A, SC.4,
ET.7, AP.145, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;
- **OLARU OCTAVIAN TUDOREL**,
STR.ZBOINA NEAGRĂ NR.5, BL.98, SC.1,
ET.1, AP.8, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
- **ȘEREMET OANA CRISTINA**,
CALEA GIULEȘTI, NR.43, BL.14A, SC.1,
ET.6, AP.23, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
- **MIHAI DRAGOȘ PAUL**,
STR.GEORGE GEORGESCU, NR.48, ET.1,
AP.1A, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- **RĂDANȚĂ VILA**, STR.DRISTORULUI
NR.96, BL.12B, SC.A, ET.8, AP.35,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;

- **IONESCU DANIELA**,
STR.ÎMPĂRATUL TRAIAN NR.3, BL.B 12,
SC.3, ET.2, AP.82, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
- **MANEA CRISTINA**, INTRAREA CĂTINEI
NR.6, BREAZA, PH, RO;
- **IVOPOL GABRIEL CĂLIN**, BD. DECEBAL
NR.13, BL.S 15, SC.2, ET.7, AP.42,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
- **GUȚU CLAUDIA MARIA**,
STR.PREVEDERII, NR.15, BL, A 12, SC.A,
ET.9, AP.38, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:

- KR 20000063338 A; S. H. MOSAVATA,
L. GHARAMANIB, Z. SOBHANIC, E. R.
HAGHIGHID, M. R. CHAIJAN, M.
HEYDARIE, "THE EFFECT OF LEEK
(ALLIUM IRANICUM (WENDELBO))
LEAVES EXTRACT CREAM ON
HEMORRHOID PATIENS: A DOUBLE
BLIND RANDOMIZED CONTROLLED
CLINICAL TRIAL", EUROPEAN JOURNAL
OF INTEGRATIVE MEDICINE, VOL. 7, PP.
669-673, 2015; US 20110200539 A1; M.
PITTLER, E. ERNST, "HORSE-CHESTNUT
SEED EXTRACT FOR CHRONIC VENOUS
INSUFFICIENCY", ARCHIEVES OF
DERMATOLOGY, VOL. 134(11),
PP. 1356-1360, 1998

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI GEL PE BAZĂ
DE EXTRACTE NATURALE, CU UTILIZARE ÎN TERAPIA
AFECȚIUNILOR HEMOROIDALE**



1 Prezenta invenție are ca obiect obținerea unor extracte naturale, fitocomplecși din
2 speciile *Aesculus hippocastanum* L. (*Sapindaceae*), *Vitis vinifera* L. (*Vitaceae*) și *Allium*
3 *porrum* var. *porrum* sin. *Allium ampeloprasum* L. (*Liliaceae*), caracterizate calitativ, cantitativ
4 și farmacologic, utilizate la prepararea de geluri cu utilizare terapeutică în afecțiuni hemoroi-
5 dale și procedeu de preparare al acestora.

6 Problema tehnică pe care invenția de față încearcă să o rezolve constă în obținerea
7 unui preparat antihemoroidal pe bază de extracte vegetale cu efect antiinflamator, analgezic
8 și cicatrizant dovedit. Necesitatea dezvoltării de noi produse pentru tratamentul antihemoroi-
9 dal este justificată de incidența foarte mare a acestei probleme de sănătate și de limitările
10 soluțiilor terapeutice existente. Cel mai frecvent acestea cuprind eficacitatea redusă, prețul
11 de achiziție ridicat și tehnologii costisitoare de fabricație, reacții adverse, administrare dificilă
12 asociată cu durere și disconfort, complianță redusă din partea pacienților.

13 *Allium ampeloprasum* (*Liliaceae*), cu denumirea populară praz este utilizat în alimen-
14 tație pentru proprietățile sale nutritive. Cercetări anterioare au evidențiat utilitatea unor prepa-
15 rate pe bază de *Allium iranicum* în tratamentul hemoroizilor, fiind folosit în acest scop sucul
16 obținut prin presarea plantei proaspete (**Mosavat și colab., 2015, European Journal of**
17 **Integrative Medicine, 7(6), 669-673**). Cercetări asupra unor soluții etanolice și metanolice,
18 precum și pe sucul proaspăt sau uleiul esențial de *Allium ampeloprasum* var. *porrum* au fost
19 evidențiat acțiunile antioxidantă, antibacteriană, antivirală, anticanceroasă, antiulceroasă,
20 antiinflamatoare și de stimulare a imunității (**Adão și colab., 2012, Chemistry &**
21 **biodiversity, 9(1), 58-67; Adão și colab., 2011, Fitoterapia, 82(8), 1175-1180; Kocic-**
22 **Tanackov și colab., 2009, Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, (116), 121-130;**
23 **Maidment și colab., 2001, Nutrition & Food Science, 31(5), 238-241; Bernaert și colab.,**
24 **2013, Postharvest biology and technology, 86, 8-16; Pauletti și colab., 2012,**
25 **US 20070036834 A1**). De asemenea, sucul proaspăt este folosit și la obținerea prin separare
26 unor enzime cu efect proteolitic utile în afecțiuni dermatologice sau în afecțiuni osoase
27 (**Abou-Nemeh, 2010, WO 2010126794 A1; Behr și colab., 2007, US 20070122492 A1;**
28 **Brenneisen și colab., 2008, US 20080194492 A1**). Tot din sucul proaspăt s-au obținut
29 diverse arome cu aplicabilitate în industria alimentară (**Hofmann și colab., 2014,**
30 **US 20070036834 A1**).

31 Fructele de *Vitis vinifera* (*Vitaceae*) sunt mult utilizate pentru conținutul ridicat în
32 resveratrol, fitocompus cu numeroase proprietăți farmacologice. Totuși, frunzele de la
33 această specie sunt mai puțin cercetate din punct de vedere farmacologic. Cercetările au
34 demonstrat prezența în cantitate ridicată a polifenolilor, inclusiv a taninurilor, compuși cu
35 acțiune antioxidantă, antibacteriană, hemostatică și hepatoprotectoare (**Katalinic și colab.,**
36 **2013, International Journal of Food Properties, 16(1), 45-60; Mairel CA 2744514 C;**
37 **Gaudout, 2015, FR 3003164 A1; Orhan și colab., 2007, Journal of ethnopharmacology,**
38 **112(1), 145-151; Angrasan și colab., 2014, Int. J. Curr Microbiol Appl. Sci., 3(9),**
39 **768-774**). Pornind de la produsul *Vitis viniferae folium* au fost obținute extracte purificate cu
40 proprietățile farmacologice enumerate anterior (**Scheuring și colab., 2018, CA 2800758 C;**
41 **Buszello și colab., 2011, US 20110200539 A1**). Diverse extracte de frunze de viță de vie
42 fac parte din compoziția complexă a unor preparate cosmetice (**Dilallo și colab., 2004,**
43 **US 20060198800 A1; Swanson și colab., 2011, US 20110097286 A1; Di Filippo și colab.,**
44 **2012, EP 2404642 A2**).

