



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00420**

(22) Data de depozit: **22/07/2021**

(41) Data publicării cererii:  
**30/01/2023** BOPI nr. **1/2023**

(71) Solicitant:

- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU BIOTEHNOLOGII ÎN HORTICULTURĂ ȘTEFĂNEȘTI-ARGEȘ, ȘOS. BUCUREȘTI-PITEȘTI NR.37, ȘTEFĂNEȘTI, AG, RO;**
- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE - DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA HULUBEI"(IFIN-HH), STR. REACTORULUI, NR.30, MĂGURELE, IF, RO;**
- **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN CLUJ-NAPOCA (UMF-IH), STR. VICTOR BABEȘ NR. 8, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:

- **RADOMIR ANA-MARIA, STR.ALEXANDRU GOLESCU, NR.61, ȘTEFĂNEȘTI, AG, RO;**
- **GUȚĂ IONELA- CĂTĂLINA, CALEA BUCUREȘTI, NR.32, BL.U4, AP.22, PITEȘTI, AG, RO;**
- **NEGUȚ CONSTANTIN DANIEL, ALEEA SANDULEȘTI, NR.3, BL.E16, SC.A, ET.8, AP.44, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **MOLDOVAN RADU-CRISTIAN, STR.HOREA, NR.30-32, SAT APAHIDA, COMUNA APAHIDA, CJ, RO;**
- **IUGA CRISTINA- ADELA, STR.IULIU HAȚIEGANU, NR.11, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI EXTRACT DE MELISSA OFFICINALIS L. ÎMBOGĂȚIT ÎN COMPUȘI FITOTERAPEUTICI PRIN IRADIERE GAMA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui extract de *Melissa Officinalis L.* (roiniță) îmbogățit în compuși fitoterapeuți pentru industria farmaceutică. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de: inițiere a culturilor *in vitro* utilizând explante prelevate de la plante mature sănătoase de roiniță prin inoculare în condiții sterile pe mediu de cultură lipsit de regulatori de creștere, subcultivarea explantelor, după un timp de 3...4 săptămâni de la inoculare pe mediu de multiplicare, iradierea vitroplantelor cu doze de 18...50 Gy,

după același interval de timp, respectiv, după tratamentul de stimulare cu radiații gama, la același interval de timp urmează extracția cu microunde la temperatura de 40...50°C, timp de 10...15 min, la o putere controlată a microundelor de 200...300 W, sub agitare magnetică la 200 rpm, rezultând un extract vegetal îmbogățit în compuși bioactivi în celula vegetală.

Revendicări: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



**PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI EXTRACT DE *MELISSA OFFICINALIS* L.  
ÎMBOGĂȚIT ÎN COMPUȘI FITOTERAPEUTICI PRIN IRADIERE GAMA**

**DESCRIEREA INVENȚIEI**

Prezenta invenție se referă la un procedeu destinat obținerii unui extract de *Melissa officinalis* L. (roiniță) îmbogățit în compuși fitoterapeutici, prin tratament cu radiații gama.

Compușii prezenți în extractul de roiniță (acizi fenolici, flavonoide, terpeni, taninuri) sunt responsabili de numeroase efecte farmacologice: antioxidant [Benedec D., Hanganu D., Oniga I., Tipericiu B., Olah N.-K., Raita O., Bischin C., Silaghi R., Vlase L. (2015). Assessment of rosmarinic acid content in six *Lamiaceae* species extracts and their antioxidant and antimicrobial potential. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(6 Suppl), 2297-2303], antimicrobian [Hancianu M., Aprotosoiaie A.C., Gille E., Poiata A., Tuchilus C., Spac A., Stanescu U. (2008). Chemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of essential oil of *Melissa officinalis* L. from Romania. *Revista medico-chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști din Iași*, 112(3), 843-847], antitumoral [Weidner C., Rousseau M., Plauth A., Wowro S., Fischer C., Abdel-Aziz H., Sauer S. (2015). *Melissa officinalis* extract induces apoptosis and inhibits proliferation in colon cancer cells through formation of reactive oxygen species. *Phytomedicine*, 22(2), 262-270], antiviral [Astani A., Navid M.H., Schnitzler P. (2014). Attachment and Penetration of Acyclovir-resistant Herpes Simplex Virus are Inhibited by *Melissa officinalis* Extract. *Phytotherapy Research*, 28(10), 1547-1552], antiinflamator [Bounihi A., Hajjaj G., Alnamer R., Cherrah Y., Zellou A. (2013). *In Vivo* Potential Anti-Inflammatory Activity of *Melissa officinalis* L. Essential Oil. *Advances in Pharmacological Sciences*, 101759].

