



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2017 00644**

(22) Data de depozit: **13/09/2017**

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

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA "POLITEHNICA"
BUCUREȘTI, FACULTATEA DE CHIMIE
APLICATĂ ȘI ȘTIINȚA MATERIALELOR,
SPL.INDEPENDENȚEI NR. 313,
BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **CĂLINESCU IOAN, STR.GHIRLANDEI
NR.38, BL.D 1, SC.C, PARTER, AP.21,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **GAVRILA ADINA-IONUTA, STR.SIBIU
NR.10, BL.OS1, SC.E, ET.2, AP.172,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ASOFIEI IOANA, STR.SIBIU NR.10,
BL.OS1, SC.E, ET.2, AP.172, BUCUREȘTI,
B, RO;**
• **IGHIGEANU DANIEL PAUL, BD.DACIA
NR.88, ET.5, AP.21, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MARTIN DIANA, STR.LIVIU REBREANU
NR.5, BL.52, SC.3, ET.4, AP.106,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU PENTRU PRETRATAMENTUL CU MICROUND
AL MATERIALELOR VEGETALE, ÎN VEDEREA CREȘTERII
EFICIENȚEI DE EXTRAȚIE A POLIFENOLILOR**

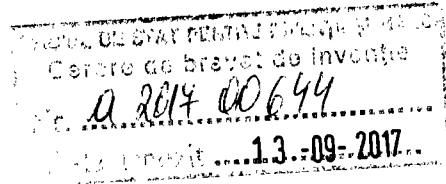
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de extracție a compușilor activi dintr-un material vegetal. Procedeu conform invenției constă în pretratamentul cu microunde a unui material vegetal proaspăt de tip cătină și anghinare, cu umiditate de 60...80% sau uscat, cu umiditate de 5...10%, la o putere SAR de 2000...2500 W/kg, timp de 100...120 s, urmat de extracția prin metode uzuale,

rezultând o scădere a timpului de extracție de la 7 la 4...5 zile, și o creștere a conținutului total de polifenoli și a activității antioxidante de 10...90%, în funcție de tipul materialului vegetal tratat.

Revendicări: 2





DESCRIERE

PROCEDEU PENTRU PRETRAMAMENTUL CU MICROUNDRE A MATERIALELOR VEGETALE ÎN VEDEREA CREȘTERII EFICIENȚEI DE EXTRAȚIE A POLIFENOLILOR

Invenția se referă la o procedură de pretratament cu microundre, ce se poate aplica materialului vegetal proaspăt sau uscat înainte de extracția clasică a principiilor active din plante, îndeosebi compuși de tip polifenoli. Procedeul descris se poate aplica la scară de laborator sau în producție.

Scopul invenției este realizarea unui procedeu de pretratament cu microundre a materialului vegetal proaspăt sau uscat în scopul îmbunătățirii extractului obținut din materialul vegetal (creșterea concentrației de compuși activi) și al scurtării semnificative a timpului de extracție.

Polifenolii sunt compuși ce conțin unul sau mai multe inele aromatice cu unul sau mai multe grupări hidroxil. Aceștia se găsesc într-o mare varietate de plante și sunt cei mai abundenți metaboliți secundari, cunoscându-se aproximativ 8000 de structuri fenolice de la molecule simple cum sunt acizii fenolici și alcoolii fenolici, până la substanțe cu grad înalt de polimerizare cum sunt taninurile [Salas, Soto, Carretero and Gutierrez, *"Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples"*, *Molecules*, 2010, 15, 8813-8826]. Polifenolii se găsesc foarte rar sub formă liberă, majoritatea fiind izolați în forme conjugate, cel mai adesea fiind legați de polizaharidele din pereții celulari atât prin legături hidrofile, cât și prin legături hidrofobe [Lattanzio, Lattanzio and Cardinali, *"Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects"*, *Phytochemistry: Advances in Research*, 2006, 23-67].

Distribuția polifenolilor în țesutul plantelor, la nivel celular și subcelular, este neuniformă. Aceștia se găsesc sub diferite forme, astfel că localizarea și concentrația acestora diferă de la specie la specie și chiar de la un țesut la altul din aceeași specie [Beckman, *"Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?"*, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2000, 57, 101-110; Naczki and Shahidi, *"Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis"*, *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41, 1523-

Imail-

17

1542]. Compușii fenolici insolubili se găsesc în pereții celulari, în timp ce compușii fenolici solubili sunt prezenți printre vacuolele celulei plantei. Enzima polifenoloxidaza este confinată tilacoidelor din plastide unde are loc sinteza compușilor polifenolici. Odată sintetizați, aceștia sunt transferați către vacuolele celulare unde sunt depozitați [Beckman, "*Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?*", *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2000, 57, 101-110]. Straturile externe ale plantei conțin o cantitate mai mare de compuși fenolici comparativ cu straturile interne [Naczk and Shahidi, "*Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis*", *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41, 1523-1542]. Compușii fenolici prezenți în peretele celular, legați de diferite componente ale celulei, sunt implicați în mecanismul de stabilitate al pereților celulari, dar și în mecanismul de creștere sau morfogeneză a celulei ca răspuns la stres (radiații ultraviolete), paraziți, prădători sau patogeni.

