



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00563

(22) Data de depozit: 15/09/2022

(41) Data publicării cererii:
29/03/2024 BOPI nr. 3/2024

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE, BUCUREȘTI,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• MANICOS S.R.L., DRUMUL TABEREI,
NR.37, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• GATEA FLORENTINA,
STR.DOAMNA GHICA NR.1, BL.1, SC.4,
ET.3, AP.133, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;
• LITESCU FILIPESCU SIMONA CARMEN,
STR.SUBCETATE, NR.97, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• RADU GABRIEL-LUCIAN,
ALEEA ROTUNDĂ NR.4, BL.H 6, SC.D,
AP.61, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• TRANDAFIR COSMIN- ADRIAN,
STR.MITROPOLITUL VARLAAM, NR.162,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI EXTRACT CONCENTRAT
ÎN ESCINĂ DIN FRUCTELE DE AESCULUS
HIPPOCASTANUM**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui extract concentrat în escină din fructele de *Aesculus hippocastanum* cu utilizare în biotehnologii. Procedeu, conform invenției, constă în pregătirea materialului vegetal, o etapă de extracție în soluție apoasă de alcool etilic de concentrație 60...95% (v/v), sub agitare continuă timp de 12...36 h, o etapă de extracție în

soluție apoasă de solvent organic prin ultrasonicare la o frecvență de 50...60 Hz, în condiții constante de temperatură, urmate de operații de filtrare, concentrare și stabilizare a extractului final, care are un conținut de escină de 288...324 mg/100 g extract.

Revendicări: 1



PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI EXTRACT CONCENTRAT IN ESCINA DIN FRUCTELE DE AESCULUS HIPPOCASTANUM

Inventia de fata se refera la un procedeu de obtinere a unui extract concentrat in escina din fructele de *Aesculus hippocastanum*, printr-o metoda care combina extractia cu solventi organici si extractia cu ultrasunete.

Aesculus hippocastanum (castanul de cal, castanul porcesc), este un arbore din familia Sapindaceae. Originar din sud-estul Europei, este raspandit in special in centrul și sudul peninsulei Balcanice, precum si in regiuni din vestul si nord-vestul Europei. *Aesculus hippocastanum* a fost folosit de secole in tratamentul pentru bronsita, dizenterie, hemoroizi probleme venoase si ale pielii in medicina populara [1]. Studiile clinice au demonstrat eficacitatea extractului de castan in insuficienta venoasă cronică, hemoroizi și edem postoperator si de asemenea proprietatile antiinflamatorii, antiangiogenice, antioxidante, antibacteriene, antivirale, hipoglicemiant, imunostimulatoare si anticancerigene [2,3]. Aceste proprietati se datoreaza compusilor biologic activi prezenti in fructe dar si in flori, frunze si scoarta. Fructele de castan contin compusi precum escina si prosapogenina taninuri, amine, aminoacizi, acid uric, fitosterol, rasini, flavonoide precum epicatechina acidului citric, leucocianidină, kaempferol si derivati ai acestuia, quercetina si derivati ai quercetinei, acizi grasi (acidul oleic si linoleic) [3].

Cel mai important compus din fructele de *Aesculus hippocastanum* este escina, un amestec complex de glicozide triterpenice saponinice prezenta in doua forme (α și β) care pot fi distinse prin proprietatile fizico-chimice si biologice respectiv, punctul de topire, solubilitatea in apa si potențialul hemolitic. β -escina este compusa din escină Ia si escina Ib, si este mai activa decat α -escina, care constă din izoescina Ia si izoescina Ib [4]. Extractia escinei (escina totala α și β) se poate realiza in mod conventional prin utilizarea solventilor adecvati (metanol, etanol, izopropanol, polietilen glicol, acetona si amestecuri ale acestora cu apa), acestea fiind

tehnici simple si relativ necostisitoare. Problemele pe care le ridica aceste metode conventionale constau in durata mare a extractiei care poate conduce la degradarea componentilor activi.

