



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00842

(22) Data de depozit: 26/10/2018

(41) Data publicării cererii:
30/05/2022 BOPI nr. 5/2022

(71) Solicitant:
• BIOTEHNOS S.A., STR. GORUNULUI
NR. 3-5, OTOPENI, IF, RO

(72) Inventatori:
• ZGLIMBEA LENUȚA, STR. DREPTĂȚII
NR. 8, BL. O 10, SC. 1, ET. 7, AP. 48,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• OLARIU LAURA, STR. LAINICI NR. 22,
ET. 2, AP. 5, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,
RO;
• DUMITRIU BRÂNDUȘA, STR. DORNEI
NR. 5, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• STANCIU LARISSA MIHAELA,
BDUL. CAMIL RESSU, NR. 3, BL. 13A, SC. A,
ET. 5, AP. 24, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;

• DINCĂ GABRIELA,
STR. DIMITRIE GROZDEA NR. 10, BL. 82,
SC. 1, ET. 1, AP. 6, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• JURCOANE ȘTEFANA, STR. BODEȘTI
NR. 5, BL. K8, SC. A, ET. 5, AP. 24, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• CRISTEA STELICĂ, INTRAREA BISERICA
ALBĂ, NR. 3, ET. 5, AP. 9, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• NIȚĂ ROXANA ANDREEA, STR. PRAVĂȚ
NR. 20, BL. P 9, SC. 7, ET. 4, AP. 140,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• PAPACOCEA IOANA RALUCA,
ȘOS. MIHAI BRAVU, NR. 296, BL. 7, SC. C,
ET. 8, AP. 107, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) **PROCEDEU ECOLOGIC DE VALORIFICARE A UNUI DEȘEU
VEGETAL DIN SOLANUM LYCOPERSICUM ȘI PRODUSE
ANTIFUNGICE OBȚINUTE PRIN ASOCIEREA UNOR
EXTRACTE DIN PLANTE, CU APLICABILITATE ÎN
TRATAMENTUL TOPIC AL INFECȚIILOR CUTANATE ȘI ÎN
CONTROLUL PATOGENILOR SPECII LOR POMICOLE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui extract glicoalcaloidic și la produse antifungice conținând extractul menționat, utilizate în tratamentul topic al infecțiilor cutanate și în controlul patogenilor speciilor pomicole și horticole. Procedeu, conform invenției, utilizează drept materie primă vegetală lăstarii-deșeu rezultați din copilirea plantei *Solanum lycopersicum*, care, după uscare și măcinare, este extrasă succesiv în două trepte, după care soluțiile obținute sunt reunite într-o instalație de separare prin decantare și supuse operației de precipitare a α -tomatinei și dehidrotomatinei prin adăugare de soluție de sodă caustică 40%, depozitul obținut este centrifugat, iar pasta onctuoasă obținută este uscată sub vid, rezultând un extract brut

uscat, care este măcinat până la obținerea unei pulberi fine cu un conținut de substanță uscată de minim 90% și de α -tomatină de minim 10%, urmând purificarea extractului glicoalcaloidic brut în alcool etilic și distilarea soluției în vederea cristalizării α -tomatinei și dehidrotomatinei, care sunt separate de soluție prin filtrare sub vid și distilare, fie până la un raport de concentrare 8:1...10:1, obținându-se un extract denumit extract glicoalcaloidic purificat, fie până la obținerea unui reziduu uscat, rezultând un extract sub formă de pulbere denumit extract glicoalcaloidic.

Revendicări: 7



**PROCEDEU ECOLOGIC DE VALORIFICARE A UNUI DESEU VEGETAL DIN
SOLANUM LYCOPERSICUM SI PRODUSE ANTIFUNGICE OBTINUTE PRIN
 ASOCIAREA UNOR EXTRACTE DIN PLANTE, CU APLICABILITATE IN
 TRATAMENTUL TOPIC AL INFECTIILOR CUTANATE SI IN CONTROLUL
 PATOGENILOR SPECIILOR POMICOLE**

Domeniul tehnic:

Prezenta inventie se refera la un procedeu tehnologic prin care se valorifica un deseu vegetal al plantei *Solanum lycopersicum* pentru obtinerea extractului glicoalcaloidic, si la asocierea acestui extract cu uleiul de *Camelina sativa*, bogat in acizi grasi esentiali, pentru obtinerea de produse antifungice utilizate in tratamentul topic al infectiilor cutanate si in controlul patogeniilor speciilor pomicole si horticole.

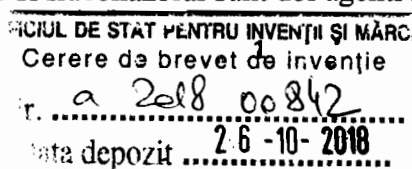
Procedeu de obtinere a extractului glicoalcaloidic din *Solanum lycopersicum* consta in recoltarea lastarilor la copilirea plantei, prelucrarea prin uscare, macinare, extractie in doua etape, separare si purificare, cu obtinerea extractului de culoare galbui-verzuie, insolubil in apa, denumit extract glicoalcaloidic ce contine un amestec de α -tomatina si dehidrotomatina, cu minim 60% α -tomatina care prin purificare avansata duce la extractul glicoalcaloidic sub forma pulbere insolubila in apa, de culoare alba, denumit extract glicoalcaloidic purificat ce contine un amestec de α -tomatina si dehidrotomatina de minim 90% α -tomatina.

Produsele topice de uz dermatologic contin conform inventiei, ca substante biologice active extractul glicoalcaloidic din *Solanum lycopersicum* si uleiul de *Camelina sativa*, in diferite proportii si anume: 0.01%...1.5% extract glicoalcaloidic cu un continut de 60...90% α -tomatina si 2...12% ulei de camelina, in produse conditionate - cu glicoalcaloid solubilizat sau in suspensie - sub forma de lotiune, crema, gel, micro / nano emulsii sau pulbere cutanata.

Preparatul fitosanitar pentru controlul speciilor pomicole, se realizeaza prin asocierea a 0.1%...5% extract glicoalcaloidic cu 3%...18% ulei de *Camelina sativa* si se conditioneaza fie sub forma unei suspensii bifazice care se agita inainte de stropirea pomilor, fie sub forma a doua componente distincte, faza apoasa - suspensie concentrata si faza uleioasa, care se combina inainte de utilizare.

Stadiul cunoscut al tehnicii:

Infectiile microbiene reprezinta una dintre problematicile majore privind sanatatea umana. Dintre acestea, micoza este o boala frecventa la nivel mondial in patologia infectioasa care se manifesta fie ca infectie primara - in special la organismele imunodeprimate, fie ca si co-infectie. Amfotericina B si fluconazolul sunt doi agenti importanti utilizati in chemoterapia



antifungica umana. Desi eficienta lor este buna, s-au raportat efecte adverse semnificative. Fluconazolul este prin structura sa un fungistatic, dar s-au raportat cazuri, pe tulpini de *Candida* recoltate din clinica, de rezistenta la acest produs (Patra M. si colab., 2003; Albertson G.D. si colab., 1996). Prin prisma sigurantei la administrare, inlocuirea agentilor terapeutici de sinteza cu cei naturali devine un subiect de actualitate (A.N. Devkate si colab., 2005; Gupta S.M. si colab., 2014). Utilizarea lor pe termen lung, impusa de specificitatea tratamentului anti-micotic si anti-bacterian cutanat, previne reactii adverse majore. Exemple de agenti antifungici naturali sunt: uleiuri esentiale (ceai verde, Lemon grass, Citronella, etc) cu actiune anti-*Candida albicans* (Hammer K.A. si colab, 1998).

