



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00661

(22) Data de depozit: 20/10/2022

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

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• 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

(72) Inventatori:
• GAVRILA ADINA- IONUTA, STR.SIBIU
NR. 10, BL.OS1, SC.E, ET.2, AP.172,
BUCUREȘTI, B, RO;

• POPA IOANA, BD.IANCU DE
HUNEDOARA, NR.29, BL.3, SC.1, ET.2,
AP.34, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• CĂLINESCU IOAN, STR. GHIRLANDEI
NR.38, BL.D1, SC.C, PARTER, AP.21,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• 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

(54) **PROCEDEU DE INTENSIFICARE A EXTRAȚIEI
PRINCIPIILOR ACTIVE DIN FRUNZELE *DEHEDERA HELIX L.*
PRIN METODE NECONVENȚIONALE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de intensificare a extracției principiilor active din planta *Hedera helix L.* (iederă), mai exact din frunzele de iederă, prin metode neconvenționale, conferind extractelor diferite activități biologice antimicrobiene, antiinflamatorii, antivirale, antiparazitice, antioxidante, antifungice, antimutagenice, citotoxice sau imunologice. Procedeu conform invenției începe cu uscarea materialului vegetal la temperatura de 40°C, urmată de măcinarea materialului uscat la dimensiuni < 315 μm, extracția într-un reactor cu micro-

unde prevăzut cu agitare de 300...900 rot/min., timp de 1...20 min., la o temperatură cuprinsă între 40...60°C, folosind ca solvenți apa și o soluție etanolică de concentrație cuprinsă între 40...80%, cu un raport plantă/solvent = 1/20 (w/v), rezultând un extract cu un conținut mai mare de saponine, carbohidrați și activitate anti-oxidantă.

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 2022 00661
Data depozit	20-10-2022

8

DESCRIERE

**PROCEDEU DE INTENSIFICARE A EXTRAȚIEI PRINCIPIILOR ACTIVE DIN *HEDERA HELIX L*
PRIN METODE NECONVENȚIONALE**

Precizarea domeniului de aplicare a invenției

Invenția se referă la un procedeu de intensificare a extracției principiilor active prin metode neconvenționale dintr-un material vegetal pentru îmbunătățirea activității biologice a extractelor obținute. Conform invenției, procedeul constă în extracția asistată de microunde a materialului vegetal uscat (frunze) de *Hedera helix L* folosind un protocol experimental: timp de extracție 1-20 minute, temperatura de 40-60 °C, cu un raport plantă/solvent = 1/20 (w/v), într-un reactor cu microunde prevăzut cu agitare de 300...900 rpm.

Scopul invenției

Scopul invenției este realizarea unui procedeu de extracție prin aplicarea tehnicilor neconvenționale, în scopul îmbunătățirii extractului obținut din materialul vegetal, prin creșterea concentrației de compuși bioactivi (saponine, carbohidrați și polifenoli), îmbunătățirea activității antioxidante și micșorarea timpului de extracție.

Precizarea stadiului cunoscut al tehnicii în domeniul obiectului invenției, cu menționarea dezavantajelor soluțiilor tehnice cunoscute

Iedera (*Hedera helix L.*), care aparține familiei *Araliaceae*, este o liană lemnoasă perenă, care crește în Asia și America de Nord, și în Centrul, Vestul și Sudul Europei, deci implicit și în România (Bezruk, I.; Marksa, M.; Georgiyants, V.; Ivanauskas, L.; Raudone, L. **Phytogeographical profiling of ivy leaf (*Hedera helix L.*). *Industrial Crops and Products* 2020, 154, 112713**). Deși *Hedera helix L* este o plantă necomestibilă atât pentru om, cât și pentru animale, frunzele acesteia sunt bogate în compuși bioactivi benefici organismului uman.

Dintre acești compuși bioactivi care se găsesc în frunzele de iederă, cei mai importanți sunt saponinele. Acestea sunt compuși bio-organici care posedă cel puțin o legătură glicozidică la atomul de carbon C-3 dintre aglicon și lanțul glucidic. Hidroliza moleculelor de saponine conduce la obținerea unui aglicon, denumit și sapogenină, și a unui rest glicozidic (El Aziz, M.M.A.; Ashour, A.S.; Melad, Al.S.G. **A review on saponins from medicinal plants: chemistry, isolation, and**



