



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2022 00655**

(22) Data de depozit: **19/10/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/04/2024 BOPI nr. **4/2024**

(71) Solicitant:

- **UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI, ȘOS.PANDURI, NR.90-92, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU ȘTIINȚE BIOLOGICE, BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **HOFIGAL EXPORT- IMPORT S.A., INTRAREA SERELOR NR.2-4, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

- **ZALARU CHRISTINA MARIE, STR.TINCANI, NR.4, BL.F7, SC.C, ET.1, AP.41, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **TATIA RODICA, STR.EROU ADRIAN FULGA NR.3, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

- **MOLDOVAN LUCIA, BD.CONSTRUCTORILOR NR.24, BL.19, SC.A, AP.13, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **SECIU-GRAMA ANA-MARIA, BD. 1DECEMBRIE 1918, NR.22, BL.3, SC.1, ET.6, AP.28, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **TARCOMNICU ISABELA, STR. TURDA, NR.127, BL.2, SC.D, ET.5, AP.167, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **GAVRILA ADINA-IONUTA, STR. SIBIU NR.10, BL.OS1, SC.E, ET.2, AP.172, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **CĂLINESCU IOAN, STR. GHIRLANDEI NR.38, BL.D1, SC.C, PARTER, AP.21, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **MARINESCU MARIA, STR.DR.ALEXANDRU VITZU, NR.17, AP.1, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **RAICIU ANCA DANIELA, STR.LEREȘTI NR.5, BL.A1, SC.4, AP. 52, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A UNOR EXTRACTE ȘI COMPUȘI BIOACTIVI CU PROPRIETĂȚI TERAPEUTICE DIN FRUNZE DE HEDERA HELIX L.**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor extracte din frunze de *Hedera helix* cu utilizări în industria farmaceutică. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: procesarea frunzelor uscate de iederă prin spălare, uscare și mărunțire mecanică până la dimensiuni mai mici de 350 μm, extracția prin macerare la temperatura camerei timp de 3...6 h, urmată de refluxare repetată timp de 2...7 h în prezență de solvenți de extracție etanol 80% sau clorură de metilen, în raport plantă uscată: solvent de 1:10....1:30, separare

și concentrare extract, separarea fitocompușilor prin eluare pe o coloană preparativă, colectarea unei fracții bogată în glucide, respectiv a unei fracții bogată în saponine, rezultând compuși din iederă sub formă de pulberi având proprietăți imunostimulatoare și antiinflamatoare.

Revendicări: 1
Figuri: 2

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 obținere a unor extracte și compuși bioactivi
cu proprietăți terapeutice din frunze de *Hedera helix***

Autori: Zălaru Christina Marie, Tatia Rodica, Moldovan Lucia, Seciu-Grama Ana-Maria, Țârcomnicu Isabela, Gavrilă Adina-Ionuța, Călinescu Ioan, Marinescu Maria, Raiciu Anca Daniela

Prezenta propunere de invenție se referă la un procedeu de obținere a unor extracte din frunze de *Hedera helix* și a compușilor biologic activi conținuți respectiv saponine și glucide, cu utilizări în industria farmaceutică și medicină. Extractul obținut precum și compușii izolați se prezintă sub formă de pulbere și au proprietăți biocompatibile, imunostimulatoare și antiinflamatoare.

