



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00270

(22) Data de depozit: 08/05/2017

(41) Data publicării cererii:
29/11/2018 BOPI nr. 11/2018

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN
CLUJ-NAPOCA, STR. VICTOR BABEȘ
NR. 8, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• OBASI TITUS, STR. BUȘTENI, NR. 7,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• OPREAN RADU, STR. FÂNTÂNELE,
NR. 57, AP. 88, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) METODĂ NOUĂ DE PURIFICARE A SAPONINELOR PRIN
PRECIPITARE ÎN EMULSIE DEMULGATĂ

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de purificare a saponinilor din surse naturale, utilizate ca emulgatori, agenți de spumare și stabilizatori. Procedeu conform invenției constă în etapele de capturare a moleculelor de saponine din extracte de plante de tip *Securidaca longipedunculata*, în emulsie prin auto-asamblare supramoleculară, emulsionarea/ adsorbția instantanee

a uleiului în prezență de eter etilic/apă, separarea fazică, separarea agregatelor și sedimentare și precipitare auto-indusă, rezultând fracțiuni de saponină derivată natural, cu o puritate de aproximativ 90%.

Revendicări: 11

Figuri: 8



OFICIUL DE STAT PENTRU BREVETE ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <i>a 2017 00270</i>
Data de depunere <i>08.05.2017</i>

Titlul invenției

Metodă nouă de purificare a saponinelor prin precipitare în emulsie demulată

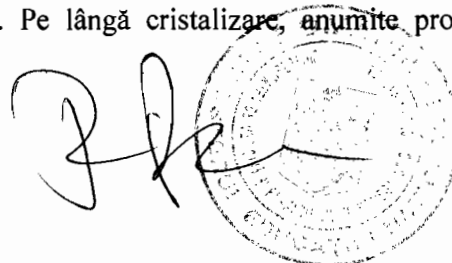
b. Domeniul de aplicare a invenției

1. Bio-procesarea, bio-separarea și purificarea saponinelor și a produșilor naturali .
2. Producerea de saponine și de nano-particule de saponine din extracte din plante.

c. Stadiul tehnicii în domeniul obiectului invenției, cu menționarea dezavantajelor soluțiilor tehnice cunoscute

Saponinele fac parte din clasa glicozidelor naturale, puternic răspândite în întregul regn vegetal ca metaboliți secundari. Acestea au vaste aplicații în produse alimentare și băuturi ca emulgatori, agenți de spumare și stabilizatori, și sunt adesea utilizate în produsele de igienă personală, precum și alte articole de toaletă pentru curățenie casnică, instituțională și industrială. Având perspective importante în producția de medicamente și de vaccinuri, există din ce în ce mai multe dovezi ce sprijină imensul lor potențial terapeutic anti-cancer, antibacterian, antiinflamator și anti-colesterol¹. De mai bine de un secol, saponinele naturale au fost exploatate din surse vegetale notabile, cum ar fi *Quillaja saponera*, *Saponera officinalis* și *Chlorogalum pomeridianum*. Saponinele au un segment imens de piață, având potențial economic puternic, în special în proiecția recentă a pieței globale a emulgatorilor alimentari, ce a fost estimată la 933.4 KT până în 2018 la o valoare de 2.858.6 milioane de USD².

Metodele tradiționale cum ar fi Soxhlet, refluxul termic și extracțiile cu ultrasunete au fost unele dintre cele mai populare metode utilizate pentru recuperarea saponinelor din surse naturale. Metode ce fac economie de timp și consumă mai puțin solvenți, cum ar fi extracția asistată de microunde³, extracția de lichide contracurent presurizat în etape multiple (PLE) și CO₂ supercritic au fost utilizate ca alternative viabile⁴. Cu toate acestea, aceste strategii sunt doar o etapă preliminară, deoarece sunt extrem de non-selective pentru saponinelor și necesită procese ulterioare de purificare pentru a atinge calitatea dorită. Anumite glicozide ale substanțelor înrudite și coexistente cu ar fi izoflavone, polifenoli, taninuri, etc., pot fi încorporate cu saponinele ca impurități în timpul procesării, constituind astfel mari dezavantaje. De cele mai multe ori, este necesară o schemă de purificare mai strictă pentru a îndeplini specificațiile corecte, în conformitate cu cererea industrială și a clienților. Procesul de purificare pentru saponinele brute este în general foarte complex, complicat și necesită abordări secvențiale. Anumite strategii, cum ar fi partiția solvenților și precipitarea sării si a solvenților⁵, au fost utilizate pentru obținerea de saponine cu puritate moderată, în timp ce adsorbția de extracție în fază solidă și ultrafiltrare, precum și cromatografia⁶ asigură o puritate mai ridicată. O altă practică foarte comună este precipitarea saponinelor din amestecuri alcanolice, unde sunt utilizate mari volume de anti-solvenți⁷, cum ar fi acetona și eterul. În 2002, Dobbins a exploatat comportamentele de temperatură și solubilitate ale saponinelor pentru a crea un proces ce utilizează apă-acetonă (4:1)⁸. Acesta a permis precipitarea concentratului de saponină la o puritate de aproximativ 70% din soia, iar cu cristalizarea ulterioară, puritatea a fost îmbunătățită la 90%. Pe lângă cristalizare, anumite proceduri



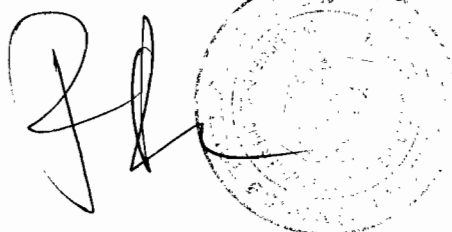
cromatografice sunt utilizate în mare măsură la scară analitică pentru purificarea saponinelor. Acestea includ cromatografia pe coloană deschisă, cromatografia în strat subțire, cromatografia flash, cromatografia lichidă (la presiune scăzută, medie sau ridicată), și cromatografia în contracurent⁷. Chiar dacă selectivitatea este adesea o problemă majoră, cromatografia de afinitate este cunoscută pentru performanțe sale excelente, dar tot are limitări puternice datorită "lipsei de sală economică" care rezultă din întreruperi frecvente și operații discontinue⁹. La scară analitică mulți cercetători preferă cromatografia în fază inversă pentru separarea unei game largi de saponine din extract apos, de exemplu scoarța de *Quillaja saponaria* a fost separată prin cromatografie în 2 de fracții diferite (QA1-22) cu diferite activități biologice și adjuvante, precum și toxicitate^{6,10}.

d. Problema tehnică pe care o rezolvă invenția

Lipsa procesului de purificare eficient pentru saponine derivate natural are un impact negativ asupra zonelor vitale ale produselor farmaceutice și produselor medicale sensibile precum saponină adjuvant pentru vaccines¹¹ uman și alte utilizări. Prin urmare, am dezvoltat o nouă strategie pentru producerea și purificarea saponinelor dintr-un extract de plante cu mai multe componente, cu un rezultat de puritate de aproximativ 90%, și recuperarea de 94% a randamentului cumulat. Nivelul ridicat de puritate a fost realizată fără a fi nevoie de cristalizare, din cauza robusteții și a altor atribute ale sistemului.

e. Prezentarea soluției tehnice a invenției, cu evidențierea elementelor de creație științifică sau tehnică originale care rezolvă problema tehnică menționată