Printre compusii vegetali cu rol in fitoprotectia plantelor, cu proprietati fungicide, antibiotice si insecticide, se numara si saponinele de tip glicoalcaloidic. Pana acum, saponinele prezente in plantele din genul *Solanum* au fost utilizate drept intermediari in sinteza corticosteroizilor, hormonilor sexuali si a contraceptivelor. Exista numeroase studii care evidentiaza efectele saponinelor asupra patogenilor. Acestea maresc permeabilitatea membranelor celulare, formand pori (I.Chaieb, 2010). Actiunea hemolitica a saponinelor este rezultatul afinitatii agliconului pentru sterolii membranari, in principal colesterol, cu care formeaza complexe insolubile. Cantitatea de glicozide necesara pentru permeabilizare este mult mai mica pentru straturile lipidice bogate in colesterol decat pentru cele fara colesterol membranar (V.Simons si colab., 2006).

Activitatea biologică a glicoalcaloizilor din *Solanum* se bazează pe două mecanisme (Ginzberg și colab., 2009; Sinani și colab., 2017): (a) afectarea activității sistemului nervos central (SNC) prin inhibiția acetilcolinesterazei (responsabilă de finalizarea transmisiunii colinergice la nivelul joncțiunii neuromusculare și al SNC) și a butirilcolinesterazei si (b) afectarea integrității membranei celulare prin crearea de rupturi la nivelul membranei celulare, printr-o reacție de complexare cu 3β-hidroxi-steroli.

Studiile au arătat că glicoalcaloizii nu au rol in creșterea și hranirea plantelor (Sinani și colab., 2017) ci in cadrul mecanismelor de aparare ale acestora, producția lor masivă de către plante fiind activată în condiții de stres (Chowánski și colab., 2016). Glicoalcaloidul α -tomatină inhiba creșterea și dezvoltarea gândacului de Colorado, a puricelui de frunze, a *Tribolium castenum*, *Manduca sexta* și molusca *Biomphalaria glabrata*. *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* și *Penicillium notatum* au fost inhibitate de extractul proaspăt de tomate, dar în cazul *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* s-a evidentiat fitotoxicitatea acestuia la doze care nu reduc sporularea fungilor (Milner și colab., 2011).



Extracțele din diferite părți de tomate prezintă activitate antimicrobiană împotriva: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria ivanovii*. Cea mai puternică activitate au prezentat-o extracțele din frunze. Activitatea poate fi pusă pe de o parte pe seama compușilor fenolici, iar pe de altă parte pe seama glicoalcaloizilor din extract și anume tomatină și tomatidină. Totodată nu este exclusă posibilitatea unui efect sinergic al fenolilor și glicoalcaloizilor. Cercetările au arătat că tomatina are efect inhibitor, iar tomatidina are efect bacteriostatic asupra *Staphylococcus aureus* SCV (Beltran și colab., 2015) În fitoterapia autohtonă (*C. Parvu*), se folosește un decoct din frunze și lujeri de tomate (*Solanum lycopersicum*), de uz extern pentru tratarea reumatismului degenerativ și a periartritei scapulo-umerale. De asemenea, pentru întepaturile de insecte, se freacă locul respectiv cu frunze proaspete de tomate.

Cercetările din ultima perioadă au arătat că saponinele de tip glicoalcaloidic pot fi valorificate în diverse aplicații datorită proprietăților biologice demonstrate: inhibiția creșterii bacteriilor Gram pozitive, antiinflamatoare, antiparazitare, antitumorale, etc..

Astfel, F. Mendel și colab. (2009) pornind de la ideea că plantele de *Solanum lycopersicum* sintetizează glicoalcaloizii dehidrotomatina și α -tomatina ca un posibil proces de apărare față de fungi, virusi și insecte, au realizat un studiu pe 6 extracțe obținute din fructele verzi și coapte ale plantei, investigând abilitatea acestora de a induce necroza celulară în linii de cancer uman. Comparativ cu martorul netratat, extractul din tomate verzi a inhibat semnificativ celulele aparținând liniilor standardizate de cancer de: sân (MCF-7), colon (HT-29), gastric (AGS), ficat (HEPG2). Utilizând tomatina comercială Sigma ce reprezintă un amestec de dehidrotomatina și α -tomatina (în proporție 1:10), s-a realizat separarea acestora și introducerea în studiu a substanțelor purificate, evidențiindu-se efectul puternic inhibitor, dependent de doza al tomatinei, pentru cancerul de colon și hepatic. Susceptibilitatea celulelor hepatice de cancer uman a fost mai mare față de tomatina decât față de doxorubicina, medicament comercial anticanceros. Autorii prezintă efecte biologice ale tomatinei, dovedite științific: creșterea imunității, regresia celulelor T în tumorile experimentale limfatice, efecte antiinflamatoare și antibiotice față de o serie de microorganisme. Pentru obținerea extracțelor intrate în studiu, fructele verzi și coapte (rosii) au fost maruntite și amestecate cu metanol ce conține acid acetic 2%. Amestecul rezultat a fost concentrat într-un rotavapor într-un raport 1/50, și concentratul obținut s-a dizolvat într-o soluție 0,2 N de HCl și centrifugat la 18 000g, 5 minute, la 5°C; supernatantul obținut se tratează cu NH₄OH concentrat, precipitând glicoalcaloidul; soluția ce conține glicoalcaloidul se încălzește la 65°C, pe baie de apă timp de



15 minute si se refrigereaza peste noapte; precipitatul obtinut se centrifugheaza si apoi se spala cu solutia de NH_4OH 2%; amoniacul se disipeaza si rezulta pelete ce sunt uscate la 30°C sub presiune, apoi pentru purificare se dizolva in solutie 2% acid acetic in metanol, se centrifugheaza si se separa supernatantul ce reprezinta extractul de glicocalcoizi.

Brevetul US 2014147523 (A1)-2014-05-29, propune utilizarea unor extracte din *Solanum esuriale* si *Solanum glaucophyllum* in produse cosmetice pentru ingrijirea pielii uscate, xerotice sau imbatranite.

Din *Solanum tuberosum*, conform brevetului KR20140024509 (A)-2014-03-03, se obtine un preparat peptidic cu proprietati antifungice ce poate fi utilizat atat in compozitii farmaceutice si cosmetice drept conservant, cat si ca agent chimic in agricultura.

Inventia NZ 598 234 (A)-2013-10-25 propune un tratament pentru preventia inflamatiei si fotodeteriorarea pielii, utilizand un extract izolat din plante ce apartin genului *Solanum*. Extractul obtinut este solubil in apa si contine un amestec de minim 60% solamargina si solasonina. Solventul utilizat pentru extractie este o solutie apoasa de acid acetic cu $\text{pH}=4$; etapa de alcalinizare se realizeaza cu hidroxid de amoniu iar pulberea uscata obtinuta se purifica prin mai multe etape de dizolvare, separare lichid-lichid, centrifugare, utilizand solventi si amestec de solventi: cloroform-metanol-apa, rezultand in final din faza apoasa prin liofilizare un extract solubil in apa de culoare galbuie.

