



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00025

(22) Data de depozit: 22/01/2020

(41) Data publicării cererii:
30/10/2020 BOPI nr. 10/2020

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
DIN BUCUREȘTI - USAMVB,
BVD.MĂRĂȘTI, NR.59, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• ORTAN ALINA - RUXANDRA - EUGENIA,
BVD.LASCĂR CATARGIU, NR.5, AP.1,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;

• BABEANU NARCISA ELENA,
BVD.VIRTUȚII, NR.5, BL.R2, SC.2, AP.50,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• AVRAMESCU SORIN MARIUS,
STR. NICOLAE FILIMON NR. 30, BL. 17,
AP. 17, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• SPINU SIMONA,
STR.ALEXANDRU IOAN CUZA, NR.21,
BL.21, AP.12, TÎRGU-JIU, GJ, RO;
• DITU LIA MARA, BD. REPUBLICII
NR. 183, BL. 8C1, SC.A, ET. 8, AP. 31,
PLOIEȘTI, PH, RO;
• GEORGIEV MILEN, 79 GEORGI KIRKOV,
FL.2, AP.3, PLOVDIV, BG

(54) **EXTRACTE STANDARDIZATE DE MELISSA OFFICINALIS L.
- PROCEDEU DE OBȚINERE ȘI POTENȚIALA UTILIZARE
TERAPEUTICĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor extracte vegetale cu acțiune terapeutică de uz topic. Procedeu, conform invenției, constă în extracția asistată de microunde a materialului vegetal constând din părți aeriene de *Melissa officinalis L.*, utilizând ca solvent alcool etilic absolut, în raport 1:3...1:6, timp de extracție 10...35 min, puteremicrounde 700...1000 W, fără agitare, urmată de concentrare în evaporatorul

rotativ și uscarea prin liofilizare, rezultând extracte vegetale care prezintă concomitent activitate antioxidantă de 80...90% și activitate antimicrobiană determinată prin măsurarea zonei de inhibiție de 1...15 mm pentru *Staphylococcus aureus* și 9...12 mm pentru *Escherichia coli*.

Revendicări: 3



EXTRACTE STANDARDIZATE DE MELISSA OFFICINALIS L. - PROCEDEU DE OBTINERE SI POTENTIALA UTILIZARE TERAPEUTICA

Prezenta invenție se refera la o serie de extracte vegetale obtinute dintr- o specie a genului *Melissa*, fitoconstituentii majori fiind caracterizati cantitativ, la procedeul de obtinere si potentialele aplicatii terapeutice, antioxidante si antimicrobiene.

Melissa officinalis L., cunoscută în mod obișnuit ca roinita, este o plantă medicinală aparținând familiei Lamiaceae, cu un puternic miros specific; este frecvent utilizat în medicina populară din multe țări. Încă din cele mai vechi timpuri, când plantele erau folosite ca ceaiuri, decocturi sau erau folosite ca atare, *Melissa officinalis* L. a fost folosită pentru tratamentul bolilor mintale, a problemelor cardiovasculare și respiratorii, ca potențator de memorie, antidepresiv, anxiolitic, antiinflamator și antispastic. Studii recente au arătat proprietățile sale antihiperlipidemice, antiinflamatorii și antioxidante. Pe lângă utilizarea farmaceutică, alte aplicații industriale ale *Melissa officinalis* L. sunt legate de utilizarea sa în apicultură (roinita fiind cunoscuta și sub denumirea de balsam de albine sau balsam de miere), în industria alimentară și a lichiorurilor, în produsele cosmetice sau ca ornamente.

În funcție de specie, cultivar, zona geografică, metoda de extracție sau solvent are o compoziție bogată în acizi fenolici (acizii cafeic, litospermic, salvainolic, p-cumaric, clorogenic, elagic și rosmarinic), terpeni (acizii ursolic, oleanolic, triterpeni S-heterozidate - urseni și oleane), derivați monoterprenici (geranial, neral, citronelal, geraniol, acetat de geraniol, etc); derivați sesquiterprenici (β -Cariofilen, germacren, etc), etc.