Barierile de protecție ale emulsiilor și sisteme coloidale sunt formate prin auto-asamblarea molecule de surfactant în jurul picăturilor dispersate în scop de stabilitate¹²⁻¹⁷. Pe baza acestei idei, am dezvoltat o nouă strategie pentru producerea și purificarea saponinelor bioactive dintr-un materiale vegetale multicomponente, prin înglobarea sistematic moleculele lor în emulsie și în final recuperarea lor în formă pură și originală prin procesul de dezemulsionare. Pe baza acestei idei, am dezvoltat o nouă strategie pentru producerea și purificarea saponinelor bioactive din materiale vegetale multicomponente, prin înglobarea sistematică a moleculelor în emulsie și în final recuperarea lor în formă pură și originală prin procesul de dezemulsionare. Un extract degresat de rădăcină de *Securidaca longipedunculata* a fost folosit ca emulgator, pentru a permite recuperarea selectivă și purificarea saponinelor sale constitutive implicate activ în emulsionare. Emulgatorii sunt o subclasă de surfactanți care au funcția de a stabiliza dispersiile în emulsii și de a forma micle în soluții prin auto-asamblare¹⁸⁻²². Saponinele sunt surfactanți neionici, caracterizate prin activitatea pe care acestea o au la suprafața lor și capacitatea de a spuma în apă, de asemenea, prin acțiunea lor hemolitică pe celule umane eritrocite^{23, 24} precum și tendința de a emulsiona lipidele pentru a forma emulsii de uleiuri-în-apă. Ele sunt amfipatice în natură, având o grupă polară hidrofilă, cuprinzând în principal lanțuri monozaharide și aglicon hidrofobe C27 sau C30, cunoscute sub numele de saponin¹. Saponinele naturale au structuri diferite, care prezintă diferite comportamente și afinități față de suprafețe și formarea de miceliu. Astfel de comportamente



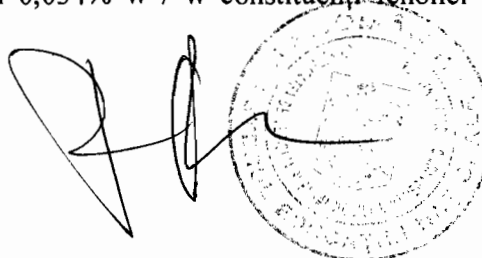
sunt în general controlate prin orientarea structurală a moleculelor și indicii fizico-chimice relevante, cum ar fi echilibrul lipophile hidrofilă²⁵. Un studiu anterior²⁶ a arătat că 4 tipuri noi de saponine au fost izolate din *Securidaca longipedunculata* care includ unele bidesmosides triterpenici, acilate cu grupul cinnamonyl legat de zahăr fucoză, împreună cu unele câteva lanțuri de monozaharide. Din fiecare indicații, aceste saponine pot forma micelile de diferite forme, dimensiuni și structuri în dispersii lichide, în conformitate cu publicațiile științifice notabile^{27,28}.

Unele publicații științifice au stabilit că substanțele emulgatoare ar putea fi recuperate din emulsie în diversele forme originale ale acestora, fără a rupe nici legătură sau fără a adăuga nimica nou, chiar fără a pune în pericol proprietățile biologice inerente²⁹⁻³². Cu toate acestea, aceste proceduri au fost descrise pe larg în multe publicații care se ocupă cu separarea emulsiilor³³⁻³⁵. Totuși, noua noastră abordare combină mai multe strategii pentru a realiza un proces fiabil de purificare, prin încorporarea unei substanțe dorite prin proces bazat pe afinitate (emulsificare), pentru a permite recuperarea acestuia în formă pură, prin procesul de dezemulsioneare [Fig.1]. Mecanismul propus este specificat mai jos, în următoarea ordine a evenimentului: i). *Prinderea de molecule în emulsie prin auto-asamblare*: Extractele naturale din plante sunt un amestec de compuși apropiați și non-înrușiți cu diferite comportamente în termeni de solubilitate și afinitate față de auto-asamblare. ii). *emulsificare / adsorbție instantanee a uleiului*: În general, surfactanți neionici naturali au mai mult tendința spre sistemul de ulei în apă, prin care uleiurile, solvenți organici și substanțe insolubile sunt adsorbiți în miezul interior a micelilor, pentru a forma micelile umflate³⁶⁻³⁸; iii). *Separarea fazică*: Dacă raportul uleiului este crescut sau dublat, inversia ar avea loc probabil, ceea ce duce la un fel de echilibru-etapizat Winsor II 39, în care emulgatorii sunt limitați la faza de ulei. În unele cazuri, capul polar al agentului tensioactiv poate contribui la formarea sistemului dublu-continuu (echilibru-etapa mijlocie Winsor III). Cu toate acestea, procesul general este foarte important pentru izolarea impurităților solubile în apă, care sunt forțate să fie extrase în faza apoasă; iv). *Separarea în calup a agregatelor prin creaming și sedimentare*: Creaming favorizează migrația ascendentă a particulelor pe baza densității și a forțelor arhimedice, în timp ce efectele favorizează separarea și descompunerea emulsiei prin coalescență și ruperea de vezicule, etc. De asemenea, adăugăm că creaming și sedimentarea particulelor²⁰ furnizează o a doua măsură pentru a asigura separarea în vrac a agregatelor, la fel ca cernerea moleculară. Prin aceste mijloace, moleculele emulgatorului sunt separate în mod sistematic de faza continuă, inundată cu impurități solubile în apă; v). *Precipitare auto-indusa*: Ca urmare a expunerii excesului de emulgator (saponine și micelile bazate pe saponină) la faze organice insolubile, pot să apară probabil precipitații. Particulele rezultate sunt supuse sedimentării treptate sub influența gravitației; acestea se separă și se stabilesc la interfața de mijloc pentru a forma o masă solidă bogată în substanțe emulgatoare⁴⁰⁻⁴⁵ [Fig. 2].

f. prezentarea unui exemplu concret de realizare a invenției

EXEMPLUL 1

100.050g de rădăcină praf de *Securidaca longipedunculata* măcinată se degresează bine cu 500 ml de diclorometan (DCM), folosind un aparat Soxhlet pentru îndepărtarea lipidelor nedorite. Solventul rezidual din borhot a fost îndepărtat în totalitate prin uscare cu aer în camere de fum înainte de re-extracție cu metanol pur ce a durat 48hr. 12.612g de reziduu a fost recuperat la 70 de grade Celsius într-un evaporator rotativ, având compoziție procentuală de 0,025% w / w flavonoidice / izoflavone și 0,034% w / w conținut fenolici totali.



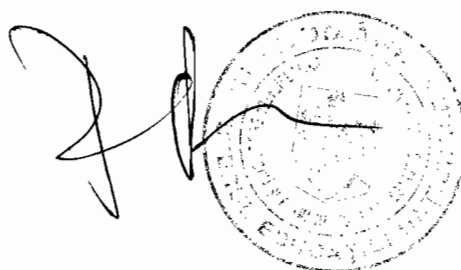
Aproximativ 5.045g a fost îndepărtat și dizolvat complet în 200 ml de apă distilată, cu agitare în baie cu ultrasunete timp de 30 minute. Soluția apoasă rezultată a fost amestecată împreună cu 400ml de etil-eter, cu agitare viguroasă pentru a forma o emulsie ulei-apă. Conținutul a fost transferat într-o pâlnie de separare și a fost lăsat să stea la temperatura camerei. Faza de separare a avut loc în 3-6 ore, având faza apoasă în exces în partea inferioară. Faza superioară organică a fost vaporizată cu particule, care au început să se sedimenteze din partea de sus până când o masă solidă groasă a fost complet depozitată la interfața de mijloc între 12-18 ore [Fig. 2]. În partea de jos s-au observat de asemenea unele depuneri solide. Aceste depozite au fost colectate cu atenție prin îndepărtarea supernatanților prin centrifugare la viteză mică de 14,5 rpm. S-a obținut un total de 0,7g de substanță solidă care a fost purificată mai departe în 3 cicluri, prin repetarea aceeași proceduri de mai sus, pentru a produce produsul final denumit 4A. Testul de confirmare pentru saponina a fost efectuat (testele Lieberman și spuma) înainte de aplicarea microscopiei electronice de înaltă rezoluție (TEM și SEM) pentru a evalua morfologia și caracterile microscopice ale 4A. Rezultatele au fost reprezentate în [Fig. 5 și 6]. Nivelul de impurități din 4A a fost de asemenea cuantificat inclusiv în cazul produselor intermediare, folosind Spectrofotometrul cu dublu fascicul UV-Vis (Specord 250 Plus, Germania). Toate probele au fost dizolvate în solvent (MeOH), în timp ce calibrarea a fost făcută din extract de rădăcină MeOH brut la diluții seriale variind de la 0,25mg / ml până la 0.0078mg / ml. Frațiile semi-purificate TLC [4A (1-4), reunite și fracțiunea 7] au fost folosite ca martori. Înainte de efectuarea măsurătorilor, un standard de referință a fost inițial rulat numai cu solvent (MeOH). Toate măsurătorile de absorbție au fost efectuate în triplicat ($n = 3$). Rezultatele reprezentate în [Fig. 8].