Iedera comună (*Hedera helix* L.), care aparține familiei *Araliaceae*, este o liană perenă lemnoasă de culoare verde, care poate fi găsită în Europa de Sud, de Vest și Centrală, Asia și America de Nord. *Hedera helix* L. este bogată în saponine triterpenice, precum: hederacozid C, hederacozid D, hederacozid B, α -hederin și β -hederin. De asemenea, conține compuși polifenolici (acizi fenolici, flavonoide, cumarine, antociani etc.), vitamine, steroizi, aminoacizi, uleiuri volatile, poliacetilene și β -lectine (Evans W. C., *Trease and Evans Pharmacognosy 16th ed. Elsevier Science limited, UK, 2009*). Componenta principală din frunze *Hedera helix* este saponina triterpenică hederacozid C care, împreună cu α -hederin și agliconul lor hederageninul sunt considerate a fi fitocompuși cu importantă activitate biologică. Acești compuși sunt responsabili pentru activitățile antimicrobiană, antiinflamatoare, antivirală, antioxidantă, antidepresivă, antimorală și citotoxică ale iederei (Rodríguez-Hernandez D. et al., *Eur. J. Med. Chem.* 10, 57, 2015; Al-Snafi A.E., *IOSR J. Pharm.*, 8, 41, 2018; Barnes L.A.J. et al., *Adv. Integr. Med.*, 7, 222, 2020).

În ultimii ani exista un interes crescut pentru dezvoltarea de metode de obținere a extractelor vegetale dar și a constituenților acestora. Interesul pentru aceste metode se bazează în principal pe multitudinea de proprietăți biologice ale compușilor acestor extracte ca o consecință a structurii chimice ale acestora.

Având în vedere efectul benefic al compușilor bioactivi, pentru obținerea extractelor bogate în saponine au fost investigate metode de extracție diferite. Compușii cu proprietăți terapeutice din iedera pot fi obținuți printr-o mare varietate de metode de extracție din materii prime vegetale, descrise în domeniul preparării produselor farmaceutice. În literatură sunt raportate diverse metode convenționale, precum: macerare și Soxhlet sau extracția termică prin

refluxare. Una dintre metodele de extracție ale principiilor active din iederă, prezente în literatura științifică, a fost macerarea părților aeriene de *H. helix* în prezența a diferiți solvenți: eter de petrol (40-60°C), cloroform, acetat de etil și metanol 80%. Fiecare extract a fost concentrat prin evaporare până la obținerea extractelor crude, acestea fiind supuse unor analize standard calitative în vederea identificării prezenței următoarelor clase de fitocompuși: carbohidrați, flavonoide, saponine, terpene, steroli și alcaloizi (**Rashed K.N. et al., Topclass J. Herb. Med., 2, 223, 2013**).

Într-un alt studiu, frunzele de iederă spălate, uscate la 40°C și mărunțite mecanic până la formarea unei pulberi, au fost supuse extracției prin macerare cu metanol 99,8%, timp de 7 zile la temperatura camerei, urmată de separarea saponinelor sub forma unui precipitat alb-gălbui prin precipitarea cu dietil eter (**Hussien S.A. et. al., Iraqi J. Pharm. Sci., 23, 33, 2014**). Izolarea saponinei hederagenin din frunze de *Hedera helix* a fost realizată dintr-un extract vegetal obținut din frunze prin macerării repetate în etanol 95% (v/v), la temperatura camerei, cu agitare intermitentă, timp de 12 zile. Extractul etanolic a fost ulterior concentrat sub presiune redusă și s-a izolat hederageninul prin precipitare cu acetonitril (**Tatia R. si al., Rev.Chim., 70, 1157, 2019**). De asemenea, s-au realizat studii în vederea evaluării potențialului antitumoral al unor fracții de extract din frunzele uscate de *Hedera helix* L. obținut prin refluxare cu etanol/apă 1:1, la 80°C, timp de 2 ore. Extractul concentrat a fost apoi fracționat prin tehnici de cromatografie, iar fracțiile rezultate au fost testate *in vitro* pe celule tumorale (**Tatia R. et al., Scient. Bul. U.P.B., 87, 1454, 2021**).

