



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00746

(22) Data de depozit: 27/09/2017

(41) Data publicării cererii:  
30/05/2018 BOPI nr. 5/2018

(71) Solicitant:

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

(72) Inventatori:

• ANCUCEANU ROBERT, STR. MOȚOC  
NR. 2, BL. P3, SC. 3, AP. 72, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• DINU MIHAELA, STR. ȘOIMĂREȘTIILOR  
NR. 19, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;  
• HOVANEȚ MARILENA VIORICA,  
STR. CĂLINULUI NR. 13, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• ANGHEL ADRIANA IULIANA,  
STR. SOLD. N. SEBE NR. 5, BL. S24,  
AP. 36, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;

• OLARU OCTAVIAN TUDOREL,  
STR. ZBOINA NEAGRĂ NR. 5, BL. 98, SC. 1,  
ET. 1, AP. 8, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• DINU PÂRVU CRISTINA ELENA,  
STR. GH. LAZĂR NR. 10, ET. 1, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• NIȚULESCU GEORGE MIHAI,  
ȘOS. OLTENIȚEI NR. 40-44, BL. 6A, SC. 4,  
ET. 7, AP. 145, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• POPESCU VIOLETA CARMEN,  
STR. SOLDAT ENE MODORAN NR. 14,  
BL. M185, SC. 1, AP. 11, ET. 2, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• DUNE CONSTANTINA-ALINA,  
BD. CONSTANTIN BRÂNCOVEANU NR. 118,  
BL. MII/4, SC. 2, ET. 8, AP. 153, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• MANEA ȘTEFANIA, ALEEA BACAU NR. 9,  
BL. H1, SC. 1, ET. 4, AP. 78, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• DOCIU FLORENTINA-STELUȚA,  
INT. BADENIN NR. 10, BL. T5, SC. 1, ET. 9,  
AP. 37, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **EXTRACT DE ORIGINE VEGETALĂ  
PENTRU SUPLIMENTAREA FIERULUI  
DIN ALIMENTAȚIE, ȘI METODĂ DE OBȚINERE A ACESTUIA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de preparare a unui extract vegetal utilizat ca ingredient activ în suplimente alimentare cu fier. Procedeu conform invenției constă în recoltarea frunzelor de *Tagetes erecta* L în perioada înfloririi, uscarea la temperaturi mai mici de 35°C și umiditate sub 65%, măcinarea și cernerea pulberii rezultate printr-o sită cu dimensiunea ochilor de 250 μm, după care materialul vegetal este extras de două ori la temperatura de 80°C, timp de 30 min, cu un solvent apă acidulată cu acid citric 3%, la un raport produs vegetal:

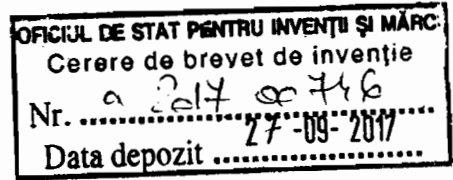
solvent de 1:10, soluțiile extractive se concentrează, și soluția concentrată se supune liofilizării la -53°C, rezultând un extract ce are un conținut de fier de minimum 900 mg/kg, polifenoli de maximum 3,5% echivalenți acid galic, și flavone de maximum 0,5% echivalenți quercetol.

Revendicări: 6

Figuri: 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).





**Descrierea invenției**

**Titlul invenției:**

Extract de origine vegetală pentru suplimentarea fierului din alimentație și metodă de obținere a acestuia.

**Domeniul tehnic la care se referă invenția:**

Prezenta invenție se referă la un extract de origine vegetală utilizat ca ingredient activ în suplimente alimentare cu fier și la metoda de obținere a acestuia.

**Stadiul tehnicii:**

Fierul este un nutrient vital pentru organismul uman, având un rol esențial într-o varietate de activități celulare. Funcționează drept co-factor pentru numeroase enzime implicate în biosinteza anumitor aminoacizi, a colagenului, a unor hormoni și neurotransmițători. Conținutul de fier în organism este strict reglat, deoarece atât deficitul cât și excesul pot avea consecințe nefaste [52]. Estimarea necesarului de fier la om variază la diferiții autori și depinde de sursele bibliografice, metodologie și ipoteze de calcul (de exemplu, aportul de referință al nutrienților – *reference nutrient intake* -, RNI este mai mare în SUA decât în Marea Britanie) [68]. Se acceptă că bărbații și femeile în vârstă (peste 51 ani) au nevoie de aproximativ 8 mg fier pe zi (8,7 mg în UK, 8 mg în SUA). Femeile de vârstă fertilă au nevoie de cantități considerabil mai mari pentru a compensa pierderea menstruală, aproximativ 18 mg pe zi (14,8 mg oficial în UK); la gravide necesarul de fier este chiar mai mare, 27 mg pe zi [67, 68]. La copii, necesarul de fier poate varia cu vârsta, fiind mai mare în primii 2 ani de viață, apoi mai scăzut și dublându-se aproape la adolescență [33].

În alimente fierul se poate prezenta sub formă hemică sau non-hem. Fierul din hem se află în alimentele de origine animală, iar cel non-hem în alimentele de origine vegetală. Primul este absorbit într-o proporție mai mare decât cea de-a doua. Totuși absorbția fierului non-hem este de asemenea influențată de alte componente ale dietei. De exemplu MHP, un factor din carne, pește și pui, favorizează absorbția fierului non-hem, în timp ce acidul ascorbic (vitamina C) poate crește de trei ori absorbția fierului non-hem. Pe de altă parte taninurile (de exemplu cele din cafea și ceai), fitații (din cereale) au efecte negative asupra biodisponibilității fierului [67].