Cercetarile din ultimele doua decenii asupra extractiei compusilor naturali au condus la identificarea unor tehnici si metode inovative mai rapide si ecologice, de tipul extractiei enzimatic, extractia cu fluide supercritice, extractia cu microunde sau ultrasunete. Extractia cu ultrasunete combinata cu tehnicile clasice de extractie conduce la cresterea randamentului de extractie prin eliberarea compusilor biologic activi din interiorul celulelor, scaderea viscozitatii mediului de extractie, scaderea cantitatii de fibre prezente in extractul final.

Exemple de brevete de inventii pentru extractia compusilor biologic activi din fructele de *Aesculus hippocastanum* sunt prezentate dupa cum urmeaza.

Brevetul de inventie RO122254B1 se refera la un procedeu de obtinere a esculetinei in stare pura din scoarta de *Aesculus Hippocastanum* sau scoarta de *Fraxinus* species.

Brevetul de inventie DE1182385B se refera la un procedeu de obtinere a extractelor durabile care contin saponina din faina degresata sau uscata din fructe de castan, cu apa, alcool apos sau anhidru.

Brevetul de inventie CH420488A se refera la un procedeu de extractie cu solventi si polietilen glicol. Extractul final, nu contine proteine si taninuri.

Brevetul de inventie AT295034B se refera la un procedeu de extractie cu amestecuri apa-solventi organici. Extractul este supus distilarii pentru indepartarea solventilor si apoi uscat. Autorii mentioneaza ca prin acest procedeu se obtine un extract fara fibre, cu un continut mare in escina si taninuri.

Brevetul de inventie DE1617413B1 se refera la un procedeu de obtinere a extractelor de castan salbatic prin extractia fructelor de castan cu alcool metilic sau etilic apos sau acetona si indepartarea solventului organic cu concentrarea fazei apoase.

Brevetul de inventie DE1667884 se refera la un proces de productie a Ae (escinei) pure prin extractia exhaustiva a fructelor de castan zdrobite cu alcoolii sau hidrocarburi alcool-clorurate in prezenta sau cu adaugare ulterioara de colesterol, concentrarea extractului, fierberea reziduului cu apa, separarea complexului insolubil escina-colesterol si descompunerea complexului utilizand diferiti solventi sau prin cromatografie pe gel de silica.

Brevetul de inventie EP3269426B1 se refera la obtinerea unui extract de Aesculus hippocastanum (din flori, seminte sau frunze) utilizand un amestec de extractie format din fructoza, glicerina si apa. Extractia are loc la o temperatura cuprinsa intre 20-80°C iar extractul final are un continut in flavonoide cuprins intre 10-200mg/100g de extract.

Brevetul de inventie WO-03080636-A1 este un proces simplificat de purificare a beta-escinei din castanul indian (Aesculus indica) prin extractie cu alcool apos, separare solvent - solvent, tratament cu o baza urmat de trecerea stratului organic prin alumina acida.

In extractia cu ultrasunete, energia mecanica, generata de undele de ultrasunete, este aplicată probelor. Prin sonicare, rezulta fenomenul de cavitatie, generarea de mici bule de vid sau goluri in lichid, care conduc la implozie la nivelul probei solide, rezultand temperaturi (aproximativ 4500°C) și presiuni (aproximativ 50 MPa) ridicate. Aceste forțe produc efecte precum sonoliza, distrugerea membranelor celulare și extragerea materialului intracelular [5]. Cei mai importanti parametri implicati in extractia cu ultrasunete a compusilor biologic activi din substraturi vegetale sau animale sunt timpul de extractie, temperatura de extractie, puterea, compozitia solventului si cantitatea de proba. Studiile referitoare la efectele temperaturii si a timpului de extractie au aratat ca la o temperatura controlata, timpul de extractie a compusilor biologic activi va creste pana la extractia completa sau saturarea cu solvent. Pe de alta parte, pentru un timp de extractie dat, prin cresterea temperaturii de extractie concentratia compusilor de interes este mai mare dar riscul degradarii compusilor este mai mare.