Compușii fenolici au, de asemenea, rol structural în diferite țesuturi de protecție sau de susținere, contribuind totodată la culoarea plantei. Compușii fenolici se găsesc în toate organele plantei fiind astfel o parte integrată în dieta umană (fructe, legume, cereale, mășline, ciocolată, ceai, cafea, bere, vin etc.) și responsabili de proprietățile organoleptice ale plantelor alimentare [Dai and Mumper, "*Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties*", *Molecules*, 2010, 15, 7313-7352].

Polifenolii sunt compuși puțin volatili, din acest motiv extracția acestora se realizează cu ajutorul unui solvent potrivit. Extracția de polifenoli din țesuturi vegetale se realizează prin metode convenționale (macerare, extracție Soxhlet) sau folosind metode neconvenționale, cum ar fi extracția asistată cu microunde, extracție asistată cu ultrasunete, extracția sub presiune sau extracția cu fluid supercritic.

Scopul oricărui proces industrial pentru extracția compușilor valoroși din plante este de a obține un randament maxim posibil, asigurând totodată că structura chimică a produșilor obținuți să fie cât mai puțin posibil modificată [Wani, Wani and Masoodi, "*Optimizing conditions for antioxidant extraction from Sea Buckthorn leaf (*Hippophae rhamnoides* L.) as herbal tea using response surface methodology (RSM)*", *International Food Research Journal*, 2013, 20, 1677-1681]. Aceste două condiții sunt cumva contradictorii: pentru obținerea unui randament maxim posibil este necesară utilizarea unor condiții de extracție severe care să permită

Imai

170

distrugerea țesutului celular și eliberarea compușilor activi, în timp ce păstrarea nemodificată a structurii chimice a acestora necesită condiții cât mai blânde.

Eficiența procesului de extracție este influențată de interacțiunile dintre matricea probei, moleculele bioactive și difuzia solventului prin materialul vegetal. Procesul de extracție depinde de mai mulți factori: temperatura de extracție, tipul solventului, raportul planta - solvent, condițiile de agitare și timpul de extracție [Galili and Hovav, "*Determination of Polyphenols, Flavonoids, and Antioxidant Capacity in Dry Seeds*", *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation 2014*]. Deoarece structura materialului vegetal este un factor cheie care influențează eficiența extracției, orice mijloc pentru a o modifica în vederea sporirii eficienței de extracție, este atractiv. Se recunoaște faptul că pretratamentul probelor afectează în mod semnificativ microstructura unui material vegetal și, în consecință, eliberarea nutrienților [Hiranvarachat, Devahastin, Chiewchan and Vijaya Raghavan, "*Structural modification by different pretreatment methods to enhance microwave-assisted extraction of β -carotene from carrots*", *Journal of Food Engineering*, 2013, 115, 190-197]. Există mai multe metode de pretratament citate în literatură. Cea mai simplă este mărunțirea (milling) [Chupin, Maunu, Reynaud, Pizzi, Charrier and Charrier-El Bouhtoury, "*Microwave assisted extraction of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark: Impact of particle size and characterization*", *Industrial Crops and Products*, 2015, 65, 142-149], dar mai sunt citate tratamentul enzimatic [Calinescu, Gavrilă, Ivopol, Ivopol, Popescu and Mircioaga, "*Microwave assisted extraction of essential oils from enzymatically pretreated lavender (*Lavandula angustifolia* Miller)*", *Central European Journal of Chemistry*, 2014, 12, 829-836] sau cel de îndepărtare a grăsimilor și uleiurilor înainte de extracția polifenolilor, pentru a îmbunătăți transferul acestora către solvent [Rodríguez-Rojo, Visentin, Maestri and Cocero, "*Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents*", *Journal of Food Engineering*, 2012, 109, 98-103].

Prin utilizarea acestor metode de pretratament se urmărește creșterea randamentului de extracție al compușilor valoroși dar și scăderea timpului de extracție, a agitării în timpul extracției sau micșorarea temperaturii de extracție.