În literatura brevetelor s-a raportat o metodă de obținere a unui extract din frunze de iederă, utilizând vapori de apă pentru umflarea țesutului și ca agent de extracție etanol 30%, în vederea utilizării acestuia ca produs farmaceutic având în compoziție compuși saponinici hederacozid C și α -hederin într-un raport optim care asigură stabilitate în timpul depozitării (**Brevet BRPI 0414535B1/ 2019**). Brevetul **DE 30 25 223 A1** prezintă un preparat farmaceutic pe bază de extract de iederă și un procedeu de obținere a acestuia care folosește ca solvenți acetonă și metanol. Preparatul astfel obținut are un conținut ridicat de hederacozid C, dar cu stabilitate mai redusă existând posibilitatea hidrolizei acestuia la α -hederin. De asemenea au fost descrise procedee de preparare a extractelor din frunze de iederă bogate în hederin C și hederacozid C utilizând extracția Soxhlet. Procedeu se realizează în două etape, respectiv în prima etapă se obține extractul bogat în hederin C și apoi extractul bogat în hederacozid C, care se amestecă în proporții bine stabilite (**Brevet US 7 943 184 B2/ 2011**). O metodă pentru obținerea unui extract din frunze de iederă folosind ca agenți de extracție amestecuri de apă/alcooli în raport de 10/90 (g/g) și respectiv de 70/30 (g/g), în care extractul cuprinde α -

hederin, a fost prezentată în brevetul **WO2004087183**. Inițial, o cantitate de frunze uscate de iederă este mărunțită, ulterior fermentată prin adăugare de apă, apoi extrasă prin adăugarea agentului de extracție și în final extractul este uscat.

În brevetul **CN101157714A / 2007** este descrisă o compoziție obținută din extracte de muguri florali de *Lonicera fulvotomentosa* din familia *Lonicera*, și triterpene provenite din *Hedera helix* și o metodă de preparare a produsului obținut prin hidroliză alcalină în vederea utilizării acestuia la prepararea de medicamente antitumorale. Au fost raportate și alte compoziții farmaceutice pe bază de iederă cum este cea prezentată în brevetul **EP 3 406 256 B1/ 2018**, care conține pulbere uscată brută de *Hedera helix* și *Pelargonium sidoides* stabilizată ca medicament. De asemenea, brevetul **KR 101387353B1/ 2014** descrie o compoziție care cuprinde extractul din frunze de iederă și compusul izolat din acesta hederacozidul C, pentru prevenirea și tratarea bolii virale gripale. Compoziția medicinală pentru tratamentul unei boli infecțioase conține pe langa combinația dintre extractul de frunze *Hedera helix* sau hederacozidul C și un agent antigripal, selectat dintre oseltamivir (Tamiflu), rinantadine, rivaririn sau taribavirin.

Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta propunere de invenție constă în obținerea unor extracte din frunze uscate de iederă cu un randament de extracție ridicat, printr-un procedeu fezabil care combină macerarea țesutului vegetal cu refluxarea repetată și prezintă avantajul că realizează și separarea principalelor clase de compuși bioactivi conținuți, respectiv saponinele și glucidele care au efect terapeutic de compensare a deficiențelor imunității organismului. În plus, procedeul de extracție din prezenta propunere de invenție folosește solvenți mai puțin toxici care nu degradează compușii bioactivi și care sunt testați din punct de vedere al proprietăților biologice (biocompatibilitate, imunostimulatoare, antibacteriană) prin experimente *in vitro* pe culturi de celule folosind linii celulare stabilizate.

Procedeul de obținere al extractelor și compușilor bioactivi cu proprietăți imunostimulatoare și antiinflamatoare din frunze de *Hedera helix* (iederă), conform invenției, constă în aceea că prezintă următoarele etape: a) procesarea materialului vegetal care constă în spălarea cu apă a frunzelor de iederă pentru îndepărtarea impurităților, uscarea acestora la temperaturi sub 50 °C și mărunțirea mecanică la dimensiuni mai mici de 350 μm; b) obținerea extractului vegetal utilizând o metodă combinată, respectiv extracția prin macerare la temperatura camerei timp de 3...6 ore, urmată de refluxare repetată timp de 2...7 ore folosind pentru fiecare metodă la alegere unul dintre următorii solvenți de extracție: etanol 80%, apă

