



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2018 00938**

(22) Data de depozit: **22/11/2018**

(41) Data publicării cererii:  
**30/07/2019** BOPI nr. **7/2019**

(71) Solicitant:  
• **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN  
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI  
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

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

• **VINATORU MIRCEA, ALEEA MOINEȘTI,  
NR.3, BL.18, SC.1, AP.3, BUCUREȘTI, B,  
RO;**  
• **DIACON AUREL,  
STR. SOLD. ENE MODORAN NR. 6,  
BL. M94, SC. 1, ET. 2, AP. 12, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **CHIPURICI PETRE, STR.CIREȘULUI,  
NR.5, AP.1, BUCUREȘTI, B, RO**

*Această publicație include și modificările descrierii,  
revendicărilor și desenelor, depuse conform art. 35,  
alin. (20), din HG nr. 547/2008.*

(54) **SOLVENT BIODEGRADABIL ȘI NETOXIC  
PENTRU EXTRAȚIA PRINCIPIILOR NATURALE  
LIPOSOLUBILE**

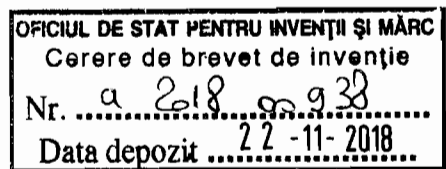
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de utilizare a esterilor etilici ai acizilor grași obținuți din uleiuri vegetale. Aceștia sunt utilizați ca solvent biodegradabil și netoxic, pentru extracția principiilor naturale liposolubile. Metoda conform invenției constă în extracția principiilor active liposolubile prin punerea în contact a solventului cu material vegetal uscat (de exemplu, morcovi sau roșii) în raport masic 20:1, la temperatura camerei, sub agitare mecanică și protejat de lumină, pentru evitarea degradării principiilor active liposolubile. Esterii etilici ai

acizilor grași obținuți din uleiuri vegetale (de floarea-soarelui, măsline, cânepă sau camelină) au un conținut ridicat de acizi grași esențiali (Omega 3 și Omega 6), și nu trebuie separați de principiile naturale liposolubile extrase, ci pot fi utilizați împreună cu acestea.

Revendicări inițiale: 3  
Revendicări amendate: 2





DESCRIERE

SOLVENT BIODEGRADABIL ȘI NETOXIC PENTRU EXTRAȚIA PRINCIPIILOR NATURALE LIPOSOLUBILE

Invenția se referă la un solvent biodegradabil și netoxic (esteri etilici de acizi grași) ce se poate obține din uleiuri vegetale cu conținut bogat în acizi grași esențiali. Acest solvent este testat pentru extracția unor principii active liposolubile din material vegetal (licopeni și caroteni). Extractul astfel obținut se poate folosi drept supliment alimentar bogat în acizi grași esențiali dar și în principii naturale liposolubile.

Scopul invenției este descrierea compoziției unor esteri etilici ai acizilor grași obținuți din uleiuri vegetale cu conținut bogat în acizi grași esențiali și testarea capacității acestor esteri etilici pentru a extrage principii naturale liposolubile din material vegetal.

**Ce sunt principiile naturale liposolubile**

În industria alimentară, dar mai ales în domeniul suplimentelor alimentare, dezvoltarea de produse ce conțin compuși bioactivi liposolubili este din ce în ce mai răspândită datorită efectelor benefice asupra sănătății și a renumelui câștigat în reducerea riscurilor de apariție a unor boli grave determinate de radicalii liberi (cancer, afecțiuni cardiace, îmbătrânire). Câteva exemple de astfel de compuși liposolubili bioactivi: vitamine liposolubile (A și E,  $\alpha$ -tocoferoli sau tocotrienoli), precursori ai vitaminei A ( $\beta$ -caroten), acizi grași  $\omega$ -3, fitosteroli, curcuminoide, etc. Încorporarea acestor principii bioactive liposolubile în soluții apoase este dificilă datorită solubilității scăzute, dar mai ales datorită sensibilității la lumină, căldură și oxigen.

**Care sunt solvenții utilizați în mod obișnuit**

Alegerea potrivită a unui solvent este de maximă importanță în realizarea proceselor de extracție și de purificare a produșilor naturali. Solventul trebuie să asigure o solubilizare cât mai bună a produșilor ce urmează a fi extrași, dar în același timp trebuie să nu fie toxic, să nu fie poluant și să fie sigur în utilizare (neinflamabil, stabil termic, inert chimic și necoroziv).