EXEMPLUL 2

Două fracțiuni de saponină purificate etichetate (4A2 și 4A4) obținute prin TLC preparativ de 4A, din extractul de rădăcină metanolică de longipedunculata S. au fost reunite și utilizate ca emulgator pentru emulsie etil, eter în apă. Frațiile au fost caracterizate anterior și confirmate ca saponine triterpenoide [Fig. 7]. Procedurile pentru obținerea emulsiei au fost respectate cu strictețe ca în exemplul 1, folosind 50mg din fracțiile comasate (4A2 și 4A4). Ulterior finalizarea fazei de separare și descompunerea emulsiei în 24 de ore, straturile bogate în saponină au fost colectate și cântărite în mod corespunzător. Soluțiile apoase rezultate au fost emulsionate în mod succesiv, până la ciclu 5 pentru a recupera toate rămășițele saponinelor în soluție. Experimentul a fost replicat în triplicat ($n = 3$) și greutatea medii ale probelor recuperate înregistrate. Rezultatele au fost reprezentate în [Fig. 3 și 4]. Un proces similar a fost efectuat folosind un surfactant anionic, laurii sulfat de sodiu (SLS), provenind de la Merck, Germania. 50mg de SLS a fost folosit ca emulsificator, aplicând aceleași condiții ca în exemplul 1.

g. avantajele rezultate din aplicarea invenției

Costul ridicat al purificării este întotdeauna o chestiune familiară, în general, alături de bioprocésarea și dezvoltarea de noi materiale din surse regenerabile. Așa cum am demonstrat în mod clar mai sus, noi strategii ar putea aduce la capăt această provocare, mai ales pentru saponine naturale pentru care procedurile de purificare sunt foarte complexe și problematice. Mai mult decât atât pentru materia prima non-saponină, cum ar fi peptide, aminoacizi,

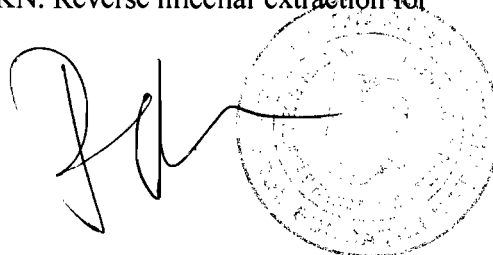


enzime, metaboliți și mai multe biomolecule, ale căror aplicații în domeniile vitale ale domeniilor farmaceutice, medicale și biomedicale au fost îngreunate din cauza cererii standard de calitate și de înaltă puritate.

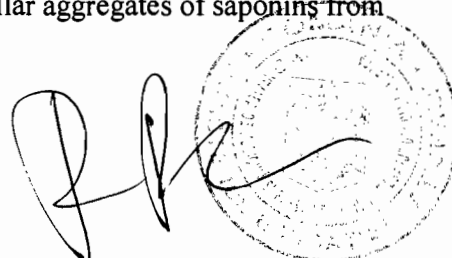
Cu toate acestea, această nouă strategie se bazează exclusiv pe extracția de pelicule protectoare de emulsie monostrat și coloizilor prin procesul de dezemulsionare, care s-au dovedit foarte eficiente până în prezent prin rezultatele obținute. Procesul fiind un prototip de extracție lichid-lichid, există șanse mai mari de aplicare și de adaptare la exploatare industrială continuă, la costuri reduse, cu „ușurința de producție mai mare“ și alte atribute legate de respectarea mediului. Prin urmare, astfel de aplicații ar valorifica cu siguranță utilizarea de produse naturale din prelucrarea biomasei durabile și ar reduce supra-dependența de piața sintetică, pe bază de petrol.

Referințe bibliografice

1. Güçlü-Ustündağ O, Mazza G. Saponins: properties, applications and processing. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2007;47(3):231-258. doi:10.1080/10408390600698197.
2. Lerner A, Matthias T. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmun Rev*. 2015;14(6):479-489. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2015.01.009.
3. Oda Kenji, Hisashi M, Toshiyuki M, Shigeji K, Toshiaki O, Masayuki Y. Adjuvant and Haemolytic Activities of 47 Saponins Derived from Medicinal and Food Plants. *Biol Chem*. 2000;381:67. doi:10.1515/BC.2000.009.
4. Eskil Hultin. Securidaca saponin. *Acta Chem Scand*. 1967;21(7):1714-1720.
5. Pan X, Liu H, Jia G, Shu YY. Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. *Biochem Eng J*. 2000;5(3):173-177. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00057-7.
6. Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol*. 2006;17(6):300-312. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004.
7. Kitagawa I, Application F, Data P. United States Patent [191. 1986.
8. Charlotte A. Kensil, Milford Dante J. Marciani H. Saponin Adjuvant. 1991;254(1974).
9. Hostettmann K, Marston A. *Saponins*: Cambridge: Cambridge University Press; 1995. doi:10.1017/CBO9780511565113.
10. Dobbins T. United States Patent. 2002;1(12):1-4.
11. Sten Ohlson, Lennart Hansson, Magnus Glad P-OL. High performance liquid affinity chromatography: a new tool in biotechnology. *Trends Biotechnol*. 1989;7(7):179-186. doi:10.1016/0167-7799(89)90096-6.
12. Güçlü-Üstündağ Ö, Mazza G. Saponins: Properties, Applications and Processing. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2007;47(3):231-258. doi:10.1080/10408390600698197.
13. Krishna SH, Srinivas ND, Raghavarao KS KN. Reverse micellar extraction for



- downstream processing of proteins/enzymes. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2002;75:119-83.
14. Ragupathi G, Gardner JR, Livingston PO, Gin DY. Natural and synthetic saponin adjuvant QS-21 for vaccines against cancer. *Expert Rev Vaccines.* 2011;10(4):463-470. doi:10.1586/erv.11.18.
 15. Harkins W. D. The physical chemistry of surface films. *Reinhold.* 1952;Vol. 116(3020):548-549. doi:10.1126/science.116.3020.548.
 16. Strassner J. Effect of pH on Interfacial Films and Stability of Crude Oil-Water Emulsions. *J Pet Technol.* 1968;20(3):303-312. doi:http://dx.doi.org/10.2118/1939-PA.
 17. Chatsisvili N, Philipse AP, Loppinet B, Tromp RH. Colloidal zein particles at water-water interfaces. *Food Hydrocoll.* 2017;65:17-23. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.036.
 18. Oseland EE, Rea A, de Heer MI, Fowler JD, Unwin PR. Interfacial kinetics in a model emulsion polymerisation system using microelectrochemical measurements at expanding droplets (MEMED) and time lapse microscopy. *J Colloid Interface Sci.* 2017;490:703-709. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2016.11.104.
 19. Powell KC, Damitz R, Chauhan A. Relating emulsion stability to interfacial properties for pharmaceutical emulsions stabilized by Pluronic F68 surfactant. *Int J Pharm.* 2017;521(1-2):8-18. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.058.
 20. Kimbler, O.K., R.L. Reed, A., and Silberberg IH. Physical Characteristics of Natural Films Formed at Crude Oil-Water Interfaces. *SPE J.* 1966;6(2). doi:http://dx.doi.org/10.2118/1201-PA.
 21. Vincent B. McBain and the centenary of the micelle. *Adv Colloid Interface Sci.* 2014;203:51-54. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2013.11.012.
 22. Shinoda K, Friberg S. Microemulsions: Colloidal aspects. *Adv Colloid Interface Sci.* 1975;4(4):281-300. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0001-8686(75)85006-8.
 23. Jack H. Schulman, Walter Stoeckenius LMP. Mechanism of Formation and Structure of Micro Emulsions by Electron Microscopy. *J Phys Chem.* 1959;63(10):1677-1680. doi:10.1021/j150580a027.
 24. McBain JW MH. Soap micelles that solubilize dimethyl phthalate, a liquid insoluble in water and in hydrocarbon. *J Am Chem Soc.* 1948;70:3838-3840.
 25. McBain, M. E. L. & Hutchinson E. *Solubilization and Related Phenomena.* New York: Academic Press Inc.; 1955.
 26. Griffin W. Calculation of "HLB" values of nonionic surfactants. *Am Perfum Essent Oil Rev.* 1955;65(5):26-9.
 27. Mitaine-Offer AC, P??nez N, Miyamoto T, et al. Acylated triterpene saponins from the roots of *Securidaca longepedunculata*. *Phytochemistry.* 2010;71(1):90-94. doi:10.1016/j.phytochem.2009.09.022.
 28. Verza SG, De Resende PE, Kaiser S, et al. Micellar aggregates of saponins from



