



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00991

(22) Data de depozit: 28/11/2018

(41) Data publicării cererii:
29/05/2020 BOPI nr. 5/2020

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

(72) Inventatori:
• NEAGU ELENA, STR. PORȚILE DE FIER
NR. 40A, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• PĂUN GABRIELA, STR. POSTĂVARUL
NR. 17, BL. O-28, SC. 3, AP. 35, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;

• RADU GABRIEL LUCIAN,
ALEEA ROTUNDA, NR.4, BL.H6, SC.D,
AP.61, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• ALBU CAMELIA, ALEEA CİSLĂU NR.12,
BL.9C, SC.1, ET.3, AP.15, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• UNGUREANU OANA RODICA,
STR. SERG.FLORESCU NICOLAE NR.110,
ET.1, AP.16, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;
• MOROEANU VERONICA IONELA,
STR.PLT.PETRE IONESCU, NR.51, BL.7,
SC.5, AP.285, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• BUZOIANU RODICA,
STR. CAPORAL ANGHELACHE IVAN
BL.M26, SC.1, ET. 2, AP. 8, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) TEHNOLOGIE DE OBTINERE DE FITOCOMPLECȘI
CONCENTRAȚI ÎN IZOFLAVONOIDE *DINTRIFOLIUM
PRATENSE* (TRIFOI ROȘU) PE BAZĂ DE PROCESE
SEPARATIVE SELECTIVE ȘI DIRIJATE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui fitocomplex concentrat în izoflavonoide din *Trifolium pratense* cu utilizări ca agent antihiperglicemic. Procedeul, conform invenției, constă în etapele de prelucrare primară a materialului vegetal, prepararea unui extract hidroalcoolic 10% masic în etanol de concentrație 50% prin ultrasonicare timp de 1 h la frecvența de 35 kHz, prefiltrare, urmată de microfiltrare prin membrane cu dimensiunea porilor de 0,22...0,45 μm, la presiunea de 2...4 bar, concentrare prin ultrafiltrare pe membrane de

ultrafiltrare cu cut-off de 1000...3000 Da, la presiunea de 8...9 bar, rezultând un fitocomplex având un conținut total de polifenoli de 1542...1550 mg/l exprimați în acid galic și conținut de flavone de 896...900 mg/l exprimate în rutin, și prezintă o activitate de inhibare a enzimelor α-amilază mai mare de 60% și α-glucozidază mai mare de 90%.

Revendicări: 1
Figuri: 3



33

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. ... a 2018 00994
Data depozit ... 28-11-2018

TITLUL BREVETULUI:

TEHNOLOGIE DE OBTINERE DE FITOCOMPLECSI CONCENTRATI IN IZOFLAVONOIDE DIN *TRIFOLIUM PRATENSE* (TRIFOI ROSU) PE BAZA DE PROCESE SEPARATIVE SELECTIVE SI DIRIJATE

Inventia se refera la utilizarea unei tehnologii pe baza de procese separative selective si dirijate pentru obtinerea unui fitocomplex concentrat in izoflavonoide din *Trifolium pratense*, cu posibile utilizari ca agent antihiperglicemic.

Trifolium pratense (fam. Fabaceae) – denumire populara: trifoi rosu, este o planta larg raspandita in Europa, care se utilizeaza atat ca planta medicinala cat si planta furajera. *T. pratense* contine si o gama larga de compusi polifenolici, saponine, rezine, acid salicilic, proteine, aminoacizi si derivati cumarinici. *T. pratense* este si o sursa foarte bogata de izoflavone continand genistein, daidzein, biochain A, calycosin, irilone, irilin B, prunetin, texasin, pseudobaptigenin, afrormosin si formononetin [Tsao R., Papadopoulos Y., Yang R., Chris Young J., Mcrae K. (2006), "Izoflavone profiles of red clovers and their distribution in different parts harvested at different growing stages", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(16), 5797-5805; Oleszek W., Stochmal A., Janda B. (2007), "Concentration of izoflavones and other phenolics in the aerial parts of *Trifolium* species", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 8095-8100].