În domeniul extracției principiilor active din plante de tip solid-lichid solvenții utilizați se pot clasifica astfel [Chemt and Strube, "Green extraction of natural products: theory and practice" (2015)]:

- Soluții apoase;
- Solvenți organici;
- Lichide supercritice;
- Lichide ionice;

De regulă în evaluarea calității unui solvent trebuie considerat nu numai procesul de extracție ci și cel de purificare a produsului extras (distilare, cristalizare, extracție, utilizare membrane sau cromatografie, etc.). Situația în care solventul utilizat pentru extracție, nu trebuie separat de principiul activ ci poate fi folosit ca atare constituie un avantaj. Dacă solventul are și el

proprietăți benefice este cu atât mai bine și astfel avem o metoda de punere în valoare atât a solventului cât și a principiului activ.

#### **Ce este FAEE (Esterii etilici ai acizilor grași), ce toxicitate are?**

Esterii etilici ai acizilor grași (FAEE), au fost propuși ca substitut pentru biodieselul clasic (esteri metilici ai acizilor grași) din dorința de a folosi doar materii prime regenerabile pentru obținerea lor [Stamenković, Veličković and Veljković, "The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives" *Fuel* (2011) 90: 3141-3155]. Succesul lor ca înlocuitori ai biodieselului clasic a fost însă redus datorită prețului sensibil mai mare al etanolului anhidru în comparație cu metanolul.

FAEE au fost însă identificați atât în natură (sunt componenți ai feromonilor albinelor [Calam, "Species and Sex-specific Compounds from the Heads of Male Bumblebees (*Bombus* spp.)" *Nature* (1969) 221: 856], și al componentelor volatile pentru marcarea teritoriului de către *Bombus terrestris* și *B. lucorum* [Calam, "Species and Sex-specific Compounds from the Heads of Male Bumblebees (*Bombus* spp)" *Nature* (1969)]) cât și în organismul uman (fac parte din lanțul metabolic de degradare neoxidativă a etanolului în organism [Laposata and Lange, "Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse" *Science* (1986) 231: 497-499]).

FAEE au căpătat utilizări în industria alimentară și cea a suplimentelor alimentare fiind folosiți inclusiv drept înlocuitor al acizilor grași omega-3 din uleiul de peste [Nordøy, Barstad, Connor and Hatcher, "Absorption of the n – 3 eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as ethyl esters and triglycerides by humans" *The American Journal of Clinical Nutrition* (1991) 53: 1185-1190]. FAEE sunt pe lista aditivilor alimentari permisi pentru adăugarea directă în alimentele pentru consumul uman [ 21CFR 172.515].

Acizii grași nesaturați se găsesc îndeosebi în uleiurile vegetale sau în cele de pește sub formă de trigliceride. Acidul mononesaturat cel mai răspândit este acidul oleic ( $\omega$ -9), el este un acid ce poate fi sintetizat de mamifere. Acizii polinesaturați, cum ar fi acidul linoleic ( $\omega$ -6) și linolenic ( $\omega$ -3) sunt considerați ca fiind acizi grași esențiali, ei nu pot fi sintetizați în organismul mamiferelor și trebuie obținuți dintr-o dietă echilibrată. Funcție de sex și vârstă necesarul zilnic de acizi grași esențiali este de 1-1,8 g/zi pentru  $\omega$ -3 și de 7-11 g/zi pentru  $\omega$ -6 [Simopoulos, "The Mediterranean Diets in Health and Disease" *The American Journal of Clinical Nutrition* (1991) 54: 771-771], adică într-un raport de 6-7 : 1  $\omega$ -6 la  $\omega$ -3.

**Problema tehnică** pe care o rezolvă invenția este identificarea și folosirea unui solvent obținut din uleiuri vegetale alimentare, care este permis a fi utilizat în compoziția suplimentelor alimentare, care are proprietăți benefice datorită conținutului de acizi grași esențiali și care poate fi utilizat și drept solvent pentru obținerea unor extracte de substanțe bioactive liposolubile.

Pentru demonstrarea calităților acestui tip de solvent s-au efectuat experimentări pentru sinteza (din uleiuri vegetale ca esteri ai acizilor grași) și caracterizarea lui precum și pentru extragerea unor principii active liposolubile din substraturi vegetale.

### Exemple de obținere și utilizare a FAEE

#### Exemplu 1 Obținerea FAEE din ulei de floarea soarelui, măsline, cânepă și camelină

Au fost selectate câteva uleiuri vegetale cu conținut reprezentativ de acizi grași esențiali: uleiul de floarea soarelui, de măsline, de cânepă (*Cannabis sativa*) și de camelină. Din aceste uleiuri au fost obținuți FAEE prin reacție cu etanol anhidru (de uz farmaceutic). S-a utilizat un raport molar ulei:etanol de 1:6 și o enzima de tip lipază.

Reacția s-a efectuat la 50°C, timp de 2 h. După reacție amestecul de reacție a fost separat și spălat cu apă acidulată în vederea îndepărtării excesului de etanol și a glicerinei. S-a obținut FAEE care a fost supus analizei cromatografice obținându-se compozițiile prezentate în tabelul 1.