In brevetul TWI 300352(B)-2008-09-01 se prezinta o compozitie farmaceutica cu activitate inhibitoare fata de celulele canceroase, obtinuta pe baza unui extract solubil in apa cu o concentratie cuprinsa intre 60-90% de solamargina si solasonina, izolat din plantele *Solanum nigrum* sau *Solanum incanum*. Procedeu consta dintr-o succesiune de etape, si anume: extractia plantei cu solutie apoasa acida, la $\text{pH}=3-5$, ajustarea extractului obtinut cu o baza la $\text{pH}=8-10$, spalarea precipitatului format cu apa, uscarea, purificarea acestuia cu un amestec de cloroform si etanol, diluarea cu apa si uscarea fazei apoase pana la consistenta unei pulberi, solubile in apa.

Din planta intreaga de *Solanum lycocarpum*, dar de preferat din fructele proaspete sau uscate, in brevetul EP 0792646 (A1)-1997-09-03 se prezinta obtinerea unui extract lichid utilizat intr-o compozitie cosmetica sau dermofarmaceutica, pentru proprietatile antiaging, regeneratoare a celulelor cutanate, antiinflamatoare si impotriva caderii parului. Procedeu de obtinere a extractului presupune extractia prin oricare dintre metodele: macerare, lixiviere, decoctie, in contracurent, cu ultrasunete, microunde, asociate sau nu cu un solvent; solventul de extractie poate fi ales dintre apa, propilenglicol, eter metilic, etilic, diglicoli policiclici,



etoxilati, propilxilati in amestec sau nu. Procedul presupune un pretratament al plantei cu alcool etilic concentrat timp de 2 ore, solutia obtinuta se indeparteaza si planta ramasa se supune unei metode de extractie cu unul dintre solventii mentionati. Dupa separarea prin filtrare si indepartarea plantei, extractul obtinut se purifica prin trecere pe carbune activ. Produsul obtinut este un lichid clar, stabil, bogat in acizi organici, vitamine, zaharuri, derivati ai acidului galic. Inventia se poate aplica si la alte specii de *Solanaceae* printre care si *Solanum lycopersicum*.

Brevetul US 2017348 222 (A1)-2017-12-07 prezinta un procedeu si o compozitie cosmetica ce utilizeaza extracte obtinute din plante ce apartin genului *Solanum*, inclusiv *Solanum lycopersicum*, caracterizat prin:

- obtinerea unui amestec de saponine sub forma solida prin - extractia plantei mai intai cu o solutie alcoolica, urmata de extractia cu o solutie apoasa acida; cele 2 solutii- alcoolica si apoasa acida - se amesteca si se trateaza cu o baza cu obtinerea unui solid; solidul rezultat se trateaza cu un al doilea alcool, obtinand a doua solutie alcoolica ce se pune in contact cu un agent lichid pentru schimbarea polaritatii si formarea amestecului de saponine in forma solida;
- brevetul propune obtinerea unei compozitii cosmetice cu una sau mai multe saponine a caror puritate este mai mare de 98%, iar saponinele conform inventiei apartin grupului: solamargina, solasonina, chaconina, solanidina, solanina, sycophantina, tomatina, solasodin monoglicozida si solasodin diglicozida;
- plantele utilizate la extractie pot fi : *Solanum agrarium*, *Solanum atropurpureum*, *Solanum betaceum*, *Solanum quitoense*, *Solanum crinitum*, *Solanum hirtum*, *Solanum marginatum*, *Solanum surattense* Burm, *Solanum lycocarpum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum macranthum*, *Solanum mammosum*, *Solanum melongena*, *Solanum nigrum*, *Solanum pschotrioides*, *Solanum sycophanta* si *Solanum xanthocarpum*.
- extractia are loc timp de 36-120 ore la temperatura camerei, dar poate fi redusa la 12-24 de ore prin ridicarea temperaturii;
- primul alcool utilizat poate fi unul din seria: etanol, propanol, 1-butanol, 2-butanol, 3-metil-1-butanol, isopropanol, isobutanol, pentanol, sau o combinatie a acestora;
- acizii utilizati pentru obtinerea solutiei apoase sunt din seria acizilor slabi, si anume: acid acetic, propionic, butiric, pentoic, si se adauga pana cand se obtine un pH=1-5, iar concentratia acestora poate fi cuprinsa intre 1-50%;



- baza adaugata pentru obtinerea solidului poate fi una selectata dintre: hidroxid de sodiu, hidroxid de potasiu, hidroxid de litiu, hidroxid de amoniu, carbonat de sodiu, de potasiu, de amoniu care se adauga pana cand pH-ul este cuprins intre 8-14. Concentratia hidroxidului de sodiu poate fi cuprinsa intre 1-30%;
- solidul obtinut este tratat cu o a doua solutie alcoolica care optional se poate incalzi la o temperatura cuprinsa intre 45-55°C; concentratia alcoolului poate fi cuprinsa intre 5-99%;
- solutia alcoolica obtinuta, optional incalzita, se trateaza cu un agent de modificare a polaritatii astfel incat sa se produca formarea saponinelor in stare solida; agenti de modificare a polaritatii utilizati conform brevetului sunt sarurile anorganice: clorura de sodiu, de potasiu, de amoniu, sulfatul de sodiu, potasiu, amoniu, fosfatul de sodiu, potasiu, amoniu singuri sau in amestec;
- saponinele solide obtinute pot fi filtrate si/sau redizolvate in solutie alcoolica apoasa, cu o concentratie cuprinsa intre 80-96% si recrystalizate, rezultand cristale ce pot fi izolate prin filtrare si uscare.

Conform stadiului tehnicii, compozitiile de ingrijire a pielii sunt utilizate pentru reducerea aparitiei ridurilor, pentru imbunatatirea texturii, pentru hidratare revitalizare si nutritie, antiaging.

Pe de alta parte, infestarea unor culturi agricole poate provoca scaderi ale productivitatii si calitatii produselor agricole, cu impact asupra sanatatii populatiei la nivel mondial. Interesul pentru utilizarea compusilor bioactivi naturali este in crestere, in special datorita problemelor de siguranta in utilizare a compusilor de sinteza (toxicitate neselectiva). Un alt aspect semnificativ este rezistenta dobandita de patogeni fata de tratamentele antibiotice / antimicrobiene clasice, efect ce poate fi contracarat de anumite structuri de origine vegetala, atent selectionate si purificate. Acest domeniu deschide perspectiva unor noi strategii de control al patogenilor, respectiv al infectiilor micotice sau bacteriene, prin exploatarea si valorificarea potentialului fitoterapeutic. Un exemplu in acest sens il constituie *Camelina sativa*, planta oleaginoasa de cultură utilizata preponderent pentru producția de biocombustibili (J.T. Budin si colab., 1995; J. Zubr, 2003, J. Dalal si colab., 2015). Semintele sale au un conținut mediu de 40% ulei (de două ori mai mult fata de semintele de soia) (J. Vollmann, 2007; BR. Moser, 2012), care poate fi ușor transformat in lubrifianti industriali, biodiesel (A. Bernardo si colab., 2003), iar făina de semințe de camelina poate fi folosita pentru consumul animal, fiind un excelent adjuvant proteic. Preocuparea pentru indentificarea de noi surse de acid eicosapentenoic (EPA) si acid docosahexenoic (DHA) a condus si la