Anemia este definită drept "concentrația hemoglobinei situată sub nivelurile de referință consacrate" [70]. Nu este o boală, ci o stare care reflectă o afecțiune subiacentă [45] sau aportul nutrițional. S-a estimat că la nivel mondial anemia afectează aproximativ 20-30% din populație [15, 45], cu o prevalență ridicată în țările în curs de dezvoltare [45]. *Anemia feriprivă* (AF) este cea mai comună formă de anemie în lume [25] și cea mai frecventă formă de anemie la gravide [8]. Se estimează că anemia feriprivă are o prevalență de 2% printre bărbații adulți și 9 – 20% printre femeile adulte, această variabilitate fiind influențată de rasă și etnie [7]. Chiar în țările dezvoltate există categorii de populații cu un aport scăzut de fier. De exemplu Canada este o țară cu rată foarte scăzută a anemiei, dar o analiză la nivel național a arătat că în timp ce aportul de fier din dietă este adecvat pentru 97% din populație, în cazul femeilor de 14-50 ani, 12% - 18% dintre acestea au un aport inadecvat de fier [15]. Studii realizate în Marea Britanie între 1980 și 2000 au arătat că în această perioadă aportul de fier din alimentație a scăzut ușor la femei și bărbați, și în 2000 – 2001 în jur de 25% dintre femei aveau un aport inadecvat de fier, această proporție crescând la 40% la categoria de vârstă sub 35 de ani [68].

Deși nu este o boală în sine, anemia este însoțită de numeroase și serioase consecințe nefaste pentru sănătatea pacienților. Aceștia sunt adesea asimptomatici (dacă pierderea de hemoglobină este limitată, de exemplu Hb mai mare de 10g/dl), dar simptomele devin manifeste la pacienții cu afecțiuni multiple (afecțiuni cardiace, boli respiratorii) [39]. Anemia în general (inclusiv anemia

feriprivă) afectează calitatea vieții [39], reduce capacitatea de muncă fizică [24] și la gravide se asociază cu naștere prematură, instabilitate emoțională și rate mai mari de depresie în perioada postpartum, precum și cu consecințe negative asupra dezvoltării neuronale la copii [8]. Există o corelație bine cunoscută între anemia feriprivă și cancerul gastro-intestinal [25], iar la pacienții non-diabetici, ca și la cei cu diabet, deficiența de fier se corelează cu niveluri crescute ale hemoglobinei glicate [57]. La vârstnici, valorile hemoglobinei situate spre limita inferioară pot afecta negativ mobilitatea și performanța fizică [18]. În plus există dovezi că în această categorie de populație anemia poate altera activitățile de zi cu zi [5], poate crește riscul de demență și declin cognitiv [48] și poate constitui un factor de risc pentru insuficiența coronariană și cerebrovasculară, precum și pentru complicații medicamentoase [6]. La pacienții cu insuficiență cardiacă anemia se asociază cu un risc crescut de mortalitate [23, 46], deși într-o analiză multivariabilă numai deficiența de fier s-a asociat cu un risc crescut de mortalitate și transplant cardiac, nu și anemia [29]. La pacienții cu artrită reumatoidă anemia afectează calitatea vieții și există tot mai multe dovezi care arată că ameliorarea anemiei se corelează cu îmbunătățirea calității vieții [16].

Multiplele efecte negative ale anemiei asupra sănătății și calității vieții justifică intervențiile destinate prevenirii și controlului anemiei, una dintre ele fiind utilizarea suplimentelor alimentare cu fier. Deși prioritatea în controlul anemiei este recunoscută pentru gravide, femeile postpartum și copii de 6 – 24 luni [59], există și alte sub-populații care necesită suplimentare cu fier pentru îmbunătățirea nivelului hemoglobinei.

Pentru combaterea deficitului de fier și anemiei feriprive există patru abordări recomandate de Organizația Mondială a Sănătății: fortificarea (îmbogățirea) alimentelor, suplimentarea alimentației (utilizarea de suplimente alimentare), educația (privind stilul de viață și sursele de fier) și programe de selecție și dezvoltare de soiuri noi, mai bogate în fier. Fortificarea și suplimentarea cu fier au în general un efect rapid și direct la populațiile expuse riscului de deficit de fier [69]. *“Datorită mărimii evidente a problemei aportului inadecvat de fier și a deficitului de fier, folosirea suplimentelor poate fi o componentă necesară a măsurilor care au o șansă realistă de a avea un impact major asupra problemei, cel puțin pe termen scurt. Consumul mai mare de fier organic din carne extra slabă și pește poate fi inacceptabil pentru un număr substanțial de persoane care sunt vegetariene sau au înclinații vegetariene. El poate fi greșit văzut ca incompatibil cu alte sfaturi legate de alimentație de a reduce consumul de grăsimi saturate. Fortificarea obligatorie cu fier a alimentelor este puțin probabil să apară într-o perioadă rezonabilă de timp, datorită mai ales depășirii necesarului (de trei ori necesarul de referință) la unii bărbați”* [68]. În ultimii ani au fost desfășurate cercetări în direcția biofortificării, manipularea genetică a speciilor vegetale în scopul creșterii preluării fierului [36], dar OMG-urile sunt cel mai adesea privite cu scepticism de consumatori.

Fierul le este necesar nu numai oamenilor, mamiferelor și altor organisme animale, ci și plantelor (deficiența sa conduce la cloroză și recolte slabe [34]). Deși plantele își iau substanțele minerale din sol, compoziția lor chimică nu este o simplă reflectare a compoziției solului, deoarece nevoile lor fiziologice și biochimice, ca și resursele, sunt diferite, conducând la o absorbție selectivă modulată de numeroși factori [58]. Relația complexă dintre sol, plante, aliment și om a fost explorată într-o bună măsură, dar numai într-un mod fragmentar. Solul este de obicei bogat în fier, dar adesea plantele sunt afectate de deficiențe în acest mineral deoarece sărurile sale, în special în solurile calcaroase, alcaline, au o solubilitate redusă [36, 53]. Deja la mijlocul anilor 1980, V. Romheld și H. Marschner (1986) au identificat 2 strategii de răspuns al plantelor la deficiența de fier: așa-numita strategie I (bazată pe reducerea  $Fe^{3+}$  la  $Fe^{2+}$ , prin eliberarea de protoni și formarea unor celule specializate de transfer în rizodermă) și strategia II (bazată pe chelatarea directă a  $Fe^{3+}$  din sol cu substanțe specifice cu structură iminocarboxilică, cunoscute ca siderofori și dezvoltarea unui sistem de absorbție specific pentru acești chelați). Au fost publicate numeroase studii despre aceste strategii și mecanismele lor moleculare și genetice. Strategia I este larg răspândită la plante, în timp ce strategia II este