45 *Aesculus hippocastanum* (semen) este un produs vegetal intens cercetat pentru pro-
46 prietățile terapeutice. Dintre acestea, au aplicabilitate pentru administrarea topică acțiunile
47 de protecție a capilarelor prin reducerea fragilității capilarelor, de combatere a insuficienței

RO 133548 B1

venoase, acțiunea antiinflamatoare, toate acestea fiind utile în terapia afecțiunilor hemoroidale (Pittler și colab., 1998, *Archives of Dermatology*, 134 (11), 1356-1360; Pittler și colab., 2012, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (11); Pittler și colab., 2004, *Cochrane database of systematic reviews*, (2); Leach și colab., 2006, *Ostomy/wound management*, 52(4), 68-70; Rahimi și colab., *International Journal of Pharmacology*, 9(1), 1-11). Extractele cu utilizare topică au la bază solvenți ca apa și alcoolul, iar metodele de obținere includ extracția la cald și rece, inclusiv purificarea pentru a crește concentrația de β -escină, principalul component cu acțiune antiinflamatoare (Yoshikawa și colab., 1996, *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 44(8), 1454-1464; 2018, CN 107890439 A; Charton și colab., 2018, US20180015027A1; Madaus R., 1979, CA1049497A; Kamezama și colab., 2015, EP2249851B1; Roemisch K, 1962, DE1133504B; Hines M., 2013, WO 2011103449 A2).

Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu de obținerea unor extracte naturale, fitocomplecși din speciile *Aesculus hippocastanum* L. (*Sapindaceae*), *Vitis vinifera* L. (*Vitaceae*) și *Allium porrum* var. *porrum* sin. *Allium ampeloprasum* L. (*Liliaceae*), caracterizate calitativ, cantitativ și farmacologic, utilizate la prepararea de geluri cu utilizare terapeutică în afecțiuni hemoroidale.

Procedeu conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că materiile prime, respectiv *Aesculus hippocastanum* L. (*Spindaceae*) sau *Vitis vinifera* L. (*Vitaceae*) sau *Allium porrum* var. *porrum* sin. *Allium ampeloprasum* L. (*Liliaceae*) sunt supuse unei extracții la rece în flacoane de sticlă sau recipiente de oțel sub agitare la temperatura camerei timp de 6 ore și urmată de un repaus de 48 de ore sau extracție la cald, la reflux timp de 60 de minute cu un amestec de alcool etilic și apă în proporții de 20...60% sau amestec de glicerină și apă în proporții de 20...60% sau amestec de propilenglicol și apă în proporții de 20...60% sau apă, în raport cantitativ masă material vegetal:volum solvent de 1:10, urmată de filtrare, extractele vegetale pot fi folosite ca atare sau pot fi concentrate la evaporatorul rotativ la 40...50°C până la 1/2 din volum iar extractele astfel obținute de la cele 3 specii vegetale se combină în proporție de 1:1:1 obținându-se extractul vegetal cu un conținut de β -escină, esculozidă, hiperozidă, rutozidă, izoquercitozină și acid clorogenic și cuprinde 386,4...655,8 mg/l polifenoli totali exprimați în acid galic și flavonozide totale exprimate în quercetol de 9,08...11,72 mg/l.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- valorificarea speciilor indigene vegetale *Aesculus hippocastanum* L. (semen), și *Alliumporrum* var. *porrum* sin. *Allium ampeloprasum* L. (herba);

- valorificarea produsului de tip folium de la *Vitis vinifera* L., produs ce poate fi recoltat după recoltarea fructelor, înainte de pregătirea de iernat a culturilor;

- obținerea extractelor vegetale se face utilizând solvenți netoxici pentru om și nepoluant;

- extractele vegetale sunt obținute printr-un procedeu cu un randament bun de extracție a principiilor active;

- extractele obținute prezintă proprietăți analgezice, cicatrizante și antiinflamatoare.

Elementul de noutate al soluției tehnice prezentate este evidențiat de asocierea sinergică a trei extracte naturale: *Allium ampeloprasum* (praz), *Vitis vinifera* (viță de vie) și *Aesculus hippocastanum* (castan), cu proprietăți farmacologice demonstrate prin modele pe animale de laborator și de asocierea acestora într-o formulare de tip gel. Un alt element de originalitate îl constituie prepararea extractelor sub formă de extracte apoase, hidroetanolic și hidroglicerinic, preparate ce favorizează încorporarea sub formă de gel și asigură o stabilitate crescută a principiilor active.

RO 133548 B1

1 Soluția tehnică a fost concepută pentru aplicare atât în laboratoare mici, cât și la
2 scară industrială prin detalierea metodelor de preparare și a tehnicilor de control necesare,
3 calitatea extractelor și a fitocomplexului rezultat din combinarea lor fiind ușor de monitorizat
4 în toate etapele critice ale procesului de fabricație.