exploatarea unor surse vegetale de seminte oleaginoase (A. Frohlich, B. Rice, 2005; T.C. Adarme-Vega si colab., 2012). Continutul semințelor de *Camelina sativa* de până la 40% ulei cu proporții ridicate de acid α -linolenic (ALA, 28%) și acid linoleic (LA, 19%) (N. Tejera si colab., 2016), face ca aceasta planta sa devina o sursa vegetala de ulei bogat in omega-3, amplificarea continutului de acizi grasi nesaturati fiind un obiectiv al manipularii genetice (J.T. Budin si colab., 1995; J.R. Petrie si colab., 2014; M. P. Mansour si colab., 2014). Un alt aspect important este rezistenta la daunatori, *Camelina sativa* fiind foarte rezistentă la înnegrire (*Maculans leptosphaeria*), este tolerantă la alternarioză (*Alternaria brassicae*), puricii de pământ (*Phyllotreta cruciferae* Goeze) atacand camelina, dar fara pagube considerabile (L.Browne si colab., 1991). *Camelina sativa* produce camalexina, substanta sintetizata de plante ca protectie la daunatori (M Purnamasari si colab., 2015), fiind rezistenta si la *Sclerotinia sclerotiorum* (G.Seguin-Swartz si colab.,2009). Camalexinul acționează prin crearea de rupturi la nivelul membranelor celulare a unor bacterii sau fungi. Acidul sinapic, acidul fitic si quercitina sunt antioxidanți cu proprietăți antimicrobiene, antiinflamatoare, antianxietate sau anticancerigene (Gupta și colab., 2015; Gupta și Kumar, 2017). Activitatea antimicrobiană a compușilor flavonoidici se bazează pe mecanisme de inactivare a adeziunii microbiene și a transportului proteinelor membranare. Totodată în semințele de camelină se găsesc cantități ridicate de glucozinolați care acționează ca pesticide naturale și sistem de apărare contra patogenilor (Gupta și colab., 2015).

Extractele metanolice si etanolice ale semințelor de *Camelina sativa* au prezentat, *in vitro*, activitate antimicrobiană față de patogeni gram-pozitivi, precum *Bacillus pumilus* și *Bacillus subtilis*, dar și față de patogeni gram-negativi *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* și *Acinetobacter junii* (Gupta și colab., 2015). Extractul metanolic din semințe de camelină are activitate antifungică împotriva speciei *Rhizopus stolonifer* comparativă cu cea a medicamentului antifungic Clotrimazol în concentrație de 100 μ g/ml (Gupta și Kumar, 2017).

Din datele prezentate cu privire la stadiul tehnicii in domeniul obtinerii extractelor din plante ce apartin genului *Solanum*, rezulta urmatoarele **dezavantaje**:

- nu s-au realizat procedee ecologice de valorificare a deseului vegetal din *Solanum lycopersicum* - lastari rezultati la copilirea plantelor, fara a afecta productia de baza a tomatelor, cu obtinerea unui extract pulbere, insolubil in apa, ce contine un amestec de α -tomatina si dehidrotomatina de minim 60% α -tomatina;



- materiile vegetale/plantele ce apartin genului *Solanum*, conform brevetelor prezentate in stadiul tehnicii sunt in principal fructele acestora: *Solanum lycocarpum* fructe proaspete sau uscate in EP 0792646 (A1)-1997-09-03, *Solanum sodomaeum*, *incanum*, *nigrum* si *robustum* fructe uscate maruntite in US 3,960,839; in brevetul NZ 598 234 (A)-2013-10-25 se propune utilizarea diferitelor parti de planta: frunze, radacini, tulpini, fructe ale plantelor din diferite specii de *Solanum*, dar nu si *lycopersicum*;
- US 2017348 222 (A1)-2017-12-07 se poate aplica si la *Solanum lycopersicum*, dar extractia plantei are loc in doua etape cu doi solventi diferiti: alcoolic si apos-acid, care in etapa urmatoare sunt prelucrati impreuna, neexistand deci posibilitatea recuperarii si reutilizarii solventului organic; etapa finala de separare a glicoalcaloidului (tomatina) se realizeaza cu un agent de modificare a polaritatii, astfel incat solventul (alcoolul) utilizat nu mai poate fi recuperat si reutilizat, deci solventii rezultati in urma procesului aplicat reprezinta deseuri;
- timpul de extractie este in general indelungat, 36-120 ore la temperatura camerei, putand fi redus la 12-24 ore prin marirea temperaturii US 2017348 222 (A1), deci cu consum de energie ridicat;
- utilizarea pentru extractie a solutiilor alcoolice de propanol, 1-butanol, 2-butanol, 3-metil-1-butanol, isopropanol, isobutanol, pentanol sau pentru purificare/separare a amestecurilor de solventi toxici: metanol:cloroform (NZ 598 234 (A) -2013-10-25);
- brevetele studiate nu au ca obiectiv realizarea unui procedeu ecologic care sa protejeze mediul prin reciclarea si recuperarea materiilor prime (vegetale, solventi) utilizate;
- preparatele pe baza de extract glicoalcaloidic au fost utilizate pana acum drept intermediari in sinteza corticosteroizilor, hormonilor sexuali si a contraceptivelor, iar compozitiile cosmetice brevetate sunt destinate reducerii aparitiei ridurilor, pentru imbunatatirea texturii pielii, pentru hidratare revitalizare si nutritie, antiaging ;
- nu s-au realizat preparate comerciale ecologice cu componente izolate din plante din speciile de *Solanum* caracterizate printr-un amestec α -tomatina si dehidrotomatina, pentru utilizari in preparate antifungice de uz topic sau pomicultura pentru fitoprotectia plantelor.

Problema tehnica pe care o rezolva prezenta inventie este de valorificare ecologica a resurselor, printr-un procedeu aplicabil la scara industriala, prin care se utilizeaza deseul vegetal de *Solanum lycopersicum* – lastarii proveniti din copilirea plantelor, fara a fi afectata productia de tomate, prin extractia si separarea componentelor glicoalcaloidice, cu reciclarea



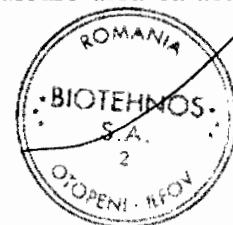
(recuperarea/reutilizarea) solventilor si obtinerea extractelor din *Solanum lycopersicum* sub forma de pulbere insolubila in apa.

Solutia prin care se rezolva problema tehnica conform inventiei de fata, consta in:

- procedeul de obtinere a extractului glicoalcaloidic din deseul vegetal - lastarii si frunzele – de *Solanum lycopersicum*;
- asocierea in diferite variante continand proportii diferite de extract de *Solanum lycopersicum* si ulei de *Camelina sativa*, ce constituie fitocompusi standardizati, cu actiuni biologice complementare, in vederea eficientizarii aplicatiilor in terapii antifungice la om, animale si plante.