Compușii fitofarmaceutici sunt sintetizați în plante în cantități mici și, uneori, în celule specifice [Finley J.W. (2005). Bioactive compounds and designer plant foods: The need for clear guidelines to evaluate potential benefits to human health. *Chronica Horticulturae*, 45(3), 6-11]. Necesitatea obținerii unor extracte vegetale bogate în compuși bioactivi, cu potențial terapeutic superior, a dus la dezvoltarea unor strategii de stimulare a activității biosintetice a celulelor vegetale: îmbunătățirea condițiilor de cultură, elicitarea, biotransformarea, producția indusă de stress, utilizarea bioreactorului, etc. [Matkowski A. (2008). Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants - A review. *Biotechnology Advances*, 26, 548-560].

Iradierea gama este considerată o metodă rapidă și eficientă de îmbunătățire a caracteristicilor calitative și cantitative ale plantelor [Wi S.G., Chung B.Y., Kim J.S., Kim

J.H., Baek M.H., Lee J.W., Kim Y.S. (2006). Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. *Micron*, 38, 553]. Efectul biologic al radiațiilor gama se bazează pe interacțiunea cu atomii sau moleculele din celule, în special cu apa, producând radicali liberi [Kovács E., Keresztes A. (2002). Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cell. *Micron*, 33(2), 199-210]. Acești radicali pot modifica componente importante ale celulelor vegetale, afectând în mod diferit morfologia, fiziologia, anatomia și biochimia plantelor în funcție de doza de iradiere [Ashraf M., Cheema A.A., Rashid M., Qamar Z. (2003). Effect of gamma rays on M1 generation in Basmati rice. *Pakistan Journal of Botany*, 35, 791].

Statisticile evidențiază faptul că un număr mare de compuși noi sunt identificați anual în diferite specii de plante și o parte însemnată dintre medicamentele prescrise pentru tratarea anumitor afecțiuni conțin substanțe de origine vegetală. Totodată, rapiditatea procesului de extincție a speciilor și de îngustare a bazei genetice a resurselor vegetale în lume a stimulat atât reconsiderarea importanței vitale a resurselor genetice, cât și interesul pentru găsirea unor metode eficiente de producere a materialului vegetal cu calități biologice superioare, sursă de extracte cu potențial terapeutic.

Cultura *in vitro* s-a dovedit a fi o alternativă eficientă la metodele convenționale de multiplicare, aceasta prezentând o serie de avantaje față de înmulțirea clasică: necesită o cantitate redusă de material biologic; este mult mai rapidă; asigură obținerea unui material liber de agenți patogeni; necesită spații restrânse și se realizează pe întreaga perioadă a anului, independent de sezon și fenomenele de latență.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este aceea de obținere a unui extract cu proprietăți fitoterapeutice superioare, prin stimularea sintezei de compuși bioactivi aplicând tratament cu radiații gama plantelor de roiniță cultivate *in vitro*.

Procedeul de obținere a unui extract de roiniță îmbogățit în compuși fitoterapeutici, conform invenției, constă în:

- prelevarea fragmentelor de lăstari erbacei de 3-4 cm de la plante mamă sănătoase de roiniță;
- spălarea sub jet de apă rece timp de 60 de minute;
- dezinfectarea cu hipoclorit de calciu 6...10 %, timp de 7...12 minute, urmată de 3-4 clătiri succesive cu apă distilată sterilă;
- inocularea explantelor reprezentate de apexuri intens regenerative (0,2-0,3 cm) și fragmente uninodale, în condiții sterile, la hota cu flux de aer laminar, pe mediul de cultură MS [Murashige T., Skoog F. (1962), A revised medium for rapid grow and bioassays with

Tabacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15, 473-497] lipsit de regulatori de creștere, autoclavat la 120°C și presiunea de 1 atm, timp de 20 de minute;

- subcultivarea explantelor, după 3...4 săptămâni de la inoculare, pe mediul MS suplimentat cu 0,5 mg/L BAP (benzilaminopurină);

- iradierea gama acută cu doze de 18...50 Gy a vitroplantelor, după 2...3 săptămâni de la subcultivare;

- obținerea extractului vegetal din plantulele iradiate, după 2...3 săptămâni de la aplicarea tratamentului cu radiații gama, utilizând metoda de extracție cu microunde care presupune următoarele: triturarea materialului vegetal proaspăt în alcool etilic 70% în proporție de 1/10, urmată de extracția cu microunde la temperatura de 40...50°C, timp de 10...15 minute, la o putere controlată a microundelor de 200...300 W, în regim de agitare magnetică la 200 rpm.

#### **Invenția prezintă următoarele avantaje:**

- utilizează cultura *in vitro* pentru producerea materialului biologic, o metodă de multiplicare controlată, prietenoasă mediului, care permite obținerea unor cantități mari de plante libere de agenți patogeni;

- tratamentul aplicat pentru stimularea capacității biosintetice a celulelor vegetale, iradierea gama, nu este toxic și nu are efecte negative asupra sănătății umane;

- iradierea este aplicată vitroplantelor, ceea ce permite tratarea unor cantități mari de material biologic necesar obținerii extractelor;

- procedeul de obținere a extractului vegetal din vitroplante iradiate este simplu și nu implică utilizarea unor reactivi toxici;

- extractul vegetal obținut din vitroplante tratate cu radiații gama este îmbogățit în compuși bioactivi, cum ar fi: acidul salvianolic B și acidul salvianolic C cresc în abundență de aproximativ 8 ori, acidul litospermic crește de 6 ori, iar acidul rosmarinic crește de 5 ori comparativ cu extractul obținut din vitroplante netratate cu radiații gama.