- Chenopodium quinoa: Characterization by dynamic light scattering and transmission electron microscopy. *Pharmazie*. 2012. doi:10.1691/ph.2012.1102.
29. Pedebos C, Pol-fachin L, Pons R, Teixeira C V, Verli H. Atomic Model and Micelle Dynamics of QS-21 Saponin. 2014;(Md):3744-3760. doi:10.3390/molecules19033744.
 30. Totland C, Blokhus AM. Swollen micelles and alcohol-surfactant co-adsorption: structures and mechanisms from liquid- and solid-state ¹H-¹H NMR spectroscopy. *Phys Chem Chem Phys*. 2017. doi:10.1039/C6CP08506G.
 31. Cao Y, Ni X, Sheng J. Comparison of microstructures of microemulsion and swollen micelle in electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A*. 2011;1218(18):2598-2603. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.015.
 32. Siano DB. The swollen micelle—microemulsion transition. *J Colloid Interface Sci*. 1983;93(1):1-7. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0021-9797(83)90377-6.
 33. Lare V, NI W, Johannes J, et al. (19) United States (12) Patent Application Publication (10) Pub . No . : US 2007 / 0231398 A1. 2007;371(19).
 34. Ernest P. Irany, Cranford and AJG, Newark NJ. Precipitation of Emulsions of STY~RENE and Copolymers Thereof. 1950:1-6.
 35. Mattea F, Martín Á, Matías-Gago A, Cocero MJ. Supercritical antisolvent precipitation from an emulsion: β -Carotene nanoparticle formation. *J Supercrit Fluids*. 2009;51(2):238-247. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2009.08.013.
 36. Jingyu Shi and Henk Verweij. Synthesis and Purification of Oxide Nanoparticle Dispersions by Modified Emulsion Precipitation. *Langmuir*. 2005;21(12):5570–5575. doi:10.1021/la0500474.
 37. Xing Wang , Jason M. Gillian and DJK. Quasi-Emulsion Precipitation of Pharmaceuticals. 1. Conditions for Formation and Crystal Nucleation and Growth Behavior. *Cryst Growth Des*. 2006;6(10):2214–2227. doi:10.1021/cg0503043.
 38. Shyu L-J, Cambria FM. Emulsion Precipitation and Characterization of Zirconia. *MRS Proc*. 1990;180. doi:10.1557/PROC-180-837.
 39. Sila-on W, Vardhanabhuti N, Ongpipattanakul B, Kulvanich P. Influence of Incorporation Methods on Partitioning Behavior of Lipophilic Drugs into Various Phases of a Parenteral Lipid Emulsion. *AAPS PharmSciTech*. 2008;9(2):684-692. doi:10.1208/s12249-008-9089-x.
 40. Férézou J, Nguyen TL, Leray C, Hajri T, Frey A, Cabaret Y, Courtieu J, Lutton C BA. Lipid composition and structure of commercial parenteral emulsions. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1213(2):149-158.
 41. Groves MJ, Wineberg M, Brain APR. The presence of liposomal material in phosphatid stabilized emulsion. *J Dispers Sci Technol*. 1985;6(2):237-243. doi:10.1080/01932698508943947.
 42. Rotenberg M, Rubin M, Bor A, Meyuhas D, Talmon Y LD. Physico-chemical characterization of Intralipid emulsions. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1086(3):265-272.



43. Spiecker PM, Gawrys KL, Trail CB, Kilpatrick PK. Effects of petroleum resins on asphaltene aggregation and water-in-oil emulsion formation. 2003;220:9-27. doi:10.1016/S0927-7757(03)00079-7.
44. Ajivand P, Vaziri A. Optimization of Demulsifier Formulation for Separation of Water from Crude Oil Emulsions. 2015;32(1):107-118. doi:dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20150321s00002755.
45. Jones, T.J., Neustadter, E.L., and Whittingham KP. Water-In-Crude Oil Emulsion Stability And Emulsion Destabilization By Chemical Demulsifiers. *J Can Pet Technol.* 1978;17(2):PETSOC-78-02-08. doi:http://dx.doi.org/10.2118/78-02-08.



Revendicări:

1. O metodă de producție, recuperare, separare și purificare de saponine, unde extracția selectivă este efectuată din țesuturi de plante sau amestecuri prin emulsificare și precipitare într-un sistem demulsificat. Amestecul amintit poate conține:

- Extracte naturale și biologice, plante extrudate, materiale vegetale și produse animale sau orice tip de amestec care decurge din reacții chimice sau bioprosesare

2. Metoda din revendicarea 1 unde compusul sau clasa de compuși vizați pentru producție, purificare sau recuperare din amestecuri este desemnată sistematic pentru a funcționa ca emulgator sau stabilizator fie pentru emulsii/sisteme coloidale. Aceasta necesită ca moleculele lor să fie incluse în scheletul structural ale filmelor protectoare de tip barieră ale emulsiilor /coloizilor, adică ale filmelor-limită monostrat și/sau ale oricărei alte infrastructuri formate de emulgator prin auto-asamblare moleculară.

3. Procesul din revendicarea 2 unde emulgatorul este o combinație de 2 sau mai mulți compuși (care trebuie separați) sau care cel puțin apar ca un amestec de substanțe, coexistând cu impuritățile în genul de amestec la care se referă revendicarea 1.


4. Metoda din revendicarea 2 unde procesul de separare, purificare și recuperare a saponinelor și/sau altor substanțe (având proprietăți de surfactanți) din amestecuri este efectuat în două etape, la temperatura camerei: 1)emulsificarea și auto-asamblarea moleculelor emulgator; 2) separarea fazelor sau demulsificarea.

5. Procesul din revendicarea 4 unde infrastructurile formate de emulgator(i) în emulsie sau sistem sistem coloidal sunt făcute pentru a deveni obiectivul primar sau unealtă de separare și recuperare a substanțelor-emulgator din amestecul/amestecurile lor. Aceasta include, de asemenea, i situație unde aceste structuri sunt desemnate ca instrument potrivit pentru a ajuta recuperarea altor substanțe prin înlăturarea selectivă a substanțelor-emulgator constituate ale amestecului. Infrastructura unei emulsii tipice cuprinde:

- Vezicule, picături, micelii, micelii umflate și/sau orice alt tip de emulsie sau agregate moleculare formate prin auto-asociere.

6. Metoda din revendicarea 2 unde parametrii fizici ca temperatura, presiunea, pH-ul, solubilitatea, salinitatea etc. sunt folosiți pentru a influența aranjamentul molecular sau compoziția filmelor-limită monostrat/agregatelor formate prin auto-asamblare, sau cel puțin influențând procesul de extracție al saponinelor sau substanțelor-emulgator dintr-un amestec, așa cum este descris în revendicările 1 și 4.