5 Extractele conform invenției sunt reprezentate de extracte vegetale lichide cu un
6 conținut de polifenoli totali exprimați în acid galic de 386,4-655,8 mg/L și un conținut de
7 flavonozide totale exprimate în quercetol de 9,08-11,72 mg/L. Procedul conform invenției
8 presupune extracția la rece sau la cald cu amestec de alcool etilic și apă în proporții de
9 20...60%) sau amestec de glicerină și apă în proporții de 20...60% sau amestec de propil-
10 engliol și apă în proporții de 20...60% sau apă, în raport cantitativ masă material vege-
11 tal:volum solvent de 1:10, urmată de filtrare. Extractele obținute pot fi utilizate ca atare sau
12 concentrate la evaporator rotativ la 40-50°C până la 1/2 din volum pentru respectarea con-
13 ținutului de principii active. Extracția la rece se realizează în flacoane de sticlă sau recipiente
14 de oțel cu ajutorul unui mixer la temperatura camerei cu agitare intermitentă timp de 6 h și
15 urmată de un repaus de 48 h. Extracția la cald se realizează la o instalație de refluxare cu
16 refrigerent ascendent timp de 30...90 min. Extractele obținute de la cele trei specii vegetale
17 se combină în proporție de 1:1:1 formând astfel extractele naturale utilizate la prepararea
18 gelului cu utilizare terapeutică. Extracția se poate realiza și concomitent atunci când se
19 intenționează ca solventul de extracție să fie același pentru cele trei produse vegetale.

20 Gelul, conform invenției, se prepară prin încorporarea sub continuă agitare a extrac-
21 telor naturale într-o bază de carbogel 2% în raport cantitativ masă extract vegetal:masă de
22 bază carbogel 2% de 6:4. Gelul astfel obținut conține β-escină, esculozidă, hiperozidă,
23 rutozidă, izoquercitrozidă și acid clorogenic și are un conținut de polifenoli totali exprimați în
24 acid galic de 54,40-92,33 mg/100 g și un conținut de flavonozide totale exprimate în
25 quercetol de 0,89-1,05 mg/100 g, o bună capacitate de întindere și un pH apropiat de cel al
26 mucoasei rectale.

27 Pentru caracterizarea calitativă a extractelor și gelului s-au efectuat amprentele
28 extractelor prin cromatografie în strat subțire (CSS) și spectrofotometrie UV/VIS. Caracteri-
29 zarea cantitativă s-a efectuat prin metode spectrofotometrice UV/VIS.

30 În continuare este prezentat un exemplu de realizare a invenției în legătură cu figurile
31 care reprezintă:

- 32 - Fig. 1, prezintă capacitatea de întindere a gelului antihemoroidal;
- 33 - Fig. 2, prezintă efectul cicatrizant al preparatelor topice testate, comparativ cu lotul
34 martor.

35 **Exemplul 1**

36 Descrierea etapelor de obținere a extractului natural alcătuit din extracte hidro-
37 etanolice de *Aesculus hippocastanum* (semen), *Vitis vinifera* (folium) și *Allium ampeloprasum*
38 (Herba):

39 *Etapa I. Prelucrarea materiei prime (produsele vegetale)*

40 Materialele vegetale constituite din semințe mature de castan porcesc (*Aesculus*
41 *hippocastanum*), frunze de viță de vie recoltate în timpul sau după recoltarea fructelor (*Vitis*
42 *vinifera*) și bulb împreună cu frunze de praz recoltate la maturitate (*Allium ampeloprasum*)
43 se supune sortării, uscării la umbră la temperatura camerei și apoi unei noi sortări. Materia
44 rezultată denumită în continuare produs vegetal, conține mai puțin de 0,5% impurități prove-
45 nite din alte specii vegetale și mai puțin de 1,5% impurități provenite din aceeași plantă. Pen-
46 tru *Allium ampeloprasum*, uscarea se continuă la etuvă până la o umiditate de maximum
47 10%. 100 g din fiecare produs vegetal se cântăresc, se mărunțesc și se trec prin sita de
2 mm.

RO 133548 B1

| | |
|---|---------------------------|
| <i>Etapa II. Extracția principiilor active</i> | 1 |
| Produsele vegetale de <i>Vitis vinifera</i> și <i>Allium ampeloprasum</i> se aduc într-un balon cu fund rotund și se umectează cu 100 mL etanol 20%. În balon se adaugă 1000 mL etanol 20% și se montează la o instalație prevăzută cu refrigerent ascendent. Pentru produsul de <i>Aesculus hippocastanum</i> se umectează cu glicerina 20% și se adaugă 1000 mL din același solvent. Se refluxează timp de 60 min. După refluxare, soluția extractivă se filtrează la presiune normală și apoi la presiune redusă. | 3 5 7 |
| <i>Etapa III. Concentrarea soluției extractive</i> | |
| Concentrarea s-a efectuat la un evaporator rotativ Ingos RVO 004, la presiune de 100 mmHg, la temperatura de 50°C, până la obținerea unei soluții cu un conținut în principii active care să se încadreze în intervalul de 14,84-55,01 mg/L flavonozide totale exprimate în quercetol și 239,1-256,5 mg/L polifenoli totali exprimați în acid galic pentru extractul de <i>Aesculus hippocastanum</i> (<i>semen</i>), de 0,06-48,03 mg/L flavonozide totale exprimate în quercetol și 305,8-924,8 mg/L polifenoli totali exprimați în acid galic pentru extractul de <i>Vitis vinifera</i> (<i>folium</i>) și de 5,99-17,62 mg/L flavonozide totale exprimate în quercetol și 153,2-201,1 mg/L polifenoli totali exprimați în acid galic pentru extractul de <i>Allium ampeloprasum</i> (<i>Herba</i>). | 9 11 13 15 17 |
| <i>Etapa IV. Obținerea extractului natural</i> | |
| Cele trei extracte obținute anterior se combină în raport de volume de 1:1:1. Extractul natural obținut astfel prezintă un conținut de principii active de 9,08-11,72 mg/L flavonozide totale exprimate în quercetol și 386,4-655,8 mg/L polifenoli totali exprimați în acid galic. | 19 21 |
| <i>Etapa V. Prepararea bazei de gel</i> | |
| Baza de gel folosită a fost preparată folosind următoarea formulă: | 23 |
| Carbopol 940 | 20 g |
| Benzoat de sodiu | 10 g |
| Glicerina anhidră | 240 g |
| Trietanolamină | 25 g |
| Apă purificată | q.s. ad 1000 g |
| Într-un flacon tarat, se cântăresc 500 g apă purificată, glicerina anhidră și 10 g de benzoat de sodiu. Se presară carbopol 940 sub agitare mecanică (100 rpm) și se lasă în repaus pentru îmbibat 24 h. După îmbibare se adaugă sub agitare mecanică și în picături soluția de trietanolamină diluată 1:1 cu apă purificată și se completează cu apă la masa prevăzută. | 27 29 31 33 |
| Gelul obținut este omogen, incolor, translucid, cu miros slab caracteristic și are un pH cuprins între 8,4-8,8. Se păstrează în recipiente bine închise, ferite de lumină, la temperatura de 2-8°C până la utilizare (o perioadă de maximum 6 luni). | 35 |
| <i>Etapa VI. Prepararea gelului cu utilizare în terapia afecțiunilor hemoroidale</i> | 37 |
| În această etapă s-a încorporat extractul natural în baza de gel preparată anterior conform formulei: | 39 |
| Bază de gel | 400 g |
| Extract natural hidroetanolic de <i>Aesculus hippocastanum</i> (<i>semen</i>) <i>Vitis vinifera</i> (<i>folium</i>) și <i>Allium ampeloprasum</i> (<i>herba</i>) (1:1:1) | 600 g |
| Într-o capsulă de porțelan sau recipient din oțel prevăzut cu agitator se aduce baza de gel cântărită peste care se dispersează în porțiuni mici și sub agitare continuă extractul natural hidroetanolic de <i>Aesculus hippocastanum</i> (<i>semen</i>), <i>Vitis vinifera</i> (<i>folium</i>) și <i>Allium ampeloprasum</i> (<i>Herba</i>) (1:1:1) anterior cântărit. | 41 43 45 47 |