Compușii fenolici sunt cel mai des întâlniți și contin grupul fitochimicelor care sunt de maximă importanță în fiziologia și morfologia plantelor. Diferențele în structura compușilor fenolici determină solubilitatea acestora în diverși solvenți cu polarități diferite; de aceea, tipul extracției și procedurile de izolare pot avea un rol important în randamentul de extracție al compușilor biologic activi. Obținerea extractelor din materialul vegetal presupune folosirea unor tehnologii și tehnici de extracție intensive, prin care să se obțină extracte bogate în principii active. Este știut că pe lângă principiile bioactive (fitocomplex), plantele (inclusiv cele medicinale) mai conțin substanțe secundare, substanțe inerte (balast) și substanțe care realizează structura scheletică a materiei vegetale. Din punct de vedere științific, respectiv farmacologic, substanțele secundare au rol în potențarea efectului terapeutic al principiilor active, iar substanțele inerte împiedică procesul de extracție al principiilor active. Substanțele care realizează structura scheletică a materiei vegetale se vor înlătura prin procesul de filtrare

Pentru separarea principiilor active de cele inerte trebuie să se țină cont de o serie de factori deosebit de importanți, pentru desfășurarea în condiții optime a procesului de extracție: natura produsului vegetal, solvenții utilizați pentru extracție, condițiile de extracție.

Utilizarea unei plante spontane cu o foarte bună distribuție naturală oferă o soluție de tratament ieftină prin potențialul său antioxidant și antimicrobial. *Melissa officinalis* L. reprezintă o foarte bună soluție pentru pregătirea unui produs de uz topic pe baza potențialului său farmacologic și a toxicității reduse.

Invenția de față se referă la obținerea unor extracte vegetale de *Melissa officinalis* L. și la evaluarea proprietăților antioxidante și antimicrobiene în vederea utilizării ca potențial tratament dermic. Obiectul invenției constă într-un procedeu de obținere a extractelor vegetale caracterizate cantitativ, la verificarea reproductibilității procesului și evaluarea activității antioxidante și antimicrobiene pe linii de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) și *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Brevetul US2421117A revendica un procedeu de obtinere a extractelor de plante utilizand di-etil eter si timp indelungat de extractie. In plus, procedeul este format si din etapa de inlaturare a solventului prin distilare suplimentara.

Brevetul WO2001007534A1 revendica un procedeu de obtinere a extractelor de plante utilizand carbune activ pentru indepartarea culorii extractului.

Brevetul WO2002094299A1 revendica extracte medicinale din scoarță, frunze și rădăcini de *Western Anacardium*, *Moringa oleifera*, *Sclerocarya birrea* si *Prosopis africana* utilizate in tratamentul diabetului.

Brevetul US8993005B2 revendica utilizarea extractului apos de *Melissa officinalis* ca baza activa pentru diverse formulari medicamentoase bogate in acid rosmarinic.

Brevetul WO2011070096A1 revendica un produs pentru tratamentul problemelor gastrointestinale bazat pe compusi extrasi din amestecul de plante *Chamomilla recutita*, *Melissa officinalis*, *Mentha x piperita*, *Carum carvi* si *Centaurium erythraea*.

Brevetul EP1349558A1 revendica o compozitie bazata pe extract de *Melissa* obtinut prin extractie in cloroform, acetona si etil acetat cu activitate anti-angiogenica si de inhibare a matricei metaloproteinizice.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția consta în dezvoltarea unui extract de material vegetal, fara utilizarea de reactivi periculosi mediului si a altor produse de sinteza chimica, fara utilizarea altor conditii predefinite extreme (temperatura, presiune, timp redus de reactie) care sunt consumatoare de energie, pentru potentiale aplicatii terapeutice (antioxidante si antimicrobiene).

Extractele conform inventiei sunt reprezentate de extracte vegetale etanolice din parti aeriene de *Melissa officinalis* L., cu un continut de polifenoli totali de 14.5...16.5 mg echivalenti acid galic /1 g extract uscat. Procedeul conform inventiei presupune utilizarea metodei de extractie asistata de microunde, utilizand ca solvent alcoolul etilic absolut, raportul de material vegetal : solvent de 1:3...1:6, timp de extractie 10...35 min, putere microunde 700...1000 W, fara agitare, umata de concentrarea la evaporatorul rotativ si uscarea prin liofilizare. Pentru verificarea reproductibilitatii procesului s-au realizat trei sarje in aceleasi conditii si s-au masurat amprentele extractelor prin cromatografie de lichide de inalta performanta (HPLC). Activitatea antioxidanta a fost determinata prin metoda spectrofotometrica colorimetrica 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) de 80...90%, iar activitatea antimicrobiana a fost determinata prin masurarea zonei de inhibitie de 11...15 mm pentru *Staphylococcus aureus* si 9...12 mm pentru *Escherichia coli*.

Soluția propusă, conform invenției, **înlătură dezavantajele** utilizarii substantelor chimice de sinteza in potentialele medicamentele de uz topic, prin aceea că utilizează materiale ieftine si naturale ce rezulta din extractiile de materiale vegetale, nu necesita substante si solventi toxici si/sau periculosi, prezinta toxicitate redusa si este fără acțiune negativă asupra mediului.