Tabel 1 Compoziție FAEE din ulei de floarea soarelui, măsline, cânepă și camelină

Nr.	Acizi grași			Compoziție (% gr.)			
	Nr. atomi de carbon	Nr. duble legături	Denumire	Floarea soarelui	Măsline	Cânepă	Camelină
1	14	0	Miristic	0.08			
2	16	0	Palmitic	6.44	10.97	6.88	6.00
3	18	0	Stearic	3.55	2.91	3.16	2.42
4	20	0	Arahic		0.56	0.81	1.42
5	22	0	Behenic	0.70		0.26	
6	16	1	Palmitoleic	0.13	0.71	0.12	0.12
7	18	1	Oleic ( $\omega$ -9)	32.86	72.04	14.06	16.27
8	20	1	Eicosanoic	0.45	0.62	0.47	15.55
9	22	1	Erucic		0.15		3.91
10	18	2	Linoleic ( $\omega$ -6)	55.46	10.34	58.17	18.27
11	20	2	Eicosadienoic			0.13	1.99
12	18	3	Linolenic ( $\omega$ -3)	0.33	1.70	15.18	33.2
13	18	3	$\gamma$ -linolenic ( $\omega$ -6)			0.76	0.85

Esterii etilici obținuți din uleiul de floarea soarelui sunt bogați în esterii acizilor grași nesaturați  $\omega$ -6 și  $\omega$ -9, dar conținutul de esterii acizilor grași esențiali  $\omega$ -3 este foarte scăzut.

Esterii etilici obținuți din uleiul de măsline au drept component principal esterul oleic ( $\omega$ -9) dar au și un conținut scăzut de ester linolenic ( $\omega$ -3).

Pentru esterii etilici obținuți din semințele de cânepă, se observă ca raportul între esterii acizilor polinesaturați:mononesaturați:saturați este de 78:11:11. Conținutul ridicat de esterii

ai acizilor polinesaturați face ca acest produs sa fie puțin stabil la depozitare, fiind susceptibil la oxidare dar are efecte nutriționale benefice, îndeosebi în prevenirea afecțiunilor cardiace și a cancerului [Oomah, Busson, Godfrey and Drover, "Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil" *Food Chemistry* (2002) 76: 33-43] datorită raportului foarte bun între esterii acizilor grași esențiali  $\omega$ -6 :  $\omega$ -3 egal cu 3:1.

Pentru FAEE obținuți din ulei de camelină, conținutul de esteri etilici ai acizilor grași esențiali  $\omega$ -3 este foarte ridicat, fiind apropiat de conținutul de acizi grași  $\omega$ -3 din uleiul de pește [Sahena, Zaidul, Jinap, Yazid, Khatib and Norulaini, "Fatty acid compositions of fish oil extracted from different parts of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) using various techniques of supercritical CO<sub>2</sub> extraction" *Food Chemistry* (2010) 120: 879-885].

Vâscozitatea cinematică a esterilor etilici obținuți, determinată la 40°C, a fost de aproximativ 10 ori mai mica decât a uleiurilor din care proveneau încadrându-se în limitele 4.5 – 5 mm<sup>2</sup>/s. Această valoare scăzută îi recomandă ca fiind solvenți buni pentru extracția principiilor lipofile din plante.

#### Exemplu 2. **Extracția de $\beta$ -caroten din morcovi în solvenți organici: FAEE, ulei de floarea soarelui și hexan.**

Obiectivul experimentului a fost dovedirea și stabilirea capacităților extractive pentru  $\beta$ -caroten ale FAEE prin comparație cu un solvent clasic (hexan) și uleiul de floarea soarelui. S-a utilizat FAEE obținut din ulei de floarea soarelui, din ulei de măsline, din ulei obținut din semințe de cânepă sau din cel de camelină (vezi ex. 1). Diferențele înregistrate în concentrația compusului activ au fost mici, de aproximativ  $\pm 0.2$  mg / L.

$\beta$ -carotenul este un compus puternic hidrofob (cu un coeficient de repartiție în octanol ridicat ( $\log P$  octanol/apă  $\sim 15$ )), ce este aproape insolubil în medii apoase.  $\beta$ -carotenul este precursorul principal al vitaminei A și acționează în organism ca și antioxidant, protector la UV, inhibitor al degenerării maculare a cristalinelor ce conduce la cataracta [Prado, Veggi and Meireles, "Extraction Methods for Obtaining Carotenoids from Vegetables - Review" *Current Analytical Chemistry* (2014) 10: 29-66].

Substratul folosit pentru extragerea  $\beta$ -carotenului a fost morcovul (măruntit, uscat blând la 40°C și sitat pentru a separa fracția 315-630  $\mu$ m).

