



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00790

(22) Data de depozit: 16/12/2021

(41) Data publicării cererii:
30/06/2023 BOPI nr. 6/2023

(71) Solicitant:

• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE
CHIMICO-FARMACEUTICĂ - ICCF
BUCUREȘTI, CALEA VITAN NR.112,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• APEL LASER S.R.L., STR.VINTILĂ
MIHĂILESCU NR.15, BL.60, SC.A, AP.12,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

• PÎRVU LUCIA CAMELIA, STR.BĂCIA
NR.11 A, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• NIȚĂ SULTANA, STR.BĂRBAT VOIEVOD
NR.21, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;

• BÂZDOACĂ CRISTINA,
BD. DIMITRIE CANTEMIR NR. 13, BL. 11,
SC. A, AP. 29, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;
• RUSU NICOLETA, STR.ARIEȘUL MARE,
NR.1, BL.15, SC.B, AP.28, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• NEAGU GEORGETA,
STR.MUNȚII MEHEDINȚI NR.4, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• ENACHE ALEXANDRU ALIN,
STR.TOCILEI, NR.25, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• UDREA VIRGIL MIRCEA, STR.VINTILĂ
MIHĂILESCU, NR.15, BL.60, SC.1, ET.1,
AP.12, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• UDREA RADU MIHAIL, STR. VINTILĂ
MIHĂILESCU, NR.15, BL.60, SC.1, AP.12,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR PRODUSE ACTIVE
VEGETALE ÎMBOGĂȚITE ÎN MINERALE
ȘI MICROELEMENTE PRIN EXTRAȚIE ASISTATĂ
CU RADIAȚIE LASER**

(57) Rezumat:

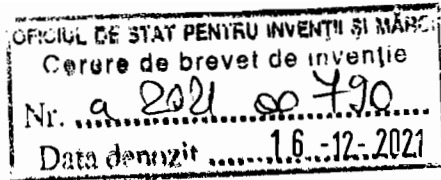
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor produse active vegetale cu activitate antioxidantă. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: extracția frunzelor de pătlăgină îngustă cu apă în regim de agitare continuă, 1 h fără laser și 1 h asistată cu radiație laser la 488 nm la temperatura masei de extracție, rezultând un extract total, precipitarea din etanol 80% a extractului total în raport 1:4 g/v, rezultând un extract

selectiv îmbogățit în minerale și microelemente, recuperarea supernatantului alcoolic și reluarea produsului în etanol concentrat, rezultând un extract selectiv final îmbogățit în polifenoli, având un conținut de 5 mg GAE per ml extract.

Revendicări: 3

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).





48

BREVET DE INVENȚIE

TITLU: "Procedeu de obținere a unor produse active vegetale îmbogățite în minerale și microelemente prin extracție asistată cu radiație laser"

AUTORI: Pîrvu Lucia Camelia, Niță Sultana, Bâzdoacă Cristina, Răsu Nicoleta, Neagu Georgeta, Enache Alexandru Alin, Udrea Virgil Mircea, Udrea Radu Mihail

A) Domeniul tehnic la care se referă invenția

1. Invenția se referă la 1 procedeu de obținere pentru trei categorii de extracte active din frunze de patlagină îngustă, bogate în minerale și microelemente și cu activitate antioxidantă augmentată, obținute prin extracția materiei prime vegetale cu apă asistată cu radiație laser la 488nm, utilizabile ca ingrediente active în obținerea de suplimente alimentare, suplimente dietetice, ori produse nutricosmetice noi.

2. Descrierea extractelor active, subiect al prezentei invenții:

2.1. Extract total obținut prin extracția cu apă asistată cu radiație laser la 488nm a frunzelor de patlagină îngustă;

2.2 Extract selectiv îmbogățit în minerale și microelemente reprezentat de precipitatul în etanol 80% (v/v) al extractului total (2.1) obținut cu apă din frunze de patlagină îngustă;

2.3 Extract selectiv îmbogățit în polifenoli reprezentat de supernatantul etanolic aferent precipitatului din etanol 80% (2.2);

B) Stadiul tehnicii

3. Este cunoscut faptul că radiația laser are capacitatea de a induce ruperea unor legături din structura ligninei, fapt demonstrat științific prin măsurători RAMAN asupra unor secțiuni din lemn de molid iradiate cu laser la 532nm (Batirtze P.M. Et al. *Following laser induced changes of plant phenylpropanoids by Raman microscopy. Scientific Reports, Nature 2018, 8:1804*) (1); în plus, s-a demonstrat că efectul de dezintegrare a ligninei vegetale la o putere a laserului de 35 mW nu a avut alte efecte oxidative asupra materialului vegetal expus.