7. Metoda din revendicarea 1 și 4 unde faza apoasă este apa în timp ce faza uleioasă este formată din lipide sau solvenți organici de densitate mai scăzută decât faza apoasă. Ca o condiție necesară, faza uleioasă este proiectată să fie relativ insolubilă sau cel puțin să joace rol de anti-solvent pentru substanțele/substanța-emulgator, pentru a-i îmbunătăți precipitarea.

A handwritten signature in black ink is written over a circular official stamp. The stamp contains text in a circular arrangement, likely identifying the official or the institution.

8. Procesele din revendicările 1 și 4 unde inversarea de faze și/sau separarea de faze sunt foarte necesare pentru recuperarea produsului sau eliminarea impurităților. În acest caz, mecanismul de degradare a emulsiei, cum ar fi ecremarea, sedimentarea, coalescența etc. poate fi esențial sau cel puțin de ajutor pentru buna separare și recuperare a substanțelor dorite.

9. Metoda din revendicarea 7 unde sunt folosite eterul etilic, acetona sau oricare alt amestec potrivit de solvenți organici făcând parte din clasa 3 a ghidului ICH Q3C , având PDE-uri de 50 de miligrame (mg) sau mai mult pe zi.

10. Procesul din revendicarea 4 unde produșii rezultați din separarea fazelor includ nanoparticule, particule solide și semi-solide bogate în saponine sau substanțe-emulgator. Alte particule anticipate ca produși pot include pelete, lipozomi monostrat/bistrat, cristale lichide (termotropice și liotropice în mezofaze nematice/smectice) etc.

11. Metoda din revendicarea 4 unde segmente bogate în emulgator sunt centrifugate sau demulsionate folosind substanțe chimice pentru a îmbunătăți recuperarea de compuși-emulgatori în exces prin degradarea filmelor monostrat și a sistemelor protective de tip barieră.

A handwritten signature in black ink is written over a circular, dotted stamp. The signature consists of several loops and a long horizontal stroke. The stamp is a circular seal with a dotted border and some illegible text inside.

Imaginile si Desene

1.

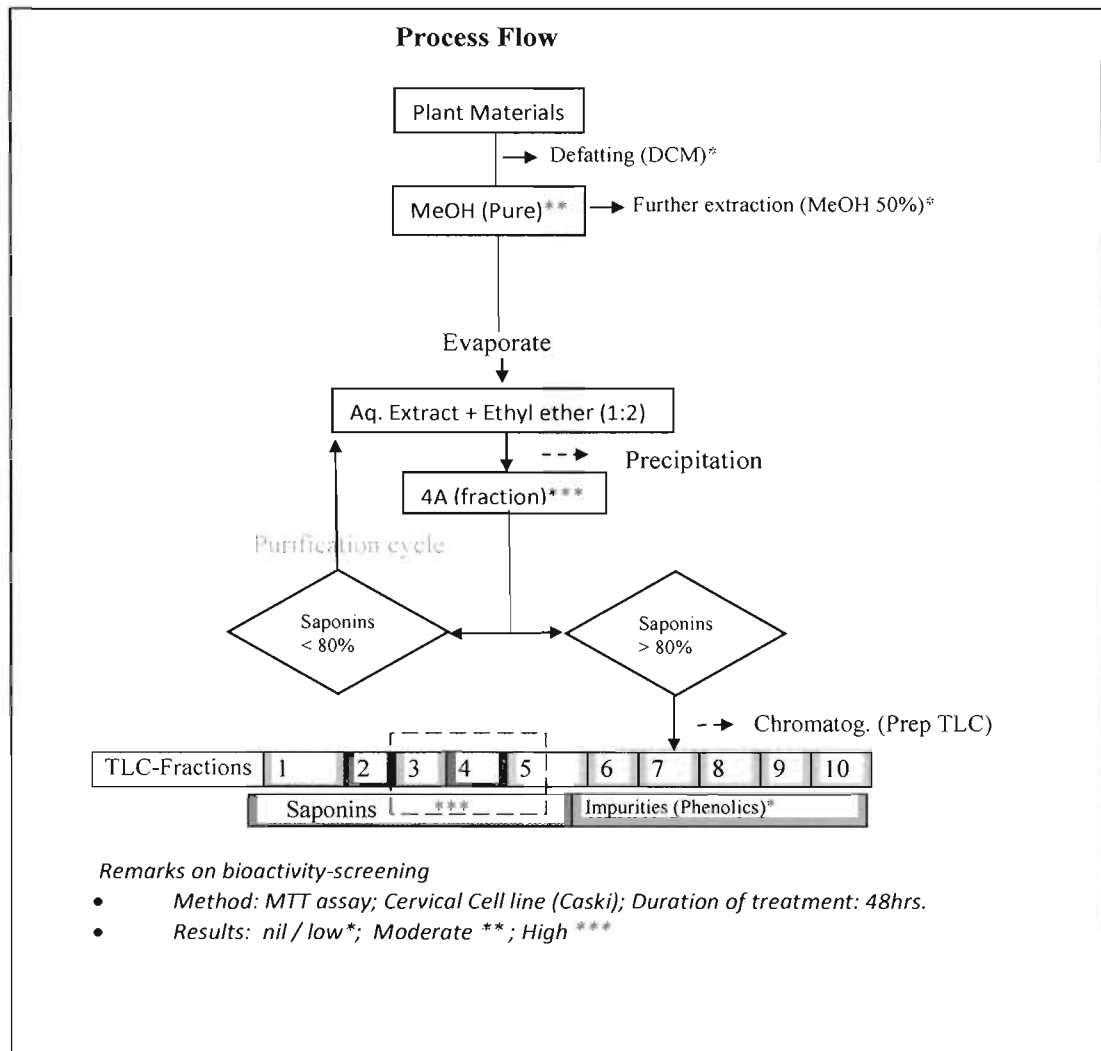
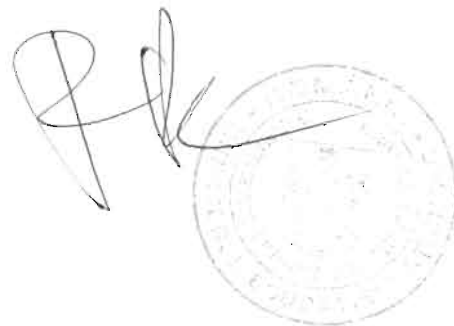


Fig. 1. A). Reprezentarea fluxului procesului. Conform exemplor 1 și 2



2.