Pentru monitorizarea evoluției procesului de extracție s-a urmărit spectrul de absorbție electronică UV-Viz. Pentru evaluarea corectă a concentrației de  $\beta$ -caroten s-au utilizat coeficienții molari de extincție ai  $\beta$ -carotenului. Pentru ulei și în hexan au fost găsiți în literatura [Jeffrey, "Beta-beta-carotene" (1997)], iar pentru FAEE au fost determinați. S-a considerat banda de absorbție de la 453 nm. Extracțiile au fost realizate la o temperatură de 60°C, cu utilizarea a 2g morcov / 40 mL solvent.

Folosind valorile coeficientul de extincție pentru  $\beta$ -caroten, s-au calculat concentrațiile din extracții efectuate la timpi diferiți folosind ecuația lui Lambert-Beer ( $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$ ), rezultatele fiind prezentate în tabelul 2.

Tabel 2 Rezultate obținute la extracția  $\beta$ -carotenului din morcov în solvenții FAEE, hexan și ulei de floarea soarelui.

Timp, min	Concentrații $\beta$ -caroten (mg/L), pentru diferiți solvenți		
	FAEE	Hexan	Ulei de floarea soarelui
2	-	11.8	7.2
4.0	16.1	15.0	-
12	-	15.9	8.3
18.0	17.7	16.9	
30.0	18.6	18.6	10.9
40.0	20.3	18.9	12.2

Analizând datele prezentate în Tabelul 2 se observa că FAEE, deși are o vâscozitate mult mai ridicată decât a hexanului reușește să fie un solvent mai bun decât acesta. Uleiul de floarea soarelui determină obținerea celor mai scăzute concentrații de  $\beta$ -caroten.

### Exemplu 3. Extracția de $\beta$ -caroten și licopen din roșii în solvenți organici: FAEE, ulei de floarea soarelui și hexan.

Pelițele de roșii (tomate) sunt cunoscute ca fiind o resursă pentru  $\beta$ -caroten și pentru licopen.

Acesta din urmă are acțiune de prevenție a cancerului de prostată, de vezică, de pancreas și de colon datorită capacității sale de a lega chimic oxigenul singlet (de trei ori mai activ decât  $\beta$ -carotenul [Prado, Veggi and Meireles, "Extraction Methods for Obtaining Carotenoids from Vegetables - Review" *Current Analytical Chemistry* (2014) 10: 29-66] ).

Substratul folosit pentru extragerea  $\beta$ -carotenului și licopenului au fost pielețele de roșii (mărunțite, uscate blând la 40°C și sitate pentru a separa fracția <200  $\mu$ m).

Pentru calcularea concentrației de licopen și  $\beta$ -caroten s-au utilizat date din literatură [Fish, "Refinements of the attending equations for several spectral methods that provide improved quantification of  $\beta$ -carotene and/or lycopene in selected foods" *Postharvest Biology and Technology* (2012) 66: 16-22] ce folosesc pentru calcul următoarele ecuații ce iau în considerare valoarea absorbantei obținute la 450 și 503 nm.

Tabel 3. Ecuațiile folosite la determinarea concentrațiilor de licopen și betacaroten, funcție de absorbantele la 503 și 450 nm, pentru diferiți solvenți.

Hexan	$[Lycopene]_{\frac{mg}{L}} = 3.521A_{503} - 0.587A_{450}$	$[Betacaroten]_{\frac{mg}{L}} = 4.367A_{450} - 2.947A_{503}$
FAEE	$[Lycopene]_{\frac{mg}{L}} = 7.507A_{503} - 1.252A_{450}$	$[Betacarotene]_{\frac{mg}{L}} = 9.311A_{450} - 6.283A_{503}$
ulei	$[Lycopene]_{\frac{mg}{L}} = 7.153A_{503} - 1.192A_{450}$	$[Betacarotene]_{\frac{mg}{L}} = 8.871A_{450} - 5.987A_{503}$

Tabel 4 Rezultate obținute la extracția  $\beta$ -carotenului și licopenului din pielite de roșii în solvenții FAEE, hexan și ulei de floarea soarelui.

Timp, min	Concentrații obținute (mg/L), pentru diferiți solvenți					
	FAEE		Hexan		Ulei vegetal	
	licopen	caroten	licopen	Caroten	licopen	caroten
2	18.6	6.6	26.4	6.5	18.1	6.2
4	19.5	6.9	28.3	7.1	19.0	6.9
6			29.9	7.8		
10	21.1	7.7				
15	21.9	8.3	31.0	8.3	20.0	7.8
30	22.9	9.4	32.5	9.7	18.6	7.5
45	23.1	10.2	32.8	10.3	18.5	8.0
60	23.4	11.0	32.7	10.7	17.3	7.4

Din analiza datelor prezentate în tabelul 4 se poate observa că și în cazul extracției de principii active liposubile din pielițe de roșii solventul de tip FAEE este mai bun decât solvenții de tip ulei vegetal sau hexan în ceea ce privește carotenul și suficient de bun în ceea ce privește licopenul (este un solvent mai bun decât uleiul vegetal și ceva mai slab decât hexanul).



