



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01024**

(22) Data de depozit: **28.10.2010**

(41) Data publicării cererii:
30.04.2012 BOPI nr. 4/2012

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE CHIMICO-
FARMACEUTICĂ-ICCF, CALEA VITAN
NR.112, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL
PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR
BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ",
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.99-101,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **NICHITA CORNELIA, STR. ALIORULUI
NR.11, BL.D5, SC.3, AP.40, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **NEAGU GEORGETA, STR. MEHEDINȚI
NR.4, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **VULTURESCU VIRGINIA CRISTIANA,
STR. PRELUNGIREA GHENCEA NR.128,
BL.C5, SC.C, ET.8, AP.110, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ALBULESCU RADU,
STR.ROȘIA MONTANĂ NR.6, BL.07, SC.C,
AP.125, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **NIȚĂ SULTANA, STR.BĂRBAT VOIEVOD
NR.21, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BAZDOACĂ CRISTINA MIRELA,
BD. DIMITRIE CANTEMIR NR.13, BL.11,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CODOREAN ELEONORA,
ALEEA HAIDUCULUI NR.1, BL.A3, SC.1,
ET.8, AP.33, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **ALBULESCU LUCIAN,
STR. ROȘIA MONTANĂ NR.6, BL.07, SC.C,
ET.2, AP.125, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **MEGHEA AURELIA, STR.OLIMPULUI
NR.76, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BADEA NICOLETA MARIA, STR. LEREȘTI
NR.3, BL.A2, SC.6, ET.4, AP.88, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;POPESCU IONELA
DANIELA, STR. LOTRIOARA NR.20,
BL.V39, SC.1, AP.9, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **TĂNASE CRISTIANA,
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR.126, BL.P34,
SC.1, AP.30, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **RĂDUCAN ELENA,
STR. FREDERIC CHOPIN NR.27,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) BIOPRODUS FLAVONOIDIC VEGETAL PROFLAV ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTUIA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un produs cu acțiune antioxidantă și la un procedeu pentru obținerea acestuia. Produsul conform invenției cuprinde flavonoide 2,19...4,00% exprimate în rutin, acizi polifenolcarboxilici 2,36...6,0% exprimați în acid cafeic, și polifenoli 3,07...13,96% exprimați în acid galic. Procedeu conform invenției constă din extracția și prelucrarea materialului vegetal obținut de la specia *Crataegus monogyna* Jacq., prin ultrasonarea materialului vegetal uscat și mărunțit timp de 20...50 min, la 20...40°C, după care urmează 2...4 cicluri de extracție la temperatura de reflux a solventului timp de 2...3,5 h, la un raport 1:1, cu un solvent constând din alcool metilic: apă demineralizată 1:1, apoi

extractul se răcește la 5°C, se filtrează, se decolorează cu carbune activ 1% și se prelucrează prin concentrare la vid la 40...60°C până la 1:4...1:10 față de volumul inițial, și se precipită, sub agitare timp de 15...45 min, cu metanol acidulat la pH 2,5...5,8, se menține la 5°C timp de 48...72 h, și se centrifughează la 4°C, timp de 20 min, pentru separarea produsului precipitat care se filtrează, se spală cu acetonă și alcool etilic, după care se usucă, obținându-se un produs precipitat brun-verzui, având o activitate antioxidantă de 95...99,5%.

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).



18

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. a	206 9/024
Data depozit	28-10-2010

BIOPRODUS FLAVONOIDIC VEGETAL PROFLAV SI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTUIA

Invenția se refera la obtinerea unui nou bioprodus flavonoidic vegetal si la procedeul de obtinere al acestuia. Bioprodusul flavonoidic vegetal prezinta actiune antioxidanta si rol modulator in proteomica stresului oxidativ.

Bioprodusul antioxidant are la baza principii active de tip - compusi flavonoidici, acizi polifenolcarboxilici si polifenoli totali, extrase din specia vegetala *Crataegus monogyna* Jacq.

Este cunoscut in literatura de specialitate importanta compusilor flavonoidici ca principii active vegetale, ce se mentin in atentia cercetarilor in domeniul stiintelor vietii, prin abordarea aspectele multiple, incepand de la studii privind relatia structura chimica - activitate biologica pana la elucidarea mecanismelor de actiune la nivel molecular.