sau clorură de metilen, refluxarea realizându-se la temperatura de fierbere a solventului iar raportul plantă uscată/solvent variază în domeniul 1:10...1:30; c) separarea extractului obținut de țesutul neextras al materialului vegetal prin filtrare la vid ; d) concentrarea extractului cu ajutorul unui rotavapor și uscarea acestuia prin evaporarea solventului la temperatura de 40...60°C; e) separarea fitocompușilor din extract pe o coloană preparativă C18 (silicagel cu dimensiunile particulelor de 0,04...0,06 mm) folosind două sisteme de eluție: I) 2...10 părți de amestec etanol- apă 20/80 (g/g) și o parte acid acetic 0,5% si II) 2...10 părți de amestec etanol- apă 90/10 (g/g) și o parte acid acetic 0,5%. Această etapă necesită următoarele operații: pregătirea coloanei preparative prin spălari repetate cu etanol 96% și condiționarea acesteia cu un amestec de etanol:apă (1:4) și acid acetic 0,5%; pregătirea probei de extract prin dizolvarea extractului concentrat în apă distilată, în raport extract/ apă de 1:10...1:20 (g/g) peste care se adaugă 10 părți amestec format din etanol :apă (1:4) și acid acetic 0,5 % ; încărcarea probei pe coloană urmată de eluția cu sistemul de eluție I și colectarea fracției 1, de culoare brună care este bogată în glucide (minim 80%), apoi se eface eluția cu sistemul de eluție II și se colectează fracția 2, de culoare galben intens, bogată în saponine (minim 70%); f) uscarea fracțiilor colectate prin evaporare la temperatura de 40 – 60 °C și depozitarea lor la rece.

Procedeul de obținere al extractului și compușilor bioactivi de iederă în conformitate cu prezenta invenție, are următoarele avantaje:

- procedeul de obținere este simplu și nu necesită aparatură complexă;
- solvenții utilizați pentru extracție sunt neagresivi pentru organism și se folosesc relativ în cantități mici;
- durata etapelor procedurii este relativ mică iar consumul de energie este scăzut;
- atât extractul cât și glucidele și saponinele obținute, conform acestui procedeu, prezintă stabilitate în timp și nu sunt toxici pentru organism;
- extractul de iederă precum și compușii bioactivi separați sunt biocompatibili, stimulează creșterea celulelor sistemului imunitar și prezintă activitate antiinflamatoare;

Prezenta propunere de invenție este ilustrată prin următoarele exemple:

Exemplul 1

Etapa I. Obținerea extractului de iederă

Se ia o cantitate de 1kg de material vegetal format din frunze de *Hedera helix*. L., care se spală intens cu apă pentru îndepărtarea impurităților, se usucă la etuvă la o temperatură de 40 °C și apoi se mărunțește țesutul uscat la dimensiuni mai mici de 315μm. Din cantitatea obținută de frunze uscate și mărunțite se cântăresc 10 g care se macerează la temperatura camerei cu agitare intermitentă timp de 6 ore, folosind ca solvent etanol 80% în raport de 1:20 material vegetal:solvent.

Apoi, amestecul macerat se refluxează timp de 3 ore, folosind ca solvent 20 volume de etanol 80%, la temperatura de fierbere a solventului. Extractul etanolic de culoare verde obținut se filtrează la vid, volumul de extract se colectează într-un balon de distilare. Peste materialul vegetal rămas se adaugă același volum de solvent și se continuă refluxarea în același condiții. Se repetă această operație încă de două ori, după care extractele reunite se filtrează și apoi se concentrează la rotaevaporator prin evaporarea solventului la temperatura de 50 °C, când se obține extractul uscat ce conține 38,4% glucide și 14,5% saponine.