Ca si planta medicinala, trifoiul rosu a fost mentionat in foarte putine tratate de specialitate. Grigore Gh. si Grigore C. in "Ghidul plantelor medicinale si al bolilor tratate cu plante", Editura All, p.124 (2007), mentioneaza utilizarea interna a florilor de trifoiu rosu pentru adenoama de prostate, colici abdominale, sindrom dispeptic gastric, bronsite, osteoporoza si imunostimulant, iar uz extern pentru eczeme de etiologii diverse, iar Ciulei I. si colaboratorii, "Plante medicinale, fitochimie si fitoterapie", vol. 2, Editura Medicala, p. 729 (1993), mentioneaza utilizarea florilor de trifoi rosu ca antitusiv, antiastmatic, pentru combaterea colicilor si ca antireumatic.

Izoflavonele sunt metaboliti secundari produsii predominant in plantele leguminoase, au o structura similara cu a estrogenului si prezinta o slaba afinitate pentru receptorii de estrogeni. Consumul de izoflavone sub forma de produse pe baza de soia sau suplimente alimentare este asociat cu protectia impotriva cancerului, bolilor cardiovasculare, osteoporozei, ameliorarea simptomelor menopauzei, tratamentul bolilor inflamatorii ale aparatului respirator, prevenirea leziunilor oxidative si a functiei cognitive [D. Kritz-Silverstein, D. Von Muhlen, E. Barrett-Connor, M.A.B. Bressel (2003), *Isoflavones and cognitive function in*

older women: The SOy and Postmenopausal Health In Aging (SOPHIA) Study Menopause-the Journal of the North American Menopause Society, 10(3) pp. 196-202; M. Messina, O. Kucuk, J.W. Lampe (2006), *An overview of the health effects of isoflavones with an emphasis on prostate cancer risk and prostate-specific antigen levels*, Journal of Aoac International, 89 (4) (2006), pp. 1121-1134; A.M. Dixit, D. Bhatnagar, V. Kumar, D. Chawla, K. Fakhruddin, Bhatnagar (2012), *“Antioxidant potential and radioprotective effect of soy isoflavone against gamma irradiation induced oxidative stress,”* Journal of Functional Foods, 4, pp. 197].

Izoflavonele pot aparea in patru forme chimice distincte: malonilglucozide, acetilglucozide, β -glucozide si aglicone. Activitatea biologica a izoflavonelor este atribuita agliconelor, daidzein si genistein, deoarece au o mai mare biodisponibilitate, se absorb mai repede si au activitate antioxidanta si estrogenica mai accentuata decat formele glicozilate sau metoxilate [K. Chen, Y. Lo, C. Liu, R. Yu, C. Chou, K. Cheng (2013), *“Enrichment of two isoflavone aglycones in black soymilk by using spent coffee grounds as an immobiliser for β -glucosidase”*, Food Chemistry, 139 pp. 79; F.S. Lima, E.L. Ida, (2014) *“Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones”* LWT – Food Science and Technology, 56 pp. 232-239].

Pana in prezent, au fost propuse mai multe tehnici de extractie a izoflavonelor, de la extractia clasica la caldura, extractia Soxhlet si extractia cu solvent sub presiune (Vacek, J., Klejdus, B., Lojko_v_a, L., Kub_an, V. (2008), *“Current trends in isolation, separation determination and identification of isoflavones: a review”*. J. Sep. Sci. 31, 2054-2067], la tehnici moderne, cum ar fi extractia asistata cu microunde [Kaufmann, B., Christen, P. (2002) *“Recent extraction techniques for natural products: microwave assisted extraction and pressurised solvent extraction”* Phytochem. Anal. 13, 105-113] si extractii cu fluid supercritic [Pyo, D., Yoo, J., Surh, J. (2009) *“Comparison of supercritical fluid extraction and solvent extraction of isoflavones from soybeans”*, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 32, 923-932].

Procesele membranare, au castigat o mare atentie in ultimul timp, fiind utilizate pe scara larga pentru separarea si concentrarea compusilor bioactivi din extractele vegetale. Aceste tehnologii sunt o buna alternativa la tehnologiile traditionale pentru concentrarea acestor tipuri de solutii datorita costurilor reduse de operare si intretinere, conditiilor de operare usoare privind presiunea si temperatura, absenta tranzitiei de faza si a cererii reduse de energie (Cissé et al., 2011; Conidi et al., 2012; Tsibranska and Tylkowski, 2013). Aceste tehnologii sunt de asemenea usor de controlat, permit separari inalt selective, nu necesita agenti sau aditivi chimici evitandu-se contaminarea produsului si pastrand astfel activitatea biologica a

compușilor de interes (Drioli, E., Romano, M., 2001. *Progress and new perspectives on integrated membrane operations for sustainable industrial growth*. Ind. Eng. Chem. Res. 40,1277-1300).