determination. *Journal of Nanomedicine Research* 2019, 7, 282-288). În iederă se găsesc preponderent glicozidele triterpenoide. Triterpenele sunt constituite din trei monoterpene a câte 10 atomi de carbon fiecare, care sunt distribuiți ca șase molecule de izopren. Saponinele pot fi împărțite, în funcție de numărul de lanțuri glucidice din structura lor în mono, di- sau tridesmozide. Monodesmozidele conțin un singur rest glucidic la atomul de carbon C-3. Didesmozidele conțin două resturi glucidice, atașate adesea printr-o legătură eterică la atomul de carbon C-3 și printr-o legătură esterică la atomul de carbon C-28 sau printr-o legătură eterică la atomul de carbon C-26 (**Guclu-Ustundag, O.; Mazza, G. Saponins: Properties, Applications and Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2007, 47, 231-258).** Dintre saponinele triterpene, majoritar în iederă se găsesc hederacozidul C, hederageninul și α -hederinul (**Gavrila, A.I.; Tatia, R.; Seciu-Grama, A.-M.; Tarcomnicu, I.; Negrea, C.; Calinescu, I.; Zalaru, C.; Moldovan, L.; Raiciu, A.D.; Popa, I. Ultrasound Assisted Extraction of Saponins from *Hedera helix* L. and an In Vitro Biocompatibility Evaluation of the Extracts. *Pharmaceuticals* 2022, 15, 1197).**

Alte principii active care se regăsesc în frunzele de iederă sunt compușii polifenolici. Polifenolii sunt cei mai abundenți metaboliți secundari sintetizați de plante, având rol de protecție. Aceștia conțin unul sau mai multe inele aromatice pe care sunt grefate unul sau mai multe grupări hidroxil. Polifenolii se găsesc, de obicei, legați de resturi glicozidice și foarte rar sub formă liberă (**Lattanzio, V.; Lattanzio, V.M.T.; Cardinali, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research* 2006, editor Imperato F., Kerala, India, Research Signpost, 23-67).** Dintre clasele de compuși polifenolici, în frunzele de iederă se găsesc preponderent acizi fenolici - cafeic, clorogenic, cinamic -, flavonoide - kaemferol, rutin, quercetină - și flavone - apigenină, luteolină (**Bezruk, I.; Marksa, M.; Georgiyants, V.; Ivanauskas, L.; Raudone, L. Phylogeographical profiling of ivy leaf (*Hedera helix* L.). *Industrial Crops and Products* 2020, 154, 112713).** Acizii fenolici sunt derivați ai acidului benzoic sau cinamic având o structură de forma C-6 – C-1 sau C-6 – C-3. Flavonoidele conțin un nucleu fenilcroman format din două inele aromatice, care sunt legate între ele de o punte C-6 – C-3 – C-6 (**Dai, J.; Mumper, R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 2010, 15, 7313-7352).**

Monozaharidele cu catenă ramificată hamamelosa (2-C-hidroximetil-D-riboză) și apiosa (3-C-hidroximetil-D-glicero-aldotetroză) au fost identificate în frunzele de *Hedera helix* L. dar și

alte zaharuri, cum ar fi glucoză, fructoză, zaharoză și rafinoză (Steponkus, P.L.; Lanphear, F. O. **The Relationship of Carbohydrates to Cold Acclimation of *Hedera helix* L. cv. Thorndale, *Physiologia Plantarum* 1968, 21, 777-791).**

Acești compuși bioactivi prezenți în frunzele de iederă conferă extractelor diferite activități biologice, cum ar fi: antimicrobiene, anti-inflamatorii, antivirale, antiparazitice, antioxidante, antifungice, antimutagenice, citotoxice sau imunologice (Tatia, R.; Zalaru, C.; Tarcomnicu, I.; Moldovan, L.; Craciunescu, O.; Calinescu, I. **Isolation and characterization of Hederagenin from *Hedera helix* L. extract with antitumor activity, *Rev Chim* 2019, 70, 1157–1161; Sparg, S. G.; Light, M. E.; van Staden, J. **Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol* 2004, 94, 219-43).****

Cele mai comune metode de extracție a acestor compuși bioactivi implică un consum mare de energie, timpi lungi de extracție, randamente nu foarte mari și, de multe ori, temperaturi mari care pot conduce la degradarea compușilor de interes. Printre metodele neconvenționale care ajută la minimizarea acestor inconveniente, se regăsește și extracția asistată de microunde. În timpul extracției cu microunde materialul vegetal, față de solventul în care are loc extracția, va fi încălzit selectiv. Acest lucru va duce la apariția unei presiuni osmotice în interiorul materialului vegetal care va determina distrugerea peretelui celular și eliberarea mai facilă a compușilor de interes (Lee, C.S.; Binner, E.; Winkworth-Smith, C.; John, R.; Gomes, R.; Robinson, J. **Enhancing natural product extraction and mass transfer using selective microwave heating. *Chem Eng Sci* 2016, 149, 97-103).** Astfel, utilizarea microundelor pentru extracția compușilor bioactivi din plante conduce la micșorarea timpului de extracție, eficiențe și selectivități mari, consum mic de solvent, un transfer termic mai eficient și impact negativ mic asupra mediului înconjurător.