Conform inventiei, procedeul de obtinere a extractului glicoalcaloidic *Solanum lycopersicum* se realizeaza in mod diferit fata de procedeele mentionate, si cuprinde urmatoarea succesiune de etape:

- a. lastarii de *Solanum lycopersicum* inlaturati de pe vrejul plantei in urma operatiei de copilire, se usuca si se macina, dupa care se extrag succesiv in doua trepte, cu solutie 5% acid acetic in apa potabila timp de 30...80 minute in treapta intai de extractie, si cu solutie 4% acid acetic in apa potabila timp de 60...120 minute in treapta a doua de extractie, in instalatia de extractie rapida, la temperatura ambianta;
- b. solutiile obtinute in urma extractiei sunt reunite intr-o instalatie de separare prin decantare si se supun operatiei de precipitare a α -tomatinei si dehidrotomatinei prin adaugarea unui agent alcalin puternic, solutie de soda caustica 40%; pentru definitivarea separarii, solutia alcalina se lasa 1...24 ore la temperatura camerei, se centrifugheaza, iar extractul glicoalcaloidic obtinut sub forma unei paste onctuoase, de culoare neagra-verzuie se usuca intr-o instalatie sub vid la o temperatura de 60...70° C, timp de 6...8 ore; extractul brut uscat de glicoalcaloizi rezultat se macina pana la aspectul unei pulberi fine de culoare brun inchis, are un continut in substanta uscata de minim 90% si de α -tomatina de minim 10% si se obtine intr-un raport de 2...4 kg/100 kg planta uscata;
- c. etapa de purificare a extractului glicoalcaloidic brut se realizeaza sub vid, prin dizolvarea pulberii in alcool etilic intr-o instalatie de distilare la reflux a solventului la 60...70° C, sub vid, timp de 60...120 minute; solutia obtinuta se filtreaza sub vid si se supune operatiei de distilare sub vid la 60...70° C, fie pana la un raport de concentrare 8:1...10:1, cand are loc cristalizarea α -tomatinei si dehidrotomatinei ce sunt separate de solutia de cristalizare prin filtrare sub vid si uscare la 105° C, obtinand un extract denumit extract glicoalcaloidic purificat sub forma unei pulberi cristaline, insolubile in apa, de culoare alba caracterizat



printr-un amestec de α -tomatina si dehidrotomatina, de minim 90% α -tomatina in cantitate de 0,2...0,4 kg/100 kg planta uscata, fie concentrand pana la reziduu uscat, obtinand un extract denumit extract glicoalcaloidic sub forma unei pulberi insolubile in apa, de culoare galbui-verzuie caracterizat printr-un amestec de α -tomatina si dehidrotomatina de minim 60% α -tomatina in cantitate de 0,2...0,6 kg/100 kg planta uscata.

d. solventul rezultat in urma operatiei de purificare si distilare sub vid este recuperat si reutilizat intr-o noua serie de productie.

Produsele de uz topic si fitosanitare obtinute conform inventiei, contin ca substante biologice active extractul glicoalcaloidic din *Solanum lycopersicum* si uleiul de *Camelina sativa*, in diferite proportii si sunt conditionate astfel in diferite variante si anume:

- Produsele de tip antimicotic, de uz topic, realizate prin asocierea a: 0.01%...1,5% extract glicoalcaloidic de puritate 60...90% α -tomatina cu 2...12% ulei de *Camelina sativa* si excipienti farmaceutici uzuali, si care dupa aducerea extractului glicoalcaloidic in forma solubilizata sau in suspensie, se conditioneaza sub forma de lotiune, crema, gel, micro / nano emulsii sau pulbere cutanata.
- Produsele de tip biofungicid fitosanitar pentru controlul speciilor pomicole, se realizeaza prin asocierea a 0.1%...5% extract glicoalcaloidic cu 3%...18% ulei de *Camelina sativa* si se conditioneaza fie sub forma unei suspensii bifazice care se agita inainte de stropirea pomilor, fie sub forma a doua componente distincte: faza apoasa - suspensie concentrata si faza uleioasa, care se combina inainte de utilizare.

Avantajele inventiei în raport cu stadiul tehnicii sunt următoarele:

- Prezinta un procedeu tehnologic aplicabil in agricultura / farmacie / dermatologie / dermatocosmetica, ce presupune valorificarea unui deseu vegetal din planta *Solanum lycopersicum* fara a periclita productia principala de tomate;
- procedeul presupune obtinerea unui extract de extract glicoalcaloidic caracterizat printr-un amestec de α -tomatina si dehidrotomatina de minim 60% α -tomatina, sub forma de pulbere insolubila in apa, si care prin asociere cu uleiul de *Camelina sativa* cu continut de acid linoleic min.10g/100g ulei; acizi linolenic si oleic min 30g/100g ulei, si tocoferol, reprezinta intermediari activi in produse utilizate in dermato-cosmetica si agricultura;
- procedeul de extractie si separare a componentelor glicoalcaloidice, prin parametrii tehnologici aplicati determina conform principiilor tehnologiilor ecologice obtinerea unor randamente optime si nu maxime, cu valorificarea tuturor resurselor si reintroducerea acestora in fluxul de productie - alcoolul etilic de calitate farmaceutica;



- instalatia de extractie este simpla dar foarte eficienta fiind alcatuita din vase de extractie si rezervor din inox - pentru solvent si solutiile extrase - intre care s-a montat o bucla de recirculare a solventului/solutiei extrase la care este amplasata o pompa centrifuga cu viteza mare 2900 rpm si un debit de 2700 L/ora ce determina o capacitate mare de extractie a componentelor din planta, procentul de substante extractibile dupa prima ora de extractie fiind de minim 70%, iar dupa cea de a doua etapa de extractie ajunge la 93%;
- timpul de extractie este mult redus datorita vitezei mari de recirculare a solventului / solutiei extrase;
- etapele de extractie se realizeaza la temperatura ambianta, economisind astfel energie;
- utilizarea unor materii prime ieftine: apa potabila pentru realizarea solventului de extractie si solutia alcalina (de ex. soda caustica tehnica de concentratie 40%) pentru precipitarea glicoalcaloidului;
- etapa de concentrare / recuperare solvent se realizeaza sub vid, marind astfel capacitatea de distilare si reducand timpul operatiilor.

Complementaritatea efectelor descrise in stadiul tehnicii pentru glicoalcaloizii steroidici (actiune ambivalenta antifungica, antimicrobiana, insecticida, pe de-o parte si antiproliferativa si antiinflamatoare pe de alta) si uleiul de camelina (proprietati emoliente, antioxidante, antiinflamatoare, hidratante si regeneratoare) a dus la ideea asocierii celor doua preparate, in scopul obtinerii unor prototipuri cu aplicatie directionata in terapeutica medicala, respectiv agricultura. Conform inventiei, utilizarea extractelor din *Solanum lycopersicum* in combinatie cu uleiul de *Camelina sativa* cultivata ecologic, este sustinuta de studiile de actiune specifica *in vitro*, precum si de testarea in livada privind controlul rapanului si moniliozei.