Încălzirea cu microunde a materialului vegetal are câteva caracteristici unice și anume: încălzirea volumetrică (încălzirea nu are loc de la o suprafață caldă ci energia microundelor este

transferată în toata masa plantei, singura limitare fiind adâncimea de pătrundere a microundelor în materialul iradiat) și încălzirea selectivă (diferitele componente ale unui sistem heterogen se pot încălzi diferit funcție de proprietățile lor dielectrice). În cazul pretratamentului cu microunde încălzirea volumetrică este cea mai importantă deoarece permite încălzirea masei vegetale, în absența solventului și fără apariția unor supraîncălziri care ar putea degrada compușii valoroși ce urmează a fi extrași.

Până în prezent este citată utilizarea pretratamentului cu microunde a materialului vegetal doar în următoarele cazuri:

- Extracția cu dioxid de carbon supercritic a uleiurilor din alge de tip *Chlorella Vulgaris*, după ce aceasta a fost pretratată cu microunde [Dejoye, Vian, Lumia, Bouscarle, Charton and Chemat, "*Combined Extraction Processes of Lipid from Chlorella vulgaris Microalgae: Microwave Prior to Supercritical Carbon Dioxide Extraction*", *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12, 9332-9341];
- Uscarea asistată de microunde pentru păstrarea mai bună a compușilor valoroși din frunzele de *Rosmarinus officinalis* [Sui, Liu, Ma, Yang, Zu, Zhang and Wang, "*Microwave irradiation to pretreat rosemary (Rosmarinus officinalis L.) for maintaining antioxidant content during storage and to extract essential oil simultaneously*", *Food Chemistry*, 2012, 131, 1399-1405];
- Pretratatarea cu microunde a materialului lignocelulozic pentru îmbunătățirea vitezei de hidroliză enzimatică a celulozei [Cullingford, George and Lightsey, "*Apparatus and method for cellulose processing using microwave pretreatment*", 1993]

Problema tehnică pe care o rezolva invenția este realizarea unui procedeu de pretratament cu microunde a materialului vegetal proaspăt sau uscat în vederea creșterii eficienței procedeuului de extracție clasică a principiilor active din acest material vegetal. În urma utilizării pretratamentului cu microunde timpul de extracție a principiilor active scade substanțial, iar calitatea extractului se îmbunătățește.

Procedeu de pretratament se realizează într-un echipament de microunde capabil să asigure o încălzire uniformă a materialului vegetal, fără supraîncălziri locale. Descrierea acestui echipament face obiectul unei cereri de brevet separate.

Jean Călin

S-au ales drept plante de referință frunzele de cățina și de anghinare, acestea au un conținut ridicat de polifenoli care se extrag în mod obișnuit prin macerare timp de 7-10 zile, la temperatura camerei cu soluții apa-etanol 50:50 % vol.

Atunci când s-au utilizat frunzele proaspete, datorită conținutului lor de umiditate relativ ridicat (~ 70%) pretratatamentul cu microunde s-a realizat ca atare. În cazul utilizării frunzelor uscate în prealabil, înainte de pretratament s-a adăugat cantitatea de apă necesară obținerii aceleași umidități totale pe care o aveau și frunzele proaspete. Materialul vegetal a fost supus tratamentului după ce planta a absorbit toată cantitatea de apă adăugată (30 min)

În experimentările efectuate s-a urmărit îndeosebi determinarea puterii specifice de microunde (SAR, exprimat în W/kg) cu care trebuie tratată planta pentru a realiza un pretratament eficient. În acest scop s-a realizat încălzirea cu microunde la puteri diferite și timpi diferiți, astfel încât energia transmisă să fie aceeași. S-a urmărit ca să nu apară o supraîncălzire a plantei iar temperatura maximă atinsă să fie sub 100 °C. După etapa de pretratament materialul vegetal s-a prelucrat prin macerare la temperatura camerei în mod similar cu probele care nu au fost pretratate. Determinarea eficienței de extracție a principiilor active s-a realizat prin prelevarea probelor de extract și analiza lor pentru determinarea conținutului total de polifenoli (TPC, exprimat în mg acid galic / mL extract) prin metoda Folin-Ciocalteu potrivit standardului internațional ISO 14502-1 și prin determinarea activității antioxidante, exprimate în mg Trolox Echivalent/ mL extract [Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang and Rice-Evans, "*Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay*", *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, 26, 1231-1237]. Probele au fost colectate la câte 6 h în primele 24 de ore și apoi zilnic timp de o săptămână. Pentru fiecare experiment în parte s-au notat valorile maxime obținute și timpul de macerare necesar.