Noutatea adusa de propunerea actuala de inventie consta in utilizarea unui procedeu de extractie asistata cu ultrasunete a escinei din pulberea de fructe de *Aesculus hippocastanum* dupa o prima extractie in solutie apoasa de solvent organic, pana la epuizarea in escina a materialului vegetal. Prin aplicarea acestei metode neconventionale pentru extractia asistata cu ultrasunete in regim controlat, se obtin urmatoarele avantaje:

- timpul de extractie se reduce de la ore la zeci de minute.
- extractia are loc intr-un solvent ecologic sau intr-un amestec de solventi ecologici.
- controlul temperaturii de extractie fara degradarea compusilor de interes.
- are loc o epuizare a materialului vegetal in compusul biologic activ de interes.

Pentru extractia escinei conform acestei descrieri de brevet se utilizeaza un dispozitiv de ultrasunete cu sonda. Sistemul de generare de ultrasunete lucreaza in domeniul de frecventa cuprins intre 46 -63 Hz, putand avea o densitate de putere aplicata de pana la 400W. Durata de atingere a temperaturii de lucru este de 1 pana la de 30 minute. Pentru realizarea extractiei, se mentine amestecul la temperatura de lucru pe durata a 1 – 60 minute, in campul de ultrasunete.

Etapele procesului de extractie conform descrierii de brevet sunt:

- aducerea materialului vegetal intr-o formă divizata, cu distributia granulometrica cuprinsa intre 100 – 800 μm ;
- extractia materialului vegetal in solutie apoasa de alcool etilic (v/v) sub agitare;
- separarea fazei lichide de faza solida;
- extractia reziduului din prima etapa, cu solutie apoasa de alcool etilic prin ultrasonicare;
- separarea materialului rezidual;
- unificarea extractelor si eliminarea solventului organic prin distilare sub vid;
- amestecarea extractului concentrat cu maltodextrina si uscare.

Materialul vegetal (fructele de *Aesculus hippocastanum*) uscat este adus într-o formă divizată sub formă de pulbere utilizând o moară cu ciocanele. Fructele de castan uscate prezintă o duritate mare, prin urmare pentru a se ajunge la dimensiunea dorită a particulelor și la o omogenitate a materialului vegetal este necesară o moară cu ciocanele. Materialul vegetal astfel divizat este supus unei prime etape de extracție cu alcool etilic de concentrație cuprinsă între 50 și 100% (v/v), de preferință, între 60 și 95% (v/v) cu agitare continuă, la o temperatură cuprinsă între 20-80°C, de preferință între 20-45°C. Raportul de extracție (g/v), solid : lichid fiind de 1:5 la 1:20, de preferință între 1:7,5 la 1:15. Durata primei etape de extracție depinde de valoarea temperaturii de extracție și de raportul de extracție și poate fi cuprinsă între 8 și 48 de ore, de preferință între 12 și 36 de ore. Omogenizarea amestecului se realizează utilizând un agitator tip elice, viteza de agitare fiind în domeniul 240 la 2000 rpm, de preferință în intervalul 200 la 1000 rpm. Utilizarea agitării amestecului asigură atât un contact bun al materialului vegetal cu solventul cât și omogenizarea temperaturii în masa amestecului. Separarea celor două faze din prima etapă de extracție se face prin decantare, reziduul fiind colectat și introdus în vasul de extracție la ultrasunete.

Etapă de extracție la ultrasunete, are loc prin adăugarea de solvent de concentrație mai mare decât în prima fază de extracție, concentrație cuprinsă între 70-100% (v/v), de preferință 85-95% (v/v) peste masa de solid preextrasă, urmată de menținerea în regim izoterm a amestecului la o temperatură cuprinsă în intervalul 20-50°C, de preferință 25-40°C și aplicarea ultrasunetelor într-un domeniu de frecvență cuprins între 46 -63 Hz, de preferință 50-60Hz ; pentru această etapă, durata poate fi cuprinsă între 5 și 60 minute, de preferință între 15 și 30 minute.