**Revendicări**

1. Obținerea din diverse uleiuri vegetale, prin cataliză enzimatică de esteri etilici ai acizilor grași, esteri ce pot fi utilizați drept solvenți biodegradabili și netoxici în prepararea de suplimente alimentare.
2. Datorită conținutului de acizi grași esențiali acești esteri pot fi ei înșiși folosiți ca supliment alimentar cu beneficiul extragerii și de compuși liposolubili bioactivi.
3. Raportul dintre acizii grași esențiali  $\omega$ -3 și  $\omega$ -6 poate fi reglat prin compoziția esterilor etilici obținuți din diferite uleiuri vegetale.
4. Toți esterii etilici obținuți au avut proprietăți foarte bune de solvent pentru extracția principiilor active liposolubile de tip caroteni, licopeni, etc.
5. Compoziția obținută, esteri etilici și compuși bioactivi liposolubili poate fi utilizată ca atare, drept supliment alimentar, iar raportul dintre acizii grași esențiali și compușii bioactivi liposolubili poate fi reglat prin alegerea potrivită a combinației de esteri etilici obținuți din diverse uleiuri și din condițiile de extracție a principiilor active liposolubile.

## DESCRIERE

## SOLVENT BIODEGRADABIL ȘI NETOXIC PENTRU EXTRAȚIA PRINCIPIILOR NATURALE LIPOSOLUBILE

Invenția se referă la un solvent biodegradabil și netoxic (esteri etilici de acizi grași) ce se poate obține din uleiuri vegetale cu conținut bogat în acizi grași esențiali. Acest solvent este testat pentru extracția unor principii active liposolubile din material vegetal (licopeni și caroteni). Extractul astfel obținut se poate folosi drept supliment alimentar fiind bogat în acizi grași esențiali dar și în principii naturale liposolubile.

*Scopul invenției este demonstrarea unei noi utilizări a esterilor etilici ai acizilor grași drept solvent biodegradabil și netoxic pentru extracția principiilor naturale liposolubile.*

**Ce sunt principiile naturale liposolubile**

În industria alimentară, dar mai ales în domeniul suplimentelor alimentare, dezvoltarea de produse ce conțin compuși bioactivi liposolubili este din ce în ce mai răspândită datorită efectelor benefice asupra sănătății și a renumelui câștigat în reducerea riscurilor de apariție a unor boli grave determinate de radicalii liberi (cancer, afecțiuni cardiace, îmbătrânire). Câteva exemple de astfel de compuși liposolubili bioactivi: vitamine liposolubile (A și E,  $\alpha$ -tocoferoli sau tocotrienoli), precursori ai vitaminei A ( $\beta$ -caroten), acizi grași  $\omega$ -3, fitosteroli, curcuminoide, etc. Încorporarea acestor principii bioactive liposolubile în soluții apoase este dificilă datorită solubilității scăzute, dar mai ales datorită sensibilității la lumină, căldură și oxigen.

**Care sunt solvenții utilizați în mod obișnuit**

Alegerea potrivită a unui solvent este de maximă importanță în realizarea proceselor de extracție și de purificare a produșilor naturali. Solventul trebuie să asigure o solubilizare cât mai bună a produșilor ce urmează a fi extrași, dar în același timp trebuie să nu fie toxic, să nu fie poluant și să fie sigur în utilizare (neinflamabil, stabil termic, inert chimic și necoroziv).

În domeniul extracției principiilor active din plante de tip solid-lichid solvenții utilizați se pot clasifica astfel (Chemat and Strube 2015):

- Soluții apoase;
- Solvenți organici;
- Lichide supercritice;
- Lichide ionice;

De regulă în evaluarea calității unui solvent trebuie considerat nu numai procesul de extracție ci și cel de purificare a produsului extras (distilare, cristalizare, extracție, utilizare membrane sau cromatografie, etc.). Situația în care solventul utilizat pentru extracție, nu trebuie separat de principiul activ ci poate fi folosit ca atare constituie un avantaj. Dacă solventul are și el proprietăți benefice este cu atât mai bine și astfel avem o metoda de punere în valoare atât a solventului cât și a principiului activ.

