



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00187**

(22) Data de depozit: **12/04/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/10/2023 BOPI nr. **10/2023**

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
DIN BUCUREȘTI - USAMVB, BD.MĂRĂȘTI,
NR.59, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

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

• SPINU SIMONA, STR.ALEXANDRU IOAN
CUZA, NR.21, BL.21, AP.12, TÎRGU-JIU, GJ,
RO;
• FIERĂSCU RADU CLAUDIU,
STR. DUNĂRII, BL. D4, ET. 4, AP. 18,
ROȘIORI DE VEDE, TR, RO;
• BAROI ANDA-MARIA, BD.1 DECEMBRIE
1918, NR.38, BL.A140, SC.A, AP.13,
MANGALIA, CT, RO;
• FIERĂSCU IRINA, STR.ION MANOLESCU,
NR.2, BL. 129, SC.B, ET.1, AP.49,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• FISTOȘ TOMA, STR. SPICULUI, NR.31,
ONEȘTI, BC, RO

(54) **EXTRACTE ECOLOGICE DIN DEȘEURI
DE BRUSTURE-PROCEDEU DE OBȚINERE ȘI POTENȚIALA
UTILIZARE TERAPEUTICĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor compuși biologic activi din deșeuri de brusture (*Arctium lappa L.*) cu activitate antioxidantă și anti-microbiană. Procedeu, conform invenției, constă în extracția asistată de microunde a deșeurilor de brusture epuizate în solvent amestec hidroalcoolic alcool: apă, în raport material vegetal: solvent de 1:5...1:11, timp de extracție

60...100 min, putere microunde 700...1000W, fără agitare, urmată de concentrarea la evaporator rotativ și uscare prin liofilizare, rezultând extracte vegetale hidroalcoolice având un conținut de polifenoli totali de 8,5...10,5 mg echivalent acid galic/1g extract uscat.

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).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 222 00187
Data depozit	12-04-2022

RO 137689 A2

21

EXTRACTE ECOLOGICE DIN DEȘURI DE BRUSTURE - PROCEDEU DE OBTINERE ȘI POTENTIALA UTILIZARE TERAPEUTICĂ

Prezenta invenție se referă la o serie de extracte vegetale obținute din deșuri de brusture (*Arctium lappa* L.) obținute în urma procesării industriale, fitoconstituenții majori fiind caracterizați cantitativ, extracte ce prezintă potențialele aplicații terapeutice, antioxidante și antimicrobiene, datorită conținutului bogat de compuși biologic activi.

Brusturele este o specie care aparține familiei Asteraceae. Este un arbust care crește până la aproximativ un metru înălțime și are o tulpină ramificată și încrețită cu un diametru de 1 până la 2 cm. Are o dezvoltare majoră a rădăcinilor, cu puține ramuri, și atinge 45–50 cm adâncime, un diametru de 3–6 cm și 100–250 g.

De la un profil de planta dăunătoare a devenit o sursă de compuși biologic activi și o sursă pentru potențiale aplicații medicale. *Brusturele* a fost folosit pentru efectul sau antiinflamator, antitumoral/cancer, antidiabetic, posedând și deosebite proprietăți antimicrobiene și antivirale. Studii recente au arătat proprietățile sale antihiperlipidemice și antioxidante. Pe lângă utilizarea farmaceutică, alte aplicații industriale ale plantei sunt legate de utilizarea sa în industria alimentară și în produsele cosmetice.

În funcție de specie, cultivar, zona geografică, metoda de extracție sau solvent are o compoziție bogată în compuși biologic activi (compuși volatili, tanin, β -eudesmol, acid cafeic, acid clorogenic, inulină, trahelogenină, sitosterol- β -D-glucopiranozidă, lappaol, terpen, poliine, arctiin, arctigenin și diarctigenin, etc.). Rădăcinile de *A. lappa* L. prezintă interes din ce în ce mai mare, nu numai datorită compușilor fenolici, ci și pentru conținutul de polizaharide cu diverse proprietăți benefice pentru sănătate. Rădăcinile sale conțin polizaharide pectice (pectină cu conținut scăzut de metoxil, cu un grad de esterificare).