Etapa II. Izolarea fitocompușilor din extractul de iederă

Separarea fitocompușilor din extract se realizează prin eluarea extractului obținut pe o coloană preparativă C18 umplută cu silicagel (SGEC -060-500) cu dimensiunile particulelor de 0,04...0,06 mm. Inițial, se spală coloana, de cel puțin 4 ori, cu o soluție de etanol 96% și apoi se condiționează cu un amestec de 5 mL etanol-apa în raport de 1:4 și 1mL acid acetic 0,5%.

Separat se pregătește proba de eluție prin dizolvarea unei cantități de 1g extract vegetal concentrat în 10 mL apă distilată, după care peste soluția obținută se adaugă 10 mL amestec format din etanol :apă (1:4) și 1mL acid acetic 0,5 %. Se încarcă proba pe coloană și apoi se eluează cu sistemul de eluție I, format din 9 mL amestec de etanol-apă 20/80 (g/g) și 1mL acid acetic 0,5%. După care, se colectează sub vid fracția 1, de culoare brună care conține 83,30 % glucide. Se eluează apoi cu sistemul de eluție II, format din 10 mL amestec de etanol :apa 90/10 (g/g) și 1mL acid acetic 0,5% și se colectează fracția 2, de culoare galben intens care conține 70,9 % saponine. Cele două fracții colectate se usucă prin evaporare la 60°C și se depozitează la rece.

Atât extractul obținut cât și fracțiile 1 și 2, izolate conform acestui exemplu, au fost testate *in vitro* pentru evaluarea proprietăților biologice.

Exemplul 2

Procesarea materialului vegetal, respectiv spălarea, uscarea și mărunțirea, este similară cu cea prezentată în exemplul 1. Obținerea extractului de frunze de iederă se realizează prin macerare la temperatura camerei cu agitare intermitentă, timp de 5 ore, folosind ca solvent apa distilată în raport de 1:30 material vegetal:solvent. Apoi, amestecul macerat se refluxează timp de 5 ore, folosind ca solvent 30 volume de apă distilată, la temperatura de 100⁰C. Se repetă operația de refluxare de 4 ori după care se amestecă toate volumele de extract și apoi extractul etanolic colectat, de culoare verde, se filtrează la vid, pentru îndepărtarea materialului vegetal epuizat. Se concentrează filtratul la rotaevaporator, după care concentratul obținut se evaporă la cald, la temperatura de 40 ⁰C, obținând astfel extractul uscat.

Etapă ulterioară de separare a fitocompușilor din extractul de iederă obținut precum și uscarea fracțiilor izolate este similară cu cea prezentată în exemplul 1.

Exemplul 3

Procesarea materialului vegetal, respectiv spălarea, uscarea și mărunțirea, este similară cu cea prezentată în exemplul 1. Se iau 10 g frunze uscate de iederă și se supun operației de macerare la temperatura camerei, cu agitare intermitentă, timp de 6 ore, folosind ca solvent apă distilată, în raport de 1:25 material vegetal: apă distilată. Extracția continuă prin refluxare, folosind clorura de metilen, la temperatura de fierbere a solventului, timp de 6 ore. Apoi se repetă operația de refluxare de 2 ori, după care se amestecă volumele de extract obținute la refluxare. Volumul total de extract de culoare verde obținut, se filtrează la vid pentru îndepărtarea materialului vegetal rezidual și se concentrează cu ajutorul unui rotaevaporator, iar soluția concentrată obținută este evaporată la cald la 60 ⁰C, pentru a se obține extractul uscat.

Separarea fitocompușilor din extractul de iederă uscat obținut precum și uscarea fracțiilor izolate este similară cu cea prezentată în exemplul 1.

Caracterizarea biologică a probelor a constat în evaluarea biocompatibilității *in vitro* a extractului de iederă obținut (Extr) și a fracțiilor 1 și 2 bogate în glucide Fr.1(Glu) și respectiv saponine Fr.2(Sap) precum și evidențierea efectului lor asupra celulelor imune și testarea activității antioxidante.