Dezvoltarea unor procese hibride bazate pe combinarea de operațiuni și tehnologiile de separare convenționale cu diferite tipuri de membrane ofera noi oportunități în ceea ce privește competitivitatea, îmbunătățirea calității, noutatea produsului, protejarea mediului [Cassano, A., Conidi, C., Ruby-Figueroa, R. (2014) "Recovery of flavonoids from orange press liquor by an integrated membrane process" Membranes 4, 509-524].

Prezenta invenție, comparativ cu metodele clasice utilizează procese membranare (micro- și ultrafiltrarea) pentru obținerea unor extracte de *Trifolium pratense* concentrate în izoflavone.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este elaborarea unei tehnologii pe baza de procese separative selective și dirijate pentru obținerea unui fitocomplex concentrat în izoflavonoide cu acțiune antioxidantă și capacitate de inhibiție a unor enzime cheie legate de patologia diabetului, care are următoarele etape:

- Prelucrarea primară a plantelor medicinale;
- Obținerea extractului vegetal;
- Prefiltrare;
- Microfiltrare;
- Ultrafiltrare;
- Obținere de extracte concentrate în izoflavonoide;
- Analiza calitativă și cantitativă a extractelor finale concentrate.

Materialul vegetal (frunze și flori) a fost mai întâi mărunțit fin cu ajutorul unei mori de macinat. S-a obținut apoi extractul hidroalcoolic 10% masă în 50% EtOH. Ca tehnică de extracție s-a utilizat macerarea cu agitare la temperatura camerei timp 1 ora, urmată de ultrasonicare timp de 1 ora.

Extractele brute au fost prelucrate printr-o tehnologie de laborator care integrează procesele membranare de *microfiltrare* și *ultrafiltrare* utilizând instalația de laborator KMS Laboratory Cell CF-1:

- microfiltrarea se realizează prin membrane cu dimensiunea porilor de 0.22 – 0.45 μm, la presiunea de 2 bar – 4 bar;

- ultrafiltrarea se realizează cu ajutorul membranelor de ultrafiltrare cu cut-off de 1.000 – 3.000 Da, la presiunea de lucru de 5 - 9 bar.

Extractele obtinute au fost analizate spectrofotometric si prin metode cromatografice (LC-MS) din punct de vedere al continutului de compusi biologic activi (polifenoli, flavone, izoflavone). De asemenea, a fost evaluata activitatea antioxidanta si de inhibitie a α -amilazei si α -glucozidazei, enzime implicate in patologia diabetului.

Se prezinta in continuare un exemplu de realizare prin procedeul descris a unui extract purificat si concentrat din *Trifolium pratense* cu activitate antioxidanta si activitate „*in vitro*” antiadiabetica.

Exemplul 1. Se realizeaza un extract hidroalcoolic prin macerarea a 100 g din partea aeriana de *Trifolium pratense* fin maruntita, cu ajutorul unei mori de macinare, cu 1 L etanol 50%. Dupa agitare la temperatura camerei timp 1 ora, extractul este ultrasonicat timp de 1 ora. Solutia extractiva se decanteaza, se filtreaza grosier, iar extractul brut obtinut este prelucrat prin urmatoarea succesiune de procese membranare: *microfiltrare* si *ultrafiltrare*. Microfiltrarea este realizata prin membrane de microfiltrare cu dimensiune porilor de 0.45 μ m, presiunea de 3-4 bar, iar pentru ultrafiltrare s-au utilizat membrane de celuloza regenerata cu cut-off de 1.000 Da; concentrarea s-a realizat in raportul 1:3 iar presiunea transmembranara a fost de 8 bar.

Extractul de *Trifolium pratense* are urmatoarele caracteristici

- ✓ Extract microfiltrat (MF):
 - aspect: lichid concentrat de culoare bruna
 - Polifenoli totali: 1180 ... 1196 mg/L exprimati in acid galic
 - Flavone: 830 ... 838 mg/L exprimate in rutin
- ✓ Extract concentrat (UF):
 - aspect: lichid concentrat de culoare brun inchisa
 - Polifenoli totali: 1542 ... 1550 mg/L exprimati in acid galic
 - Flavone: 896 ... 900 mg/L exprimate in rutin

Prin ultrafiltrare se obtin extracte concentrate cu o cantitate mai mare de principii active de interes (polifenoli si izoflavone).

