



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01260

(22) Data de depozit: 29.11.2011

(41) Data publicării cererii:  
30.07.2013 BOPI nr. 7/2013

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
ȘTIINȚE BIOLOGICE,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• PĂUN GABRIELA, STR. POSTĂVARUL  
NR.17, BL. 0-28, SC. 3, AP. 35, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;

• RADU GABRIEL-LUCIAN,  
ALEEA ROTUNDĂ NR.4, BL.H 6, SC.D,  
AP.61, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• NEAGU ELENA, STR. PORȚILE DE FIER  
NR. 40A, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;  
• MOROEANU VERONICA,  
STR. PLT. PETRE IONESCU NR. 51, BL. 7,  
SC. 5, AP. 285, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• ROTINBERG PINCU, STR. ION CREAMĂ  
NR. 73, BL. J 3, SC. B, AP. 9, IAȘI, IS, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI EXTRACT PURIFICAT ȘI  
CONCENTRAT DIN GERANIUM ROBERTIANUM ȘI  
HELLEBORUS PURPURASCENS CU EFECT CITOSTATIC,  
UTILIZÂND TEHNOLOGII MEMBRANARE**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a extractelor purificate și concentrate din *Geranium robertianum* și *Helleborus purpurascens*, caracterizat prin utilizarea tehnologiilor membranare de microfiltrare și ultrafiltrare, prin care se realizează atât purificarea extractelor, cât și concentrarea acestora. Procedeu constă în extracția cu apă bidisti-lată a produsului vegetal, în raport vegetal/ solvent de 5:100...10:100, la 25...30°C, urmată de filtrarea extractului care este prefiltrat, într-o primă etapă, cu ajutorul unui cartuș

filtrant, cu dimensiunea porilor de 50 μm sau 25 μm, iar în a doua etapă este supus microfiltrării printr-o membrană cu pori de 0,22...1 μm, la presiunea de 1,5...3 bar, microfiltratul fiind apoi concentrat prin ultrafiltrare. Extractele obținute au acțiune inhibitoare asupra dezvoltării culturilor celulare neoplazice HeLa și Hep-2p în valoare de peste 70% cele apoase și peste 85% cele hidroalcoolice.

Revendicări: 3

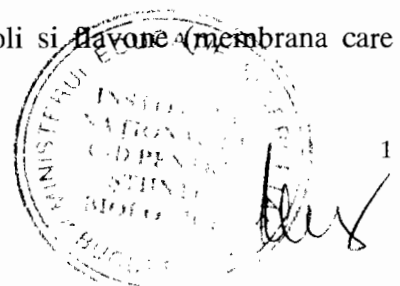
Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea 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 obtinere a unui extract purificat si concentrat din *Geranium robertianum* si *Helleborus purpurascens* cu efect citostatic, utilizand tehnologii membranare**

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a extractelor purificate si concentrate din *Geranium robertianum* si *Helleborus purpurascens*, ce pot fi utilizate ca materie prima in industria farmaceutica. Cele 2 specii de plante medicinale sunt cunoscute in fitoterapie ca avand proprietati antioxidante, antiinflamatoare si imunostimulatoare [1, 2], iar cercetari recente au aratat ca extractele de *Geranium sp.* si *Helleborus sp.* au actiuni antitumorale [3-6]. Comparativ cu metodele clasice de concentrare a extractelor, prezenta inventie se refera la aplicarea unor tehnologii membranare performante care decurg la temperatura mediului ambiant (microfiltrare si ultrafiltrare) pentru obtinerea concentratelor purificate si concentrate. In cadrul procesului de prelucrare a extractelor vegetale, microfiltrarea se realizeaza in scopul de a indeparta suspensiile si impuritatile grosiere cu dimensiuni mai mari decat diametrul porilor membranei (cca. 0,45  $\mu\text{m}$ ), precum si pentru sterilizarea extractelor. Ultrafiltrarea este aplicata in scopul concentrarii proteinelor, polizaharidelor, polifenolilor si a compusilor flavonici cu mase moleculare mai mari de 1000 Dalton din extractele de plante medicinale studiate.

Procedeu conform inventiei consta in aceea ca se supune produsul vegetal (frunze sau radacina) maruntit foarte fin extractiei cu apa bidistilata, intr-un raport masic produs vegetal/solvent de 5:100 ... 10:100, la 25-30°C, urmata de filtrare pentru separarea solutiei extractive. Extractul prefiltrat este supus microfiltrarii printr-o membrana cu pori de 0,22 - 1  $\mu\text{m}$ , iar apoi microfiltratul este concentrat prin ultrafiltrare prin membrane cu pori de dimensiuni suficient de mici pentru a retine proteine, polizaharide, polifenoli si flavone (membrana care



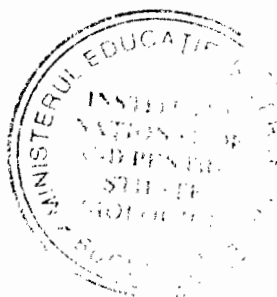
retine compusii cu mase moleculare mai mari de 10.000 – 50.000 Dalton). Extractul final este caracterizat din punct de vedere al continutului in compusii biologic activi cu efect citostatic (polifenoli, flavone, proteine) si al efectului citostatic al extractelor concentrate pe linii de culturi celulare normale (celule renale de maimuta = RM) si neoplazice umane (HEp-2p si HeLa).