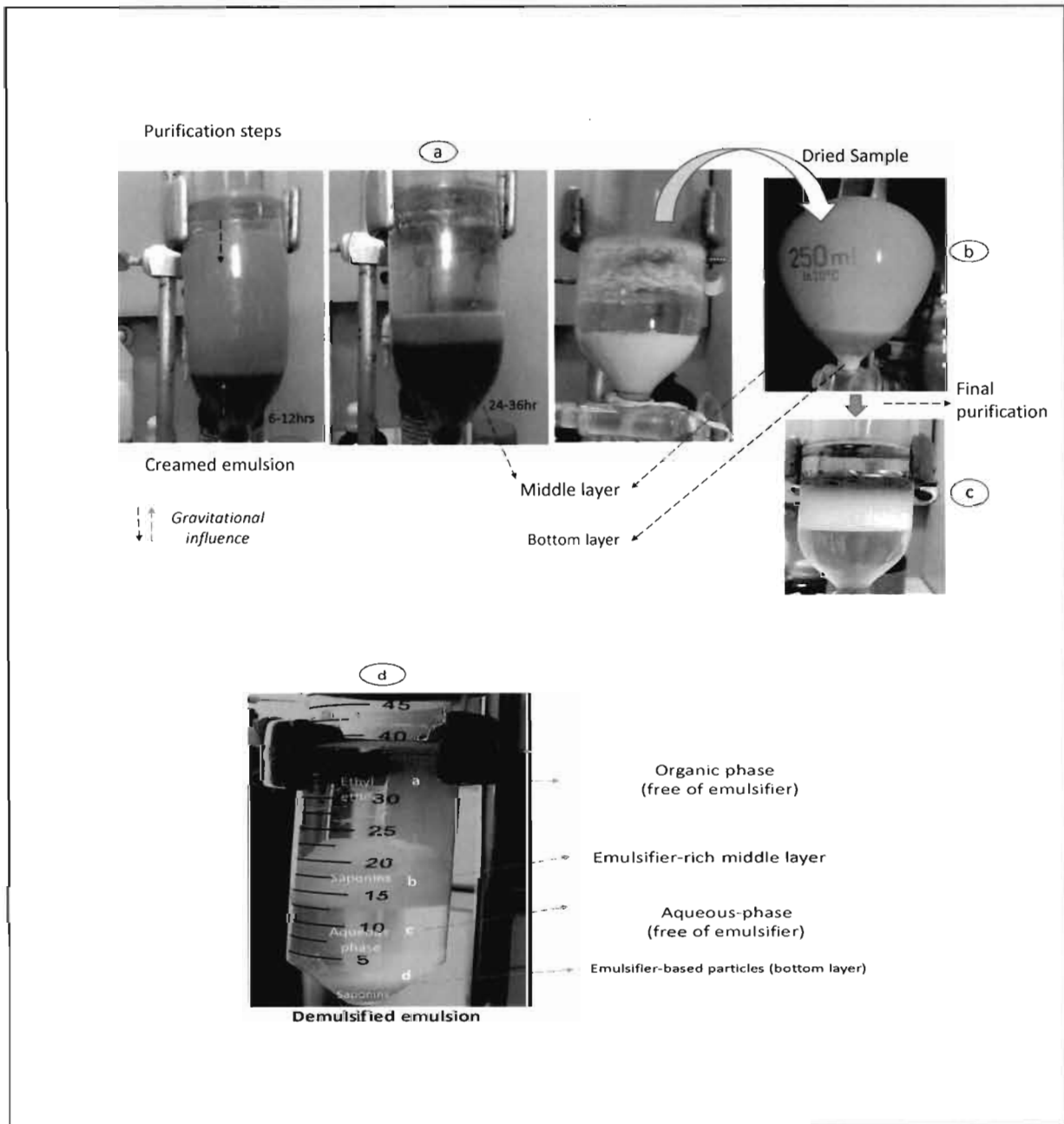


Fig. 2. a), b) și c) Reprezentarea procesului de extracție și purificare; d) și e). Conform exemplului 1

3.

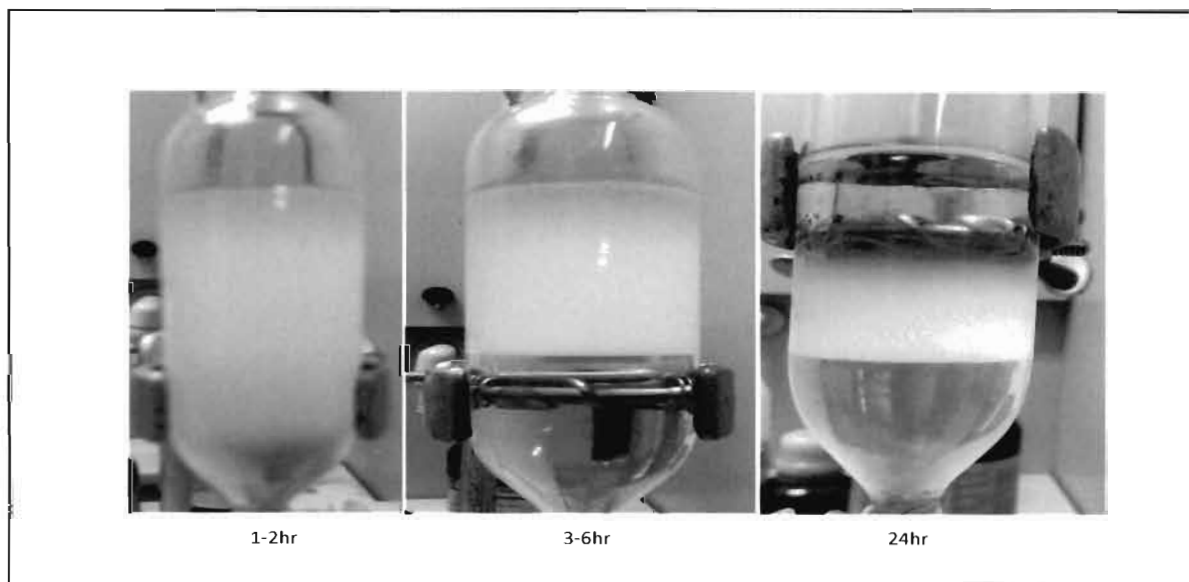


Fig. 3. Validarea conceptului folosind fracțiile (4A2 și 4A4) purificate CSS caracterizate ca saponine triterpenice. Conform exemplului 2.

4.

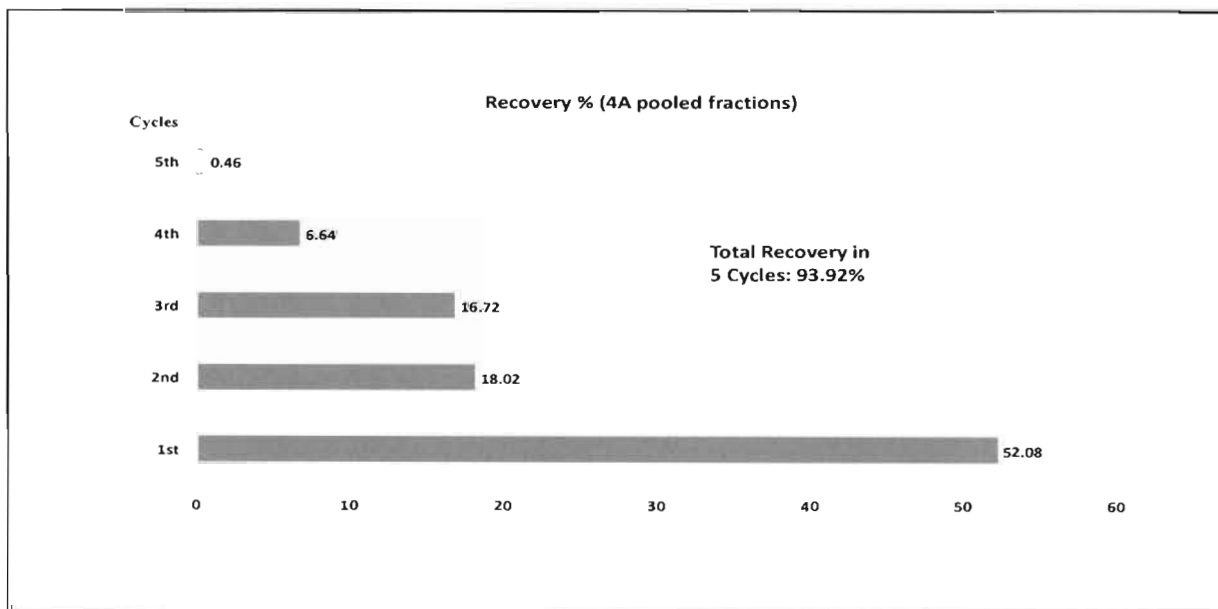


Fig. 4. Rata și procentul de recuperare a saponinelor din emulsia demulsionată. Conform experimentului 2

5.