#### **Se dă în continuare un exemplu de aplicare a invenției.**

Conform invenției, iradierea gama a plantulelor de *Melissa officinalis* L. cultivate *in vitro* stimulează sinteza unor compuși bioactivi în celula vegetală, compuși care se regăsesc în extractul de roiniță.

Procedeul de obținere a unui extract de roiniță îmbogățit în compuși fitoterapeutici, conform invenției, debutează cu inițierea culturilor *in vitro* utilizând explante prelevate de la plante mature sănătoase de *Melissa officinalis* L.

Lăstari erbacei de 3-4 cm se spală sub jet de apă rece timp de 60 de minute, se dezinfectează cu hipoclorit de calciu 6...10 %, timp de 7...12 minute, după care se clătesc cu apă distilată sterilă.

Explantele reprezentate de apexuri intens regenerative (0,2-0,3 cm) și fragmente uninodale rezultate din fragmentarea lăstarilor se inoculează în condiții sterile, la hota cu flux de aer laminar, pe mediul de cultură MS lipsit de regulatori de creștere, autoclavat la 120°C și presiunea de 1 atm, timp de 20 de minute.

După 3...4 săptămâni de la inoculare explantele se subcultivă pe mediul MS suplimentat cu 0,5 mg/L BAP (benzilaminopurină).

Vasele de cultură se incubează în camera de creștere la temperatura de 23±2°C, fotoperioada fiind de 16 ore lumină și iluminarea 3000-3500 lx.

După 2...3 săptămâni de la subcultivare vitroplantele sunt iradiate gama acut, în vasele de cultură, cu doze de iradiere de 18...50 Gy.

Extractul vegetal din plantulele iradiate se obține după 2...3 săptămâni de la aplicarea tratamentului cu radiații gama, utilizând metoda de extracție cu microunde care presupune: triturarea materialului vegetal proaspăt în alcool etilic 70% în proporție de 1/10, urmată de extracția cu microunde la temperatura de 40...50°C, timp de 10...15 minute. Puterea microundelor este controlată și menținută la 200...300 W. Se utilizează agitare magnetică la 200 rpm.

## REVENDICĂRI

1. Procedeu de obținere a unui extract de *Melissa officinalis* L. îmbogățit în compuși fitoterapeutici prin iradiere gama, **caracterizat prin aceea că**, protocolul de lucru constă în următoarele etape: prelevarea fragmentelor de lăstari erbacei de 3-4 cm de la plante mamă sănătoase de *Melissa officinalis* L.; spălarea sub jet de apă rece timp de 60 de minute; dezinfectarea cu hipoclorit de calciu 6...10 %, timp de 7...12 minute, urmată de clătiri succesive cu apă distilată sterilă; inocularea explantelor reprezentate de apexuri intens regenerative (0,2-0,3 cm) și fragmente uninodale pe mediu de inițiere; subcultivarea explantelor pe mediu de multiplicare; iradierea gama acută a vitroplantelor; obținerea extractului vegetal din plantulele iradiate, după 2...3 săptămâni de la aplicarea tratamentului cu radiații gama.

2. Procedeu de obținere a unui extract de *Melissa officinalis* L. îmbogățit în compuși fitoterapeutici prin iradiere gama, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, pentru producerea materialului biologic se utilizează cultura *in vitro* care presupune inocularea explantelor în condiții sterile, la hota cu flux de aer laminar, pe mediul de cultură MS (Murashige și Skoog, 1962) lipsit de regulatori de creștere, autoclavat la 120°C și presiunea de 1 atm, timp de 20 de minute, urmată de subcultivarea explantelor, după 3...4 săptămâni de la inoculare, pe mediul MS suplimentat cu 0,5 mg/L BAP (benzilaminopurină).

3. Procedeu de obținere a unui extract de *Melissa officinalis* L. îmbogățit în compuși fitoterapeutici prin iradiere gama, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, iradierea vitroplantelor se face cu doze de 18...50 Gy, după 2...3 săptămâni de la subcultivare.

4. Procedeu de obținere a unui extract de *Melissa officinalis* L. îmbogățit în compuși fitoterapeutici prin iradiere gama, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, pentru obținerea extractului vegetal din plantulele iradiate se utilizează metoda de extracție cu microunde care presupune triturarea materialului vegetal proaspăt în alcool etilic 70% în proporție de 1/10, urmată de extracția cu microunde la temperatura de 40...50°C, timp de 10...15 minute, la o putere a microundelor controlată în intervalul 200...300 W, în condiții de agitare magnetică la 200 rpm.