4. De asemenea, este cunoscut că lignina este *liantul* care leagă microfibrilele de celuloză în structura dură și impermeabilă a peretelui celulei vegetale. Din punct de vedere chimic, lignina este un polimer fenolic care conține 3 tipuri de unități fenolice solubile în apă: alcool p-cumarilic, alcool coniferilic și alcool sinapilic.
5. Slăbirea forțelor care leagă microfibrilele de celuloză în structura dură a peretelui celular vegetal, prin metode care nu distrug lignina vegetală (procedeul clasic de separare a celulozei de lignina se face în mediu bazic puternic, cu hidroxid de sodiu la pH >10, ceea ce conduce la distrugerea totală a ligninei) este de un interes economic imens, deoarece aceasta contribuie atât la eficientizarea valorificării celulozei din plante, totodată permite recuperarea ligninei vegetale, de asemenea, de un interes economic major, ca urmare a potențialului enorm de utilizare a acesteia ca ingredient activ în industria farmaceutică.
6. Calitățile farmaceutice și potențialul de utilizare a ligninei vegetale pentru o gamă largă de aplicații industriale, de la biocombustibili la produse chimice și materiale avansate, sunt urmare a proprietăților de biocompatibilitate, a capacității de absorbție a radiației UV, a activității antioxidante și antimicrobiene, precum și a capacității de îmbunătățire a rezistenței mecanice a biomaterialelor (Robles RJ, Carcamo-Martinez A, Stewart SA, Donnelly RF, Larraneta E, Borrega M. Lignin for pharmaceutical and biomedical applications – Could this become a reality? *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2020, 18:100320) (2).
7. Un alt beneficiu al efectului de *inmuiere* a radiației laser asupra ligninei din peretele celulei vegetale ar putea fi **marirea randamentului de extracție a metaboliților primari și secundari din biomasa vegetală**, slăbirea forțelor de legare dintre componentele peretelui celulei vegetale făcând teoretic posibilă mărirea vitezei de extracție a compușilor vegetali, și/sau mărirea cantității de compuși extractibili, ori extracția unor molecule cu masă mai mare, ca urmare a măririi porilor celulei vegetale prin acest efect dezintegrant al radiației laser monocrome asupra structurii rigide a peretelui celulei vegetale.
8. Menționăm faptul că radiația laser la 532nm a fost dovedită eficientă în solvent apos, nu și în mediu alcoolic sau acetonic (1).
9. În acest context general, având la bază rezultatele studiilor realizate de Batirtze și colab, 2018 (1), s-a considerat de interes științific și practic ridicat ^{a)}studiul efectului radiației laser la 532nm asupra randamentului extracției compușilor activi dintr-o biomasă vegetală, dar și ^{b)}studiul efectului radiațiilor laser la 488nm, 514nm, 552nm, 660nm și 785nm asupra randamentului extracției compușilor activi vegetali de interes pentru om, cele 5 lungimi de undă noi fiind la propunerea unor specialiști în fizica laserilor, parteneri în proiectul de cercetare.



10. Punctual, studiile s-au realizat pe proiect POC Cod SMIS 105542 cu titlul *Noi tehnologii și produse pentru sănătate*, Contract subsidiar D nr. 35/08.11.2019 (cu termen de finalizare 30.03.2022), având ca parteneri ICCF Bucuresti (în calitate de organizație de cercetare) și Apel Laser SRL (în calitate de întreprindere beneficiară - IMM); s-a selectat pentru cercetare materia primă vegetală *Plantago lanceolata* L. - *folium*, respectiv frunze de pătlagină îngustă.

11. Prezenta cerere de brevet de invenție valorifică rezultatele studiului de colaborare efectivă pe contract D35/08.11.2019, respectiv brevetează un procedeu de obținere a trei categorii de extracte active din frunze de patlagină îngustă, utilizabile ca ingrediente active în obținerea de suplimente alimentare, suplimente dietetice și produse nutraceutice noi, prin extracția materiei prime vegetale cu apă asistat cu radiație laser la 488nm, procedeu dovedit în cadrul cercetării pe Contract D35 cu efect de sporire a cantității de minerale și microelemente, totodată și de augmentare a efectului antioxidant a categoriilor de extracte brute și selectivă rezultate.

C) Prezentarea problemei tehnice

12. Este bine cunoscută importanța mineralelor și microelementelor în nutriție și sănătate, acestea fiind în fapt elemente chimice indispensabile tuturor organismelor vii, având rol structural și funcțional major. Hormonii, enzimele, mesagerii chimici, pompele celulare, ca și majoritatea vitaminelor depind de acțiunea catalizatoare a unor minerale și microelemente, de asemenea stau la baza realizării metabolismul energetic și oxidativ al tuturor organismelor vii; de exemplu, la om, cuprul asistă tirozinaza, iodul asistă tiroxina, cobaltul este indispensabil pentru funcția vitaminei B12, iar zincul asistă funcționarea superoxid-dismutazei, astfel fiind indispensabil în buna funcționare a sistemului imunitar al acestuia (3-9).

13. Este bine cunoscut și faptul că, dintre metaboliții vegetali secundari, polifenolii sunt compușii vegetali printre cei mai folositori la om, fiind responsabili de prevenirea bolilor și de menținerea stării de sănătate, în special ca urmare a efectului antioxidant ridicat, la care se adaugă multiple efecte benefice în refacerea organismului după boală (10-13).

14. În acest context, extractele active obținute din frunze patlagină îngustă, bogate în minerale, microelemente, polifenoli (derivați de acid cafeic și derivați de luteolin) și polizaharide cu proprietăți de biocompatibilitate dovedite pe mucoasa tractului digestiv, tractului respirator ca și epidermul la om (14), sunt produse cu valoare terapeutică și alimentară foarte ridicată (15-17).

15. În acest context, problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție se referă la realizarea UNUI PROCEDEU DE OBȚINERE A TREI VARIANTE DE EXTRACTE ACTIVE DIN FRUNZE DE PATLAGINĂ ÎNGUSTĂ (*Plantago lanceolata* L. *folium*, *Plantaginis folium*),



care pot fi utilizate ca ingrediente active naturale pentru obținerea de multiple produse sanogene pentru om, suplimente alimentare, suplimente dietetice, ori produse nutricosmetice noi, cu un conținutul standardizat în minerale, microelemente și polifenoli activi vegetali.