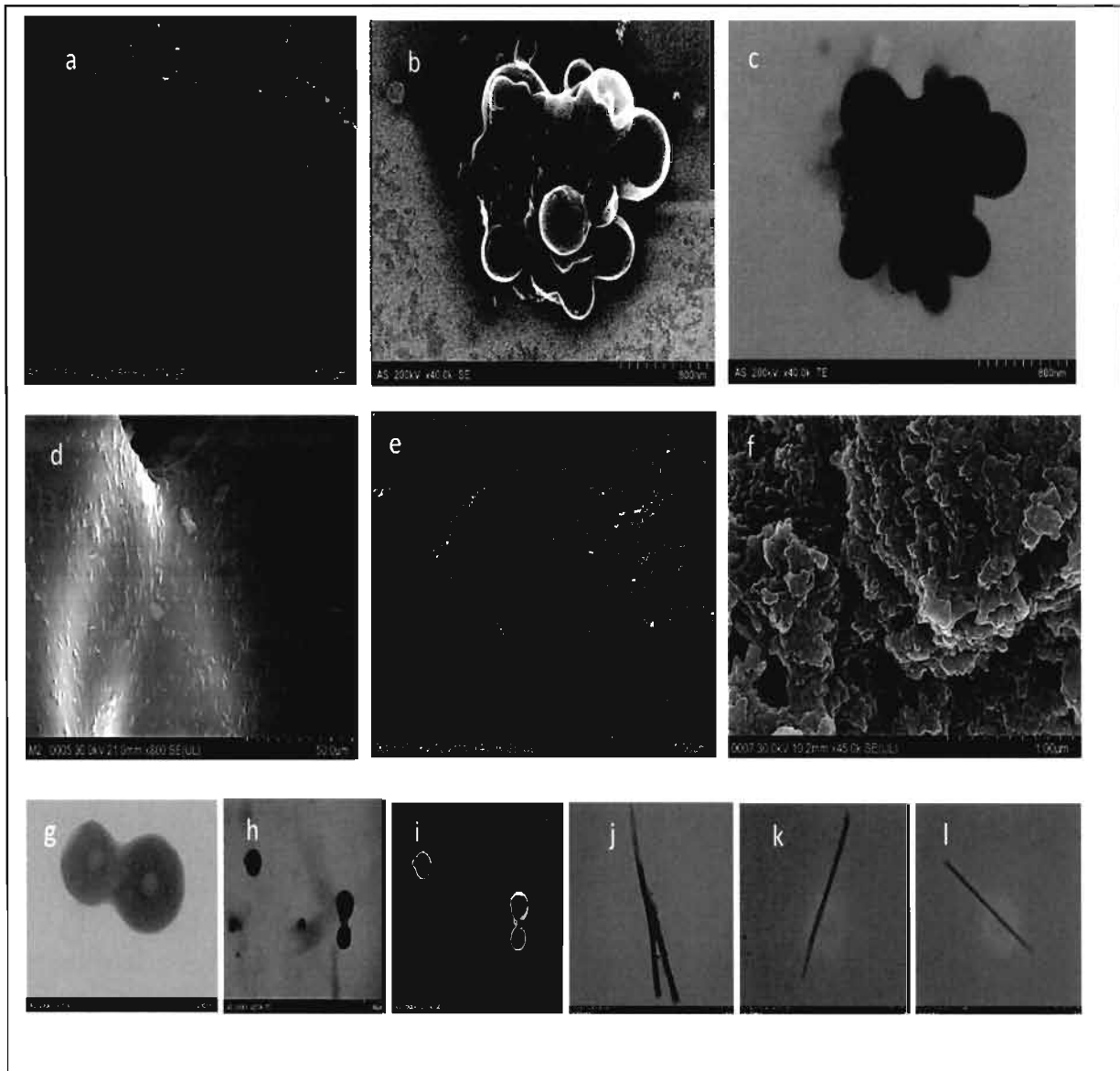


Fig. 5. Imagini TEM și SEM ale particulelor saponinice derivate din proces. Imaginile a), b) și c) reprezintă stratul inferior; d), e) și f) se referă la stratul mijlociu, iar g), h), i), j), k) și l) reprezintă posibile artefacte ale emulsiei.

Handwritten signature and a circular stamp.

6.

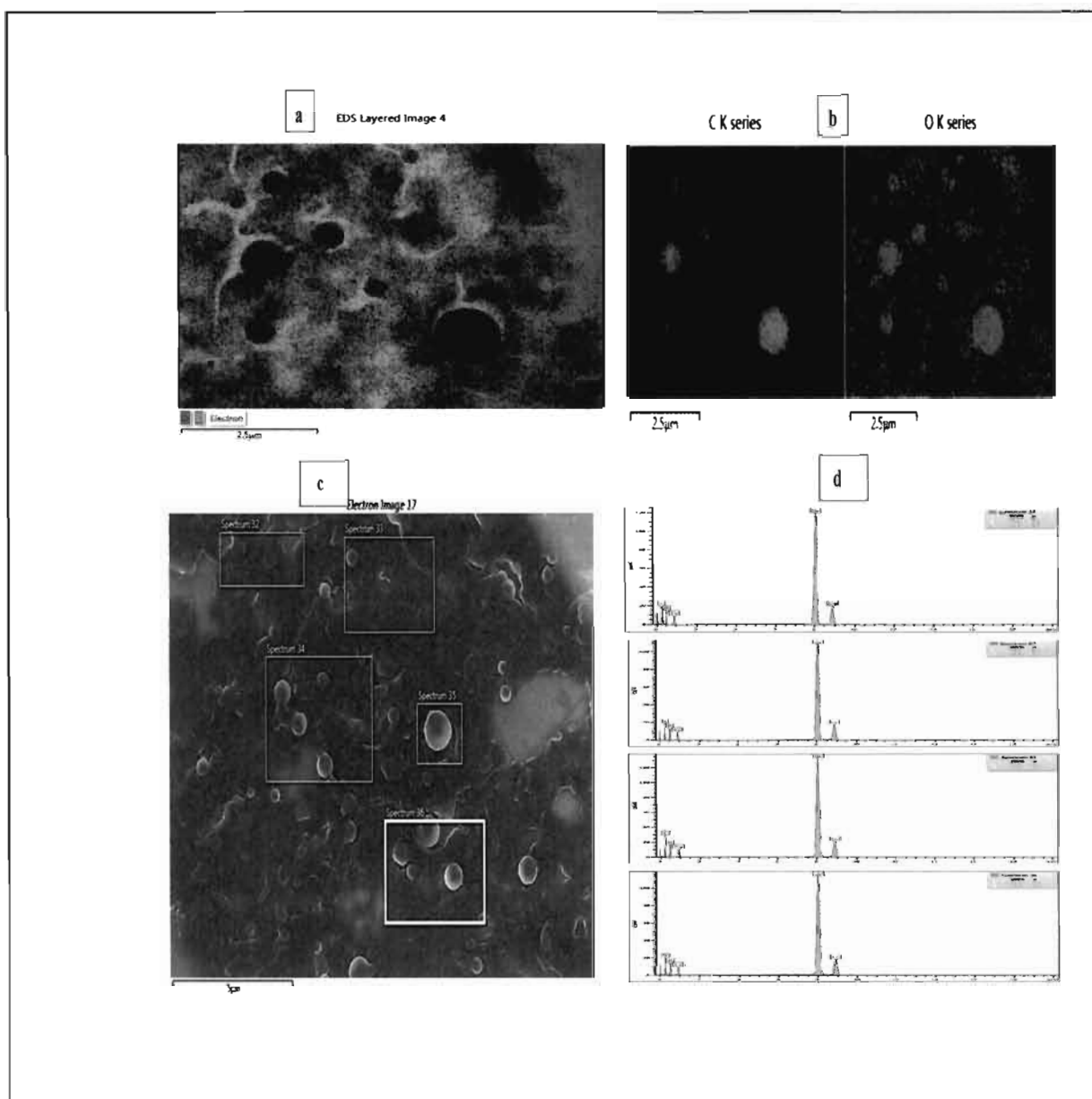


Fig. 6. Imagini SEM cu microanaliză de raze X (SEM / EDS). Imaginile a și b arată o distribuție omogenă a carbonului și oxigenului la suprafața particulelor; c și d compoziția procentuală relativă de carbon și oxigen în respectivul grup de particule.

Handwritten signature and a circular stamp.

7.