întâlnită la graminee [53], Într-un studiu, din 15 specii analizate (arbori, arbuști, plante ierbacee), numai în 6 s-au identificat corelații semnificative statistic între conținutul de fier al solului (sol bogat în cromit) și organele plantei (și numai pentru unele organe – rădăcină, tulpină sau frunză) [56]. Factorii de sol, alții decât conținutul de fier și forma chimică, de exemplu conținutul de bicarbonat și nitrat, pH-ul (peste valoarea 4, solubilitatea fierului scade de o mie de ori pentru fiecare unitate de pH adăugată), Fe extractibil cu DTPA, conductivitatea electrică (CE), sau umiditatea [9, 17, 37, 73] par să afecteze absorbția fierului de către plantă. Creșterea cantităților de crom s-a raportat a reduce absorbția fierului de către plante [49].

Majoritatea suplimentelor alimentare de pe piața din România și de pe piețele internaționale utilizează săruri de fier (de origine chimică) și nu fier „biologic”. Suplimentele alimentare orale pe bază de fier pot cauza (și adesea cauzează) efecte adverse gastro-intestinale neplăcute, în principal constipație sau diaree, pirozis („arsuri la stomac”), greață și crampe abdominale. Ele determină adesea modificări în culoarea scaunului, care pot îngrijora utilizatorii, dar acesta nu este un efect advers propriu-zis [3]. Majoritatea acestor efecte ar putea fi legate de natura fierului utilizat în aceste suplimente – în majoritatea cazurilor săruri de fier anorganice sau organice. Se poate specula că extractele naturale bogate în fier ar putea să nu aibă aceste efecte. Această ipoteză este susținută de faptul că dieta normală, cu un aport adecvat de fier, nu determină asemenea efecte, precum și de constatarea acceptată în prezent ca reală, că atunci când suplimentele de fier sunt luate împreună cu alimentele (și nu pe stomacul gol), probabilitatea apariției lor se reduce considerabil [3].

Există o varietate de brevete care propun soluții de administrare îmbunătățită a fierului la diverse categorii de populație. Majoritatea se bazează pe săruri anorganice sau organice de fier, cărora încearcă să le optimizeze anumite calități, de la palatabilitate (gust) la proprietățile farmacocinetice sau la profilul de siguranță. P. Monsivais (2015) a propus utilizarea unui complex cu polizaharidele și adăugarea unui îndulcitor non-nutritiv de origine vegetală (fruct de *Siraitia grosvenorii*) pentru îmbunătățirea gustului, pentru a permite administrarea la copii cu vârste mici [42]. A. Lacorte și G. Tarantino (2015) au propus utilizarea unei săruri de fier (III) alături de lecitină și anumiți esteri ai zaharozei sau sucresteri, care să îmbunătățească absorbția și tolerabilitatea [35]. H. Hongsheng adaugă lactat feros la un amestec de condimente amestecate cu frunză de *Phyllanthus emblica* L. [26]. L. Xia (2015) utilizează sulfat feros, pe care îl asociază cu chitină, acid acetic, un complex trioxid de sulf-piridină și bicarbonat de sodiu, componentul principal pe lângă fier fiind chitina solubilă extrasă din cochilia unor crustacee, pretinzându-se că utilizarea ei favorizează absorbția în comparație cu produsele convenționale pe bază de sulfat feros și recomandând utilizarea lui la copii [71]. Un alt brevet utilizează chitosan pentru complexarea coordinativă a fierului [30]. I. Ikuko au brevetat o bomboană în formă de bob de cereale, incluzând o sare de fer și acid folic, pe suportul unui fruct deshidratat, acoperită în final cu ciocolată [28]. Un brevet recent (2016) propune asocierea uneia sau mai multor săruri ori a unor complecși ai fierului cu un agent destinat să atenueze efectele gastro-intestinale ale metalului, agent bazat pe un component pe bază de zinc și/sau a unui chelator [10]. O altă invenție utilizează o sare de fer neîncapsulată, împreună cu un transportor care cuprinde un ulei comestibil digestibil, lichid la temperatura de 20°C, pretinzându-se posibilitatea de administrare atât la adulți, cât și la sugari [62].

J.B. Wicking și Y. Bian (2015) adaugă săruri de fer anorganice sau organice în mediul de cultură al unor fungi filamentoși (de preferință *Aspergillus oryzae* sau *Aspergillus niger*) [69]. Unele brevete (din China) au propus obținerea de tăței (*noodles*) cu pulbere de *Dendrobium* [40, 41]. A. Bulbarelo și G. Steiger (2015) reconstituie nucleeele bobului de orez din făina de orez, îmbogățindu-le cu pirofosfat feric și acid citric sau o sare a acestuia [11]. Mai multe brevete au ca obiect o metodă de preparare a unor ouă bogate în fier, având și alte proprietăți nutriționale considerate benefice pentru sănătate (de ex. conținut redus de colesterol) [63-65].

Alte invenții utilizează componente de origine animală care pentru consumatorii vegetarieni sau cu înclinații vegetariene pot fi considerate inacceptabile. Y. Ru et al. (2008) propun un produs pe bază de gelatină din piele de măgar și un amestec de organe subterane din mai multe specii vegetale, supuse decoctiei în apa în care a fost infuzată gelatina [55]. Jing W. et al. (2016) au formulat un comprimat masticabil bazat pe lactoferină bovină și fier din drojdie, pretinzând că prin eliminarea *Helicobacter pylori* asigură o uniformitate a efectului [31]. P. Fengguang et al. (2016) au brevetat un supliment alimentar sub formă de pulbere, bazat pe chelatarea clorurii ferice cu hemoglobină izolată din sânge de porc [22]. L. Ke (2016) utilizează un amestec complex de mai multe specii vegetale, dar și "*cornu cervi degelatinatum*" (corn de cerb, degelatinat), de origine animală [32]. Ronghua Z et al. (2017) utilizează un amestec de proteine vegetale, animale și din gălbenuș de ou, sub formă de pulbere [54].