Separarea fazei lichide după extracția cu ultrasunete de materialul rezidual se face prin filtrare sau centrifugare. Extractele lichide obținute în cele două etape de extracție se reunesc, se filtrează pe o palnie la vid, se introduc în vasul unui rotavapor unde se realizează separarea

solventului si concentrarea extractului pana la un volum cuprins intre 5 si 30% din volumul initial, de preferinta 10-20%. Lichidul de culoare galbena rezultat se amesteca cu maltodextrina in procent de 5-25% (g/g), de preferinta 10-20% si se usuca la o temperatura cuprinsa intre 30-50°C, de preferinta 35-45 °C.

In continuare se prezinta trei exemple de extractie a escinei conform propunerii de inventie, precum si rezultatele determinarii continutului in principii active ale probelor de extract de fructe de *Aesculus hippocastanum*, exprimat ca si continut in principiu activ escina la 100g de masa de extract final.

Exemplul 1. Extractia escinei din fructul de *Aesculus hippocastanum*.

Intr-un vas de extractie cu capac si sistem de agitare se introduc 100g de fructe de *Aesculus hippocastanum* sub forma de pulbere cu granulatia medie de 400 μ . Se adauga in continuare 1250 mL de etanol 80% si se porneste agitarea amestecului la 800 rotatii pe minut. Amestecul se lasa la extractie timp de 24 ore la o temperatura de 25°C. Agitarea functioneaza pe intreaga durata a procesului. Dupa prima etapa de extractie, se decanteaza lichidul de extractie iar peste reziduu se adauga 1000 mL alcool etilic in concentratie de 95% si se introduce sonda de sonicare. Aceasta etapa de extractie are loc la o temperatura de 30°C, iar frecventa de sonicare a fost de 50 Hz timp de 20 minute. Dupa sonicare, se filtreaza amestecul de reactie impreuna cu faza lichida din prima etapa pe o palnie la vid, iar extractul este introdus in vasul unui rotavapor pentru concentrare pana la un volum de 250ml. La extractul concentrat, se adauga sub agitare maltodextrina in concentratie de 18% (g/v). Extractul cu adaos de maltodextrina se usuca la o temperatura de 40°C.

Exemplul 2. Extractia escinei din fructul de *Aesculus hippocastanum*.

Intr-un vas de extractie cu capac si sistem de agitare se introduc 100g de fructe de *Aesculus hippocastanum* sub forma de pulbere cu granulatia medie de 400 μ . Se adauga in continuare 1500 mL de etanol 85% si se porneste agitarea amestecului la 800 rotatii pe minut.

Amestecul se lasa la extractie timp de 30 ore la o temperatura de 25°C. Agitarea functioneaza pe intreaga durata a procesului. Dupa prima etapa de extractie, se decanteaza lichidul de extractie iar peste reziduu se adauga 750 mL alcool etilic in concentratie de 90% si se introduce sonda de sonicare. Aceasta etapa de extractie are loc la o temperatura de 30°C, iar frecventa de sonicare a fost de 60 Hz timp de 20 minute. Dupa sonicare, se filtreaza amestecul de reactie impreuna cu faza lichida din prima etapa pe o palnie la vid, iar extractul este introdus in vasul unui rotavapor pentru concentrare pana la un volum de 250ml. La extractul concentrat, se adauga sub agitare maltodextrina in concentratie de 18% (g/v). Extractul cu adaos de maltodextrina se usuca la o temperatura de 40°C.

Exemplul 3. Extractia escinei din fructul de *Aesculus hippocastanum*.