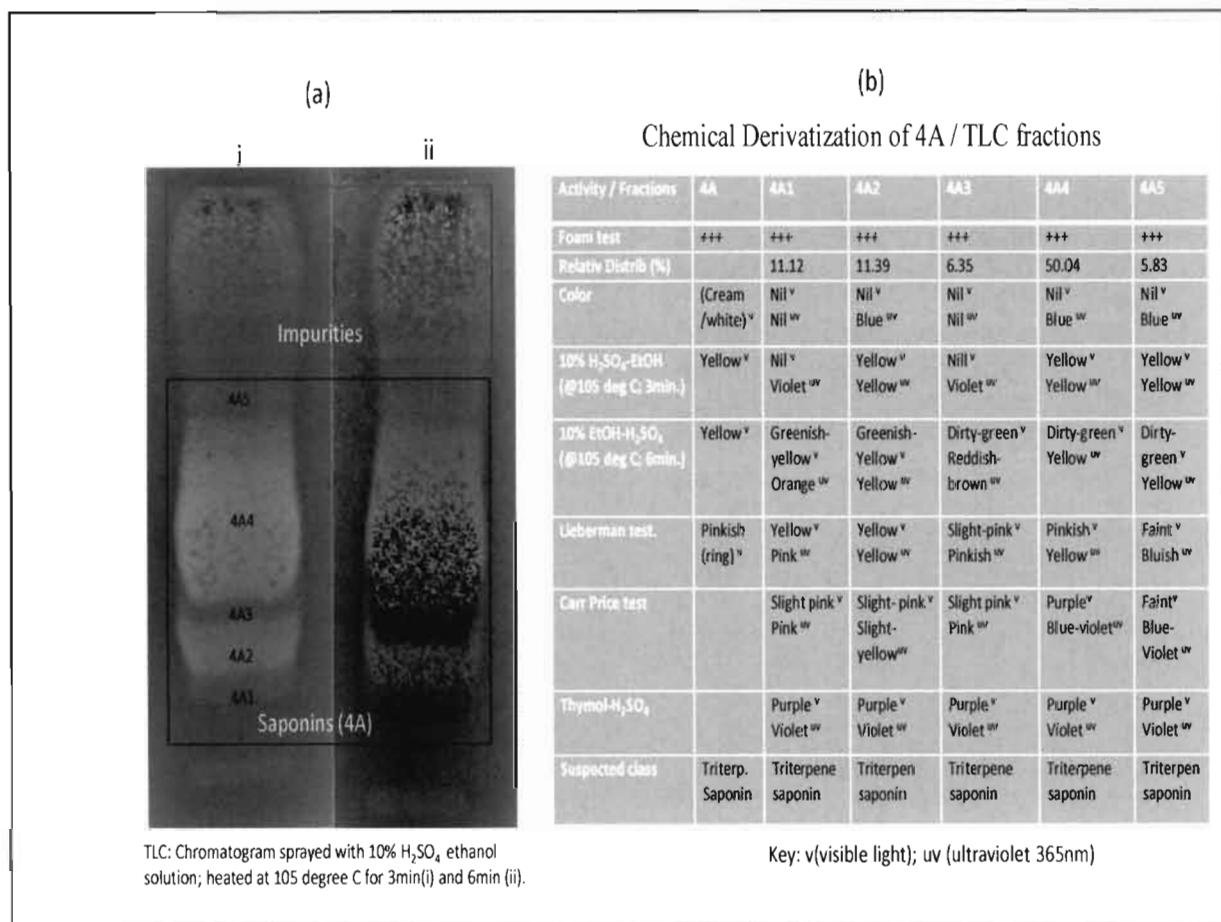


Fig. 7. a). Cromatograma CSS a 4A arătând fracțiile relevante de saponine și impurități și b. Derivatizarea chimică a 4A și a fracțiilor CSS.

8.

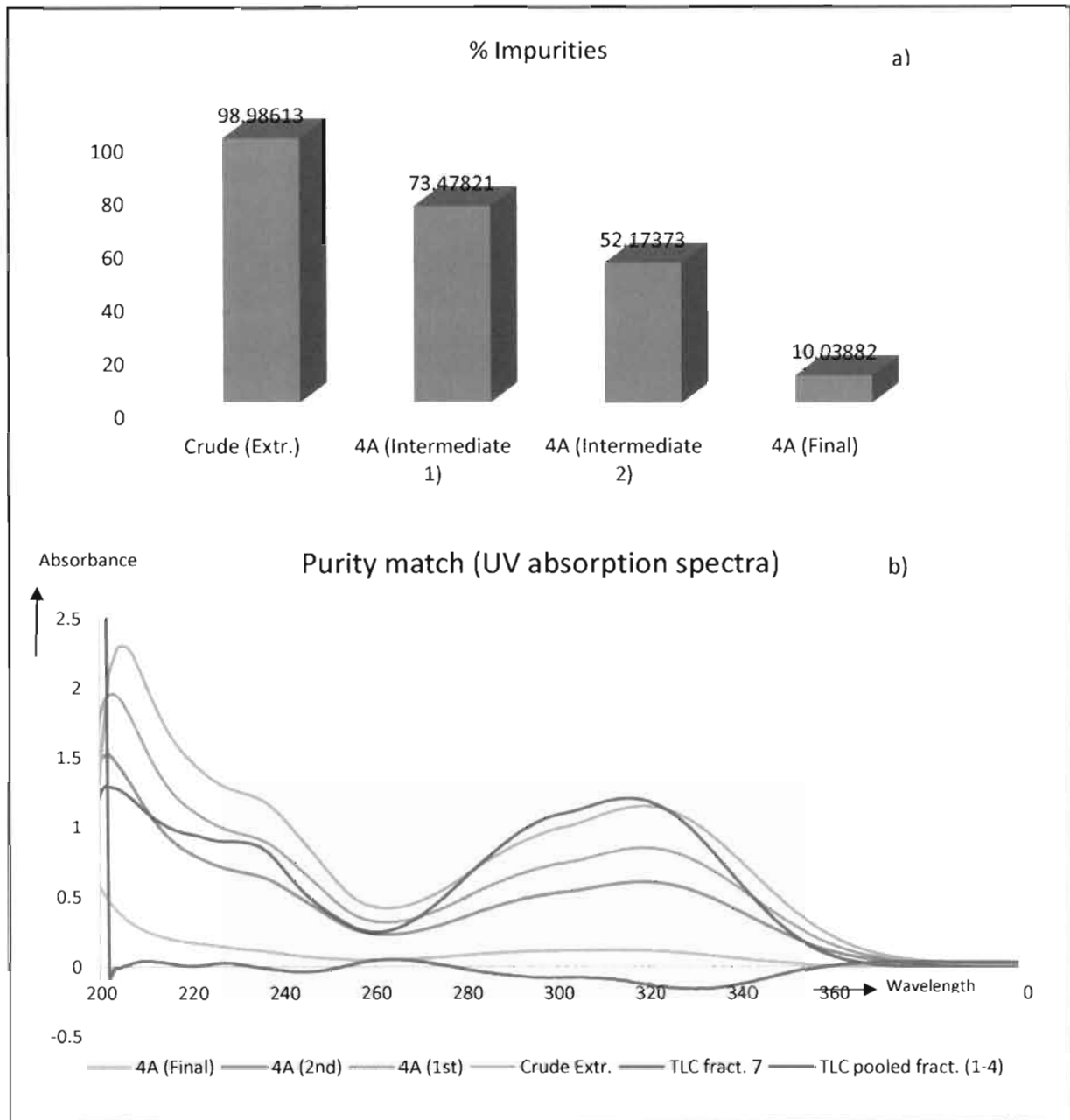


Fig. 8. Rezultatul determinărilor impurităților folosind spectroscopie UV-Vis; a) Conținutul procentual de impurități în fiecare ciclu de purificare comparativ cu rezultatul final (4A final); b) „The Purity match”, comparând extractul brut și fracțiile intermediare cu produsul (4A final). „Experiment de control” reprezentate de fracțiile CSS 4A (1-4) și 4A (7). Conform experimentului I.

Handwritten signature and a circular stamp of the University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Faculty of Medicine, Cluj-Napoca.