Mai multe brevete inspirate de medicina chineză tradițională propun amestecuri de mai multe specii vegetale în diferite proporții, extrase cu apă sau etanol la cald [20, 21].

*Tagetes erecta* L., crăițe (fam. Asteraceae), este utilizată în scopuri medicinale în diverse zone ale lumii, de exemplu ca antireumatic, în afecțiuni gastro-intestinale, renale sau hepatice, în febră sau pneumonie [13]. Planta a fost explorată în cercetări farmacologice pentru potențiale utilizări ca analgezic, antidepresiv, anxiolitic și sedativ [47], imunostimulator, antiinflamator, antitumorigen, antiviral [4], antihelmintic [50], insecticid [51], antidiabetic și antihiperlipemic [66] etc. Din punct de vedere chimic, din organele speciei s-au izolat uleiuri volatile, terpeni (beta-sitosterol, lupeol), flavonoide (kaempferol, quercetol, patuletină, quercetagetol, miricetină, luetol), compuși fenolici (acid m-cumaric), alcoolii, carotenoide (peste 70% esteri ai luteinei), polizaharide și chiar alcaloizi [1, 4, 47]. Nu există date în literatura științifică de până în prezent care să afirme un rol al extractelor de *Tagetes erecta* L. (în particular, al frunzelor speciei) ca surse de fier cu utilizare nutrițională.

Prezenta invenție își propune să furnizeze un extract vegetal bogat în fier, obținut din frunzele speciei *Tagetes erecta* L., care să fie utilizat ca supliment alimentar.

### **Expunerea invenției. Rezumat**

Prezenta invenție se referă la un proces de preparare a unui extract vegetal din frunzele speciei *Tagetes erecta* L., bogat în fier, care să poată fi utilizat ca supliment alimentar. Obținerea extractului implică următoarele etape:

- a) Colectarea materialului vegetal la momentul optim;
- b) Uscarea materialului vegetal în condiții controlate de temperatură și umiditate;
- c) Pulverizarea materialului vegetal uscat și sitarea acestuia;
- d) Extracția repetată a materialului pulverizat cu un solvent polar acidulat, de preferință cu acid citric;
- e) Concentrarea soluțiilor extractive obținute la etapa d) la temperaturi mai mici sau egale cu 80 °C prin metode cunoscute;
- f) Liofilizarea soluției concentrate obținute la etapa e) la temperaturi mai mici de -50 °C.

### **Expunerea detaliată a invenției.**

Descrierea detaliată a prezentei invenții și exemplele furnizate aici sunt ilustrative, deoarece variate modificări și ajustări sunt posibile, acestea fiind ușor evidente pentru o persoană de specialitate în domeniu. Modurile de realizare prezentate în continuare sunt ilustrative și nu limitează descrierea invenției așa cum va fi prezentată în continuare. Materialul vegetal poate fi colectat din flora spontană sau poate fi obținut în condiții de cultură, cu respectarea bunelor practici agricole pentru plante medicinale. Extractul conform invenției are un conținut minim de fier de 900 mg/kg, un conținut în polifenoli de maximum 3,5 g echivalenți

acid galic la 100 g extract și un conținut în flavone de maximum 0,5 grame echivalenți quercetol la 100 g extract.

Obținerea extractului conform invenției presupune următoarele etape:

1. Materialul vegetal, reprezentat de frunzele speciei *Tagetes erecta* L., colectat de preferință la stadiul înfloririi, este purificat de corpurile străine de planta producătoare și de impurități.
2. Materialul vegetal se usucă în condiții adecvate de temperatură și umiditate, de preferat la umbră (temperaturi mai mici de 35°, umiditate sub 65%).
3. Frunzele uscate sunt supuse pulverizării prin măcinare și cernute printr-o sită cu dimensiunea ochiurilor de 250 μm.
4. Materialul vegetal se supune extracției de două ori cu un solvent polar acidulat cu un acid organic sau anorganic la o temperatură variind între 40° și 100 °C, de preferință 80 °C, timp de cel puțin 10 minute la fiecare etapă de extracție (de preferință 30 de minute), utilizând un raport între solvent și produsul vegetal variind între 5:1 și 50:1, de preferință 10:1
5. Soluțiile extractive se filtrează, se reunesc și se concentrează prin metode cunoscute la temperaturi mai mici sau egale cu 80 °C, de exemplu cu ajutorul unui evaporator rotativ.
6. Soluția concentrată se supune apoi liofilizării la temperaturi mai mici de (-)50 °C, când se obține un extract cu miros slab caracteristic și gust acru.

Extractul obținut conform invenției are un conținut de fier de cel puțin 900 mg/kg și un conținut redus în polifenoli (mai puțin de 3,5% echivalenți acid galic) și flavone (mai puțin de 0,5% echivalenți quercetol).

Extractul uscat astfel obținut poate fi procesat pentru obținerea de suplimente alimentare, utilizând excipienți adecvați. Exemple de excipienți adecvați sunt: lactoza, celuloza microcristalină și derivații de celuloză, maltodextrinele, talcul, siliciul coloidal, polietilen-glicolul și derivații acestuia. Antioxidanți (de preferință acid ascorbic) sau aminoacizi cu caracter bazic (arginină, lizină), pot fi de asemenea utilizați.

Într-un alt mod de realizare a invenției, extractul poate fi administrat sub formă de comprimate (simple sau filmate) sau capsule operculate, prin asociere cu excipienți adecvați, pentru suplimentarea fierului în alimentație.

Într-un alt mod de realizare a invenției, extractul obținut este asociat cu un extract obținut din fructe de *Pimpinella anisum* L. și apă (de preferință 2,5 grame fructe la 100 ml apă) prin fierbere timp de 5 minute, urmată de concentrare și liofilizare.