Pentru extracția diferitelor principii active din materialul vegetal trebuie să se țină cont de o serie de factori deosebit de importanți, pentru desfășurarea în condiții optime a procesului de extracție: natura produsului vegetal (deșeu sau material proaspăt), solvenții utilizați pentru extracție, condițiile de extracție. Amestecurile de solvenți folosite în extracția compușilor fenolici sunt în concentrații diferite și cu polarități diferite, în funcție de produșii ce se doresc a fi obținuți: de exemplu se pot utiliza amestecuri acetona/apa/ acid acetic (70/28/2, v/v/v); acetona/apa/ acid acetic (70/29.5/0.5, v/v/v); acetona/apa/ acid acetic (70/29.8/0.2, v/v/v); metanol/apa (50/50, v/v); metanol/apa/ acid acetic (50/49.5/0.5, v/v/v); metanol/ acid acetic (99.5/0.5, v/v) sau hexan, eter etilic, etanol, hexan - eter etilic (1:1, v/v), eter etilic - etanol (1:1, v/v), hexan - eter etilic - etanol (1:1:1, v/v).

Pentru obținerea de compuși biologic activi din deșuri vegetale sunt necesare tehnici de extracție mai puternice, care să aibă capacitate de extracție. *Extracția asistată de microunde* (MAE) este o tehnică care utilizează energia microundelor pentru a încălzi solventul și proba în vederea creșterii ratei transferului de masă dintre substanțele dizolvate din matricea probei și solvent, contribuind la trecerea mai ușoară a acestora în solvent. Avantajul acestei tehnici față de metodele convenționale de extracție constă în timpul redus de extracție, în condițiile folosirii unui consum redus de energie și solvent și cu o eficiență de extracție ridicată.

Utilizarea unei plante spontane sub forma de deșeu „epuizat” în urma proceselor tehnologice industriale, cu o foarte bună distribuție naturală oferă o soluție de tratament ieftină prin potențialul său antioxidant și antimicrobian.

Extractele standardizate reprezintă o foarte bună soluție pentru pregătirea unui produs de uz topic pe baza potențialului său farmacologic și a toxicității reduse.

Invenția de față se referă la obținerea unor extracte vegetale de *Arctium lappa* L. și la evaluarea proprietăților antioxidante și antimicrobiene în vederea utilizării ca potențial tratament

medical. Obiectul invenției consta într-un procedeu de obținere a extractelor vegetale caracterizate cantitativ, la verificarea reproductibilității procesului și evaluarea activității antioxidante și antimicrobiene pe linii de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) și *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Brevetul US6428822B1 revendica o substanță mixtă pentru tratarea hipertensiunii arteriale, constipației, detoxifiere, întărirea sistemului imunitar produsă prin extracția *Arctium lappa* L., morcov și ridiche cu apă, una sau două ore la temperatura de 70° C...100° C sub agitare, Extractele sunt condensate în vid, apoi extractele condensate sunt liofilizate la temperatură joasă în pulbere, pulberea este încapsulată sau presată în tabletă.

Brevetul CN103936803A revendica o metodă de extracție, separare și purificare a arctiinei. Metoda cuprinde următoarele etape: a) extracția cu etanol, și anume măcinarea *Arctium lappa*, adăugarea unei soluții de etanol care este de preferință de 5-10 ori în greutate, efectuarea extracției la reflux timp de trei ore de două până la trei ori și amestecarea soluțiilor de extracție; b) decolorarea cărbunelui activ, respectiv adăugarea de cărbune activ care reprezintă 0,5% din volumul soluției de extracție, efectuând decolorarea la reflux și efectuând filtrare, obținându-se astfel o soluție de decolorare; c) concentrare, și anume reciclarea soluției de decolorare la presiune redusă și permițând să rămână aproximativ 20% în volum de soluție de etanol; d) îndepărtarea impurităților, și anume adăugarea unei soluții mixte de eter de petrol și acetat de etil, agitarea soluției și extragerea impurităților și repetarea etapei de patru-șase ori; e) extracția cu arctiină, și anume adăugarea unui diclormetan pentru a extrage produsul și repetarea etapei de cinci-opt ori; f) concentrare și cristalizare, și anume amestecarea soluțiilor de extracție cu diclormetan care conțin produse, concentrarea soluției de extracție, adăugarea de metanol pentru a dizolva concentratul și adăugarea a 20% în volum de eter izopropilic pentru cristalizare, în care concentrația raportului de etanol la apă este de 70- 95%; raportul dintre eterul de petrol și acetatul de etil este (1:1)-(1:3). Metoda are efectele benefice și are un cost de producție scăzut și se scalează cu ușurință în producția industrială.