Intr-un vas de extractie cu capac si sistem de agitare se introduc 100g de fructe de *Aesculus hippocastanum* sub forma de pulbere cu granulatia medie de 400 μ . Se adauga in continuare 1000 mL de etanol 90% si se porneste agitarea amestecului la 800 rotatii pe minut. Amestecul se lasa la extractie timp de 36 ore la o temperatura de 25°C. Agitarea functioneaza pe intreaga durata a procesului. Dupa prima etapa de extractie, se decanteaza lichidul de extractie iar peste reziduu se adauga 1250 mL alcool etilic in concentratie de 85% si se introduce sonda de sonicare. Aceasta etapa de extractie are loc la o temperatura de 30°C, iar frecventa de sonicare a fost de 55 Hz timp de 20 minute. Dupa sonicare, se filtreaza amestecul de reactie impreuna cu faza lichida din prima etapa pe o palnie la vid, iar extractul este introdus in vasul unui rotavapor pentru concentrare pana la un volum de 250ml. La extractul concentrat, se adauga sub agitare maltodextrina in concentratie de 18% (g/v). Extractul cu adaos de maltodextrina se usuca la o temperatura de 40°C.

Din extractele obtinute conform exemplelor 1, 2 si 3 au fost prelevate probe care au fost analizate pentru determinarea continutului de escina. Produsul final rezultat sub forma de pulbere a fost caracterizat din punct de vedere al continutului in escina utilizandu-se o metoda

de analiza de electroforeza capilara in mediu neapos (NACE), rezultatele obtinute fiind prezentate in Tabelul 1.

Tabel 1. Continutul de escina in produsele finale conform celor 3 exemple

Compus	Produs final	Produs final	Produs final
	Exemplul 1	Exemplul 2	Exemplul 3
	mg/100g extract		
Escina	335,42±12,24	320,17±11,18	298,078±10,33

Dupa cum se observa, in toate cele trei variante prezentate, continutul de escina este crescut.

Bibliografie:

1. Gökçe Şeker Karatoprak, Chapter 3.26 - Horse Chestnut, Editor(s): Seyed Mohammad Nabavi, Ana Sanches Silva, Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements, Academic Press, 2019, Pages 295-299, ISBN 9780128124918
2. Neha Yadav, Aakash Partap Singh, Avtar Chand Rana, Sunil Kumar, Prabhjeet Kaur, Jitender Singh, Ashok Jangra & Dinesh Kumar, *Aesculus indica*: an updated review on its pharmacognosy, phytochemistry and pharmacological profile, Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences, 9:1, 2022, 125-135, DOI: [10.1080/2314808X.2022.2045455](https://doi.org/10.1080/2314808X.2022.2045455)
3. Idris, Sahar, Mishra, Anuradha and Khushtar, Mohd. "Phytochemical, ethanomedicinal and pharmacological applications of escin from *Aesculus hippocastanum* L. towards future medicine" *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, vol. 31, no. 5, 2020, pp. 20190115. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2019-0115>
4. Cesare R. Sirtori, Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile, *Pharmacological Research*, Volume 44, Issue 3, 2001, Pages 183-193, ISSN 1043-6618, <https://doi.org/10.1006/phrs.2001.0847>
5. Benedikt A. Weggler, Beate Gruber, Paige Teehan, Roman Jaramillo, Frank L. Dorman, Chapter 5 - Inlets and sampling, Editor(s): Nicholas H. Snow, *Separation Science and Technology*, Academic Press, Volume 12, 2020, Pages 141-203, ISSN 1877-1718, ISBN 9780128137451, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813745-1.00005-2>.

REVENDICARI

1. Procedeu de extractie a escinei din fructul de *Aesculus hippocastanum* caracterizat prin aceea ca materialul vegetal este supus unor extractii succesive in solutii apoase de alcool etilic de concentratie intre 60 si 95% (v/v) cu agitare continua, la o temperatura intre 20-45°C, timp de 12-36 de ore, una dintre etapele de extractie fiind realizata prin ultrasonicare la o frecventa de 50-60 Hz care creste randamentul de extractie al escinei, urmate de operatii de filtrare, concentrare si uscare.