### **Avantaje.**

Invenția oferă o soluție pentru obținerea unui extract de origine vegetală, fiind bazată pe investigația sistematică a variației conținutului de fier, polifenoli și flavone în organele mai multor specii vegetale, cultivate pe soluri diferite, la diferitele stadii de dezvoltare ale plantelor, precum și pe investigația sistematică a principalilor parametri care definesc procesul de extracție. Procesul de obținere a extractului este simplu și eficient din punct de vedere al costurilor. Materia primă vegetală poate fi obținută la costuri rezonabile, frunzele fiind un organ vegetal regenerabil și reprezintă un produs secundar al speciei, care în scopuri medicinale este utilizată în principal pentru flori. Solventul utilizat în modalitatea preferată de realizare a invenției (apă și etanol), este ieftin și sigur. Extractul obținut conform invenției are un conținut redus în polifenoli (mai puțin de 3,5% echivalenți acid galic) și flavone (mai puțin de 0,5% echivalenți quercetol), despre care se știe că influențează negativ absorbția fierului [2, 14, 27, 38, 61]. Deoarece solventul de extracție este apa acidulată cu acid citric 3%, extractul conține cantități importante de acid citric, despre care se știe că influențează favorabil absorbția fierului la administrare orală [44, 60]. În literatură s-a argumentat că este necesară prezența/adăugarea

a 1 g de acid citric la o masă alimentară conținând 3 mg de fier. Prin conținutul ridicat de acid citric, invenția propusă satisface această cerință. În plus, acidul citric poate inhiba dezvoltarea *Helicobacter pilory* [72], care este un important factor contributiv la anemia feriprivă [12, 43]. Asocierea cu un extract apos obținut prin fierberea semințelor de *Pimpinella anisum* L. și apă, permite îmbunătățirea suplimentară a absorbției [19].

În continuare se prezintă două exemple de realizare și utilizare a invenției.

**Exemplu 1.** Frunzele de *Tagetes erecta* L., recoltate în perioada înflorii, se usucă și se supun măcinării. Din pulberea obținută prin sitarea cu o sită cu dimensiunea ochiurilor de 250 μm se cântăresc 100 g. Această cantitate se supune extracției repetate (două extracții), la 80 °C, timp de 30 de minute pentru fiecare extracție, utilizând ca solent apă acidulată cu acid citric 3%, după o umectare prealabilă de 5 minute și un raport produs vegetal: solvent de 1:10 (sunt necesari cca. 2,5 litri solvent). Soluțiile obținute se reunesc și se concentrează cu ajutorul unui evaporator rotativ la 80 °C, iar soluția apoasă concentrată rezultată se supune liofilizării la -53 °C. Se obțin 99,56 g de extract cu miros slab caracteristic și gust acru. Randamentul de extracție aparent foarte ridicat (100%) este datorat prezenței acidului citric în produsul final de extracție. Extractul obținut conține 2,97% (d.s. 0.03%) polifenoli (echivalenți acid galic) și 0,37% (d.s. 0,02) flavone (echivalenți quercetol). Spectrul IR al extractului (Fig. 1) permite evaluarea reproductibilității metodei de obtinere, prin utilizarea coeficientului de corelație Pearson pentru seriile ulterioare.

**Exemplu 2.** 5,8 kg de extract obținut conform exemplului 1 se introduc într-un granulator împreună amidon de porumb (20 g), unde se omogenizează prin amestecare timp de 60 de minute și se usucă timp de alte 15 minute. Se introduc în granulator câte 20 g de talck și stearat de magneziu, se omogenizează 15 minute, iar granulele obținute se sitează (1,035 mm) timp de 30 de minute. Pulberea sitată se utilizează la umplerea de capsule (520 mg), cu un conținut de cca. 0.49 mg fier per capsulă.

## Referințe Bibliografice

1. Abdala AF, Gallardo AP, Olvera LG, Silva EM. Hydrolysis of carotenoid esters from *Tagetes erecta* by the action of lipases from *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour Bioprocess*. 2017;4(1):5. doi: 10.1186/s40643-016-0131-7
2. Abizari AR, Moretti D, Schuth S et al. Phytic acid-to-iron molar ratio rather than polyphenol concentration determines iron bioavailability in whole-cowpea meal among young women. *J Nutr*. 2012; 142(11):1950-5
3. Alpers DH, Stenson WF, Taylor BE, Bier DM. *Manual of nutritional therapeutics*. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia (PA), 2008, p. 63
4. Ayub MA, Hussain AI, Hanif MA, Chatha SAS, Kamal GM, Shahid M, Janneh O. Variation in Phenolic Profile, β-Carotene and Flavonoid Contents, Biological Activities of Two *Tagetes* Species from Pakistani Flora. *Chem Biodivers*. 2017; 14(6). doi: 10.1002/cbdv.201600463
5. Bailey RA, Reardon G, Wasserman MR et al. Association of anemia with worsened activities of daily living and health-related quality of life scores derived from the Minimum Data Set in long-term care residents. *Health Qual Life Outcomes*. 2012; 10:129
6. Balducci L, Ershler WB, Krantz S. Anemia in the elderly - Clinical findings and impact on health. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*; 2006; 58:156-165
7. Barish CF, Koch T, Butcher A et al. Safety and Efficacy of Intravenous Ferric Carboxymaltose (750 mg) in the Treatment of Iron Deficiency Anemia: Two Randomized, Controlled Trials. *Anemia*. 2012;2012:172104
8. Barroso F, Allard S, Kahan BC et al. Prevalence of maternal anaemia and its predictors: a multi-centre study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011; 159(1):99-105