Datele de literatura evidentiaza complexitatea si multitudinea efectelor biologice ale flavonoidelor: activitatea antioxidanta, antiinflamatorie, imunomodatoare, neuroprotectoare, cardioprotectoare, antiosteoporotica, antimutagena, antineoplazica, antiangiogenetica, apoptotica, antimetastazanta, antitumorală, antivirală. Astfel acesti compusi naturali s-au dovedit a fi inhibitori ai activarii transcriptionale a enzimelor COX-2 si iNOS (apigenina, luteolina, quercetina), inhibitori ai fosfatidil-inozitol (PI)3-kinazei (quercetina), puternici inhibitori ai productiei de IL-4 si IL-13 de catre bazofile (luteolina si apigenina), inhibitori ai citocromului P-450 (apigenina, luteolina, quercetina), inhibitori ai metaloproteinazelor din matricea extracelulara (luteolina, apigenina, quercetina), inhibitori ai Nf-KB (quercetina).

Potentialul apigeninei de a inhiba cresterea si de a initia apoptoza a fost observat intr-o varietate de linii celulare, ceea ce denota faptul ca acest flavonoid reprezinta un agent chimiopreventiv si/sau chimioterapeutic promitator in profilaxia si terapia cancerului. In ceea ce priveste efectul antiproliferativ exercitat fata de progenitorii medulari ai celulelor sangvine normale si leucemice, s-a constatat ca quercetina a fost eficienta, in concentratii mici, in majoritatea cazurilor de leucemie acuta mieloida si in toate cazurile de leucemie acuta limfoida.

Studile farmacologice *in vivo* au evidentiat actiunea luteolinei de a inhiba toxicitatea indusa de lipopolizaharide (LPS) si expresia moleculelor proinflamatorii.

Specia vegetala *Crataegus monogyna* Jacq. contine un complex de compusi flavonoidici a caror actiune antioxidanta diminueaza producerea afectiunilor cardiovasculare in special a aterosclerozei datorita inhibarii peroxidarii LDL.

Deasemenea sunt cunoscute procedee de obtinere a compusilor flavonoidici prin extractie, cum ar fi macerarea, percolarea, extractia solid-lichid.

Produsele cunoscute si procedeele de obtinere a acestora prezinta o serie de dezavantaje cum ar fi biodisponibilitatea scazuta in cazul produselor si existenta unor aspecte legate de toxicitate in cazul procedeelor.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia consta in aceea ca se obtine un bioprodus flavonoidic vegetal cu o biodisponibilitate superioara si activitate antioxidanta cu valori mari, printr-un procedeu special conceput care sa permita separarea avansata a bioprodusului din extractul vegetal total.

Procedeul conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că are un conținut de flavonoide 2.19...4.00 %, exprimat în rutin, acizi polifenolcarboxilici 2.36...6.00 % exprimat în acid cafeic și de polifenoli totali cuprins între 3.07...13.96 %, exprimat în acid galic și că prezintă o activitate antioxidantă cuprinsă între 95.76...99.5%.

Procedeul conform invenției înlătură dezavantajele procedeelor cunoscute prin aceea că înainte de etapa de extracție, materialul vegetal uscat și mărunțit se ultrasonază timp de 20...50 minute, la o temperatură cuprinsă între 20...40°C, apoi extracția are loc timp de 2...3.5h, la temperatura de reflux a solventului, după care, extractul se răcește la temperatura de +5°C, se filtrează și se decolorează cu carbune activ 1 %, aplicând între 2-4 cicluri extractive, urmat de etapele de prelucrare care cuprind: concentrarea la vid la rapoarte cuprinse între 1:4...1:10 v/v la o temperatură de 40...60°C, precipitarea extractului concentrat sub agitare la un pH cuprins între 2.5 și 5.8, la un raport de 1:4...1:10 v/v, staționarea la temperatura de +5°C și centrifugarea la o turatie de 4000 rot/min, timp de 20 de minute, urmată de filtrare, spălare și esorare cu acetona și alcool etilic, rezultând un bioprodusul flavonoidic vegetal.