RO 133548 B1

1 Gelul astfel obținut este omogen, lucios, brun-roșcat, cu un pH de $7,3 \pm 0,3$ și un
2 conținut în principii active de 0,89-1,05 mg/100 g flavonozide totale exprimate în quercetol
3 și 54,40-92,33 mg/100 g polifenoli totali exprimați în acid galic.

4 *Condiționarea gelului cu proprietăți antihemoroidale*

5 Gelul se condiționează în recipiente din material plastic, bine închise, la întuneric și
6 la o temperatură de cel mult 25°C.

7 *1. Verificarea calității gelului cu proprietăți antihemoroidale*

8 Proba A de analizat a fost obținută astfel: într-un pahar Berzelius de 50 mL se aduc
9 5 g de gel de analizat; peste gel se adaugă 10 mL metanol, se agită folosind un agitator
10 magnetic și se filtrează prin hârtie de filtru la vid. Filtratul obținut se centrifughează la
11 6000 rpm timp de 10 min și se lucrează cu supernatantul.

12 *1.1. Identificarea principiilor active prin CSS*

13 *Identificarea polifenolilor și flavonoidelor*

14 S-au folosit plăcuțe de silicagel depus pe aluminiu Merck F60 254; faza mobilă utili-
15 zată pentru identificarea agliconilor flavonici a fost acetat de etil:acid formic:acid acetic:apă
16 (72:7:7:14); Identificarea s-a făcut pe baza valorii Rf (factor de retenție) și a fluorescenței în
17 UV (366 nm).

18 Probe aplicate: soluția A (20 μ L/spot);

19 Substanțele de referință aplicate: 7-neo glucozida kaempferolului, cinarozida, hipero-
20 zida, rutozida, izoquercitrozida, acidul galic, acidul p-cumaric, acidul ferulic, acidul clorogenic
21 (Sigma Aldrich, Cari Roth).

22 Au fost identificate:

23 - esculozida (Rf = 0,68), hiperozida (Rf = 0,64), rutozida (Rf = 0,38), izoquercitrozida
24 (Rf = 0,73) și acidul clorogenic (Rf = 0,32); spectrele UV corespund.

25 *Identificarea β -escinei*

26 Identificarea β -escinei s-a realizat prin cromatografie în strat subțire, iar pentru
27 separare s-a folosit coloană de silicagel C18 (**Glensk și colab., 2011, Chemistry of Natural
28 Compounds, 47; Constantini A., 1999, Il Farmaco**). Separarea escinelor s-a efectuat pe
29 coloană de silicagel C18 astfel: 3 volume metanol (9 mL); 2 volume de apă (6 mL); soluția
30 probă A (3 mL); 5 volume de apă (15 mL); eluare cu metanol 20% (6 mL) + metanol (18 mL),
31 reținându-se fracțiunea metanolică.

32 Faza mobilă a fost constituită din propanol:acetat de etil:apă (14:18:8 v/v/v) iar vizua-
33 lizarea spoturilor s-a făcut cu vanilină sulfurică. S-a utilizat proba A (20 μ L/spot), iar stan-
34 dardul utilizat a fost β -escina (100 μ g/mL)(Sigma Aldrich). Migrarea s-a realizat în 6 h,
35 cromatoplaca fiind apoi uscată la etuvă, iar revelarea spoturilor s-a efectuat cu vanilină sulfu-
36 rică. În paralel au fost testate probele nepurificate pe coloană. A fost identificată β -escina
37 (Rf = 0,52).

38 *1.2. Standardizarea în principii active*

39 Analiza principiilor active antioxidante - flavonozide totale exprimate în g de quercetol
40 s-a efectuat prin metoda spectrofotometrică cantitativă cu $AlCl_3$ și polifenoli totali exprimați
41 în g de acid galic s-a efectuat prin metoda spectrofotometrică cantitativă Folin Ciocâlțeu.

42 Volume corespunzătoare de probă A se folosesc pentru determinarea flavonozidelor
43 totale la 430 nm și pentru determinarea polifenolilor totali la 750 nm conform procedurii
44 descris în literatura de specialitate (**Olaru și colab., Oncol Lett. 2015; 10(3): 1323-1332**).

45 Gelul pe bază de extracte naturale (exemplul 1) prezintă un conținut de polifenoli
46 totali exprimați în acid galic de 54,40-92,33 mg/100 g și un conținut de flavonozide totale
47 exprimate în quercetol de 0,89-1,05 mg/100 g.

1.3. Controlul organoleptic

Determinările s-au efectuat conform prevederilor Farmacopeei Române în vigoare (FR. X). Controlul organoleptic constă în verificarea preliminară a caracteristicilor preparatelor legate de aspect, culoare, omogenitate, miros și consistență.

Proprietățile organoleptice ale gelului

Tabelul 1

| Preparat | Aspect | Culoare | Omogenitate | Miros | Consistență |
|----------|--------|-------------|-------------|-----------------------------|-------------|
| Bază | lucios | transparent | omogen | inodor | semisolid |
| Gel | lucios | brun-roșcat | omogen | caracteristic componentelor | semisolid |

1.4. Determinarea pH-ului

Preparatele cu aplicare locală trebuie să prezinte un pH apropiat de cel al locului de aplicare, în acest caz mucoasa rectală (pH aproximativ 7,4) pentru a fi bine tolerate. Determinarea pH-ului se face prin metoda colorimetrică sau prin metoda potențiometrică.