Biocompatibilitatea *in vitro* a fost evaluată pe linia celulară stabilizată de tip fibroblaste de șoarece NCTC (clona L929), experimentele realizându-se prin metoda contactului direct în conformitate cu standardul SR EN ISO 10993-5:2009. După cultivarea celulelor în prezența probelor la concentrații cuprinse în domeniul 10-600 $\mu\text{g/mL}$, timp de 48 de ore, s-a determinat viabilitatea celulară prin metoda spectrofotometrică MTT, care evaluează activitatea metabolică a celulelor vii. Rezultatele valorilor viabilității fibroblastelor în prezența variantelor de probe testate, comparativ cu martorul netratat (mediul de cultură) prezentate în tabelul 1 au evidențiat efectul biocompatibil al variantelor testate la toate concentrațiile de probă (valori mai mari de 80%).

Viabilitatea celulelor NCTC tratate cu extractul de iederă și compusii glucidici și saponinici, timp de 48 de ore.

Tabel 1.

Concentrație testată	Viabilitate celulară fibroblaste NCTC (%)		
	Extr.	Fr. 1 (Glucide)	Fr. 2 (Saponine)
10 $\mu\text{g/mL}$	101.76	112.57	103.80
100 $\mu\text{g/mL}$	113.57	109.75	101.87
200 $\mu\text{g/mL}$	104.01	107.57	100.12
400 $\mu\text{g/mL}$	103.68	106.28	98.13
600 $\mu\text{g/mL}$	89.17	96.39	87.39

În domeniul de concentrații de 10-400 $\mu\text{g/mL}$ atât extractul cât și fracțiile separate au avut efect de biostimulare asupra proliferării celulelor (valori mai mari decât martorul), excepție făcând fracția de saponine la concentrația de 400 $\mu\text{g/mL}$.

Evidențierea efectului imunostimulator s-a efectuat prin testarea *in vitro* a probelor pe o linie celulară de macrofage umane RAW264.7 și determinarea viabilității celulare prin metoda cantitativă MTT. Celule RAW 264.7 aflate în fază de subconfluentă la 24 ore de cultivare, au fost puse în contact cu concentrații de extract de iederă și fracții izolate variind între 10– 600 $\mu\text{g/mL}$, după care s-a realizat incubarea timp de 48 ore. Rezultatele obținute demonstrează efectul imunostimulator al tuturor celor trei probe, cu viabilității celulare mai mari de 100%, respectiv valori cuprinse între 100,23 – 117,38 %, pe întreg intervalul de

concentrații testate (Fig.1). S-a observat ca fracția bogată în glucide (Fr.1 Glu) a generat un efect imunostimulator superior celorlalte două probe la toate concentrațiile testate.

Testarea activității antiinflamatoare s-a realizat pe un model experimental *in vitro* folosind o linie celulară umană de monocite leucemice THP-1, stimulate cu substanța inflamatoare LPS (lipopolizaharid bacterian). Celulele au fost apoi tratate cu probele de interes, extractul vegetal, fracțiile de glucide și saponine, în diferite concentrații (10, 200, 400 și 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) timp de 18 ore. Mediile de cultură au fost prelevate, centrifugate și analizate prin determinarea conținutului acestora în citokinele TNF- α și IL-8 prin tehnica ELISA.

Datele obținute au arătat că celulele tratate cu extract de iederă dar și cu fracțiile de glucide și saponine au secretat o cantitate mai scăzută de citokine pro-inflamatorii IL-8 și TNF- α comparativ cu martorul stimulat cu LPS și netratat, la toate concentrațiile de probe testate (Fig. 2). S-a observat o scădere a producției de IL-8, mai ales în cazul tratamentului cu fracția de saponine când s-a obținut o inhibare de $\sim 68\%$ comparativ cu extractul ($\sim 47\%$) și fracția de glucide ($\sim 44\%$) (Fig. 2A). Cel mai bun efect inhibitor al secreției TNF- α s-a înregistrat la concentrația de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pentru fracția de saponine ($\sim 90\%$) comparativ cu extractul de iederă ($\sim 42\%$) și fracția de glucide ($\sim 27\%$) (Fig. 2B). Aceste rezultate demonstrează efectul antiinflamator al tuturor probe analizate în special la concentrațiile mari testate.