**Ce este FAEE (Esterii etilici ai acizilor grași), ce toxicitate are?**

Esterii etilici ai acizilor grași (FAEE), au fost propuși ca substitut pentru biodieselul clasic (esteri metilici ai acizilor grași) din dorința de a folosi doar materii prime regenerabile pentru obținerea lor (Stamenković, Veličković et al. 2011). Succesul lor ca înlocuitori ai biodieselului clasic a fost însă redus datorită prețului sensibil mai mare al etanolului anhidru în comparație cu metanolul.

FAEE au fost însă identificați atât în natură (sunt componenți ai feromonilor albinelor (Calam 1969), și al componentelor volatile pentru marcarea teritoriului de către *Bombus terrestris* și *B. lucorum* (Calam 1969)) cât și în organismul uman (fac parte din lanțul metabolic de degradare neoxidativă a etanolului în organism (Laposata and Lange 1986)).

FAEE au căpătat utilizări în industria alimentară și cea a suplimentelor alimentare fiind folosiți inclusiv drept înlocuitor al acizilor grași omega-3 din uleiul de pește (Nordøy, Barstad et al. 1991). FAEE sunt pe lista aditivilor alimentari permisi pentru adăugarea directă în alimentele pentru consumul uman [ 21CFR 172.515]. *Biodegradabilitatea bună a FAEE este descrisă în literatură (Makareviciene and Janulis 2003).*

Acizii grași nesaturați se găsesc îndeosebi în uleiurile vegetale sau în cele de pește sub formă de trigliceride. Acidul mononesaturat cel mai răspândit este acidul oleic ( $\omega$  -9), el este un acid ce poate fi sintetizat de mamifere. Acizii polinesaturați, cum ar fi acidul linoleic ( $\omega$  -6) și linolenic ( $\omega$  -3) sunt considerați ca fiind acizi grași esențiali, ei nu pot fi sintetizați în organismul mamiferelor și trebuie obținuți dintr-o dietă echilibrată. Funcție de sex și vârstă necesarul zilnic de acizi grași esențiali *pentru oameni* este de 1-1,8 g/zi pentru  $\omega$  -3 și de 7-11 g/zi pentru  $\omega$  -6 (Simopoulos 1991), adică într-un raport de 6-7 : 1  $\omega$  -6 la  $\omega$  -3.

***Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este o nouă utilizare a solventului biodegradabil și netoxic (esterii etilici ai acizilor grași) pentru extracția principiilor naturale liposolubile. Solventul utilizat poate fi obținut din uleiuri vegetale alimentare cu proprietăți benefice datorită conținutului de acizi grași esențiali.***

Pentru demonstrarea calităților acestui tip de solvent s-au efectuat experimentări pentru sinteza (din uleiuri vegetale ca esteri ai acizilor grași) și caracterizarea lui precum și pentru extracția unor principii *naturale* liposolubile din substraturi vegetale.

*Extracția principiilor active liposolubile s-a realizat prin punerea în contact a solventului cu materialul vegetal uscat în raport masic 20:1, la temperatura camerei sub agitare mecanică și protejat de lumină pentru a evita degradarea principiilor active.*

*Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:*

- *Principiile naturale liposolubile pot fi extrase cu un solvent ce este biodegradabil și netoxic;*
- *Acest solvent înlocuiește cu succes solvenți precum hexanul sau uleiul vegetal, având proprietăți mai bune decât aceștia;*

2  
I. Ail

- Acest solvent, obținut din uleiuri vegetale are conținut ridicat de acizi grași esențiali ( $\omega$ -3 și  $\omega$ -6), el nu trebuie separat de principiile naturale liposolubile ci poate fi utilizat împreună cu acestea, drept supliment alimentar;
- Raportul dintre acizii grași esențiali și compușii bioactivi liposolubili poate fi reglat prin alegerea potrivită a combinației de esteri etilici obținuți din diverse uleiuri și din condițiile de extracție a principiilor active liposolubile.

### Exemple de obținere și utilizare a FAEE

#### Exemplu 1 Obținerea FAEE din ulei de floarea soarelui, măsline, cânepă și camelină

Din ulei de floarea soarelui, de măsline, din cel obținut din semințe de cânepă (*Cannabis sativa*) și de camelină au fost obținuți FAEE prin reacție cu etanol anhidru (de uz farmaceutic). S-a utilizat un raport molar ulei:etanol de 1:6 și o enzima de tip lipază.

Reacția s-a efectuat la 50°C, timp de 2 h. După reacție amestecul de reacție a fost separat și spălat cu apă acidulată în vederea îndepărtării excesului de etanol și a glicerinei. S-a obținut FAEE care a fost supus analizei cromatografice obținându-se compozițiile prezentate în tabelul 1.