Testele efectuate în vederea evidențierii activității specifice a componentelor active obtinute din *Solanum sp.* si *Camelina sativa* pentru sustinerea aplicațiilor în tratarea micozelor cutanate si controlul patogenilor speciilor pomicole:

a) **Evidentierea efectului antifungic** prin testarea pe tulpini standardizate de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* și *Aspergillus brasiliensis*

Acțiunea antimicrobiană a extractului glicoalcaloidic si a uleiului de camelina a fost testată asupra tulpinilor microbiene standardizate de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* și *Aspergillus brasiliensis* prin metoda macrodiluțiilor pentru determinarea concentrației minime inhibitorii (CMI) și metoda godeurilor pentru determinarea zonei de inhibiție a creșterii microbiene. Rezultatele testelor asupra actiunii antimicrobiene a variantelor testate au evidențiat faptul că:



- varianta de asociere ulei de camelina 20% și extract glicoalcaloidic 1mg/ml are efect antimicrobian asupra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* și *Aspergillus brasiliensis*
- varianta ulei de camelina 20% și extract glicoalcaloidic 4mg/ml are efect antifungic asupra *Candida albicans* și *Aspergillus brasiliensis*.
- variantele ulei de camelina 100% și extract glicoalcaloidic 80mg/ml; ulei de camelina 100% și extract glicoalcaloidic 40mg/ml; ulei de camelina 100% și extract glicoalcaloidic 20mg/ml au dezvoltat zone de inhibiție cuprinse între 18-26,72 mm relevând din punct de vedere calitativ acțiune antifungică asupra tulpinii de *Candida albicans*.

b) **Evidențierea efectelor antiinflamatoare și de regenerare dermica** – acțiuni suport pentru produs de uz topic

S-au derulat studii *in vitro* particularizate pe toxicitatea la nivel celular și principalele mecanisme relevante în demonstrarea efectelor de regenerare și reducere a inflamației cutanate, având în vedere complementaritatea cu efectele antimicrobiene demonstrate pe tulpini de *Staphylococcus*, *Candida*, *Aspergillus*. Au fost investigate principalele procese celulare în funcție de ținta terapeutică (regenerare tisulară și inhibarea proceselor inflamatorii) după cum urmează: la nivel de *epiderm*, primul strat cu funcție de barieră a pielii (keratinocite) – inflamație, stress oxidativ, hidratare prin expresia filagrinei, diferențiere epidermală și turn-over celular; la nivel de *derm*, - status proliferativ, sinteza proteinelor din matrixul extracelular (colagen), inflamație, stress oxidativ, turn-over celular; la nivel de *endoteliu vascular*, cu rol major în homeostazia pielii prin furnizarea de oxigen, nutrienți și hormoni (celule endoteliale umane) – inflamație, stress oxidativ. S-au utilizat tehnici de culturi celulare și analiza qPCR, citometrie în flux, microscopie, analiza enzimatică, etc. Modelele experimentale au avut o mare complexitate și au urmărit simularea *in vitro* a condițiilor unui atac bacterian sau fungic (tratare cu LPS), dar și cele ale instalării unui status inflamator sistemic nespecific (TNF α). Efectul antiinflamator a fost demonstrat prin qRT-PCR și citometrie în flux la nivelul factorilor pro-inflamatori IL6, IL8, VEGF și a moleculelor de adeziune ICAM și VCAM în special pentru extract glicoalcaloidic 50ng/ml și combinația ulei de camelina 0.04% + extract glicoalcaloidic 70 ng/ml;

Efectul antioxidant a fost indus de ambele componente vegetale (extract glicoalcaloidic și ulei de camelina), prin modularea catalazei / superoxid-dismutazei – (ex. creșterea activității enzimatică a catalazei cu procente cuprinse între 140% - 183%), corelativ cu scăderea intracelulară a radicalilor liberi oxigenați (apa oxigenată și anion superoxid).

Inducerea regenerării cutanate prin reepitelizare - diferențiere keratinocite. Uleiul de



camelina stimuleaza expresia citokeratinei, inducand diferentiere keratinocitara inca din stratul bazal. Extractul glicoalcaloidic induce preponderent supraexpresia transglutaminazei-1, deci progresia stratului spinos. Compusii bioactivi stimuleaza turn-overul keratinocitelor (cu 20% - 30%), atat in conditii nediferentiate (mediu sarac in calciu), cat si de inducere a diferentierii (12mg calciu), efect ce sustine procesul de regenerare epidermala. Refacerea dermica este sustinuta de stimularea dinamicii celulare si a sintezei de colagen de catre ambii compusi si de asocierea lor, acestia potentandu-si reciproc aceste cai de actiune celulara.

Prin evidentierea acestor efecte induse de extractul glicoalcaloidic si uleiul de camelina s-a realizat largirea spectrului de activitate biologica si s-au identificat noi tinte terapeutice, diferite de efectul antimicrobian clasic, rezultate ce conduc la dezvoltarea de noi produse bazate pe valorificarea potentialului agricol (deseuri de planta, respectiv specii cu adaptabilitate mare si potential agricol imens). Studiile au stat la baza dezvoltarii de produs antimicotic de uz topic, in sustinerea efectelor complementare de refacere tisulara.

c) Controlul patogenilor speciilor pomicole – testare *in vitro*

Demonstrarea efectelor antifungice ale extractelor vegetale s-a realizat la nivel de laborator pe o selectie de patogeni ai speciilor pomicole (*Monilinia fructigena* si *Monilinia laxa*, *Venturia inaequalis*) recoltati din livada. *Monilinia fructigena* este agentul patogen responsabil de aparitia putregaiului brun si mumifierii fructelor la speciile pomicole samantoase (in special mar, par, gutui), prezent oriunde se cultiva aceste specii. *Monilinia laxa* este responsabil de producerea moniliozei la pomii samburosi - prun. Ciuperca *Venturia inaequalis* este agentul patogen responsabil de aparitia rapanului marului. Rapanul este considerat una dintre bolile cele mai importante ale marului si este frecvent oriunde se cultiva aceasta specie (Bowen et al. 2011). Au fost testate: extractul glicoalcaloidic din *Solanum*, uleiul de camelina si produsul biofungicid rezultat din asocierea extractului glicoalcaloidic cu uleiul de camelina. S-au utilizat ca metode de testare: (1) metoda includerii în mediu (Food poison technique) în diferite concentrații ale extractului glicoalcaloidic și a produsului biofungicid si (2) metoda difuziei cu discuri de hârtie de filtru (Filter paper disc diffusion Kirby-Bauer- metoda difuzimetrica adaptata) pentru produsul biofungicid in dilutie 1/10. S-a calculat eficacitatea extractului glicoalcaloidic asupra cresterii ciupercii *Monilinia fructigena* si s-a constatat ca dupa 9 zile de observatie eficacitatea a fost de 24.6% la concentratia de 0.1% si de 85.8% la concentratia de 0.5%. Eficacitatea a crescut la 31.8% si 88.8% la aceleasi concentratii dupa 12 zile de incubare. S-a remarcat un ritm mai lent de crestere a ciupercii in



intervalul 9- 12 zile la concentratia 0.5%. Eficacitatea a fost maxima la concentratia de 1% (tabel 1).

Tabel 1. Eficacitatea extractului glicoalcaloidic asupra patogenului *Monilinia* spp

Varianta/concentratia(%)	Diametrul coloniei(mm) / 12 zile	Eficacitate (%)
extract glicoalcaloidic/ 0.1	34.4	26.8
extract glicoalcaloidic/ 0.5	5.0	89.0
extract glicoalcaloidic/ 1	2.8	94.0
Control	47.0	-

Cercetarile prezentate au aratat inhibarea cresterii ciupercilor *Monilinia* spp.izolate de pe fructele de prun la variantele extract glicoalcaloidic0.5% si extract glicoalcaloidic1%, la care eficacitatea a fost de 89% si 94%.