16. Realizarea a trei variante de extracte active din frunze de patlagină este în sprijinul aplicantului invenției prin posibilitatea de a selecta un anumit tip de produs sanogen din cele trei categorii cunoscute, ținând cont de infrastructura aplicantului, totodată și de cerințele la notificarea acestora. Conform definiției EMA (EU) și FDA (USA):

16.1) *suplimentele dietetice* sunt produse pentru sănătate cu scopul de a suplimenta dieta în vitamine, minerale, acizi grași, aminoacizi, fibre și alte substanțe care nu sunt esențiale pentru viață, dar au efecte benefice asupra sănătății;

16.2) *suplimentele alimentare* sunt produse pentru sănătate cu rol de a corecta anumite deficiențe nutriționale, sau de suport pentru anumite funcții fiziologice, care pot să conțină vitamine, minerale, aminoacizi, acizi grași esențiali, fibre, dar și extracte vegetale;

16.3) În categoria de produse *nutricosmetice* intră, atât suplimentele alimentare, cât și anumite băuturi, ori alte produse alimentare cu rol de suport asupra funcțiilor care se reflectă în aspectul exterior al corpului, sau asupra aparențelor, aici intrând aspectul pielii, aspectul părului, aspectul unghiilor, etc.

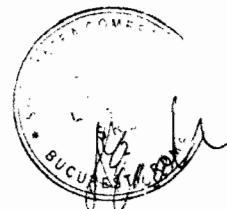
17. Argumente în favoarea invenției:

17.1. Speciile de patlagină sunt foarte bine reprezentate în flora României;

17.2. Produsele active izolate din patlagină pot fi utilizate în multiple formule sanogene, funcție de solicitarea pieței și/sau de gama de produse dorită a se realiza de către aplicant (o întreprindere de profil), ca urmare a compoziției chimice bogate în special în minerale, și microelemente, care intră în însăși definiția unui produs sanogen;

17.3. Procedul de obținere pentru cele trei variante de extracte active din frunze de patlagină îngustă (extract total, extract selectiv îmbogățit în polizaharide minerale și microelemente și extract selectiv îmbogățit în polifenoli) ofera ingrediente active pentru obținerea a oricare dintre cele trei variante de produse sanogene pentru om (16.1, 16.2, 16.3), având un conținut modulat și standardizat de minerale, microelemente și polifenoli.

17.4. Procedul de obținere pentru cele trei variante de extracte active este gradual, ușor de realizat, și poate fi realizat la orice aplicant (întreprindere de profil) cu infrastructura/echipamente standard pentru obținerea de extracte active vegetale.



D) Expunerea invenției

18. Procedeele de obținere pentru cele trei categorii de extracte active din frunze de patlagină îngustă se referă la:

18.1. Un extract total (codificat E1) sub formă de pulbere, obținut prin extracția cu apă asistată cu radiație laser la 488nm a frunzelor de patlagină îngustă, cu un conținut standardizat în: total de minerale și microelemente (mg/g pulbere) și total de polifenoli exprimați în acid galic (mg GAE/g pulbere);

18.2 Un extract selectiv (codificat E2.1) sub formă de pulbere, îmbogățit în minerale și microelemente, reprezentat de precipitatul în etanol 80% (v/v) al extractului total din apa (2.1), cu un conținut standardizat în: total de minerale și microelemente (mg/g pulbere),

18.3 Un extract selectiv (codificat E2.2) sub formă de extract standardizat în etanol 21% (v/v), îmbogățit în polifenoli, reprezentat de supernatantul etanolic aferent precipitatului din etanol 80% (2.2), cu un conținut standardizat în: total de polifenoli exprimați în acid galic (mg GAE/mL extract);

19. Cele trei categorii de extracte active se pot utiliza ca ingrediente active pentru obținerea de suplimente alimentare (se referă la extractul total, E1), suplimente dietetice (se referă la cele două extracte selective, E2.1 și E2.2), ori produse nutricosmetice noi (se referă la extractul selectiv îmbogățit în minerale și microelemente, E2.1), standardizarea lor permițând un baleaj extins al concentrației acestora în produsul final, alături de alte ingrediente active vegetale.

20. Descrierea procedurii de obținere a extractului total (E1);**Etape de lucru:**

20.1. extracția materiei prime vegetale (frunze de patlagină îngustă, uscate și măcinate) cu apă (raport materie primă:solvent de extracție, 1:20, g/v), cu agitare continuă (300 rotații pe minut), 1 oră fără laser la temperatura de reflux a solventului, urmat ce 1 oră asistat cu radiație laser la 488nm de putere 40 mW la temperatura masei de extracție;

20.2. separarea extractului apos brut prin filtrare pe filtru de pânză de burbuc;

20.3. dozarea totalului de polifenoli din extractul apos brut (mg GAE/mL extract);

20.4. concentrarea extractului apos brut la produs *spiss*;

20.5 uscarea produsului *spiss* în cuptor/etuvă cu vid la temperatura ambiantă;

20.6. măcinarea extractului uscat rezultat (denumit extract total din *Plantaginis folium* - E1) la pulbere fină și dispunerea acesteia în recipiente etanșe, ferit de lumină;

20.7. analiza calitativă (profil polifenoli, HPTLC) și cantitativă (total minerale și microelemente și total polifenoli) a produsului E1 pentru stabilirea *Specificației tehnice de*



calitate (se prelucrează rezultatele din minim trei șarje consecutive, pentru fiecare lot de plantă în lucru).