9. Bloom PR, Rehm GW, Lamb JA, Scobbie AJ. Soil Nitrate is a Causative Factor in Iron Deficiency Chlorosis in Soybeans. *Soil Science Society of America*. 2010; 75(6): 2233-2241
10. Bortz JD. Iron supplement. Brevet, MX2015016660 (A) — 2016-07-26.
11. Bulbarello A, Steiger G. Iron supplementation of rice kernels. Brevet, IN8761DEN2014 (A) — 2015-05-22
12. Burns M, Amaya A, Bodi C, Ge Z, Bakthavatchalu V, Ennis K, Wang TC, Georgieff M, Fox JG. *Helicobacter pylori* infection and low dietary iron alter behavior, induce iron deficiency anemia, and modulate hippocampal gene expression in female C57BL/6 mice. *PLoS One*. 2017 Mar 29;12(3):e0173108. doi: 10.1371/journal.pone.0173108
13. Chkhikvishvili I, Sanikidze T, Gogia N, Enukidze M, Machavariani M, Kipiani N, Vinokur Y, Rodov V. Constituents of French Marigold (*Tagetes patula* L.) Flowers Protect Jurkat T-Cells against Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:4216285. doi: 10.1155/2016/4216285
14. Cook JD, Reddy MB, Hurrell RF. The effect of red and white wines on nonheme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr*. 1995; 61(4):800-4
15. Cooper M, Greene-Finestone L, Lowell H et al. Iron sufficiency of Canadians. *Health Rep*. 2012; 23(4):41-8
16. Doyle MK, Rahman MU, Han C et al. Treatment with infliximab plus methotrexate improves anemia in patients with rheumatoid arthritis independent of improvement in other clinical outcome measures—a pooled analysis from three large, multicenter, double-blind, randomized clinical trials. *Semin Arthritis Rheum*. 2009; 39(2):123-31
17. Dzida K. Nutrients Contents in Sweet Basil (*Ocimum Basilicum* L.) Herb Depending on Calcium Carbonate Dose and Cultivar. *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus*. 2010; 9:143-151
18. Eisenstaedt R, Penninx BW, Woodman RC. Anemia in the elderly: current understanding and emerging concepts. *Blood Rev*. 2006 Jul;20(4):213-26
19. el-Shobaki FA, Saleh ZA, Saleh N. The effect of some beverage extracts on intestinal iron absorption. *Z Ernährungswiss*. 1990; 29(4):264-9
20. Fei Y. Iron-supplementing blood-tonifying healthcare product. Brevet, CN105394463 (A) — 2016-03-16
21. Feng Q. Iron-deficiency anemia disease curing Chinese herbal medicine added black tea . Brevet, CN105053302 (A) — 2015-11-18
22. Fengguang P, Jing Z, Xuqing Z. Phytochelatin iron supplementation powder containing iron and preparation method of phytochelatin iron supplementation powder. Brevet, CN105420323 (A) — 2016-03-23.
23. Groenveld HF, Januzzi JL, Damman K et al. Anemia and mortality in heart failure patients a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 52(10):818-27
24. Haas JD, Brownlie T 4th. Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship. *J Nutr*. 2001;131(2S-2):676S-688S
25. Ho CH, Yu YB, Wu PH. The prevalence of iron deficiency anemia and its clinical implications in patients with colorectal carcinoma. *J Chin Med Assoc*. 2008;71(3):119-22
26. Hongsheng H. *Phyllanthus emblica* leaf mixed food spice rich in calcium and iron ions, and preparation method thereof. Brevet, CN104187525 (A) — 2014-12-10
27. Hurrell RF, Reddy M, Cook JD. Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *Br J Nutr*. 1999; 81(4):289-95
28. Ikuko I. Grain-shaped confectionery as iron supplement, and manufacturing method thereof. Brevet, JP2015104368 (A) — 2015-06-08
29. Jankowska EA, Rozentryt P, Witkowska A et al. Iron deficiency: an ominous sign in patients with systolic chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2010;31(15):1872-80
30. Jianming P, Runrun W, Hengjia Z, Wei H et al. Preparation method of iron-chitosan metal supermolecular gel. Brevet, CN105646902 (A) — 2016-06-08.
31. Jing W, ShengZhou W, Yuan Q. Chewable tablet for treating iron-deficiency anemia and preparation method thereof. Brevet, CN105688196 (A) — 2016-06-22
32. Ke L. Chinese herbal preparation for treating iron-deficiency anemia and preparation method and application thereof. Brevet, CN105456474 (A) — 2016-04-06
33. Khambalia AZ, Zlotkin SH. Iron. In: *Nutrition in Pediatrics. Basic Science. Clinical Applications*. Duggan C, Watkins JB, Walker WA (Ed.). BC Dekker, Hamilton (Ontario), 2008, pp. 86-87