Tabel 1 Compoziție FAEE din ulei de floarea soarelui, măsline, cânepă și camelină

Nr.	Acizi grași			Compoziție (% gr.)			
	Nr. atomi de carbon	Nr. duble legături	Denumire	Floarea soarelui	Măsline	Cânepă	Camelină
1	14	0	Miristic	0.08			
2	16	0	Palmitic	6.44	10.97	6.88	6.00
3	18	0	Stearic	3.55	2.91	3.16	2.42
4	20	0	Arahic		0.56	0.81	1.42
5	22	0	Behenic	0.70		0.26	
6	16	1	Palmitoleic	0.13	0.71	0.12	0.12
7	18	1	Oleic ( $\omega$ -9)	32.86	72.04	14.06	16.27
8	20	1	Eicosanoic	0.45	0.62	0.47	15.55
9	22	1	Erucic		0.15		3.91
10	18	2	Linoleic ( $\omega$ -6)	55.46	10.34	58.17	18.27
11	20	2	Eicosadienoic			0.13	1.99
12	18	3	Linolenic ( $\omega$ -3)	0.33	1.70	15.18	33.2
13	18	3	$\gamma$ -linolenic ( $\omega$ -6)			0.76	0.85

Esterii etilici obținuți din uleiul de floarea soarelui sunt bogați în esterii acizilor grași nesaturați  $\omega$ -6 și  $\omega$ -9, dar conținutul de esterii acizilor grași esențiali  $\omega$ -3 este foarte scăzut.

Esterii etilici obținuți din uleiul de măsline au drept component principal esterul oleic ( $\omega$ -9) dar au și un conținut scăzut de ester linolenic ( $\omega$ -3).

Pentru esterii etilici obținuți din semințele de cânepă, se observă ca raportul între esterii acizilor polinesaturați: mononesaturați:saturați este de 78:11:11. Conținutul ridicat de esterii ai acizilor polinesaturați face ca acest produs să fie puțin stabil la depozitare, fiind susceptibil la oxidare dar are efecte nutriționale benefice, îndeosebi în prevenirea afecțiunilor cardiace și a cancerului (Oomah, Busson et al. 2002) datorită raportului foarte bun între esterii acizilor grași esențiali  $\omega$ -6 :  $\omega$ -3 egal cu 3:1.

Pentru FAEE obținuți din ulei de camelină, conținutul de esterii etilici ai acizilor grași esențiali  $\omega$ -3 este foarte ridicat, fiind apropiat de conținutul de acizi grași  $\omega$ -3 din uleiul de pește (Sahena, Zaidul et al. 2010).

Vâscozitatea cinematică a esterilor etilici obținuți, determinată la 40°C, a fost de aproximativ 10 ori mai mică decât a uleiurilor din care proveneau, încadrându-se în limitele 4.5 – 5 mm<sup>2</sup>/s. Această valoare scăzută îi recomandă ca fiind solvenți buni pentru extracția principiilor lipofile din plante.

#### **Exemplu 2. Extracția de $\beta$ -caroten din morcovi în solvenți organici: FAEE, ulei de floarea soarelui și hexan.**

Obiectivul experimentului a fost dovedirea și stabilirea capacităților extractive pentru  $\beta$ -caroten ale FAEE prin comparație cu un solvent clasic (hexan) și uleiul de floarea soarelui. S-a utilizat FAEE obținut din ulei de floarea soarelui, din ulei de măsline, din ulei obținut din semințe de cânepă sau din cel de camelină (vezi ex. 1). Diferențele înregistrate în concentrația compusului activ au fost mici, de aproximativ  $\pm 0.2$  mg / L.

$\beta$ -carotenul este un compus puternic hidrofob (cu un coeficient de repartiție în octanol ridicat ( $\log P$  octanol/apă  $\sim 15$ )), ce este aproape insolubil în medii apoase.  $\beta$ -carotenul este precursorul principal al vitaminei A și acționează în organism ca și antioxidant, protector la UV, inhibitor al degenerării maculare a cristalinului ce conduce la cataracta (Prado, Veggi et al. 2014).

Substratul folosit pentru extragerea  $\beta$ -carotenului a fost morcovul (mărunt, uscat blând la 40°C și sitat pentru a separa fracția 315-630  $\mu$ m).

Pentru monitorizarea evoluției procesului de extracție s-a urmărit spectrul de absorbție electronică UV-Viz. Pentru evaluarea corectă a concentrației de  $\beta$ -caroten s-au utilizat coeficienții molari de extincție ai  $\beta$ -carotenului. Pentru ulei și hexan au fost găsiți în literatură (Jeffrey 1997), iar pentru FAEE au fost determinați. S-a considerat banda de absorbție de la 453 nm. Extracțiile au fost realizate la o temperatură de 60°C, cu utilizarea a 2g morcov / 40 mL solvent.