20.8 – produsul E1 se caracterizează prin aceea că are un conținut de: minim 55mg total minerale și microelemente și minim 15 mg polifenoli totali exprimați în acid galic per 1 g pulbere produs;

21. Descrierea procedurii de obținere a extractelor selective - extract selectiv îmbogățit în minerale și microelemente (E2.1) și extract selectiv îmbogățit în polifenoli (E2.2);

Etape de lucru:

21.1. extracția materiei prime vegetale (frunze de patlagină îngustă, uscate și măcinate) cu apă (raport materie primă:solvent de extracție, 1:20, g/v), cu agitare continuă (300 rotații pe minut), 1 oră fără laser la temperatura de reflux a solventului, urmat de 1 oră asistat cu radiație laser la 488nm de putere 40 mW, la temperatura masei de extracție;

21.2. separarea extractului brut apos prin filtrare pe filtru de pânză de bumbac;

21.3. dozarea totalului de polifenoli din extractul apos brut (mg GAE/mL extract);

21.4. concentrarea extractului apos brut la produs *spiss*;

21.5 trecerea produsului *spiss* în etanol 80% (v/v), raport de precipitare 1:4, g/v;

21.6 staționarea suspensiei rezultate în scopul precipitării componentelor (se realizează într-un interval de 20-24 ore, la frigider);

21.7. separarea precipitatului (21.8) îmbogățit în minerale și microelemente prin decantare, cu recuperarea supernatantului alcoolic (21.9) îmbogățit în polifenoli;

21.8.1 uscarea precipitatului în cuptor/etuvă cu vid la temperatura ambiantă;

21.8.2 măcinarea extractului uscat rezultat (denumit extract selectiv îmbogățit în minerale și microelemente din *Plantaginis folium* - E2.1) la pulbere fină și dispunerea acesteia în recipiente etanșe, ferit de lumină;

21.8.3 analiza calitativă și cantitativă (conținut specific în minerale și microelemente, metoda ICP-MS) a produsului E2.1 pentru stabilirea *Specificației tehnice de calitate* (se prelucrează datele din minim trei șarje consecutive, pentru fiecare lot de plantă).

21.8.4 – produsul E2.1 se caracterizează prin aceea că are un conținut minim de 110 mg total minerale și microelemente per 1 g pulbere produs;

21.9.1 dozarea totalului de polifenoli din supernatantului alcoolic (mg GAE/mL extract);

21.9.2 concentrarea supernatantului alcoolic la produs *spiss*;

21.9.3 reluarea produsului *spiss* în etanol 21% (v/v) astfel încât să rezulte un extract cu conținut standardizat, de 5mg GAE / 1mL extract în etanol 21% (v/v);



21.9.4 disponerea extractului alcoolic standardizat rezultat (denumit extract selectiv îmbogățit în polifenoli din *Plantaginis folium* - E2.2) în recipiente ferite de lumină;

21.9.5 analiza calitativă (profil polifenoli, HPTLC) și cantitativă (total polifenoli în extract exprimați în acid galic) a produsului E2.1 pentru stabilirea *Specificației tehnice de calitate* (se prelucrează datele/rezultatele din minimum trei șarje consecutive, pentru fiecare lot de plantă).

21.9.6 – Produsul E2.2 se caracterizează prin aceea că are un conținut de: 5 mg ($\pm 5\%$) polifenoli totali exprimați în acid galic per 1 mL soluție în etanol 21% (v/v);

E) AVANTAJE INVENȚIE

22. Prin aplicarea punctelor 20 (procedeu simplificat) și 21 (procedeu extins), conform invenției, rezulta trei avantaje:

22.1 Se oferă o soluție tehnică de o complexitate graduală (procedeu simplificat și procedeu extins), care ține cont de infrastructura potențialilor aplicanți utilizatori ai invenției, și care permite obținerea a trei categorii de extracte active vegetale, deosebit de valoroase pentru industria produselor sanogene;

22.2 Obținerea celor trei categorii de extracte active necesită un singur solvent (alcool etilic concentrat), care se poate refolosi în procesul tehnologic;

22.3 Cele trei categorii de extracte active sunt produse stabile: doua dintre ele sunt extracte uscate sub formă de pulbere și al treilea este un extract în etanol 21% (v/v), ușor de analizat și de standardizat în scopul elaborării *Specificației tehnice de produs/extract*;

22.4 Cele trei categorii de extracte active din *Plantaginis folium* se pot combina într-un număr infinit de produse sanogene din categoria suplimente alimentare, suplimente dietetice și produse nutraceutice noi și îmbunătățite;

H) Mod de realizare

23. Modul de realizare se referă la obținerea de extracte totale (procedeu simplificat) și extracte selective (procedeu extins) din frunze de patlagină îngustă prin extracție cu apă asistată cu radiație laser la 488nm.

24.1. Descrierea operațiilor tehnologice pentru obținerea extractului total din frunze de patlagină îngustă (E1):

- 250 g materie primă vegetală (frunze de patlagină îngustă, uscate și măc nate) se extrag cu 5000 mL apă (raport materie primă:solvent extracție, 1:20, g/v), mai întâi 1 oră la temperatura



de reflux a solventului de extracție, cu agitare continuă (300 rotații pe minut) fără radiație laser, după care se întrerupe încălzirea și se extrage încă 1 oră la temperatura masei de extracție, cu agitare continuă (300 rotații pe minut) asistat cu radiație laser la 488 nm la o putere de 40 mW;

- la finalul celor 2 ore de extracție se separă extractul apos de masă vegetală prin filtrare pe filtru de pânză de bumbac - se obțin în medie 3850 mL extract apos brut cu un conținut mediu de 0.35 mg GAE/mL extract;

- extractul apos brut se concentrează la produs spiss;

- produsul spiss se dispune în tăvi și se usucă în cuptor/etuvă cu vid la temperatura ambiantă;

- produsul uscat se macină la pulbere fină;

- se obțin, în medie, 70 g extract uscat sub formă de pulbere fină de culoare gri cu miros specific, denumit **extract total din *Plantaginis folium* - extract E1**;

- extractul uscat E1 se analizează în ceea ce privește conformitatea calitativă – punctual se realizează analiza HPTLC privind profilul în polifenoli al produsului E1;

- extractul uscat E1 se analizează în ceea ce privește conformitatea cantitativă – punctual se determina totalul de minerale și microelemente (mg/g), totodată și totalul de polifenoli exprimat în acid galic (mg/g), care trebuie să corespundă intervalelor stabilite de *Specificația tehnică de calitate a extractului total din frunze de pătlagina* (stabilită anterior în baza a minim 3 șarje consecutive de produs E1 din același lot și de la același furnizor);

- extractul E1 (produs final) se caracterizează prin aceea că are un conținut de: minim 55 mg total minerale și microelemente și minim 15 mg polifenoli totali exprimați în acid galic per 1 g pulbere; produsul final E1 se depozitează în recipiente etanșe, ferit de lumină.