Extractele obtinute au fost analizate prin *metode cromatografice* (HPLC-MS) pentru determinarea profilului polifenolic cu accent pe prezenta si concentrarea izoflavonelor (Tabelul 1 si Tabelul 2).

Tehnologia elaborata se caracterizeaza prin aceea ca se obtin extracte de *Trifolium pratense* cu un continut ridicat de flavone: *isoquercetin*, *kaemferol*, *isorhamnetin* si izoflavonoide:

genistein, daidzein, genistin. Extractele contin de asemenea, cantitati mari de izoflavonoide: *formononetin, pseudobaptigenin, calicosina, biocanin A, prunetin*.

Extractele concentrate obtinute prin procedeul descris in exemplul 1 prezinta si o activitate antioxidanta pronuntata studiată prin metodele ABTS [Rice-Evans, C., Miller, N.J., Meth.Enzymol., 234, 1994, p.279] si reducing power [Berker, K., Guclu, K., Tor, I., Apak, R., 2007, *Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents*. Talanta. 72, 1157–1165] (Figura 1 si Figura 2, atasate): 312.7mg/mL TEAC, respectiv 97.61 % reducing power, valoare apropiata de cea a vitaminei C (care a fost utilizata ca referinta): 316.01 mg/mL TEAC si respectiv: 94.5% reducing power.

Extractul concentrat obtinut prin tehnologia descrisa prezinta actiune antidiabetica *in vitro*, bazat prin inhibarea enzimelor α -amilaza (61.9%) si α -glucozidaza (92.2%), inhibitie mai mare decat cea a acarbozei, un medicament anti-diabetic utilizat pe scara larga (Figura 3). Ca urmare, extractele concentrate de *Trifolium pratense* obtinute prin tehnologia aplicata pot fi exploatate ca surse promitatoare in managementul controlului glucozei pentru persoanele cu diabet zaharat de tip 2.

Tabel 1. Valorile obtinute pentru compusi polifenolici in urma analizei HPLC-PDA-MS a extractului de *Trifolium pratense*

Compus	µg/mL	
	MF	Concentrat UF
Ac. elagic	-	-
Rutin	83.72	87.19
Isoquercetin	100.60	105.56
Luteolin	0.96	1.01
Quercetol	8.63	9.17
Ac. cafeic	5.43	5.83
Ac. rosmarinic	-	-
Ac. feluric	8.46	8.88
Ac. clorogenic	5.70	7.50
Isorhamnetin	4.90	5.38
Daidzein	2.03	2.94
Genistein	6.81	8.47
Ac. p-cumaric	3.32	3.85
Genistin	8.65	10.95
Kaemferol	17.37	19.11

Tabel 2. *Compusi polifenolici identificati folosind modul de achizitie SCAN al spectrometrului de masa din Trifolium pratense*

Compus	[M-H]-	<i>Trifolium pratense</i>
Catecol	109	-
Pirogalol	125	-
Tiramina	136	-
Acid p-hidroxybenzoic	137	+
Acid cinamic	147	-
Acid gentisic	153	+
Acid protocatecuic	153	-
Acid galic	169	+
Acid salicilic	197	-
Acid siringic	197	-
Pratensein	209	+
Acid sinapic	223	+
Crisina	253	-
Formononetin	267	+++
Naringenin	271	+
Pseudobaptigenin	281	+++
Calicosina	283	+++
Biocanin A	283	+++
Prunetin	283	+++
Fistein	285	+
Catechin	289	-
Epicatechin	289	++
Irilona	297	++
Miricetin	317	-
Quercitrin	447	+
Hesperidin	609	-

Revendicari

Revendicări depuse conform
art. 44 alin. 7 din legea nr. 64 / 1991
la data de 10 -01- 2019

1. Tehnologie pe baza de procese separative selective si dirijate pentru obtinerea unui fitocomplex concentrat in izoflavonoide din *Trifolium pratense*, care se caracterizeaza prin integrarea proceselor membranare de *microfiltrare* si *ultrafiltrare* si consta in:
 - ✓ prelucrarea primara a materialului vegetal (frunze si flori) prin maruntire fina cu ajutorul unei mori de macinat;
 - ✓ obtinerea extractului hidroalcoolic 10% masa in etanol concentratie 50% prin ultrasonicare timp de 1 ora la frecventa de 35 kHz;
 - ✓ prefiltrare urmata de microfiltrare prin membrane cu dimensiunea porilor de 0.22 – 0.45 μm , la presiunea de 2 bar – 4 bar;
 - ✓ concentrare prin ultrafiltrare, realizata prin membrane de ultrafiltrare cu cut-off de 1.000 – 3.000 Da, la presiunea de lucru de 8 - 9 bar.