Avantajele aplicarii inventiei: extractele vegetale sunt obtinute printr-un procedeu cu randament bun de extractie al principiilor active, produsul obtinut este ecologic si natural, prezinta concomitent doua tipuri de actiune terapeutica: antioxidanta si antimicrobiana, prezinta potentiale aplicatii in tratamente naturale de uz topic, ce nu implica utilizarea substantelor de sinteza fata de care de-a lungul timpului s-a dezvoltat rezistenta crescuta.

Se dau în continuare patru exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1

Materialul proaspat constituit din partile aeriene ale speciei vegetale *Melissa* a fost recoltat si supus sortarii. Materia rezultata, denumita in continuare produs vegetal, contine mai putin de 0.4% impuritati provenite din alte specii si mai putin de 1.5% impuritati provenite din aceeaasi planta. Materialul vegetal a fost uscat la temperatura de 23°C pana la o umiditate de 10...12% si apoi la etuva la 40...45°C pana la o umiditate de 8...10%. Materialul vegetal uscat a fost macinat si sitat prin sita de 2 mm. Extractia s-a realizat prin metoda asistata de microunde,

utilizand ca solvent alcoolul etilic absolut, raportul de material vegetal : solvent de 1:3...1:6, timp de extractie 10...35 min, putere microunde 700...1000 W, fara agitare. Concentrarea s-a efectuat pe un evaporator rotativ, sub vid, la temperatura de 35 °C, pana la obtinerea unei suspensii apoase cu un volum de aproximativ 1/10 ori mai mic decat volumul initial. Uscarea solutiei extractive concentrata a fost realizata la o temperatura de liofilizare de -50 °C timp de 48 ore. Randamentul de obtinere a extractului uscat a fost de $21.38 \pm 1.55\%$. Extractul obtinut a fost conditionat in flacoane de sticla brune cu dop din pvc, si pastrat la intuneric si temperatura camerei. In aceste conditii au fost realizate trei sarje de produs pentru a se determina reproductibilitatea metodei.

Exemplul 2

0.100 g extract obtinut la exemplul 1 din fiecare sarja (S1, S2, S3) se dizolva in 10 ml etanol 50%. Solutiile se concentreaza la aproximativ 1 ml. Amprenta calitativa a polifenolilor se realizeaza prin metoda colorimetrica Folin Ciocalteu. Determinarea polifenolilor se realizeaza la 765 nm conform protocolului descris in literatura de specialitate [I. Fierascu, si colab. Rom. Biotechnol. Lett. 20 (2015) 10570–10580].

In tabelul 1, sunt prezentate concentratiile de compusi fenolici totali ai extractelor din cele trei sarje.

Tabelul 1

Sarja	Sarja 1-S1	Sarja 2-S2	Sarja 3-S3
Continut total de polifenoli (exprimat in mg echivalenti acid galic/1 g extract uscat)	15.54	15.32	15.67

Rezultatele determinarilor calitative au fost analizate statistic prin aplicarea testelor ANOVA si Tukey. Nu s-au inregistrat diferente statistice intre concentratiile de fenol total din cele trei sarje de extract ($p=0.4005$, $R^2 = 0.2612$). In urma analizei statistice s-a calculat procentul de compusi fenolici din extract ca fiind de 14.5...16.5 mg exprimat in echivalenti acid galic /1 g extract uscat.

Amprenta cantitativa a fitoconstituentilor se determina prin cromatografie de lichide de inalta performanta (HPLC). Analizele cromatografice au fost realizate pe un sistem HPLC prevazut cu un detector DAD, autosampler si coloana de tip Eclipse XDB-C18 (150 x 4.6 mm i.d., 5 µm dimensiune de particule) (Agilent) iar datele obtinute sunt prelucrate cu un software specific. Faza mobila consta din doua solutii diferite: solutia A (1% acid acetic in apa) si B (1% acid acetic in acetone). Solutiile se degazeaza si se filtreaza prin filtru Labtech Vp30 de 0.45 µm. Se opereaza in regim de gradient dupa urmatoarea procedura: de la 0-55 min faza B variaza de la 2 la 100% urmeaza etapa 55-60 min in care faza B ramane const la 100. In final se aplica un timp de 3 minute pentru echilibrarea coloanei la raportul initial A:B=96:4. Debitul de lucru este 1mL/min si volumul de injectie este de 10 µL. Detectia UV se realizeaza la 280 nm. S-au realizat curbe de calibrare pe 5 puncte construite pe fiecare compus analizat cu $R^2 > 0.999$, folosindu-se material standard pentru acid galic, acid clorogenic, rutin, acid ferulic, quercitin, apigenin, bergapten.