24.2. Descrierea operațiilor tehnologice pentru obținerea ~~extractelor selective~~ din frunze de patlagină îngustă (E2.1 și E2.2):

- 250 g materie primă vegetală (frunze de pătlagină îngustă, uscate și măcinate) se extrag cu 5000 mL apă (raport materie primă:solvent extracție, 1:20, g/v), mai întâi 1 oră la temperatura de reflux a solventului de extracție cu agitare continuă (300 rotații pe minut) fără radiație laser, după care se întrerupe încălzirea și se extrage încă 1 ora la temperatura masei de extracție, cu agitare continuă (300 rotații pe minut) asistat cu radiație laser la 488 nm la o putere de 40 mW;

- la finalul celor 2 ore de extracție, se separă extractul apos de masa vegetală prin filtrare pe filtru de pânză de bumbac - se obțin în medie 3850 mL extract apos brut cu un conținut mediu de 0.35 mg GAE/mL extract;

- extractul apos brut se concentrează la produs spiss;



- produsul spiss obținut, în cantitate medie de 100g, se adaugă în fir subțire, sub agitare, într-un volum de 400 mL etanol concentrat, 96% (v/v) (însemnând un raport de precipitare 1:4, g/v), iar suspensia obținută se staționează peste noapte (20-24 ore) la frigider (8C), pentru definitivarea precipitării componentelor insolubile în alcool concentrat;

-¹⁾precipitatul rezultat (extractul îmbogățit în minerale și microelemente) se separă de
²⁾supernatantul alcoolic (extractul îmbogățit în polifenoli) prin decantare;

¹⁾precipitatul se reia în tăvi și se usucă în cuptor/etuvă cu vid la temperatura ambiantă, iar produsul uscat se macină la pulbere fină;

- se obțin, în medie 25g extract uscat/pulbere fină de culoare gri deschis, denumit **extract selectiv îmbogățit în minerale și microelemente din Plantaginis folium - extract E2.1;**

- extractul uscat E2.1 se analizează în ceea ce privește conformitatea calitativă și cantitativă – punctual se determină prin tehnica ICP-MS conținutul specific și conținutul total în minerale și microelemente (mg/g), care trebuie să corespundă intervalelor stabilite de *Specificația tehnică* de calitate a extractului selectiv îmbogățit în minerale și microelemente din frunze de patlagină (stabilită anterior în baza a minim 3 șarje consecutive de produs E2.1 din același lot și de la același furnizor);

- extractul E2.1 (produs final) se caracterizează prin aceea că are un conținut de: minim 110mg total minerale și microelemente per 1 g pulbere;

- produsul final E2.1 se depozitează în recipiente etanșe, ferit de lumină

²⁾supernatantul alcoolic se analizează mai întâi din punctul de vedere al conținutului total în polifenoli (mg GAE/mL);

- supernatantul alcoolic se concentrează la produs spiss;

- se obțin, în medie, 45g produs spiss care se reia în etanol 21% (v/v) astfel încât să rezulte un extract cu conținut exact de 5mg GAE / 1mL etanol 21% (v/v), denumit **extract selectiv îmbogățit în polifenoli din Plantaginis folium - extract E2.2;**

- extractul alcoolic E2.2 se analizează în ceea ce privește conformitatea calitativă – punctual se realizează analiza HPTLC privind profilul în polifenoli al produsului E2.2;

- extractul alcoolic E2.2 se analizează în ceea ce privește conformitatea cantitativă – punctual se determină totalul de polifenoli exprimați în acid galic (mg/g), care trebuie să corespundă intervalelor stabilite de *Specificația tehnică* de calitate a extractului selectiv îmbogățit în polifenoli din frunze de patlagină (stabilită anterior în baza a minim 3 șarje consecutive de produs E2.2 din același lot și de la același furnizor);



- Extractul E2.2 (produs final) se caracterizează prin aceea că are un conținut de 5mg ($\pm 5\%$) polifenoli totali exprimați în acid galic per 1 mL soluție în etanol 21% (v/v);
- produsul final E2.2 se depozitează în recipiente etanșe, ferit de lumină.

25. Prin aplicarea procedurii tehnologice descris mai sus:

- Rezultă trei extracte standardizate din frunze de patlagină care se pot utiliza ca ingrediente active naturale pentru obținerea de suplimente alimentare, suplimente dietetice și produse nutraceutice noi și îmbunătățite;
- Extractul total (E1) se caracterizează prin aceea că are un conținut de: minim 55mg total minerale și microelemente și minim 15 mg polifenoli totali exprimați în acid galic per 1g pulbere;
- Extractul selectiv (E2.1) se caracterizează prin aceea că are un conținut de: minim 110mg total minerale și microelemente per 1g pulbere;
- Extractul selectiv (E2.2) se caracterizează prin aceea că are un conținut de: 5 mg ($\pm 5\%$) polifenoli totali exprimați în acid galic per 1 mL soluție în etanol 21% (v/v);

26. Argumente științifice privind datele din prezenta cerere de brevet de invenție:

26.1 Figura 1 prezintă comparația între conținutul chimic calitativ în polifenoli al extractului total E1, față de extractul selectiv îmbogățit în polifenoli E2.2, obținute din frunze de patlagină îngustă - realizat prin metoda HPTLC.