Metoda colorimetrică are o precizie limitată și se realizează cu ajutorul hârtiei indicator, în cazul de față determinarea pH-ului a fost realizată cu pH-metru Hanna HI 98127.

1 g de gel se introduce în 20 mL apă distilată și se agită energic până la obținerea unei soluții care apoi se filtrează. În această soluție se introduce pH-metru și se citește valoarea pH-ului indicată. Rezultatele au indicat un pH de 8,6 pentru bază și 7,5 pentru gelul final la preparare și de 8,4 pentru bază și 7,3 pentru gelul final la 30 de zile de la preparare. Gelul obținut are un pH corespunzător preparatelor cu aplicare pe mucoasa rectală, fără a suferi modificări majore în timp.

1.5. Determinarea capacității de întindere a gelurilor

Determinarea are la bază metoda extensometrică propusă de P. Ojeda și S. Arbussa, care utilizează două plăci de sticlă pătrate identice, cu greutatea cunoscută ($P = 149,52$ g). Pe partea externă a plăcii de sticlă inferioare se pune o hârtie milimetrică, pe care sunt desenate cinci cercuri concentrice. În centrul plăcii inferioare se plasează 1 g de gel peste care se așează cea de-a doua placă și după un minut se notează diametrul ocupat de gel în urma presării. În mod analog, se măsoară diametrul suprafeței după aplicarea unor greutăți în ordine crescătoare: 50 g, 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g.

Se citesc diametrele cercurilor formate și se calculează suprafața de etalare conform formulei:

$$S = \pi r^2$$

unde: S= suprafața de întindere; r = raza de întindere

Pentru gelurile preparate, atât înainte cât și după încorporarea substanțelor active s-a efectuat această determinare, conform tehnicii anterioare, obținându-se rezultatele din fig. 1.

Concluzii

Evaluarea rezultatelor obținute demonstrează buna capacitate de întindere a gelului. Prezența extractelor influențează plasticitatea gelului final. Conform graficului, după încorporarea extractelor vegetale, plasticitatea gelului de carbopol a crescut.

2. Evaluarea efectelor farmacologice a extractelor vegetale componente

Toate procedurile au fost efectuate respectând normele de bioetică în cercetarea pe animale de experiență în scop științific, conform Legii 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice și Directivei 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010, privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice. Animalele (șoareci și șobolani de laborator), achiziționate de la INCDMI Cantacuzino, București au fost lăsate timp de 2 zile să se obișnuiască în noul habitat. Hrana (grăunțe

RO 133548 B1

1 pentru șoareci și șobolani, Institutul Cantacuzino, București) și apa potabilă au fost puse la
dispoziția animalelor *ad libitum*. Animalele au fost cazate în condiții de umiditate și tem-
3 peratură constantă, monitorizate cu un termohigrometru. Valorile înregistrate au fost cuprinse
între 35-45% pentru umiditate și, respectiv, 20°C și 22°C pentru temperatură.

5 Calculul statistic s-a efectuat utilizând programele Microsoft Excel 2016 (Microsoft
Corp., SUA) și GraphPad Prism v. 5.0. (GraphPad Software, SUA). Rezultatele testelor
7 statistice de discriminare aplicate au prezentat un interval de încredere 95%.

9 Extractele de *V. vinifera*, *A. hippocastanum* și de *A. ampeloprasum* au fost obținute
conform procedurii descris în exemplul 1 la etapele I-III.

2.1. Evaluarea efectului analgezic

11 S-a evaluat efectul analgezic a trei extracte de *Vitis vinifera (folium)* folosind testul
stimulului chimic, care decelează acțiunea analgezică de tip periferic, mediată de substanțe
13 endogene precum prostaglandinele, metaboliți ai acidului arahidonic pe calea ciclooxigena-
zei (**Chen și colab., 2008, Phytomedicine. 15(6-7):427-436**).

Mod de lucru

15 S-au folosit 42 de șoareci masculi, sușa NMRI.

17 Animalele, au fost împărțite în 5 loturi, ținute la post alimentar timp de 4 h, apoi au
primit următoarele tratamente:

19 - Lotul 1: apă distilată 0,2 mL/10 g, p.o.;

- Lotul 2: Metamizol 100 mg/kgc, p.o.;

21 - Lotul 3: extract apos de *Vitis vinifera (folium)* 0,2 mL/10 g, p.o.;

- Lotul 4: extract etanolic 20% de *Vitis vinifera (folium)* 0,2 mL/10 g, p.o.;

23 - Lotul 5: extract în glicerină 20% de *Vitis vinifera (folium)* 0,2 mL/10 g, p.o.

25 La o oră după administrarea soluțiilor animalele au primit i.p. 0,1 mL acid acetic 0,6%.
Animalele au fost plasate în cutii de pexiglas individuale și după 5 min de la administrarea
acidului acetic, s-au numărat timp de 20 min contorsiunile efectuate de fiecare șoarece. S-a
27 considerat contorsiune întinderea animalului succedată de torsiunea trunchiului, reacția
abdomenului și opistotonus, astfel încât trenul posterior să atingă suprafața pe care se află
29 animalul.

Rezultate

31 În tabelul 2, sunt prezentate rezultatele experimentale privind numărul de contorsiuni
efectuate de animalele din loturile experimentale, după administrarea acidului acetic, efectul
33 analgezic al extractelor testate, comparativ cu lotul martor și cu cel de referință, precum și
interpretarea statistică.