Brevetul WO1998015259A1 revendica metoda de extracție care consta în: 1) supunerea plantelor zdrobite la o prima extracție într-un excipient cosmetic (apa, glicerina, glicoli); 2) supunerea plantelor drenate rezultate la distilare prin apă pentru colectarea condensatului îmbogățit în molecule volatile; și 3) combinarea celor două faze într-una singură prin orice mijloace adecvate (emulsie, microemulsie, încapsulare). Aceste preparate sunt destinate utilizării în toate tipurile de produse cosmetice sau dermofarmaceutice.

Brevetul CN103432184A revendica o nouă aplicare a extractului de fructe de brusture în prepararea medicamentelor sau a alimentelor pentru prevenirea și tratarea depresiei.

Brevetul CN101391016B revendica o tehnică de extracție pentru extracția de compuși din brusture, soia sau usturoi.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția consta în dezvoltarea unui extract de material vegetal, fără utilizarea de reactivi periculoși mediului și a altor produse de sinteză chimică, fără utilizarea altor condiții predefinite extreme (temperatura, presiune, timp redus de reacție) care sunt consumatoare de energie, pentru potențiale aplicații terapeutice (antioxidante și antimicrobiene).

Extractele conform invenției sunt reprezentate de extracte vegetale hidroalcoolice din *Arctium lappa* L. (rădăcini), cu un conținut de polifenoli totali de 8,5...10,5 mg echivalent acid galic /1 g extract uscat prin liofilizare. Procedeu conform invenției presupune utilizarea metodei de extracție asistată de microunde, utilizând ca solvent amestecul hidroalcoolic de 30:70...70:30 (alcool:apa), raportul de material vegetal : solvent de 1:5...1:11, timp de extracție 60...100 min, putere microunde 700...1000 W, fără agitare, urmata de concentrarea la evaporatorul rotativ și uscarea prin liofilizare. Pentru verificarea reproductibilității procesului s-au realizat trei șarje în aceleași condiții și s-au măsurat amprentele extractelor prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC). Activitatea antioxidantă a fost determinată prin metoda spectrofotometrică colorimetrică 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) de 85...95%, iar activitatea antimicrobiană a fost determinată prin măsurarea zonei de inhibiție de 10...14 mm pentru *Staphylococcus aureus* și 11...15 mm pentru *Escherichia coli*.

Soluția propusă, conform invenției, **înlătură dezavantajele** utilizării substanțelor chimice de sinteză în potențialele formulări de uz topic, prin aceea că utilizează materiale ieftine și naturale ce rezultă din extracțiile de materiale vegetale, nu necesită substanțe și solvenți toxici și/sau periculoși, prezintă toxicitate redusă și este fără acțiune negativă asupra mediului.

Avantajele aplicării invenției: extractele vegetale sunt obținute printr-un procedeu cu randament bun de extracție al principiilor active dintr-un material vegetal obținut în urma procesării industriale, produsul obținut este ecologic și natural, prezintă concomitent două tipuri de acțiune potențial terapeutică: antioxidantă și antimicrobiană, prezintă interes pentru aplicații în tratamente naturale de uz topic, ce nu implică utilizarea substanțelor de sinteză față de care de-a lungul timpului s-a dezvoltat rezistența crescută.