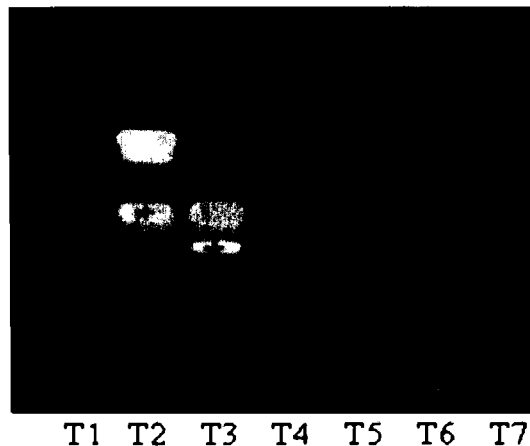


Figura 1. Comparație între conținutul chimic calitativ în polifenoli (metoda HPTLC) al extractului total (E1) față de extractul selectiv îmbogățit în polifenoli (E2.1) obținute din *Plantaginis folium*; Unde: Track T1, quercetin-3-O-rutinoside/rutin, quercetin-3-O-galactoside/hyperoside and gallic acid (ref.); Track T2 quercetin-3-O-rutinoside/rutin, chlorogenic acid, quercetin-3-O-galactoside/hyperoside, luteolin-7-O-glucoside/ cynaroside, apigenin-8-C-glucoside/vitexin, caffeic acid (ref.); Track T3: rutin, chlorogenic acid, apigenin-7-O-glucoside/cosmosiin and kaempferol (ref.); Track T4-T5, extract total (E1) din *Plantaginis folium* (duplicat); Track T6-T7, extract selectiv îmbogățit în polifenoli (E2.2) din *Plantaginis folium* (duplicat);

[Handwritten signature]



Astfel, la același volum de probă test, se constată un conținut chimic calitativ similar în polifenoli în cele două extracte test, E1 și E2.2, punctual se constată prezența derivaților de acid cafeic (spoturile albastre fluorescente) și a derivaților de luteolin (spoturile galbene fluorescente), care sunt specifici materiei prime *Plantaginis folium*, compusi care sunt superior cantitativ în extractul selectiv E2.2 (Track T6-T7), față de extractul total E1 (Track T4-T5);

26.2 Tabelul 1 prezintă comparația între conținutul chimic calitativ și cantitativ în minerale și microelemente al extractului total E1, față de extractul selectiv E2.1, obținute din frunze de patlagină îngustă - realizat prin tehnica ICP-MS.

Nr. crt.	Element	E1 (n=3)	E2.1 (n=3)
		Extract total (pulbere) din <i>Plantaginis folium</i> (extracție laser 488nm) μg/g (ppm)	Extract selectiv (pulbere) din <i>Plantaginis folium</i> (extracție laser 488nm) μg/g (ppm)
1	Na	730,9196	693,60
2	Mg	2373,94	8992,172
3	P	5119,440	18887,203
4	K	39008,94	36700,673
5	Ca	11066,548	44917,687
6	Cr	3,310	10,181
7	Mn	85,696	509,814
8	Fe	239,751	1774,314
9	Cu	8,359	23,328
10	Zn	37,297	133,793
11	Cd	0,089	1,331
12	Pb	1,120	0,595
Total general		58.675 ppm (Specificație tehnică produs - min. 55 mg/g pulbere)	112.645 ppm (Specificație tehnică produs - min. 110 mg/g pulbere)

Astfel, analiza conținutului în minerale și microelemente al extractului total (E1), în comparație cu extractul selectiv îmbogățit în minerale și microelemente (E2.1), obținute prin extracție cu laser la 488nm (la o putere de 40mW), relevă dublarea cantității de minerale și microelemente în extractul selectiv: punctual, se constată un conținut ~~minim~~ de 55 mg/g pulbere extract E1, față de 110 mg/g pulbere extract E2.1.



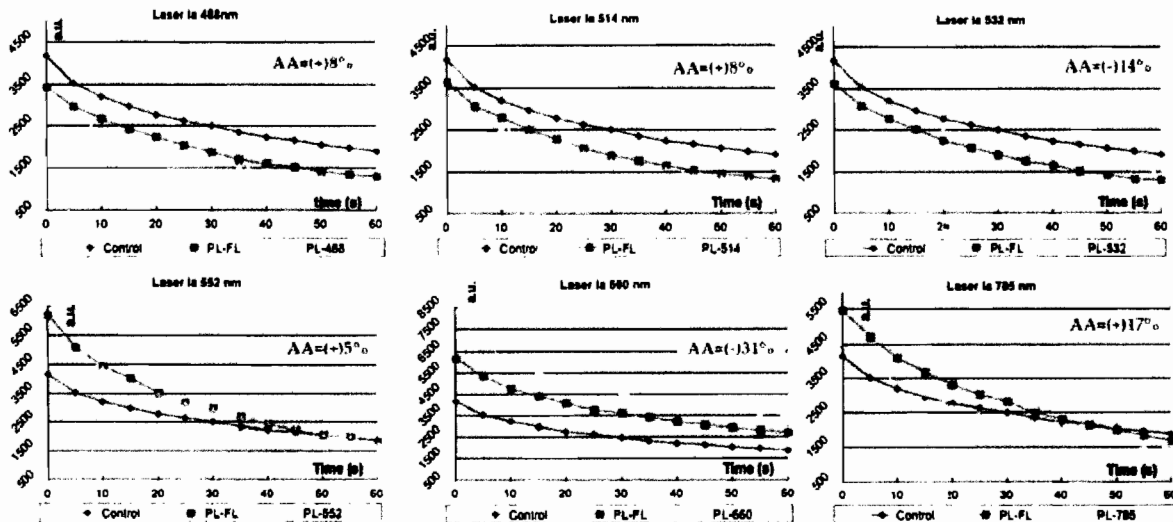
26.3 Tabelul 2 prezintă comparația între conținutul chimic calitativ în minerale și microelemente al extractului total E1 obținut prin extracție fără laser (Martor - FL) în comparație cu extractul total obținut prin extracție asistată cu radiație laser, la lungimile de undă studiate în cadrul Contractului D35/08.11.2019, punctual radiație laser la 488nm (40mW), 514nm (15mW), 532nm (20mW), 552nm (15mW), 660nm (75mW) și 785nm (70mW).