Se prezintă în continuare 3 exemple de realizare a procedurii de pretratament conform invenției.

Exemplul 1

S-au pre-tratat șarje de frunze de cățina proaspete de câte 80 g (umiditate 67%), la puteri diferite de microunde și timpi diferiți pentru menținerea aceleași energii introduse în sistem. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 1.

Ionuț

Tabelul 1. Condițiile experimentale și rezultatele obținute pentru pre-tratamentul frunzelor de cățina proaspete

Nr. Exp.	Condiții experimentale pretratare			Rezultate obținute					
	Putere MW, (W)	Timp pretratare (s)	SAR (W/kg)	TPC max.		Timp (h)	Activitate Antioxidantă		Timp (h)
				(mg GAE/mL)	%		(mg TE/mL)	%	
0	0	-	-	6.71	100.0	7*24	14.6	100.0	7*24
1	66	300	825	7.19	107.2	5*24	15.25	104.5	5*24
2	160	120	2000	7.43	110.7	4*24	15.89	108.8	4*24
3	200	100	2500	7.05	105.1	5*24	15.56	106.6	5*24

Exemplul 2

S-au pre-tratat șarje de frunze de anghinare proaspete de câte 80 g, la puteri diferite de microunde și timpi diferiți pentru menținerea aceleiași energii introduse în sistem. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2. Condițiile experimentale și rezultatele obținute pentru pre-tratamentul frunzelor de anghinare proaspete

Nr. Exp.	Condiții experimentale pretratare			Rezultate obținute					
	Putere MW, (W)	Timp pretratare (s)	SAR (W/kg)	TPC max.		Timp (h)	Activitate Antioxidantă		Timp (h)
				(mg GAE/mL)	%		(mg TE/mL)	%	
0	0	-	-	1.7	100.0	7*24	2.03	100.0	7*24
1	66	300	825	2.24	131.8	5*24	2.6	128.1	5*24
2	160	120	2000	2.85	167.6	5*24	3.06	150.7	5*24
3	200	100	2500	3.22	189.4	5*24	3.85	189.7	5*24

Exemplul 3

S-au pre-tratat șarje de frunze de cătină uscate de câte 27.8 g (umiditate 5%), la puteri diferite de microunde și timpi diferiți pentru menținerea aceleiași energii introduse în sistem.

Înainte de pretratament s-au adăugat 52.2 mL apă distilată și s-a așteptat ca planta să absoarbă această cantitate de apă pentru a se obține un material vegetal cu masa și umiditate echivalente cu cea a materialului vegetal proaspăt utilizat în exemplu nr. 1. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 3.

Tabelul 3. Condițiile experimentale și rezultatele obținute pentru pre-tratamentul frunzelor de cățina uscate

Nr. Exp.	Condiții experimentale pretratare			Rezultate obținute					
	Putere MW, (W)	Timp pretratare (s)	SAR (W/kg)	TPC max.		Timp (h)	Activitate Antioxidantă		Timp (h)
				(mg GAE/mL)	%		(mg TE/mL)	%	
0	0	-	-	5.43	100	7*24	10.65	100	7*24
1	66	300	825	5.75	105.9	5*24	12.48	117.2	5*24
2	160	120	2000	5.67	104.4	5*24	12.25	115	5*24
3	200	100	2500	5.78	106.4	5*24	13.20	123.9	5*24

REVENDICĂRI

1. Procedeu pentru pretratamentul cu microunde a materialelor vegetale în vederea creșterii eficienței de extracție a polifenolilor se caracterizează prin aceea că la utilizarea unor condiții adaptate de pretratament (valori ale SAR cuprinse între 2000 și 2500 W/kg, timp de pretratament 100-120 secunde) se poate obține:
 - o scădere a timpului de extracție: de la 7 zile, pentru planta netratată la 4-5 zile în funcție de tipul plantei tratate.
 - o creștere semnificativă a conținutului total de polifenoli și a activității antioxidante a extractului obținut. Creșterile pot fi cuprinse între 10 și 90% funcție de tipul plantei tratate.
2. Procedeu pentru pretratamentul cu microunde a materialelor vegetale în vederea creșterii eficienței de extracție a polifenolilor se caracterizează prin aceea că se poate utiliza pentru materiale vegetale proaspete (cu umiditate de 60-80%) sau pentru materiale vegetale uscate (cu umiditate de 5-10%) dacă se restaurează umiditatea acestora.