35 *Reducerea numărului de contorsiuni comparativ cu lotul martor și lotul de referință,*
37 *de către extractele testate și semnificația lor statistică*

Tabelul 2

| Lot | Lot 1 | Lot 2 | Lot 3 | Lot 4 | Lot 5 |
|--------------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| M ± DS (nr. contors.) | 38,56 ± 6,52 | 18,75 ± 9,11 | 25,25 ± 15,94 | 16,50 ± 11,83 | 20,56 ± 12,14 |
| Distribuție normală # | DA | DA | DA | DA | DA |
| Efect % vs. M | - | -51,37 | -34,51 | -57,20 | -46,69 |

Tabelul 2 (continuare)

| Lot | Lot 1 | Lot 2 | Lot 3 | Lot 4 | Lot 5 |
|---|-------------|-------|-------|--------|-------|
| ANOVA (p) | ** (0,0022) | | | | |
| Pot test Dunnett | - | ** | ns | ** | ** |
| Efect % vs. MET | - | - | 34,67 | -12,00 | 9,63 |
| ANOVA (p) | ns (0,5545) | | | | |
| Pot test Dunnett | - | - | ns | ns | ns |
| M - medie; DS - deviație standard; # conform testului D'Agostino & Pearson; ** foarte semnificativ statistic; ns nesemnificativ statistic | | | | | |

Rezultatele experimentale au evidențiat următoarele aspecte:

- atât substanța de referință cât și cele 3 extracte testate au prezentat efect analgezic comparativ cu lotul martor, efect evidențiat prin scăderea numărului mediu de contorsiuni,

- cel mai puternic efect analgezic a fost observat la animalele din lotul 4 - care au primit extractul hidroetanolic 20% de *Vitis vinifera (folium)* (57,20%, $p < 0,01$);

- de asemenea și lotul care a primit metamizol (lotul 2) și cel care a primit extract în glicerină 20% de *Vitis vinifera (folium)* au prezentat efect analgezic comparativ cu lotul martor, rezultate înalt semnificativ statistic ($p < 0,01$);

- efectul analgezic înregistrat de lotul tratat cu extract apos de *Vitis vinifera (folium)*, nu a fost semnificativ din punct de vedere statistic (34,51%, $p > 0,05$);

- extractele de *Vitis vinifera* hidroetanolic 20% și hidroglicerice 20% prezintă efect analgezic mai intens, comparativ cu substanța de referință (metamizol sodic), însă rezultatele nu sunt semnificative din punct de vedere statistic.

În concluzie, extractul cu efectul analgezic cel mai bun, înregistrat în testul stimulului chimic, este extractul hidroetanolic 20% de *Vitis vinifera (folium)*, urmat de extractul hidroglicerice.

2.2. Evaluarea proprietăților antiinflamatoare

S-a evaluat efectul antiinflamator a 3 extracte de *A. hippocastanum* prin metoda pletismometrică, după administrarea intraplantară de agenți flogistici (caolinul și carageenanul). Modelul de inducere a edemului cu ajutorul carageenanului este cel mai utilizat în cercetarea efectelor antiinflamatoare ale produșilor naturali (**Nonato și colab., 2009, Journal of ethnopharmacology, 125(1), 102-107**).

Au fost folosiți 70 de șobolani masculi, sușa Wistar. Animalele au fost împărțite în 10 loturi, a câte 7 animale care au fost denumite în funcție de tratamentul primit și modelul de inducere a inflamației folosit astfel:

Lotul 1: M-CARR: bază de gel (ex. 1)

Lotul 6: M-CAO: bază de gel (ex. 1)

Lotul 2: D-CARR: Gel cu diclofenac sodic 5%

Lotul 7: D-CAO: Gel cu diclofenac sodic 5%

Lotul 3 AA-CARR: gel obținut din extractul de *A. hippocastanum* cu apă

Lotul 8 AA-CAO: gel obținut din *A. hippocastanum* cu apă

Lotul 4: AE-CARR: gel obținut din *A. hippocastanum* cu etanol 20%

Lotul 9: AE-CAO: gel obținut din *A. hippocastanum* cu etanol 20%

Lotul 5: AG-CARR: gel obținut din *A. hippocastanum* cu glicerina 20%

Lotul 10: AG-CAO: gel obținut din *A. hippocastanum* cu glicerina 20%

RO 133548 B1

1 Animalele au fost anesteziate cu uretan 1300 mg/kg corp, soluție 13%, administrat
i.p. După instalarea anesteziei generale, s-a determinat volumul inițial al piciorului drept.

3 Câte 0,2 g gel a fost aplicat pe suprafața labei drepte și masat de 50 de ori. Inflamația
a fost indusă prin administrarea intraplantară de agent inflamator, după cum urmează:

- 5 - 0,1 ml carageenan suspensie 1% pentru loturile 1-5;
- 0,2 ml caolin suspensie 10% pentru loturile 6-10.

7 După administrarea agentului inflamator s-a urmărit evoluția edemului indus, la 1, și
la 3 h (Ugo Basile Plethysmometer Cat. No. 7140).

9 În tabelele 3 și 4, sunt redată valorile evoluției procentuale a inflamației induse cu
carageenan, respectiv caolin, raportată la valorile inițiale, înainte de inducerea edemului,
11 precum și interpretarea statistică.

Evoluția procentuală a inflamației pentru animalele care au primit intraplantar carageenan

Tabelul 3

| | | | |
|--|----------------------|---------------|-------|
| | Medie | 1,73 | 2,21 |
| | DS | 0,19 | 0,36 |
| | Distribuție normală* | DA | DA |
| | Ef% față de inițial | | 28,10 |
| | Testul t Student (p) | *(0,0102) | |
| | Medie | 1,70 | 2,01 |
| | DS | 0,06 | 0,18 |
| | Distribuție normală* | DA | DA |
| | Ef% față de inițial | | 19,01 |
| | Testul t Student (p) | **(0,0039) | |
| | Medie | 1,65 | 1,97 |
| | DS | 0,11 | 0,15 |
| | Distribuție normală* | DA | DA |
| | Ef% față de inițial | | 19,01 |
| | Testul t Student (p) | **(0,0028) | |
| | Medie | 1,65 | 2,11 |
| | DS | 0,13 | 0,29 |
| | Distribuție normală* | DA | DA |
| | Ef% față de inițial | | 28,30 |
| | Testul t Student (p) | *** (0,0008) | |
| | Medie | 1,81 | 2,00 |
| | DS | 0,17 | 0,18 |
| | Distribuție normală* | DA | DA |
| | Ef% față de inițial | | 10,83 |
| | Testul t Student (p) | *** (0,0021) | |

RO 133548 B1

Evoluția procentuală a inflamației pentru animalele care au primit intraplantar caolin