Nr. crt.	Element (µg/g)	E1 Martor - FL	E1 L488	E1 L514	E1 L532	E1 L552	E1 L660	E1 L785
1	Na	628,929	730,9196	665,879	677,310	641,094	630,362	391,176
2	Mg	2244,42	2373,94	1919,98	2470,67	1971,72	1956,47	1223,90
3	P	4627,43	5119,440	3353,930	5165,932	4150,800	4376,248	2333,790
4	K	37101,70	39008,94	25343,85	39304,13	32897,501	32290,46	17106,027
5	Ca	10660,05	11066,548	7179,166	11034,65	8565,559	9268,698	5185,342
6	Cr	2,515	3,310	2,032	2,819	2,526	10,136	2,611
7	Mn	80,171	85,696	56,657	89,305	60,775	63,372	40,577
8	Fe	173,323	239,751	189,184	197,478	199,414	205,083	127,208
9	Cu	7,421	8,359	5,878	8,008	5,895	7,932	4,319
10	Zn	39,425	37,297	18,52	223,115	21,590	24,566	37,288
11	Cd	0,098	0,089	0,099	0,103	0,120	0,109	0,100
12	Pb	1,120	1,120	1,009	1,150	1,127	1,123	1,082
I. Total minerale și microelemente		55.566	58.675 +5.3%	38.736 -30.28%	59.174 + 6%	48.518 - 13%	48.836 -12%	26.453 -52.39%

Astfel, analiza extractelor totale (de tip E1) obținute din *Plantaginis folium* prin extracție asistată cu radiație laser la 488nm, 514nm, 532nm, 552nm, 660nm și 785nm, față de extractul martor obținut fără laser (Martor - FL) indica radiațiile la 488nm și 532nm că fiind capabile să crească conținutul în minerale și microelemente din extracte, în timp ce radiațiile laser la lungimile de unda de 514nm, 552nm, 660nm și 785nm scad semnificativ conținutul în minerale și microelemente din extracte.



26.4 Diagrama 1 prezintă rezultatele studiilor de chemiluminescență privind activitatea antioxidantă măsurată în procente (AA%) a celor 6 extracte totale (E1) obținute prin extracție asistată cu radiație laser la lungimile de undă de 488nm (40mW), 514nm (15mW), 532nm (20mW), 552nm (15mW), 660nm (75mW) și 785nm (70mW), față de activitatea antioxidantă a extractului total (E1) obținut fără radiație laser (Martor - FL).



Analiza datelor privind activitatea antioxidantă (sau potențialul scazenger de radicali liberi ai oxigenului) a extractelor totale (E1) obținute din *Plantaginis folium* prin extracție asistată cu radiație laser la 488nm, 514nm, 532nm, 552nm, 660nm și 785nm indică radiațiile laser la 532nm și 660nm ca fiind capabile să aducă radicali liberi în sistem (se constată scăderea puterii antioxidante a acestor extracte cu 14%, respectiv 31%), în timp ce radiațiile laser la 488nm, 514nm, 552nm și 785nm măresc activitatea antioxidantă a extractelor cu 8%, 8%, 5% și chiar 17%, față de extractul martor fără laser (Martor - FL).

27. CONCLUZII STUDIULI ȘTIINȚIFICE PE CONTRACT D35/08.11.2019

Din analiza datelor obținute la extracția materiei prime *Plantaginis folium* cu radiație laser la cele șase lungimi de undă (488nm, 514nm, 532nm, 552nm, 660nm, 785nm) propuse spre studiu de către specialiștii de la întreprinderea parteneră (Apel Laser SRL) s-a constatat:

- scăderea activității antioxidante a extractelor asistate cu radiație laser la 532nm și 660nm, care induc o scădere a puterii antioxidante cu 14%, respectiv 37%, față de extractul martor obținut fără laser;



- scăderea semnificativă a conținutului în minerale și microelemente în cazul extracției cu radiație laser la 514nm, 552nm, 660nm și 785nm, față de extractul martor obținut fără laser;
- creșterea conținutului în minerale și microelemente (cu 5,8%), totodată și augmentarea activității antioxidante (cu 8%) a extractului asistat cu radiație laser la 488nm, față de extractul martor obținut fără laser.

28. Prezentul brevet de invenție a fost realizat în baza lucrărilor de cercetare, colaborare efectivă între ICCF București și întreprinderea APEL LASER SRL, pe Contract subsidiar D nr. 35/08.11.2019 cu titlul "TEHNOLOGIE INOVATIVĂ DE EXTRACȚIE A BIOMASEI VEGETALE UTILIZÂND RADIAȚIA LASER", care se desfășoară pe proiect POC-A1-A1.2.3-G-2015 cu titlu NOI TEHNOLOGII ȘI PRODUSE PENTRU SĂNĂTATE, ID P_40_406, SMIS 105542, Contract nr. 60/05.09.2016 având că beneficiar ICCF București, fiind Indicator de realizare pe proiect.