Procedeul de obtinere a extractelor purificate si concentrate la nivel pilot prezinta urmatoarele faze tehnologice si se realizeaza pe o instalatie care va avea in componenta 1 cartus de prefiltrare, 1 cartus de microfiltrare si 1 cartus de ultrafiltrare:

- prefiltrarea se realizeaza cu ajutorul unui cartus filtrant cu dimensiunea porilor de 50  $\mu\text{m}$  sau 25  $\mu\text{m}$  (in functie de gradul de incarcare in suspensii al solutiei si de natura materiei prime vegetale folosite).
- microfiltrarea se realizeaza cu ajutorul unui cartus filtrant cu dimensiunea porilor de 0,22 - 1  $\mu\text{m}$ , la presiunea de 1,5 bar – 3 bar;
- ultrafiltrarea se realizeaza cu ajutorul unui cartus cu membrana „hollow-fiber” cu cut-off de 10.000 – 50.000 Da (membrana care retine compusii cu mase moleculare mai mari de 10.000 – 50.000 Dalton), la presiunea de lucru de 3 bar-5 bar, stabilita astfel incat debitul de permeat sa fie de 100 - 200 L/h.

Procedeul conform inventiei prezinta urmatoarele avantaje:

- obtinerea unor extracte purificate si concentrate de calitate superioara, cu actiune citostatica bine definita, corelata cu continutul in grupe de principii active extrase;
- separarea si concentrarea compusilor termolabili;
- pretul de cost al produsului final (extractul concentrat in compusi bioactivi) este mai mic decat cel obtinut prin tehnologia clasica, ca urmare a eliminării etapei de concentrare la temperatura care este mai costisitoare.



Procedeul este conceput astfel incat produsul fiecărei etape este trecut in cea urmatoare, fara adaos de compusi chimici, iar produsul etapei finale este extractul purificat si concentrat cu efect citostatic din *Geranium robertianum* si *Helleborus purpurascens*, un extract cu eficienta ridicata si efecte secundare minime, care poate fi folosit ca adjuvant in terapia cancerului.

Se prezinta in continuare 3 exemple de realizare a unui extract purificat si concentrat din *Geranium robertianum* si *Helleborus purpurascens* cu efect citostatic prin procedeul descris.

**Exemplul 1.** Se realizeaza extracte apoase prin macerare prin amestecul a 3...5 kg din fiecare planta fin maruntita, cu ajutorul unei mori de macinare, cu 50 L apa distilata, la temperatura de 24-30°C, timp de 8-10 ore. Solutiile extractive se decanteaza, se filtreaza grosier si se introduc in vasul de alimentare al instalatiei pilot unde extractele sunt prelucrate prin urmatoarea succesiunea de operatii: prefiltrare (prefiltru cu pori de 20 µm), microfiltrare (microfiltru cu pori de 1 µm) si ultrafiltrare (cartus cu membrana „hollow-fiber” cu cut-off de 30.000 Da).

Extractul de *Geranium robertianum* purificat si concentrat are urmatoarele caracteristici:

- aspect: lichid concentrat de culoare brun inchisa;
- polifenoli (exprimati in acid galic): min. 35 mg la 100 g produs
- flavone (exprimate in quercetin): min 3,3 mg la 100 g produs
- proteine: min. 0,3 g la 100 g produs

Extractul de *Helleborus purpurascens* purificat si concentrat are urmatoarele caracteristici:

- aspect: lichid concentrat de culoare brun inchisa;
- polifenoli (exprimati in acid galic): min. 20 mg la 100 g produs
- flavone (exprimate in quercetin): min 1,5 mg la 100 g produs
- proteine: min. 0,26 g la 100 g produs



Extractul purificat si concentrat mixt obtinut din cele 2 plante medicinale in raport de 1:1 (volume egale din cele 2 extracte concentrate) are urmatoarele caracteristici:

- aspect: lichid concentrat de culoare brun inchisa;
- polifenoli (exprimati in acid galic): min. 25 mg la 100 g produs
- flavone (exprimate in quercetin): min 2,2 mg la 100 g produs
- proteine: min. 0,28 g la 100 g produs

Extractele concentrate obtinute prin procedeul descris prezinta un efect citostatic *in vitro* semnificativ, materializat prin inhibarea dezvoltarii culturilor celulare neoplazice HeLa si Hep-2p in procente de peste 70%, in timp ce impactul acestor extracte este nesemnificativ din punct de vedere al evaluarii citostatice asupra culturilor de celule normale. Acest aspect demonstreaza ca tinta preferentiala a acestor produse este localizata preponderent la nivelul celulelor tumorale.