REVENDICARE

Procedeul de obținere al extractelor și compușilor bioactivi cu proprietăți imunostimulatoare și antiinflamatoare din frunze de *Hedera helix* (iederă), **caracterizat prin aceea că prezintă următoarele etape:** a) procesarea materialului vegetal care constă în spălarea cu apă a frunzelor de iederă pentru îndepărtarea impurităților, uscarea acestora la temperaturi sub 50 °C și mărunțirea mecanică la dimensiuni mai mici de 350 μm; b) obținerea extractului vegetal utilizând o metodă combinată, respectiv extracția prin macerare la temperatura camerei timp de 3...6 ore, urmată de refluxare repetată timp de 2...7 ore folosind pentru fiecare metodă la alegere unul dintre următorii solvenți de extracție: etanol 80%, apă sau clorură de metilen, refluxarea realizându-se la temperatura de fierbere a solventului iar raportul plantă uscată/solvent variază în domeniul 1:10...1:30; c) separarea extractului obținut de țesutul neextras al materialului vegetal prin filtrare la vid ; d) concentrarea extractului cu ajutorul unui rotavapor și uscarea acestuia prin evaporarea solventului la temperatura de 40...60°C; e) separarea fitocompușilor din extract pe o coloană preparativă C18 (silicagel cu dimensiunile particulelor de 0,04...0,06 mm) folosind două sisteme de eluție: I) 2...10 părți de amestec etanol- apă 20/80 (g/g) și o parte acid acetic 0,5% și II) 2...10 părți de amestec etanol- apă 90/10 (g/g) și o parte acid acetic 0,5%. Această etapă necesită următoarele operații: pregătirea coloanei preparative prin spălari repetate cu etanol 96% și condiționarea acesteia cu un amestec de etanol:apă (1:4) și acid acetic 0,5%; pregătirea probei de extract prin dizolvarea extractului concentrat în apă distilată, în raport extract/ apă de 1:10...1:20 (g/g) peste care se adaugă 10 părți amestec format din etanol :apă (1:4) și acid acetic 0,5 % ; încărcarea probei pe coloană urmată de eluția cu sistemul de eluție I și colectarea fracției 1, de culoare brună care este bogată în glucide (minim 80%), apoi se eface eluția cu sistemul de eluție II și se colectează fracția 2, de culoare galben intens, bogată în saponine (minim 70%); f) uscarea fracțiilor colectate prin evaporare la temperatura de 40 – 60 °C și depozitarea lor la rece.

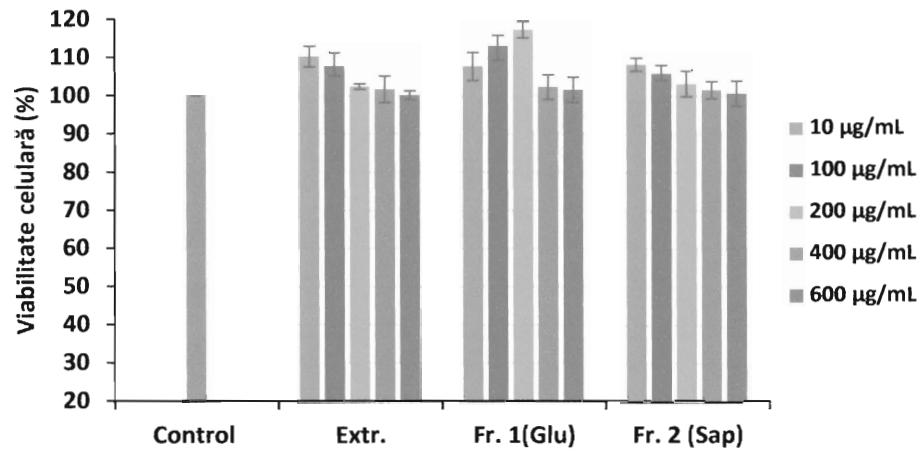


Figura 1.