34. Kim SA, Guerinot ML. Mining iron: iron uptake and transport in plants. *FEBS Lett.* 2007; 581(12):2273-80
35. Lacorte A, Tarantino G. Solid composition comprising iron for use in iron deficient conditions. Brevet, US 2015/0250885 A1.
36. Ma JF, Ling HQ. Iron for plants and humans. *Plant Soil.* 2009; 325 (1):1 – 3
37. Ma JF. Plant Root Responses to Three Abundant Soil Minerals: Silicon, Aluminum and Iron, *Critical Reviews in Plant Sciences.* 2005 ; 24 (4):267-281
38. Ma Q, Kim EY, Lindsay EA, Han O. Bioactive dietary polyphenols inhibit heme iron absorption in a dose-dependent manner in human intestinal Caco-2 cells. *J Food Sci.* 2011; 76(5):H143-50
39. Macciò A, Madeddu C. Management of anemia of inflammation in the elderly. *Anemia.* 2012;2012:563251
40. Mingzhu JB. Iron-enriched dendrobium dried noodles and making method thereof. Brevet, CN105029208 (A) — 2015-11-11
41. Mingzhu Z. Dendrobium instant noodles rich in iron trace element, and preparation method thereof. Brevet, CN105105013 (A) — 2015-12-02
42. Monsivais P. Formulation for iron supplements. Brevet, US 2015/0079268 A1.
43. Muhammad JS, Zaidi SF, Saeed SA, Ishaq M. Current status of *Helicobacter pylori* association with haematological and cardiovascular diseases: A mini review. *J Pak Med Assoc.* 2017; 67(6):907-911
44. Palika R, Mashurabad PC, Kilari S, Kasula S, Nair KM, Raghu P. Citric acid mediates the iron absorption from low molecular weight human milk fractions. *J Agric Food Chem.* 2013; 61(46):11151-7. doi: 10.1021/jf403973j
45. Parker-Williams EJ. Investigation and management of anaemia. *Medicine.* 2009; 37 (3):137-142
46. Pascual-Figal DA, Bonaque JC, Manzano-Fernández S, Fernández A, Garrido IP, Pastor-Perez F, Lax A, Valdes M, Januzzi JL. Red blood cell distribution width predicts new-onset anemia in heart failure patients. *Int J Cardiol.* 2012; 160(3):196-200
47. Pérez-Ortega G, Angeles-López GE, Argueta-Villamar A, González-Trujano ME. Preclinical evidence of the anxiolytic and sedative-like activities of *Tagetes erecta* L. reinforces its ethnobotanical approach. *Biomed Pharmacother.* 2017; 93:383-390. doi: 10.1016/j.biopha.2017.06.064
48. Peters R, Burch L, Warner J et al. Haemoglobin, anaemia, dementia and cognitive decline in the elderly, a systematic review. *BMC Geriatr.* 2008; 8:18
49. Pillay V, Jonnalagadda SB. Elemental uptake by edible herbs and lettuce (*Lactuca sativa*). *Journal of Environmental Science and Health Part B.* 2007; 42:423-428
50. Piña-Vázquez DM, Mayoral-Peña Z, Gómez-Sánchez M, Salazar-Olivo LA, Arellano-Carbajal F. Anthelmintic effect of *Psidium guajava* and *Tagetes erecta* on wild-type and Levamisole-resistant *Caenorhabditis elegans* strains. *J Ethnopharmacol.* 2017; 202:92-96. doi: 10.1016/j.jep.2017.03.004
51. Politi FA, Nascimento JD, da Silva AA, Moro IJ, Garcia ML, Guido RV, Pietro RC, Godinho AF, Furlan M. Insecticidal activity of an essential oil of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) on common bed bug *Cimex lectularius* L. and molecular docking of major compounds at the catalytic site of ClAChE1. *Parasitol Res.* 2017; 116(1):415-424
52. Rolfes SR, Kathryn P, Whitney E. *Understanding normal and clinical nutrition*, 8th edition. Wordsworth, Belmont (CA), 2009, p. 442
53. Romheld V. Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Physiol. Plantarum.* 1987; 70 (2): 231-234
54. Ronghua Z, Mingli L, Cheng Y, Jinhua L et al. High-nutrition protein powder rich in natural calcium, iron and zinc. Brevet, CN106578331 (A) — 2017-04-26
55. Ru Y, Mou H, Zhou F, Du S, Liang M. Preparation of Chinese medicine for treating iron deficiency anemia. Brevet, CN101264238 (A) — 2008-09-17.
56. Samantaray S, Rout GR, Das P. Heavy Metal and Nutrient Concentration in Soil and Plants Growing on a Metalliferous Chromite Minespoil, *Environmental Technology*, 2001 ; 22 (10): 1147-1154
57. Shanthi B, Revathy C, Manjula Devi AJ, Subhashree. Effect of iron deficiency on glycation of haemoglobin in nondiabetics. *J Clin Diagn Res.* 2013 Jan;7(1):15-7. Epub 2012 Sep 18.
58. Sosorova SB, Gyninova AB, Merkusheva MG et al. The content of microelements and iron in soils and plants in the basin of lake Kotokel' in Western Transbaikalia. *Eurasian Soil Science.* 2012 ; 45 (4): 376-385
59. Stoltzfus RJ, Dreyfuss ML. *Guidelines for the Use of Iron Supplements to Prevent and Treat Iron Deficiency Anemia.* Ilsi Press. Washington, DC, 1998. Available at:

- [http://www.who.int/entity/nutrition/publications/micronutrients/guidelines\\_for\\_Iron\\_supplementation.pdf](http://www.who.int/entity/nutrition/publications/micronutrients/guidelines_for_Iron_supplementation.pdf) [04.03.2013]
60. Teucher B, Olivares M, Cori H. Enhancers of iron absorption: ascorbic acid and other organic acids. *Int J Vitam Nutr Res.* 2004; 74(6):403-19
  61. Tuntawiroon M, Sritongkul N, Brune M et al. Dose-dependent inhibitory effect of phenolic compounds in foods on nonheme-iron absorption in men. *Am J Clin Nutr.* 1991 Feb;53(2):554-7
  62. Vieth R. Iron supplement composition. Brevet, SG10201605497X (A) — 2016-09-29.
  63. Wang J, Tian D, Zhao X. Preparation method of eggs low in cholesterol content and high in iron content and potassium content. Brevet, CN103829045 (A) — 2014-06-04
  64. Wang J, Tian D, Zhao X. Preparation method of eggs low in cholesterol content and high in iron content and zinc content. Brevet, CN103829044 (A) — 2014-06-04
  65. Wang J, Tian D, Zhao X. Production method of low cholesterol, iron-rich and magnesium-rich egg. Brevet, CN103829050 (A) — 2014-06-04.
  66. Wang W, Xu H, Chen H, Tai K, Liu F, Gao Y. In vitro antioxidant, anti-diabetic and antilipemic potentials of quercetagenin extracted from marigold (*Tagetes erecta* L.) inflorescence residues. *J Food Sci Technol.* 2016; 53(6):2614-24. doi: 10.1007/s13197-016-2228-6
  67. Webb FS, Whitney E. *Nutrition: concepts and controversies*, 11th edition. Thomson Higher Education, Belmont (CA), 2008, p. 297
  68. Webb GP. *Dietary Supplements and Functional Foods*. Blackwell Publishing, Chichester (UK), 2nd edition, 2011 (Kindle edition) (Chapter 4, Iron).
  69. Wicking JB, Bian Y. Nutritional supplement containing iron. Brevet, US 2015/0250839 A1.
  70. World Health Organisation, UNICEF. Focusing on anaemia. Towards an integrated approach for effective anaemia control. (Joint statement by the World Health Organization and the United Nations Children's Fund). Available at: [http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/WHOandUNICEF\\_statement\\_anaemia/en/index.html](http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/WHOandUNICEF_statement_anaemia/en/index.html) [06.03.2013]
  71. Xia L. Iron-supplement agent for children. Bibliographic data: CN104413411 (A) — 2015-03-18
  72. Zazgornik J, Mittermayer H. Citric acid inhibits growth of *Helicobacter pylori* in vitro: a new strategy for eradication. *Wien Klin Wochenschr.* 2011; 123(1-2):38-40. doi: 10.1007/s00508-010-1524-9
  73. Zuo Y, Ren L, Zhang F, Jiang RF. Bicarbonate concentration as affected by soil water content controls iron nutrition of peanut plants in a calcareous soil. *Plant Physiol Biochem.* 2007; 45(5):357-64