Tabel 2. Eficacitatea extractului glicoalcaloidic asupra patogenului *Venturia inaequalis*

Varianta / concentratia (%)	Diametrul coloniei (mm)/ 12 zile	Eficacitate (%)
Control	4.5	-
extract glicoalcaloidic/ 0.1	3.0	33.3
extract glicoalcaloidic/ 0.5	2.0	55.5
extract glicoalcaloidic/ 1	1.0	77.7

In cazul *Venturia inaequalis* (*in vitro*), dupa 12 zile de observatie s-a calculat eficacitatea, ca procent de inhibare a cresterii ciupercii, pentru extractul glicoalcaloidic adaugat in mediul de cultura. Aceasta creste proportional cu doza, la peste 55% la varianta de extract glicoalcaloidic 0.5% si 77.7% la varianta de concentratie 1% .

Tabel 3. Eficacitatea produsului biofungicid asupra patogenului *M fructigena*

Varianta / Concentratie(%)	Diametrul coloniei(mm) / 9 zile	Eficacitate (%)	Diametrul coloniei(mm)/ 12 zile	Eficacitate (%)
Control	48.8	-	58.3	-
biofungicid / 0.5	18.5	62.0	24.2	58.5
biofungicid / 1	5.3	89.1	6.7	82.8
biofungicid / 2	5.0	89.7	5.7	90.2

Observatiile *in vitro* privind testarea produsului biofungicid au aratat ca fata de varianta martor, fara produs biofungicid, la varianta cu produs biofungicid 2% ciuperca a crescut cel mai putin, ajungand la diametrul mediu de 5.7mm dupa 12 zile de observatie. La aceeasi concentratie (2%), dupa 9 zile de observatie, diametrul mediu al ciupercii a fost de 5.0 mm. Valori apropiate ale cresterii ciupercii s-au determinat si la varianta biopesticid 1% dupa 9 zile de la incubare. Observatiile efectuate asupra cresterii miceliene a ciupercii au aratat ca la varianta biofungicid 1%, miceliul ciupercii a fost mai lax la periferie, fata de varianta 2% la care miceliul a avut o crestere mai densa in jurul ronelei. Calculand eficacitatea s-a constatat ca varianta 2% are cea mai mare eficacitate, de 90.2%.



Tabel 4. Eficacitatea produsului biofungicid asupra patogenului *M laxa*

Varianta - Concentratie(%)	Diametrul colonei(mm) / 9 zile	Eficacitate (%)	Diametrul colonei(mm) / 12 zile	Eficacitate (%)
Control	13.6	-	16.8	-
biofungicid - 0.5	10.0	26.4	16.3	30
biofungicid -1	7.2	47.0	9.8	41.6
biofungicid -2	2.0	85.2	2.6	84.5

Datele privind eficacitatea produsului biofungicid asupra cresterii ciupercii *M. laxa* sustin cea mai mare valoare a eficacitatii de 84.5% la varianta de concentratie 2%. Fata de varianta biofungicid 1% la care eficacitatea a fost de 45.6, la varianta biofungicid 2% in cazul ciupercii *M laxa*, eficacitatea s-a dublat. Includerea in mediu a produsului in concentratie de 0.5% a avut o eficacitate de 30% fata de martor (control).

Tabel 5. Eficacitatea produsului biofungicid asupra patogenului *V inaequalis*

Varianta / Concentratie(%)	Diametrul colonei(mm) / 9 zile	Eficacitate (%)	Diametrul colonei(mm) / 12 zile	Eficacitate (%)
Control	10.0	-	14.0	-
biofungicid / 0.5	6.0	40	8.0	42.8
biofungicid /1	4.6	54	6.0	57.1
biofungicid /2	1.8	82	2.3	83.5

Produsul biofungicid inclus in mediul de cultura nu a permis cresterea ciupercii *V. inaequalis* dupa 3 zile de la incubare. Incepand cu a 6 a zi de observatie, ciuperca s-a dezvoltat, ajungand la 3.8mm la varianta biofungicid 0.5% si 1mm media diametrului la varianta 2%. Dupa 9 zile de observatie diametrul mediu al ciupercii a avut cea mai mare valoare la varianta martor, urmata de varianta biofungicid 0.5%. La varianta biofungicid 2% s-a determinat cea mai scazuta valoare medie a diametrului ciupercii (1.8 mm). Dupa 12 zile de observatie, cresterea ciupercii a fost minima fata de martor si fata de celelalte variante, ajungand la 2.3 mm fata de varianta martor.

d) Controlul patogenilor speciilor pomicele – testare in livada

Testarea s-a realizat pe meri si pruni, in trei variante de concentratie pentru produsul biofungicid (asociere intre extractul glicoalcaloidic si uleiul de camelina), comparativ cu un produs comercial standard (Mimox 3% + Copfort 3%). S-au realizat 3 repetitii in bloc randomizat, 5 pomi/ repetitie – 15 pomi/varianta. Aplicarea biofungicidului in concentratie de 1%, a determinat o eficacitate a tratamentului de 95,83% (calculata cu formula lui Abbott). Aplicat in concentratie de 2%, biofungicidul a determinat o eficacitate de 100% in combaterea moniliozei la prun. Aplicarea produsului la conc. de 1,0% respectiv 2,0% a limitat frecventa atacului rapanului la mar la 0,67% pe frunze, 0,83% pe lăstari respectiv 0,33 % - 0,67% pe fructe. Comparativ, la martorul netratat, frecventa atacului de rapan a fost de 15,83% pe

55

frunze, 25,83% pe lăstari și 42,33% pe fructe. În ceea ce privește intensitatea atacului de monilioze la mar, în variantele tratate cu produsul biofungicid, la conc. de 2,0% intensitatea atacului a fost limitată la 0,00 la recoltare până la 0,33 pe perioada de păstrare, în timp ce în varianta standard, aceasta a fost notată cu 2,00. Comparativ, la matorul netratat, intensitatea atacului a fost cuantificată cu 2,33 la recoltare până la 3,00 pe perioada de păstrare.

Exemplul 1. Procedeu de obtinere a extractului glicoalcaloidic din deseul vegetal - lastari ai plantelor de *Solanum lycopersicum*

75 kg lastari rezultati la copilirea plantei *Solanum lycopersicum* sunt uscati in curent de aer cald la o temperatura cuprinsa intre 30-60° C, rezultand 10,5 kg materie vegetala uscata care se macina la o dimensiune a particulelor de 2+5 mm din care, 10,0 kg se introduc in instalatia de extractie rapida prevazuta cu o pompa centrifuga cu viteza mare 2900rpm si un debit de 2700l/ora, pentru realizarea operatiei de extractie in doua trepte succesive, cu 120 L solutie 5% acid acetic in apa potabila, timp de 1 ora in treapta intai, si cu 90 L solutie 4% acid acetic in apa potabila timp de 2 ore in treapta a doua de extractie, la temperatura ambianta; solutiile extrase obtinute in cantitate de 180 L reunite intr-o instalatie de separare prin decantare, cu robinet de evacuare la partea inferioara, se supun operatiei de precipitare a α -tomatinei si dehidrotomatinei prin adaugarea cu agitare a 20 L solutie de soda caustica 40%; solutia alcalina se lasa 4 ore la temperatura camerei, iar depozitul de glicoalcaloizi format se evacueaza pe la partea inferioara a instalatiei, se centrifugheaza 10 minute la 9000 rpm iar extractul glicoalcaloidic obtinut sub forma unei paste onctuoase, de culoare neagra-verzuie se usuca intr-o instalatie cu tavi de inox, sub vid la o temperatura de 60-70° C, timp de 8 ore. Extractul brut uscat de glicoalcaloizi rezultat in cantitate de 470 g, se macina pana la aspectul unei pulberi fine de culoare brun inchis, are un continut in substanta uscata de 92% si de α -tomatina de 15%. Etapa de purificare a extractului glicoalcaloidic brut se realizeaza sub vid, prin dizolvarea pulberii in 40 L alcool etilic farmaceutic intr-o instalatie de distilare la reflux a solventului la 65°C, timp de 1 ora; solutia obtinuta se filtreaza sub vid si se supune operatiei de distilare sub vid, pana la reziduu uscat, obtinand 88 g extract sub forma unei pulberi de culoare galbui-verzuie caracterizat printr-un amestec de α -tomatina si dehidrotomatina cu un continut de 66 % α -tomatina, iar cei 38 L alcool etilic rezultati sunt reutilizati intr-o noua serie de productie.