29. Bibliografie

1. Batirtze P.M. Et al. *Following laser induced changes of plant phenylpropanoids by Raman microscopy. Scientific Reports*. Nature; 2018, 8:1804)
2. Juan Dominguez Robles, Alvaro Carcamo-Martinez, Sarah A. Stewart, Ryan F. Donnelly, Eneko Larraneta, Marc Borrega. Lignin for pharmaceutical and biomedical applications – Could this become a reality? *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2020, 18:100320.
3. Alves J, Barrientos G, Toro V, Grijota FJ, Muñoz D, Maynar M. Correlations between Basal Trace Minerals and Hormones in Middle and Long-Distance High-Level Male Runners. *Int. J. Environ. Res Public Health*. 2020; 17:9473.
4. Sanchez-Capelo A, Cremades A, Tejada F, et al. Potassium regulates plasma testosterone and renal ornithine decarboxylase in mice. *FEBS Lett*. 1993; 333:32–34.
5. Basini G, Tamanini C. Selenium stimulates estradiol production in bovine granulosa cells: possible involvement of nitric oxide. *Domest Anim Endocrinol*. 2000;18:1–17.
6. Garfinkel L, Garfinkel D. Magnesium regulation of the glycolytic pathway and the enzymes involved. *Magnesium*. 1985; 4:60–72.
7. MacDonald RS. The role of zinc in growth and cell proliferation. *J Nutr*. 2000; 130:1500S–1508S.
8. Ishikawa Y, Kudo H, Suzuki S, et al. Down regulation by a low-zinc diet in gene expression of rat prostatic thymidylate synthase and thymidine kinase. *Nutr Metab*. 2008; 5:12.
9. Moe SM. Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium. *Prim Care*. 2008; 35 215–237.
10. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2009; 2:270-278.
11. Fraga CG, Galleano M., Verstraeten SV, Oteiza PI Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med*. 2010; 31:435-45.
12. Cory H., Passarelli S., Szeto J., Tamez M., Mattei Josiemer. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Front. Nutr*. 2018, <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>.
13. Vona R., Pallotta L., Cappalleti M., Severi C., Matarese P. The Impact of Oxidative Stress in Human Pathology: Focus on Gastrointestinal Disorders. *Antioxidants (Basel)*. 2021; 10:201.
14. Pirvu Lucia, Coprean Dragomir, Schiopu Stelian, Gabriela Pintilie, Svetlana Colceru Mihul, Nicoleta Alexandru. *Produs antiulceros de natura vegetala si procedeu de obtinere. Patent RO121764(B1)2008-04-30.*
15. José Luis Guil-Guerrero. Nutritional composition of *Plantago* species (*P-major* L., *P-lanceolata*, L., and *P-media* L.). *Ecology of Food and Nutrition*. 2010; 40:481-495.
16. Najafian Y., Hamed SS, Farshchi MK, Feyzabadi Z. *Plantago major* in Traditional Persian Medicine and modern phytotherapy: a narrative review. *Electron Physician*. 2018; 10:6390-6399.
17. Farcas AD, Mot AC, Parvu AE, Toma VA, Popa MA, Mihai MC, Sevastre B, Romana I, Vlase L, Parvu M. *In Vivo Pharmacological and Anti-inflammatory Evaluation of Xerophyte Plantago sempervirens Crantz*. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019:5049643.



REVICICARI

1. Procedeu de obținere pentru un extract vegetal standardizat de uz sanogen **denumit extract total din frunze de patlagină îngustă** cu un conținut de minim 55mg total minerale și microelemente și minim 15 mg polifenoli totali exprimați în acid galic (GAE) per 1 g pulbere, caracterizat prin aceea că: materia primă vegetală uscată și măcinată se extrage cu apă (1:20, g/v) în regim de agitare continuă, 1 oră fără laser la temperatura de reflux a solventului și 1 oră asistat cu radiație laser la 488 nm la o putere de 40 mW la temperatura masei de extracție, urmat de separarea prin filtrare a extractul apos, concentrarea extractului apos la un produs spiss, uscarea produsului spiss la vid și măcinarea acestuia la pulbere fină, care se depozitează la loc uscat ferit de lumină;

2. Procedeu de obținere pentru un extract vegetal standardizat de uz sanogen **denumit extract selectiv îmbogățit în minerale și microelemente din frunze de patlagină îngustă** cu un conținut de minim 120mg total minerale și microelemente per 1 g pulbere, caracterizat prin aceea că: materia primă vegetală uscată și măcinată se extrage cu apă (1:20, g/v) în regim de agitare continua, 1 oră fără laser la temperatura de reflux a solventului și 1 oră asistat cu radiație laser la 488 nm la o putere de 40 mW la temperatura masei de extracție, urmat de separarea prin filtrare a extractul apos, concentrarea extractului apos la un produs spiss, precipitarea produsului spiss din etanol concentrat (raport 1:4, g/v), uscarea precipitatului la vid și măcinarea acestuia la pulbere fină, care se depozitează la loc uscat ferit de lumina;

2. Procedeu de obținere pentru un extract vegetal standardizat de uz sanogen **denumit extract selectiv îmbogățit în polifenoli din frunze de patlagină îngustă** cu un conținut de 5mg GAE ($\pm 5\%$) per 1 mL extract în etanol 21% (v/v), caracterizat prin aceea că: materia primă vegetală uscată și măcinată se extrage cu apă (1:20, g/v) în regim de agitare continuă, 1 oră fără laser la temperatura de reflux a solventului și 1 oră asistat cu radiație laser la 488 nm la o putere de 40 mW la temperatura masei de extracție, urmat de separarea prin filtrare a extractul apos, concentrarea extractului apos la un produs spiss, precipitarea produsului spiss din etanol concentrat (raport precipitare 1:4, g/v), recuperarea supernatantului alcoolic, dozarea conținutului în polifenoli totali (mg GAE/mL) în supernatantul alcoolic, concentrarea supernatantului alcoolic la un produs spiss, reluarea produsului spiss în etanol 21% (v/v) astfel încât să rezulte un extract final cu un conținut exact de 5 mg GAE per 1 mL extract, care se depozitează în recipiente de sticlă, la loc uscat ferit de lumină.