## Revendicări

1. Extract pentru suplimentarea fierului din alimentație, caracterizat prin aceea că se obține din frunzele speciei *Tagetes erecta* prin extracție repetată cu solvenți adecvați, de preferință apă acidulată cu acid citric 3%.
2. Extract conform revendicării 1, la care solvenții utilizați pentru extracție sunt polari, de preferință apă acidulată cu acid citric 3%.
3. Extract conform revendicării 1, la care temperatura de extracție variază între 40 și 100° C (de preferință 80 °C), iar durata de extracție între 10 și 60 de minute (de preferință 30 de minute).
4. Extract conform revendicării 1, obținut prin concentrare la temperaturi mai mici de 80 °C și uscare prin liofilizare.
5. Extract conform revendicării 1, utilizat sub formă de comprimate, capsule, granule, pelete sau într-o formă farmaceutică lichidă.
6. Extract conform revendicărilor 1-5, așa cum a fost descris anterior cu referire la exemplele de realizare, conținând cel puțin 900 mg/kg fier, cel mult 3,5% polifenoli (echivalenți acid galic) și cel mult 0,5% flavone (echivalenți quercetol).

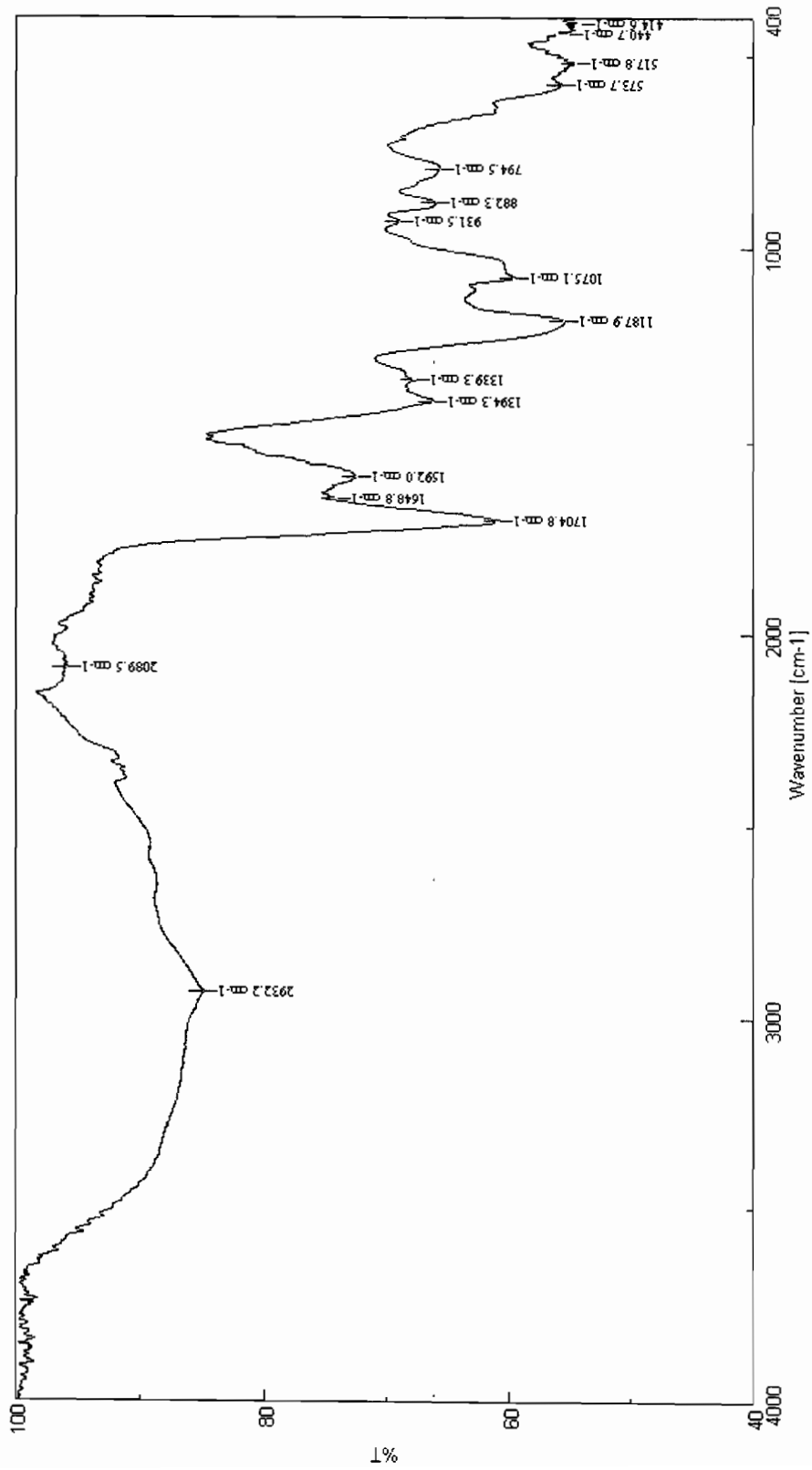


Figura 1. Spectrul IR al extractului obținut conform invenției