**Exemplul 2.** Se realizeaza extracte hidroalcoolice prin macerare prin amestecul a 3...5 kg din fiecare planta fin maruntita, cu ajutorul unei mori de macinare, cu 50 L alcool etilic 50%, la temperatura de 24-30°C, timp de 7-8 zile. Solutiile extractive se decanteaza, se filtreaza grosier si se introduc in vasul de alimentare al instalatiei pilot unde extractele sunt prelucrate prin urmatoarea succesiune de operatii: prefiltrare (prefiltru cu pori de 20 µm), microfiltrare (microfiltru cu pori de 1 µm) si ultrafiltrare (cartus cu membrana hollow-fiber cu cut-off de 30.000 Da).

Extractul de *Geranium robertianum* purificat si concentrat are urmatoarele caracteristici:

- aspect: lichid concentrat de culoare brun inchisa;
- polifenoli (exprimati in acid galic): min. 65 mg la 100 g produs
- flavone (exprimate in quercetin): min 8,5 mg la 100 g produs
- proteine: min. 0,2 g la 100 g produs



Extractul de *Helleborus purpurascens* purificat si concentrat are urmatoarele caracteristici:

- aspect: lichid concentrat de culoare brun inchisa;
- polifenoli (exprimati in acid galic): min. 45 mg la 100 g produs
- flavone (exprimate in quercetin): min 5,5 mg la 100 g produs
- proteine: min. 0,16 g la 100 g produs

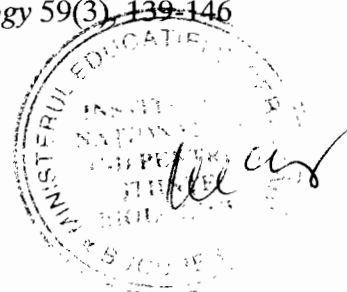
Extractul purificat si concentrat mixt obtinut din cele 2 plante medicinale in raport de 1:1 (volume egale din cele 2 extracte concentrate) are urmatoarele caracteristici:

- aspect: lichid concentrat de culoare brun inchisa;
- polifenoli (exprimati in acid galic): min. 55 mg la 100 g produs
- flavone (exprimate in quercetin): min 6,5 mg la 100 g produs
- proteine: min. 0,2 g la 100 g produs

Extractele concentrate obtinute prin procedeul descris prezinta un efect citostatic *in vitro* semnificativ, materializat prin inhibarea dezvoltarii culturilor celulare neoplazice HeLa si Hep-2p in procente de peste 85%, in timp ce impactul acestor extracte este nesemnificativ din punct de vedere al evaluarii citostatice asupra culturilor de celule normale.

### Referinte bibliografice

1. Sónia Amaral, Lurdes Mira, J.M.F. Nogueira, Alda Pereira da Silva, M. Helena Florêncio, (2009). Plant extracts with anti-inflammatory properties—A new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure–antioxidant activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(5), 1876-1883
2. Büssing, A., Schweizer, K. (1998). Effects of a phytopreparation from *Helleborus niger* on immunocompetent cells in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* 59(3), 139-146



3. Okuda T, Yoshida T, Hatano T., 1992. Pharmacologically active tannins isolated from medicinal plants. *Basic Life Sci.*, 59, 539-69
4. Jesse P (2009). Präklische Evaluation von Helleborus niger in Zellkulturversuchen. *Der Merkurstab.*, 4, 308-314.
5. Rosselli S, Maggio A, Bruno M, Spadaro V, Formisano C, Irace C, Maffettone C, Mascolo N. (2009). Furostanol Saponins and Ecdysones with Cytotoxic Activity from *Helleborus bocconeii* ssp. *intermedius*. *Phytother. Res.* 23, 1243–1249
6. P. Jesse, G. Mottke, J. Eberle, G. Henze, A. Prokop (2008). *Helleborus niger* as new cytostatic compound against lymphoma and leukemia in childhood. *European Journal of Integrative Medicine*, Vol. 1, Suppl. 1, 5-6 (DOI: 10.1016/j.eujim.2008.08.090)



## Revendicari

1. Procedeu de obtinere a extractelor purificate si concentrate caracterizat prin utilizarea tehnologiilor membranare de microfiltrare si ultrafiltrare prin care se realizeaza atat purificarea extractelor cat si concentrarea lor.
2. Extract vegetal concentrat cu actiune citostatice, caracterizat prin aceea ca este constituit din principii active hidrosolubile atat din *Geranium robertianum* si *Helleborus purpurascens* cat si din amestecul celor doua plante.
3. Procedeu care conduce la obtinerea unor extracte cu actiune inhibitoare asupra dezvoltarii culturilor celulare neoplazice HeLa si Hep-2p in procente de peste 70% cele apoase si peste 85% cele hidroalcoolice, dar avand un impactul nesemnificativ din punct de vedere al evaluarii citostatice asupra culturilor de celule normale.