In tabelul 2, sunt prezentate concentratiile fitoconstituentilor extractelor din cele trei sarje de extract.

Tabelul 2

Sarja/compus (mg/100 g extract uscat)	Sarja 1-S1	Sarja 2-S2	Sarja 3-S3
acid galic	5,90	5.81	5.87

acid clorogenic	8,92	8.78	8.90
rutin	8,62	8.59	8.65
acid ferulic	11,90	11.88	11.92
quercitin	119,80	119.2	119.63
apigenin	0,37	0.35	0.39
bergapten	0,89	0.84	0.90

Exemplul 3

Pentru extractul de la exemplul 1, pentru cele trei sarje, s-a determinat activitatea antioxidantă prin metoda spectrofotometrică colorimetrică 2,2-difenil-1-picrylhidrazil (DPPH), prin măsurarea absorbantei la 517 nm conform protocolului descris în literatura de specialitate [I. Fierascu, și colab. Rom. Biotechnol. Lett. 20 (2015) 10570–10580].

Rezultatele determinarilor individuale sunt prezentate în tabelul 3.

Tabelul 3

Sarja	Sarja 1-S1	Sarja 2-S2	Sarja 3-S3
Activitate antioxidantă (%)	85.6	84.9	85.2

Exemplul 4

Extractul obținut la exemplul 1 a fost testat din punct antimicrobian prin testarea calitativă și a activității antibacteriene pe *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) și *Escherichia coli* (ATCC 25922). Pentru realizarea experimentului au fost realizate 2 pasaje succesive, prin trecerea tulpinilor bacteriene pe mediu geloză nutritivă și incubare timp de 24 h, la 37 °C. Pentru realizarea experimentului, din cultura tânără s-a realizat o suspensie celulară în AFS (Apă fiziologică sterilă) (suspensia de lucru) cu densitate celulară la valoarea finală de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (Unități Formatoare de Colonii/ml) corespunzătoare standardului McFarland 0.5. Pentru testarea activității antimicrobiene a probelor mai sus menționate, la concentrația de lucru de 10 mg/ml, s-a utilizat metoda difuzimetrică adaptată (adaptare după CLSI, 2019). Astfel, pentru fiecare specie bacteriană testată s-a realizat un inocul cu densitate standard 0,5 MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml), în AFS (apă fiziologică sterilă). Inoculul a fost insamantat în panză, cu tamponul steril, la suprafața mediu LB solid. Ulterior, peste inocul, s-au repartizat în spot, câte 10 μ l probă la concentrația de lucru. Plăcile au fost lasate în repaus la temperatura camerei pentru adsorbția picăturii de soluție în mediu, după care plăcile au fost incubate la 37°C, cu capacul în jos, timp de 24 de ore. Activitatea inhibitorie a fost evaluată prin apariția unei zone de inhibare a creșterii în jurul fiecărui spot și măsurarea diametrului acesteia.

Rezultatele măsurării zonei de inhibiție sunt prezentate individual în tabelul 4.

Tabelul 4

Sarja/Linie microbiana	Sarja 1-S1 Zona de inhibiție (mm)	Sarja 2-S2 Zona de inhibiție (mm)	Sarja 3-S3 Zona de inhibiție (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	13	12	13
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	10	11	11

Revendicări

1. Extracte vegetale obtinute din *Melissa officinalis* L. **caracterizate prin aceea ca acestea** contin acid galic, acid clorogenic, rutin, acid ferulic, quercitin, apigenin, bergapten si cuprind 14.5...16.5 mg echivalenti acid galic /1 g extract uscat.
2. Procedeu de obtinere a extractelor vegetale de *Melissa officinalis* L. caracterizat prin aceea ca Batoane din material fibros de plante oleaginoase **caracterizate prin aceea ca** utilizeaza ca solvent alcoolul etilic absolut, raportul de material vegetal : solvent de 1:3...1:6, timp de extractie 10...35 min, putere microunde 700...1000 W, fara agitare, este urmata de concentrarea la evaporatorul rotativ si uscarea prin liofilizare.
3. Extracte vegetale conform revendicarilor 1 si 2 **caracterizate prin aceea ca prezinta concomitent activitate** antioxidanta de 80...90% si activitate antimicrobiana determinata prin masurarea zonei de inhibitie de 11...15 mm pentru *Staphylococcus aureus* si 9...12 mm pentru *Escherichia coli*.