Extracția asistată de microunde a fost puțin utilizată la extracția compușilor bioactivi din *Hedera helix* L. Până în prezent extracția asistată de microunde a principiilor active din iederă este citată doar în aplicarea unui tratament cu microunde înainte de extracția hederacozidelor cu dioxid de carbon supercritic din specia de iederă *Caulis Hederae Sinensis* (Guilin, Y.; **Biological Science & Technology Co Ltd, Method for extracting hederacoside from ivy, China, CN105237608B).**

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este realizarea unui procedeu de extracție a principiilor active din frunzele de *Hedera helix* L uscate cu ajutorul microundelor în vederea

creșterii eficienței procedurii de extracție clasică a componentelor bioactive din acest material vegetal. Acest procedeu de intensificare a extracției compușilor bioactivi din frunzele de iederă conduce la scăderea semnificativă a timpului de extracție și în același timp la îmbunătățirea calității extractului.

Prezentarea soluției tehnice a invenției

Descrierea invenției și exemplele prezentate aici sunt ilustrative, diferite ajustări și modificări pot fi aplicate. Extractele conform invenției conține saponine, carbohidrați și polifenoli și prezintă activitate antioxidantă.

Obținerea extractelor conform invenției presupune următoarele etape:

1. Materialul vegetal, reprezentat de frunzele de *Hedera helix* L, se usucă în condiții adecvate de temperatură și umiditate într-o etuva încălzită la 40 °C.

2. Frunzele de iederă uscate sunt măcinate până la dimensiuni mai mici de 315 μm și sortate prin sitare. S-a determinat umiditatea materialului vegetal uscat (5,8%).

3. În următoarea etapă are loc extracția asistată de microunde, timp de 1-20 minute, la temperaturi de 40-60 °C. Solvenții folosiți au fost apa și o soluție etanolică de 40-80%, la un raport plantă / solvent de 1 / 20.

4. După extracție materialul vegetal solid este îndepărtat prin centrifugare, iar probele de extract au fost supuse analizei pentru determinarea eficienței de extracție a principiilor active – saponine, carbohidrați, polifenoli precum și activitatea antioxidantă. Conținutul total de saponine (TSC, exprimat în mg diosgenină echivalent/g material uscat – mg DE/gDM) s-a determinat colorimetric prin metoda raportată de Hiai și colab., cu modificări minore (Hiai, S.; Oura, H.; Nakajima, T. **Color reaction of some saponins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Med*, 1976, 29, 116-122**). Conținutul total de carbohidrați (TCC, exprimat în mg glucoză echivalent/g material uscat – mg GE/gDM) s-a determinat colorimetric prin metoda raportată de Varkhade (Varkhade C.B., Pawar H.A., **Spectrophotometric Estimation of Total Polysaccharides in *Plantago ovata* Husk Mucilage, *Intern. J. of Chem. and Pharm. Analysis*, 2013, 1(1), 2-4**). Conținutul total de polifenoli (TPC, exprimat în mg acid galic echivalent/g material uscat – mg GAE/gDM) s-a determinat colorimetric potrivit standardului internațional ISO 14502-1, iar activitatea antioxidantă s-a determinat folosind metoda colorimetrică CUPRAC, exprimată în mg Trolox echivalent/g material uscat – mg TE/gDM (Ozyurek M.; Guclu K.; Tutem E.; Baskan S. K.;

Ercag E.; Celik E.; Baki S.; Leyla Y.; Karaman S.; Resat A., A comprehensive review of CUPRAC methodology, *Analytical Methods*, 2011, 3, 2439-2453).

Prezentarea unor exemple de realizare a invenției

Se prezintă în continuare 2 exemple de realizare a procedurii de intensificare a extracției principiilor active din frunzele de *Hedera helix* L prin metode neconvenționale.