Avantajele bioprodusul flavonoidic vegetal, conform invenției constau în aceea că prezintă activitate antioxidantă foarte ridicată și prin mecanisme specifice contracarează efectele inflamatoare și aterogene induse de stresul oxidativ la nivelul endoteliului vascular. Bioprodusul flavonoidic vegetal proflav prezintă caracteristici optime de citoprotecție și imunoprotecție.

Avantajele procedurii de obținerea a bioprodusul flavonoidic vegetal proflav conform invenției, constau în aceea că bioprodusul este obținut din specia vegetală *Crataegus monogyna* Jacq., printr-o tehnologie extractivă nepoluantă, economică, eficientă și flexibilă care conduce la obținerea unui nou produs vegetal cu înalt potențial profilactic și terapeutic. Rezultatele testării, bioprodusul flavonoidic vegetal proflav realizat în urma elaborării procedurii, permit utilizarea ca supliment alimentar și recomandarea în prevenția și terapia afecțiunilor cardiovasculare și a altor afecțiuni mediate de mecanisme inflamatoare și stres oxidativ.

Se prezintă în continuare un exemplu de realizare a invenției.

Extracție vegetală

Mod de lucru:

Materialul vegetal 200 g/proba, uscat și mărunțit conform Farmacopeei, se extrage în solvent alcool metilic: apă demineralizată 1:1 (v/v), raportul material vegetal: solvent având valori cuprinse între 1:10 (m/v) ... 1:20 (m/v).

Înainte de a fi supus procesului de extracție solid-lichid, amestecul material vegetal-solvent este ultrasonat timp de 20...50 minute, la temperatura de 20...40°C.

Timpul de extracție este de 2...3.5h, la temperatura de reflux a solventului. Extractul se răcește la temperatura de +5°C și se filtrează pe hartie de filtru industrială. Filtratul obținut se supune operației de decolorare cu carbune activ 1 %.

Prelucrarea extractelor vegetale

Solutiile hidroalcoolice obtinute in urma celor 2...4 cicluri de extractie, dupa operatia de filtrare si decolorare se reunesc si se supun concentrarii la vid in rapoarte de concentrare diferite cuprinse intre 1:4... 1:10 (v/v), fata de filtratul total, pana la obtinerea unui extract concentrat de culoare brun verzui. Operatia de concentrare se realizeaza la temperatura de 40... 60°C, utilizand un rotovapor tip Buchi B-480, prevazut cu baie de apa termostata. Extractul concentrat este precipitat sub agitare, in metanol acidulat, la un pH cuprins in intervalul 2.5...5.8. Raportul extract concentrat/metanol este 1:4... 1:10 (v/v).

Procesul de agitare se realizeaza cu un agitator tip Multimixer MM1000 Biosan, timp de 15...45 de minute la viteza de 200... 400 rot/min. Suspensia obtinuta se mentine la temperatura scazuta 5°C timp de 48...72 h dupa care se supune operatiei de centrifugare la temperatura de 4°C, timp de 20 de minute la turatie de 4000 rot/min. In urma procesului de centrifugare realizat cu centrifuga tip Universal 320 R (Hettich-Germania) - prevazuta cu sistem de racire, se produce separarea unui precipitat obtinut prin filtrare la vid.

Precipitatul obtinut in urma operatiei de filtrare se usuca la temperatura camerei, se spala succesiv cu acetona si alcool etilic si apoi se lasa la esorat in alcool etilic pentru indepartarea completa a metanolului. Operatia de spalare se repeta de trei ori dupa care se obtine o pulbere brun - verzui care este mojarata pana la consistenta foarte fina.

Determinarile prin cromatografie in strat subtire de inalta performanta (HPTLC) evidentiaza prezenta compusilor flavonoidici specifici: rutin, hiperozida, apigenina, quercetina, acid clorogenic.

Bioprodusul flavonoidic antioxidant prezinta un continut de flavonoide (exprimat in rutin) cuprins intre 2.19...4.00 %, acizi polifenolcarboxilici (exprimat in acid cafeic), cuprins intre 2.36...6.00 % si polifenoli totali (exprimat in acid galic), cuprins intre 3.07...13.96 %.

Bioprodusul flavonoidic vegetal proflav prezinta o activitate antioxidanta, determinata prin chemiluminescenta, cu o valoare cuprinsa intre 95.76...99.5%.

Se analizeaza indicatorii de biosecuritate si eficacitate ai bioprodusului flavonoidic vegetal proflav prin metodologie moderna *in vitro*.