Fitocomplexul concentrat in izoflavonoide, precum si alti compusi din clasa polifenoli din *Trifolium pratense* cu posibile utilizari ca agent antihiperglicemic, are un continut total de polifenoli de 1542 ... 1550 mg/L exprimati in acid galic si continut de flavone de 896 ... 900 mg/L exprimate in rutin si prezinta o activitate de inhibarea enzimelor α -amilaza (> 60%) si α -glucozidaza (>90%).

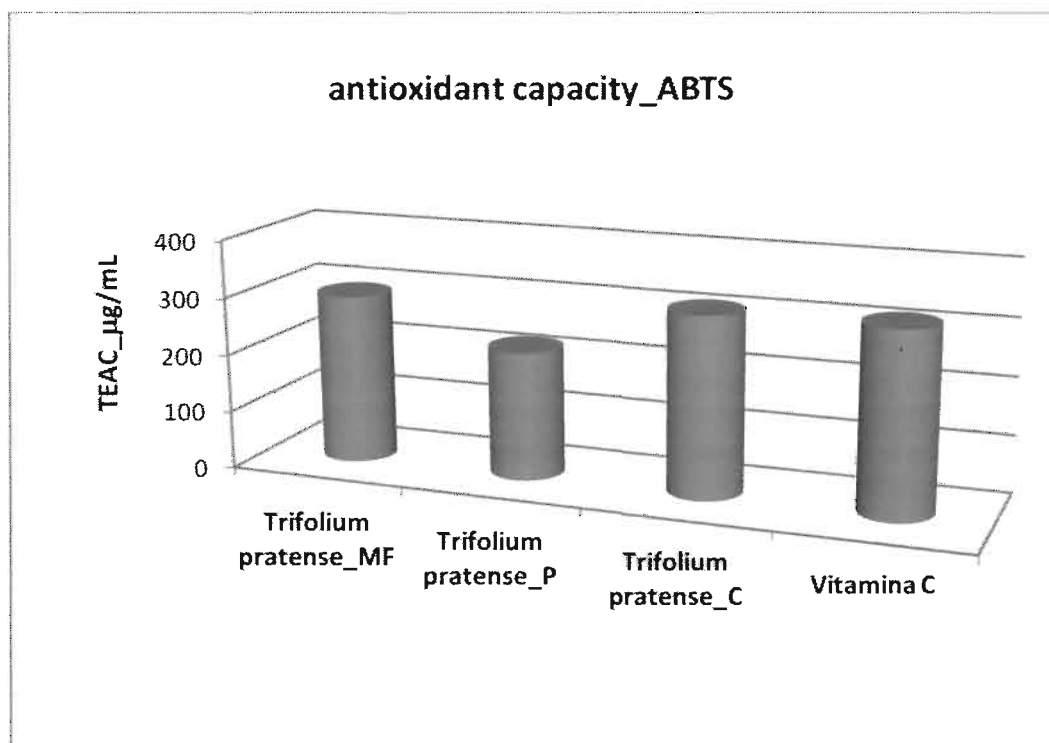


Figura 1. Determinarea activitatii antioxidante a extractelor prin metoda ABTS

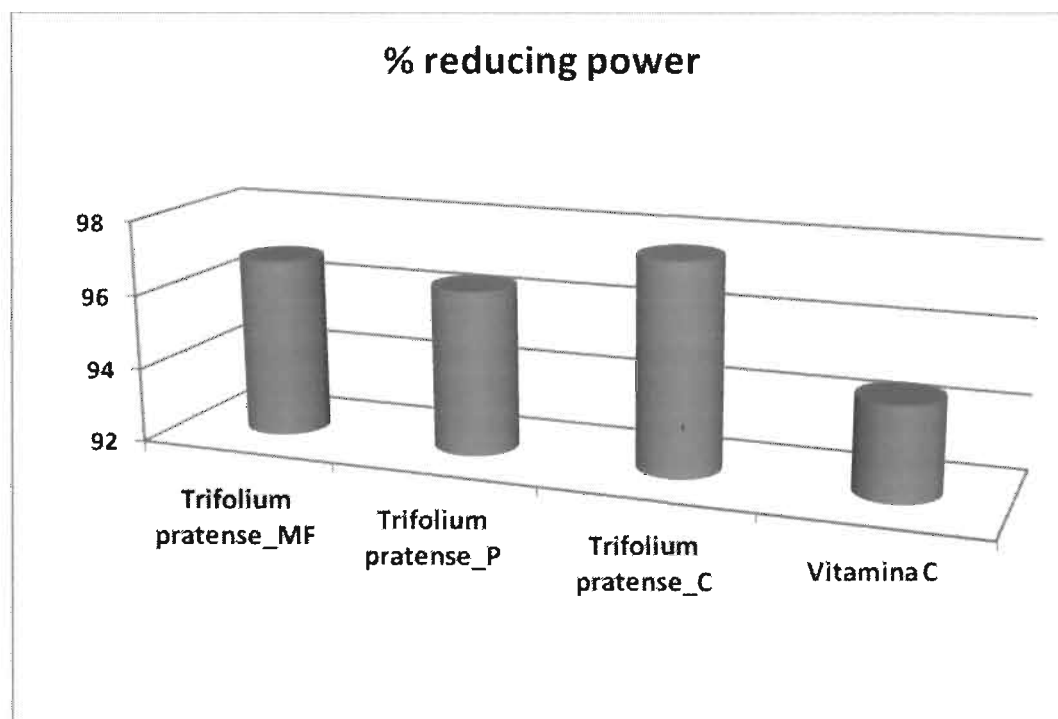


Figura 2. Activitatea antioxidanta a extractelor determinata prin reducing power

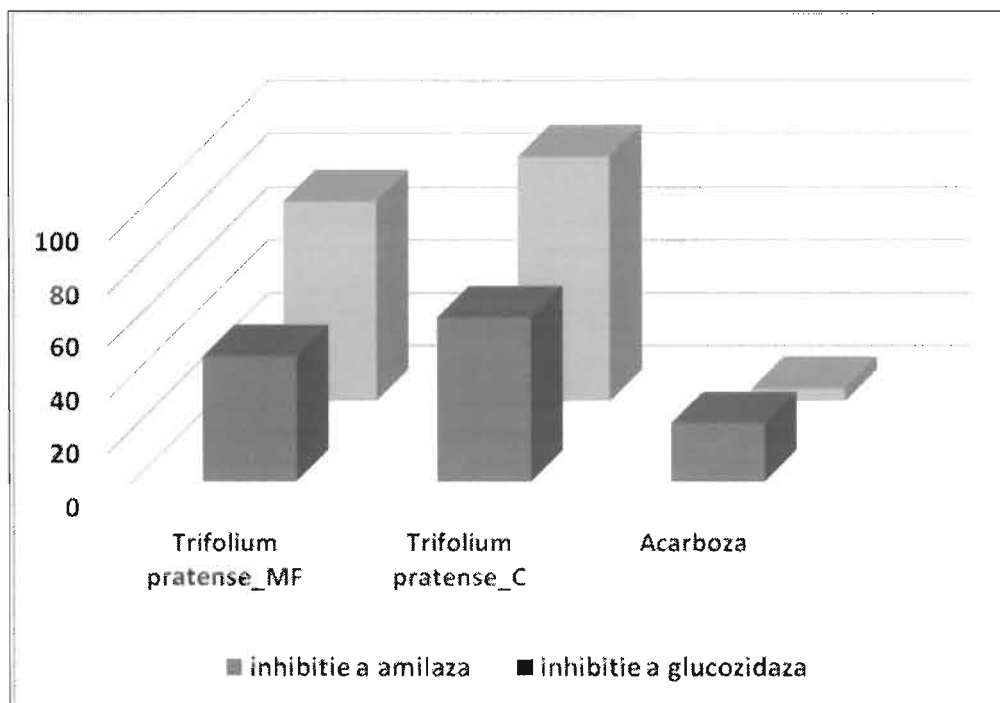


Figura 3. Efectul inhibitor al extractelor asupra α amilazei si α glucozidazei