Exemplul 2. Produs de tip antimicotic, de uz topic, condiționat sub formă de cremă, conform formulei de mai jos. Produsul se aplica în terapia infectiilor fungice cutanate.



Nr. Crt.	Denumire substanta	Cantitate (%)
1.	Apa purificata	Ad. 100
2.	Propilene glicol	5.00
3.	Acid citric	0.20
4.	Gliceril stearat	2.00
5.	Ulei de <i>Camelina sativa</i>	10.00
6.	Extract glicoalcaloidic din <i>Solanum lycopersicum</i>	0.20
7.	Hidroxid de sodiu	Q.s
8.	Lecitina hidrogenata, alcool c12-16 si acid palmitic	5.00
9.	Etilhexil olivat	2.00
10.	Conservant (diazolidinil urea, metilparaben, propilparaben, propilene glicol)	1.00
11.	Guma de cyamopsis tetragonoloba, guma de guar , guma de xantan	0.30
12.	Ulei de rozmarin	1.00
13.	Tocoferol	0.10

Exemplul 3. Produs de tip biofungicid, conditionat sub forma de suspensie bifazica, de culoare alb-bej deschis, opaca cu aspect lptos si spuma abundenta la suprafata, care isi mentine stabilitatea 15-20 minute dupa agitare, conform formulei de mai jos. Produsul este aplicabil în limitarea gradului de atac in monilioze si rapan la specii de pomi fructiferi.

Nr.crt	Denumire substanta	Cantitate (%)
1	Extract glicoalcaloidic din <i>Solanum lycopersicum</i>	0.50
2	Acid acetic	0.50
3	Dodecil sulfat de sodiu	6.00
4	Ulei de <i>Camelina sativa</i>	5.00
5	Conservant (Benzoat de sodiu, sorbat de potasiu apa)	1.00
6	Apa purificata	Ad 100



REVENDICARI

1. Procedeu de obtinere a extractului glicoalcaloidic, insolubil in apa, din *Solanum lycopersicum* caracterizat prin aceea ca utilizeaza drept materie prima vegetala lastarii -deseu rezultat de la copilirea plantei, care dupa uscare si macinare se extrage succesiv in doua trepte, cu solutie 5% acid acetic in apa potabila timp de 30...80 minute, in treapta intai de extractie in raport 1:10...1:15 planta :solvent, si cu solutie 4% acid acetic in apa potabila timp de 60...120 minute in treapta a doua de extractie in raport 1:5...1:10 planta:solvent, in instalatia de extractie rapida la temperatura ambianta; solutiile obtinute sunt reunite intr-o instalatie de separare prin decantare, din sticla, cu robinet de evacuare la partea inferioara si se supun operatiei de precipitare a α -tomatinei si dehidrotomatinei prin adaugare de solutie de soda caustica 40%, depozitul obtinut se evacueaza pe la partea inferioara a instalatiei, se centrifugheaza, iar extractul glicoalcaloidic obtinut sub forma unei paste onctuoase, de culoare neagra-verzuie, se usuca intr-o instalatie cu tavi, sub vid, la o temperatura de 60...70° C, timp de 6...8 ore; extractul brut uscat rezultat se macina pana la aspectul unei pulberi fine de culoare brun inchis, are un continut in substanta uscata de minim 90% si de α -tomatina de minim 10% si se obtine intr-un raport de 2...4 kg/100 kg planta uscata; etapa de purificare a extractului glicoalcaloidic brut se realizeaza prin dizolvarea pulberii in alcool etilic intr-o instalatie de distilare la reflux a solventului la 60...70° C, timp de 60...120 minute; solutia obtinuta se filtreaza sub vid si se supune operatiei de distilare la presiune 80...200 mbari, temperatura 60...70° C, fie pana la un raport de concentrare 8:1...10:1, cand are loc cristalizarea α -tomatinei si dehidrotomatinei ce sunt separate de solutia de cristalizare prin filtrare sub vid si uscare la 105° C timp de 2 ore, obtinand un extract sub forma unei pulberi cristaline de culoare alba denumit **extract glicoalcaloidic purificat**, fie pana la obtinerea unui reziduu uscat, rezultand un extract sub forma unei pulberi de culoare galbui-verzuie denumit **extract glicoalcaloidic**; solventul rezultat in urma operatiilor de purificare si distilare sub vid este recuperat si reutilizat intr-o noua serie de productie.
2. Extract glicoalcaloidic purificat obtinut conform revendicarii 1, caracterizat prin aceea ca reprezinta un amestec de α -tomatina si dehidrotomatina, standardizat in minim 90% α -tomatina care se obtine intr-un raport de 200...400g/100 kg lastari uscati proveniti de la copilirea plantei *Solanum lycopersicum*.
3. Extract glicoalcaloidic obtinut conform revendicarii 1, caracterizat prin aceea ca reprezinta un amestec de α -tomatina si dehidrotomatina standardizat in minim 60%



tomatina care se obtine intr-un raport de 200...600 g/100 kg lastari uscatai proveniti de la copilirea plantei *Solanum lycopersicum*.

4. Produse de tip antimicotic, de uz topic, **caracterizate prin aceea ca** au in compozitie ca substante biologice active 0.01...1.5% extract glicoalcaloidic din *Solanum lycopersicum* obtinut conform revendicarii 1 si definit conform revendicarii 3, si 2...12% ulei de *Camelina sativa* alaturi de excipienti farmaceutici uzuali si care dupa aducerea extractului glicoalcaloidic in forma solubilizata sau in suspensie, sunt conditionate sub forma de lotiune, crema, gel, micro / nano emulsii sau pulbere cutanata.
5. Produse de tip biofungicid, **caracterizate prin aceea ca** includ ca substante biologice active 0.1...5% extract glicoalcaloidic din *Solanum lycopersicum* obtinut conform revendicarii 1 si definit conform revendicarii 3 si 3...18% ulei de *Camelina sativa* si sunt conditionate sub forma de suspensie bifazica sau sub forma a doua componente distincte: faza apoasa - suspensie concentrata si faza uleioasa care se combina inainte de utilizare.
6. Produse de tip antimicotic, conform revendicarii 4, pentru utilizare in terapia infectiilor fungice cutanate.
7. Produse de tip biofungicid, conform revendicarii 5, pentru utilizare in limitarea gradului de atac in monilioze si rapan la specii de pomi fructiferi, in tratamentul semintei la specii de plante legumicole, precum si in tratamentul in vegetatie la plantele horticole.