Tabelul 4

| | | | | |
|---|----------------------|---------------|-------|----|
| | Medie | 1,69 | 2,28 | 1 |
| | DS | 0,13 | 0,20 | 5 |
| | Distribuție normală* | DA | DA | 7 |
| | Ef% față de inițial | | 35,00 | 9 |
| | Testul t Student (p) | ***(< 0,0001) | | |
| | Medie | 1,67 | 2,14 | 11 |
| | DS | 0,18 | 0,13 | 13 |
| | Distribuție normală* | DA | DA | 15 |
| | Ef% față de inițial | | 27,89 | 17 |
| | Testul t Student (p) | *** (0,0002) | | |
| | Medie | 1,63 | 2,06 | 19 |
| | DS | 0,10 | 0,22 | 21 |
| | Distribuție normală* | DA | DA | 23 |
| | Ef% față de inițial | | 26,49 | |
| | Testul t Student (p) | ** (0,0016) | | |
| | Medie | 1,67 | 2,24 | 25 |
| | DS | 0,08 | 0,10 | 27 |
| | Distribuție normală* | DA | DA | 29 |
| | Ef% față de inițial | | 34,00 | 31 |
| | Testul t Student (p) | ***(< 0,0001) | | |
| | Medie | 1,75 | 2,18 | 33 |
| | DS | 0,12 | 0,18 | 35 |
| | Distribuție normală* | DA | DA | 37 |
| | Ef% față de inițial | | 24,88 | 39 |
| | Testul t Student (p) | ***(< 0,0001) | | |
| SD - deviație standard; * conform testului Kolmogorov ** foarte semnificativ statistic; * semnificativ statistic,- Smirnov; *** extrem de semnificativ statistic; | | | | 41 |

Rezultatele experimentale au evidențiat următoarele aspecte:

Pentru modelul de inflamație cu carageenan:

- administrarea carrageeanului a produs creșterea în volum a labei pentru toate cele 5 loturi luate în lucru;

- pentru toate loturile luate în lucru, creșterile procentuale ale volumului labei de șobolan au fost semnificative statistic, atunci când au fost comparate cu volumul inițial;

RO 133548 B1

1 - la 3 h de la administrarea carageenanului cea mai mare creștere procentuală a fost
înregistrată pentru lotul tratat cu extract etanolic de *A. hippocastanum* (28,30%, $p < 0,0001$),
3 urmat de lotul martor M-CARR (28,10%, $p < 0,05$), lotul de referință D-CARR (19,01%,
 $p < 0,01$) și lotul AA-CARR (18,04%, $p < 0,01$). Cea mai mica creștere a fost înregistrată de
5 lotul care a primit extractul în glicerina, AG-CARR (10,83%, $p < 0,0001$);

- comparativ cu lotul martor cel mai puternic efect antiinflamator a fost observat
7 pentru lotul care a primit extractul în glicerina AG-CARR (17,27%). Diclofenacul și extractul
apos au prezentat un efect antiinflamator similar, 10,06%, respectiv 9,08%. Extractul etanolic
9 de *A. hippocastanum* nu a avut efect antiinflamator. Rezultatele au fost semnificative din
punct de vedere statistic (ANOVA, $p < 0,0001$).

11 *Pentru modelul de inflamație cu caolin:*

- administrarea caolinului a produs creșterea în volum aabei pentru toate cele
13 5 loturi luate în lucru;

- pentru toate loturile luate în lucru, creșterile procentuale ale volumuluiabei de
15 șobolan au fost semnificative statistic, atunci când au fost comparate cu volumul inițial;

- la 3 h de la administrarea caolinului cea mai mare creștere procentuală a fost
17 înregistrată pentru lotul martor M-CAO (35,00%, $p < 0,0001$), urmat de lotul AE-CAO
(34,00%, $p < 0,001$), lotul de referință D-CARR (27,89%, $p = 0,002$) și lotul AA-CARR
19 (26,47%, $p = 0,0016$). Cea mai mică creștere a fost înregistrată de lotul care a primit
extractul în glicerină, AG-CARR (24,88%, $p < 0,0001$);

- comparativ cu lotul martor cel mai puternic efect antiinflamator a fost observat
21 pentru lotul care a primit extractul în glicerină AG-CARR (10,12%). Diclofenacul și extractul
23 apos au prezentat un efect antiinflamator similar, 7,11%, respectiv 8,5%. Extractul etanolic de
A. hippocastanum nu a avut efect antiinflamator. Rezultatele au fost semnificative din punct
25 de vedere statistic (ANOVA, $p < 0,0001$).

În concluzie, dintre cele 3 extracte de *A. hippocastanum* testate, cel în glicerină a pre-
27 zentat efectul antiinflamator cel mai bun, după aplicare topică, atât în modelul de inflamație
cu carrageenan, cât și în cel cu caolin.

29 *2.3. Efectul cicatrizant*

A fost evaluat efectul cicatrizant a 3 extracte din praz (*Allium ampeloprasum*) folosind
31 un model experimental bazat pe inducerea unor arsuri la rozătoare și cercetarea ratei de
vindecare a acestora (Guo HF și colab., 2017, Int. J. Burns Trauma, 7(6): 107-114; Cai
33 și colab., 2014, Arch Plast Surg. 41 (4):317-24).

Au fost utilizați 30 de șobolani masculi, sușa Wistar. Animalele de laborator au fost
35 împărțite în 5 loturi ($n = 6$) și le-a fost îndepărtată blana de pe partea dorsală, cu aproximativ
24 de ore înainte de test.

37 În ziua experimentului fost indusă anestezia generală prin administrare ip. de tio-
pental sodic 60 mg/kg. Animalele au primit ca analgezic, nefopam 20 mg/kgc intraperitoneal.

39 Arsurile au fost create prin plasarea pe spatelul, după dezinfectare cu soluție alcoolică
de uz chirurgical a unor corpuri metalice cilindrice cu masa de 100 g și diametrul de 2 cm,
41 încinse în ser fiziologic încălzit la temperatura de 100°C. Corpurile încinse au fost lăsate pe
spatele animalelor timp de 10 sec. După 5 min, animalelor le-au fost administrate topic, pe
43 suprafața arsurilor, câte 0,2 mL din următoarele preparate:

- Lotul 1 - martor: bază de gel (exemplul 1);

45 - Lotul 2 - referință: cremă Cicatrizin (Tis Farmaceutic, SA);

- Lotul 3 - gel extract apos de *Allium ampeloprasum* (APA);

47 - Lotul 4 - gel extract alcoolic 20% de *Allium ampeloprasum* (APE);

- Lotul 5 - gel extract glicerolic 20% de *Allium ampeloprasum* (APG).