26

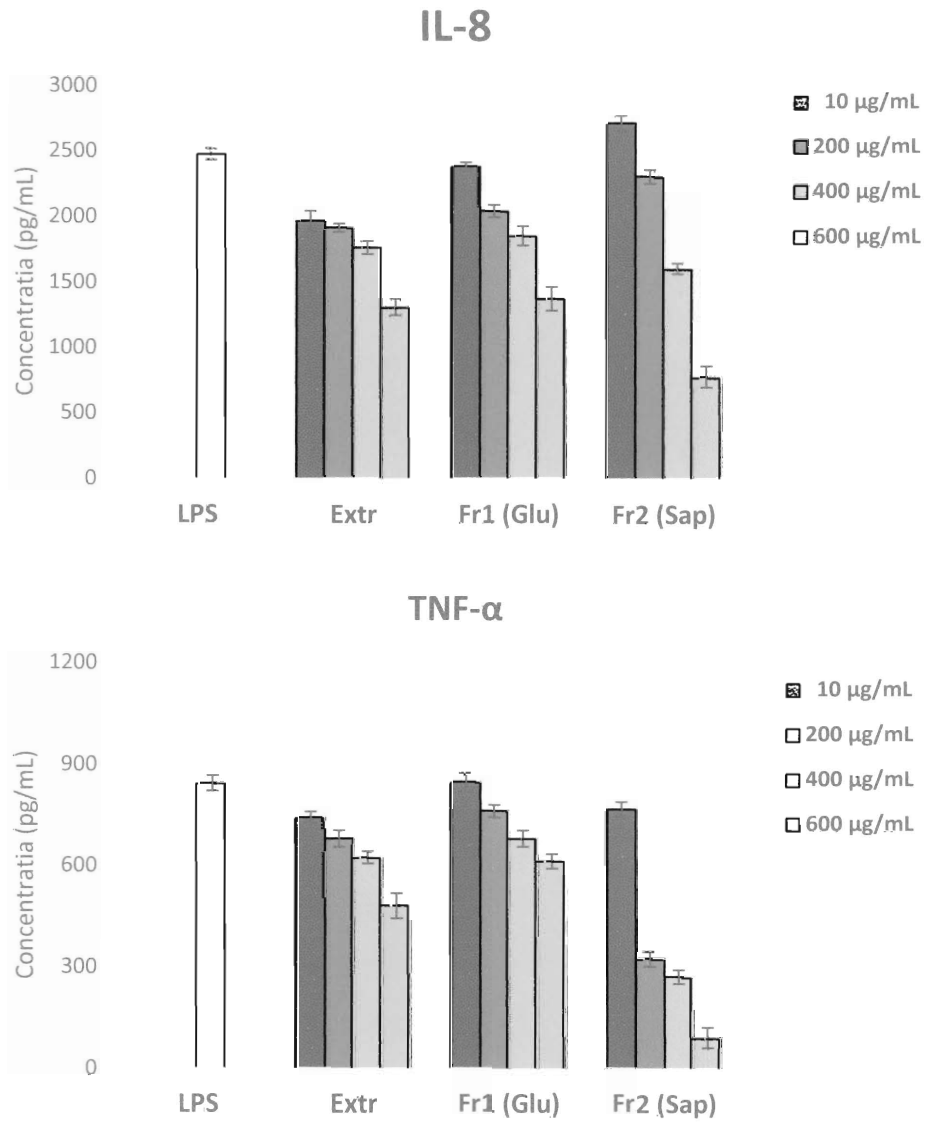


Figura 2.