4  
Zaidul

Folosind valorile coeficientului de extincție pentru  $\beta$ -caroten, s-au calculat concentrațiile din extracții efectuate la timpi diferiți folosind ecuația lui Lambert-Beer ( $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$ ), rezultatele fiind prezentate în tabelul 2.

Tabel 2 Rezultate obținute la extracția  $\beta$ -carotenului din morcov în solvenții FAEE, hexan și ulei de floarea soarelui.

Timp, min	Concentrații $\beta$ -caroten (mg/L), pentru diferiți solvenți		
	FAEE	Hexan	Ulei de floarea soarelui
2	-	11.8	7.2
4.0	16.1	15.0	-
12	-	15.9	8.3
18.0	17.7	16.9	
30.0	18.6	18.6	10.9
40.0	20.3	18.9	12.2

Analizând datele prezentate în Tabelul 2 se observă că FAEE, deși are o vâscozitate mult mai ridicată decât a hexanului reușește să fie un solvent mai bun decât acesta. Uleiul de floarea soarelui determină obținerea celor mai scăzute concentrații de  $\beta$ -caroten.

**Exemplu 3. Extracția de  $\beta$ -caroten și licopen din roșii în solvenți organici: FAEE, ulei de floarea soarelui și hexan.**

Pielilele de roșii (tomate) sunt cunoscute ca fiind o resursă pentru  $\beta$ -caroten și pentru licopen.

Acesta din urmă are acțiune de prevenție a cancerului de prostată, de vezică, de pancreas și de colon datorită capacității sale de a lega chimic oxigenul singlet (de trei ori mai activ decât  $\beta$ -carotenul (Prado, Veggi et al. 2014) ).

Substratul folosit pentru extragerea  $\beta$ -carotenului și licopenului au fost pielilele de roșii (mărunțite, uscate blând la 40°C și sitate pentru a separa fracția <200  $\mu$ m).

Pentru calcularea concentrației de licopen și  $\beta$ -caroten s-au utilizat date din literatură (Fish 2012) ce folosesc pentru calcul următoarele ecuații ce iau în considerare valoarea absorbantei obținute la 450 și 503 nm.

Tabel 3. Ecuatiile folosite la determinarea concentrațiilor de licopen și betacaroten, funcție de absorbanțele la 503 și 450 nm, pentru diferiți solvenți.

Hexan	$[Lycopene]_{\frac{mg}{L}} = 3.521A_{503} - 0.587A_{450}$	$[Betacaroten]_{\frac{mg}{L}} = 4.367A_{450} - 2.947A_{503}$
FAEE	$[Lycopene]_{\frac{mg}{L}} = 7.507A_{503} - 1.252A_{450}$	$[Betacarotene]_{\frac{mg}{L}} = 9.311A_{450} - 6.283A_{503}$
ulei	$[Lycopene]_{\frac{mg}{L}} = 7.153A_{503} - 1.192A_{450}$	$[Betacarotene]_{\frac{mg}{L}} = 8.871A_{450} - 5.987A_{503}$

Tabel 4 Rezultate obținute la extracția  $\beta$ -carotenului și licopenului din pielețe de roșii în solvenții FAEE, hexan și ulei de floarea soarelui.

Timp, min	Concentrații obținute (mg/L), pentru diferiți solvenți					
	FAEE		Hexan		Ulei vegetal	
	licopen	caroten	licopen	Caroten	licopen	caroten
2	18.6	6.6	26.4	6.5	18.1	6.2
4	19.5	6.9	28.3	7.1	19.0	6.9
6			29.9	7.8		
10	21.1	7.7				
15	21.9	8.3	31.0	8.3	20.0	7.8
30	22.9	9.4	32.5	9.7	18.6	7.5
45	23.1	10.2	32.8	10.3	18.5	8.0
60	23.4	11.0	32.7	10.7	17.3	7.4

Din analiza datelor prezentate în tabelul 4 se poate observa că și în cazul extracției de principii active liposubile din pielețe de roșii solvențul de tip FAEE este mai bun decât solvenții de tip ulei vegetal sau hexan în ceea ce privește carotenul și suficient de bun în ceea ce privește licopenul (este un solvent mai bun decât uleiul vegetal și ceva mai slab decât hexanul).

**Revendicări**

1. *Solventul biodegradabil și netoxic pentru extracția principiilor naturale liposolubile este caracterizat prin aceea că este format din esterii etilici obținuți din uleiuri vegetale.*
2. *Compoziția obținută între esterii etilici și principiile naturale liposolubile, conform revendicării 1, este caracterizată prin aceea că poate fi utilizată ca atare, drept supliment alimentar, iar raportul dintre acizii grași esențiali și compușii bioactivi liposolubili poate fi reglat prin alegerea potrivită a combinației de esterii etilici obținuți din diverse uleiuri și din condițiile de extracție a principiilor active liposolubile.*