Se dau în continuare patru exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1

Materialul supus extracției este constituit din material vegetal procesat anterior industrial și supus sortării (rădăcini). Materia rezultată, denumită în continuare produs vegetal, conține mai puțin de 0.2% impurități provenite din alte specii și mai puțin de 2.5% impurități provenite din aceeași plantă. Materialul vegetal primar a fost obținut prin uscarea unui deșeu obținut în urma procesării industriale, până la o umiditate de maxim 7%. Materialul vegetal uscat a fost supus extracției utilizând ca solvent amestecul hidroalcoolic de (în raport apă:alcool 60:40), raportul de material vegetal : solvent de 1:10, timp de extracție 80 min, putere microunde 900W, fără agitare, urmată de concentrarea la evaporatorul rotativ. Concentrarea s-a efectuat pe un evaporator rotativ, sub vid, la temperatura de 30°C, până la obținerea unei suspensii apoase cu un volum de aproximativ 1/10 ori mai mic decât volumul inițial. Uscarea soluției extractive concentrată a fost realizată la o temperatură de liofilizare de -45°C timp de 72 ore. Randamentul de obținere a extractului uscat a fost de 23.52 ±1.75%. Extractul obținut a fost condiționat în flacoane de sticlă brună cu dop din PVC, și păstrat la întuneric și temperatura camerei. În aceste condiții au fost realizate trei șarje de produs pentru a se determina reproductibilitatea metodei.

Exemplul 2

0.25 g extract obținut la exemplul 1 din fiecare șarjă (S1, S2, S3) se dizolvă în 25 ml etanol 50%. Soluțiile se concentrează la aproximativ 2.5 ml. Amprenta calitativă a polifenolilor se realizează prin metoda colorimetrică Folin Ciocâlteu. Determinarea polifenolilor se realizează la 765 nm conform protocolului descris în literatura de specialitate [I. Fierascu, și colab. Rom. Biotechnol. Lett. 20 (2015) 10570–10580].

În tabelul 1, sunt prezentate concentrațiile de compuși fenolici totali ai extractelor din cele trei șarje.

Tabelul 1

Șarjă	Șarjă 1-S1	Șarjă 2-S2	Șarjă 3-S3
Conținut total de polifenoli (exprimat în mg echivalenți acid galic/1 g extract uscat)	9.74	9.81	9.76

Rezultatele determinărilor calitative au fost analizate statistic prin aplicarea testelor ANOVA și Tukey. Nu s-au înregistrat diferențe statistice între concentrațiile de fenol total din cele trei șarje de extract ($p=0.4005$, $R^2 = 0.2610$). În urma analizei statistice s-a calculat procentul de

compuși fenolici din extract ca fiind de 9.77 ± 0.04 mg exprimați în echivalenți acid galic /1 g extract uscat.

Amprenta cantitativa a fitoconstituentilor se determina prin cromatografie de lichide de înalta performanta (HPLC). Analizele cromatografice au fost realizate pe un sistem HPLC prevăzut cu un detector DAD, autosampler și coloana de tip Eclipse XDB-C18 (150 x 4.6 mm i.d., 5 μm dimensiune de particule) (Agilent) iar datele obtinute sunt prelucrate cu un software specific. Faza mobila consta din doua soluții diferite: soluția A (1% acid acetic în apa) și B (1% acid acetic în acetonitril). Soluțiile se degazează și se filtrează prin filtru Labtech Vp30 de 0.45 μm. Se operează în regim de gradient după următoarea procedura: de la 0-55 min faza B variază de la 2 la 100% urmează etapa 55-60 min în care faza B rămâne constant la 100. În final se aplica un timp de 3 minute pentru echilibrarea coloanei la raportul inițial A:B=96:4. Debitul de lucru este 1mL/min și volumul de injecție este de 10 μL. Detecția UV se realizează la 280 nm. S-au realizat curbe de calibrare pe 5 puncte construite pe fiecare compus analizat cu $R^2 > 0.999$, folosindu-se material standard pentru acid galic, acid clorogenic, rutin, acid ferulic.