Exemplul 1

Frunzele de iederă se usucă la temperatura de 40 °C până la umiditatea finală de 5,8 %. După uscare, materialul vegetal se macină, se sortează prin cernere pe site cu ochiuri cu dimensiunea de 315 μm. Extracția principiilor active s-a realizat în sistem discontinuu folosind un reactor special pentru microunde din sticlă. Extracțiile s-au efectuat timp de 10 min, la temperatura de 50 °C, un raport plantă / solvent = 1/20 (w/v), într-un reactor cu microunde, cu agitate de 900 rpm. Ca solvent de extracție s-a folosit apa. Puterea de microunde aplicată a fost setată astfel încât temperatura în reactor să nu depășească 50 °C pentru a evita degradarea termică a compușilor bioactivi. Pentru evidențierea avantajelor aduse de procedeul de intensificare cu microunde, pentru comparație, în paralel s-a realizat și o extracție (Control) în aceleași condiții ca cele descrise pentru extracția în câmp de microunde, folosind același reactor discontinuu, cu diferența că s-a folosit metoda de încălzire clasică. După extracție materialul vegetal solid este îndepărtat prin centrifugare, iar probele de extract au fost supuse analizei pentru determinarea eficienței de extracție a principiilor active. S-au evaluat conținutul total de saponine, carbohidrați, polifenoli și activitatea antioxidantă, iar rezultatele sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1. Rezultatele obținute în urma extracției asistată de microunde a principiilor active din frunzele de iederă folosind ca solvent de extracție apa.

Nr. exp.	Tipul de încălzire	TSC (mgDE/gDM)	TCC (mgGE/gDM)	TPC (mgGAE/gDM)	Activitate antioxidantă (mgTE/gDM)
1	Control	21,79 ± 0,24	80,42 ± 3,32	8,16 ± 0,26	42,32 ± 0,64
2	Microunde	23,04 ± 0,36	137,14 ± 1,02	10,72 ± 0,06	60,29 ± 0,96

*Toate experimentele s-au realizat în triplicat iar valorile rezultate sunt prezentate împreună cu deviația standard

Exemplul 2

Se lucrează ca în exemplul 1 cu următoarea diferență: ca solvent de extracție s-a folosit o soluție etanolică de concentrație 80%. S-a utilizat etanol de uz alimentar. Extractele obținute au fost supuse analizei pentru determinarea conținutului total de saponine, carbohidrați, polifenoli și activitatea antioxidantă, iar rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2. Rezultatele obținute în urma extracției asistată de microunde a principiilor active din frunzele de iederă folosind ca solvent de extracție soluție etanolică 80%.

Nr. exp.	Tipul de încălzire	TSC (mgDE/gDM)	TCC (mgGE/gDM)	TPC (mgGAE/gDM)	Activitate antioxidantă (mgTE/gDM)
1	Control	46,68 ± 0,72	124,59 ± 0,78	10,66 ± 0,15	91,24 ± 1,27
2	Microunde	58,35 ± 0,54	142,07 ± 1,98	15,15 ± 0,25	111,21 ± 0,91

*Toate experimentele s-au realizat în triplicat iar valorile rezultate sunt prezentate împreună cu deviația standard

Conform datelor prezentate în tabelele 1 și 2 se observă că în cazul extracțiilor în apă se obțin rezultate mai mici comparativ cu extracțiile în soluție etanolică 80%. Extracțiile prin metodele neconvenționale (extracțiile asistate de microunde) au condus la rezultate mai bune pentru toate principiile active studiate.

Prezentarea avantajelor rezultate din aplicarea invenției

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- Procedeu simplu și ușor de aplicat la scară industrială;
- Utilizare de aparatură existentă pe piața fiabilă și eficientă energetic;
- Timpul de extracție este foarte mic, de doar 10 minute;
- Procedeu permite obținerea unor extracte cu cantități mari de compuși bioactivi;
- Procedeu permite obținerea unor extracte cu activitate antioxidantă mare;
- Produsul obținut prin aplicarea acestui procedeu este netoxic deoarece folosește, ca solvenți, apa și alcoolul etilic de uz alimentar.

REVEDICĂRI

1. Procedeu de intensificare a extracției principiilor active din *Hedera helix* L prin metode neconvenționale, caracterizat prin aceea că este alcătuit din 4 etape: (1) uscarea materialului vegetal, (2) macinarea materialului uscat, (3) extracția cu solvenți a principiilor active, (4) separarea prin centrifugare și analiza extractului obținut, conform descrierii invenției.
2. Procedeu conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că extracția principiilor active se realizează în câmp de microunde, într-un reactor discontinuu, folosind 2 solvenți – apa și soluție etanolică 80%.
3. Procedeu conform revendicărilor 1 și 2, caracterizat prin aceea că extractele obținute prin extracția asistată de microunde au un conținut total de saponine, carbohidrați, polifenoli și o activitate antioxidantă mai mare decât extractele obținute prin metoda de încălzire clasică.