RO 133548 B1

| | |
|---|----|
| Cele 5 preparate topice au fost aplicate o dată pe zi, timp de 5 zile. Aspectul rănilor a fost înregistrat cu o cameră digitală în ziua formării arsurilor și după 1, 3, respectiv 5 zile. | 1 |
| Analiza macroscopică a rănilor a fost realizată prin intermediul programului ImageJ versiunea 1.52, determinând diametrul și densitatea optică a acestora. | 3 |
| Rata de vindecare a fost măsurată prin cuantificarea contracției rănii, utilizând următoarea formulă: | 5 |
| $\text{rată de contractie} = \frac{\text{diametrul ziua } x - \text{diametrul ziua } 0}{\text{diametrul ziua } 0} \times 100\%$ | 7 |
| | 9 |
| Densitatea optică a fost utilizată ca măsură a formării unei cruste la suprafața rănii, proces datorat proliferării keratinocitelor și fibroblaștilor. | 11 |
| <i>Rezultate</i> | |
| În ziua a cincea a experimentului cele mai bune rezultate au fost obținute pentru animalele tratate cu gelurile obținute din extractele APE (-30,62%, $p < 0,01$) și APG (-26,68%, $p < 0,001$). | 13 |
| Comparativ cu lotul martor, doar pentru extractele APE și APG s-a observat un efect cicatrizant, care a fost maxim pentru APE în ziua a cincea a experimentului (7,31%, $p > 0,5$), iar pentru APG în prima zi a experimentului (9,73% $p > 0,5$) (fig. 2). | 15 |
| În concluzie, atât extractul etanolic, cât și cel în glicerină de <i>Alium porrum</i> posedă proprietăți cicatrizante, superioare preparatului de referință Cicatrizin. | 17 |
| | 19 |

RO 133548 B1

Revendicări

1

3

1. Procedeu de obținere a unor extracte naturale, **caracterizat prin aceea că**, materiile prime, respectiv *Aesculus hippocastanum L. (Sapindaceae)* sau *Vitis vinifera L. (Vitaceae)* sau *Allium porrum var. porrum sin. Allium ampeloprasum L. (Liliaceae)* sunt supuse unei extracții la rece în flacoane de sticlă sau recipiente de oțel sub agitare la temperatura camerei timp de 6 h și urmată de un repaus de 48 h sau extracție la cald, la reflux timp de 60 min cu un amestec de alcool etilic și apă în proporții de 20...60% sau amestec de glicerină și apă în proporții de 20...60% sau amestec de propilenglicol și apă în proporții de 20...60% sau apă, în raport cantitativ masă material vegetal:volum solvent de 1:10, urmată de filtrare, extractele vegetale pot fi folosite ca atare sau pot fi concentrate la evaporatorul rotativ la 40...50°C până la 1/2 din volum iar extractele astfel obținute de la cele 3 specii vegetale se combină în proporție de 1:1:1 obținându-se extractul vegetal cu un conținut de β-escină, esculozidă, hiperozidă, rutozidă, izoquercitozină și acid clorogenic și cuprinde 386,4...655,8 mg/L polifenoli totali exprimați în acid galic și flavonozide totale exprimate în quercetol de 9,08...11,72 mg/L.

17

2. Extracte vegetale naturale, fitocomplecși din speciile *Aesculus hippocastanum L. (Sapindaceae)*, *Vitis vinifera L. (Vitaceae)* și *Allium porrum var. porrum sin. Allium ampeloprasum L. (Liliaceae)* obținute prin procedeul definit în revendicarea 1.

19

21

3. Utilizarea extractului vegetal definit în revendicările 1 și 2 în tratarea afecțiunilor hemoroidale sub formă de gel obținut prin încorporarea în carbopol 940, sub agitare mecanică, a extractului vegetal natural obținut prin procedeul definit în revendicarea 1 cu un conținut de polifenoli totali exprimați în acid galic de 54,40...92,33 mg/100 g și un conținut de flavonozide totale exprimate în quercetol de 0,89...1,05 mg/100 g, gelul având o bună capacitate de întindere și un pH apropiat de cel al pielii.

23

25

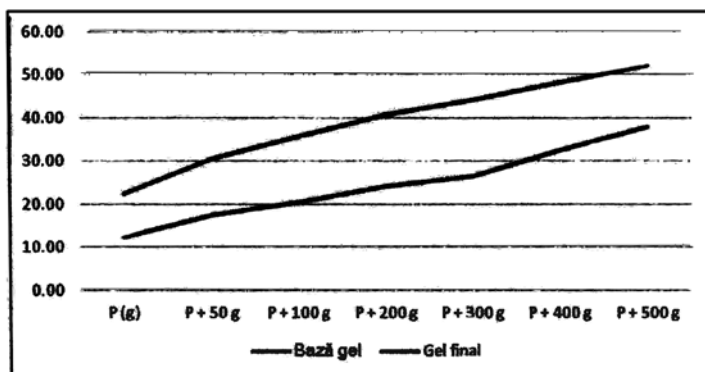


Fig. 1

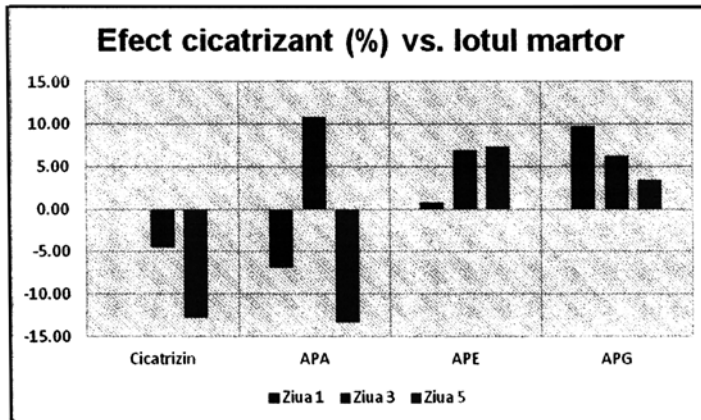


Fig. 2