În tabelul 2, sunt prezentate concentrațiile fitoconstituentilor extractelor din cele trei șarje de extract.

Tabelul 2

Șarja/compus (mg/100 g extract uscat)	Șarja 1-S1	Șarja 2-S2	Șarja 3-S3
acid galic	6,83	6.87	6.85
acid clorogenic	9,81	9.94	9.93
rutin	8,71	8.67	8.87
acid ferulic	10,02	10.12	9.99

Exemplul 3

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

Rezultatele determinărilor individuale sunt prezentate în tabelul 3.

Tabelul 3

Șarja	Șarja 1-S1	Șarja 2-S2	Șarja 3-S3
Activitate antioxidantă (%)	88.9	87.8	88.5

Se constată o activitate antioxidantă ridicată ($88.40 \pm 0.56\%$), determinată prin metoda DPPH.

Exemplul 4

Extractul obținut la exemplul 1 a fost testat din punct antimicrobian prin testarea calitativă a activității antibacteriene pe *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) și *Escherichia coli* (ATCC 25922). Pentru realizarea experimentului au fost realizate 2 pasaje succesive, prin trecerea tulpinilor bacteriene pe mediu geloză nutritivă și incubare timp de 24 h, la 37 °C. Pentru realizarea experimentului, din cultura tânără s-a realizat o suspensie celulară în AFS (Apă fiziologică sterilă) (suspensia de lucru) cu densitate celulară la valoarea finală de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (Unități Formatoare de Colonii/ml) corespunzătoare standardului McFarland 0.5. Pentru testarea activității antimicrobiene a probelor mai sus menționate, la concentrația de lucru de 10 mg/ml, s-a utilizat metoda difuzimetrică adaptată (adaptare după CLSI, 2019). Astfel, pentru fiecare

specie bacteriană testată s-a realizat un inocul cu densitate standard 0,5 MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml), în AFS (apă fiziologică sterilă). Inoculul a fost însămânțat în pânză, cu tamponul steril, la suprafața mediu LB solid. Ulterior, peste inocul, s-au repartizat în spot, câte 10 μ l probă la concentrația de lucru. Plăcile au fost lăsate în repaus la temperatura camerei pentru adsorbția picăturii de soluție în mediu, după care plăcile au fost incubate la 37°C, cu capacul în jos, timp de 24 de ore. Activitatea inhibitorie a fost evaluată prin apariția unei zone de inhibare a creșterii în jurul fiecărui spot și măsurarea diametrului acesteia.

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

Tabelul 4

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

Se constata o activitate antibacteriana ridicata, atât asupra liniilor gram-pozitive (determinata prin efectul asupra *Staphylococcus aureus* – zona de inhibiție 11.67 ± 1.15 mm), cat si asupra liniilor gram-negative (determinata prin efectul asupra *Escherichia coli* – zona de inhibiție 12.33 ± 0.58 mm).

Revendicări

1. Extracte vegetale obținute din *Arctium lappa* L. **caracterizate prin aceea ca acestea** conțin acid galic, acid clorogenic, rutin, acid ferulic și cuprind 8,5...10.5 mg echivalenți acid galic /1 g extract uscat.
2. Procedeu de obținere a extractelor vegetale de *Arctium lappa* L. **caracterizate prin aceea** ca utilizează ca solvent amestecul hidroalcoolic de 30:70...70:30 (raport alcool: apă), raportul de material vegetal : solvent de 1:5...1:11, timp de extracție 60...100 min, putere microunde 700...1000 W, fără agitare, extracția fiind urmată de concentrarea la evaporatorul rotativ și uscarea prin liofilizare.
3. Extracte vegetale conform revendicărilor 1 și 2 **caracterizate prin aceea ca prezintă concomitent activitate** antioxidantă de 85...95% și activitate antimicrobiană determinată prin măsurarea zonei de inhibiție de 10...14 mm pentru *Staphylococcus aureus* și 11...15 mm pentru *Escherichia coli*.