Tinand seama de efectele speciei *Crataegus monogyna* Jacq la nivelul aparatului cardiovascular - efecte antihipertensive si efecte cardioprotective - se elaboreaza un model experimental adecvat, de investigare a interferentei fitoproduselor in mecanismele patologiei cardiovasculare la om.

Se utilizeaza un model experimental complex *in vitro* de expunere a celulelor endoteliale si a sangelui periferic integral in cultura, la extracte naturale, comparativ cu substante etalon, cu actiune cunoscuta, pentru evaluarea efectelor la nivel celular: viabilitate, citotoxicitate, contracarare a stresului oxidativ si a mediatorilor inflamatiei, a efectelor imunomodulatoare (raspunsul la mitogeni - PHA, LPS). Astfel se utilizeaza, culturi de celule endoteliale umane, linia HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) pentru aplicarea testelor de viabilitate / capacitate de proliferare celulara, citotoxicitate.

Rezultatele citoprotectoare la nivel endotelial si imun sunt evidentiate in prezenta bioprodusului si sunt reproductibile in sistemele experimentale utilizate. Evaluarea profilului citokinelor IL-1b, IL-6, TNF-a si IL-8, indica contracararea

secretiei de citokine pro-inflamatoare si mediatoare ale mecanismelor patologice la nivel endotelial. Deasemenea, se utilizeaza culturi de sange uman periferic integral pentru evaluarea modularii profilului citokinelor prin tehnologie multiplex xMAP.

Analiza proteomica se realizeaza utilizand platforma SELDI-TOF-MS (Surface-Enhanced Laser Desorbition/Ionization - Time of Flight - Mass Spectrometry, BioRad), sistem de desorbție-ionizare cu laser a moleculelor adsorbite selectiv pe suprafete speciale, pentru evidentierea modificarilor profilului proteinelor, in screeningul produselor obtinute din plante. Analiza proteomica realizata indica diferente ale spectrelor proteinelor la nivelul mediatorilor afectiunilor cardiovasculare - angiotensina, vimentina, actina, tubulina.

Bioprodusul flavonoidic vegetal proflav prezinta caracteristici optime de citoprotectie si imunoprotectie.

Studiul de toxicitate in vivo, respectiv toxicitatea dupa doza unica, a evidentiat faptul ca in conformitate cu clasificarea Hodge-Steiner, se poate aprecia ca bioprodusul flavonoidic vegetal proflav testat, nu prezinta toxicitate in conditiile experimentului. Produsul are o larga aplicabilitate in industria farmaceutica si ca supliment alimentar, avand un inalt potential profilactic si/sau terapeutic.

REVENDICĂRI

1. Bioprodus flavonoidic vegetal proflav. **caracterizat prin aceea ca** are un continut de flavonoide 2.19...4.00 %, exprimat in rutin, acizi polifenolcarboxilici 2.36...6.00 % exprimat in acid cafeic si de polifenoli totali cuprins intre 3.07...13.96 %, exprimat in acid galic.
2. Bioprodus flavonoidic vegetal proflav. conform revendicarii 1. **caracterizat prin aceea ca**, prezinta o activitate antioxidanta cuprinsa intre 95,76...99,5%.
3. Procedeu de obtinere a bioprodusului flavonoidic vegetal proflav. prin extractie si etape ulterioare de prelucrare **caracterizat prin aceea ca**, inainte de etapa de extractie. se ultrasoneaza materialul vegetal uscat si maruntit timp de 20...50 minute. la o temperatura cuprinsa intre de 20...40°C, are loc apoi extractia. timp de 2...3.5h. la temperatura de reflux a solventului, dupa care. se raceste extractul la temperatura de +5°C. se filtreaza si se decoloreaza cu carbune activ 1 %, aplicand intre 2-4 cicluri extractive. dupa care se realizeaza etapele de prelucrare care cuprind: concentrarea la vid la rapoarte cuprinse intre 1:4...1:10 v/v la o temperatura de 40...60°C. precipitarea extractului concentrat sub agitare la un pH cuprins intre 2.5 si 5.8 la un raport de 1:4...1:10 v/v. stationarea la temperatura de +5°C si centrifugarea la o turatie de 4000 rot/min. timp de 20 de minute. si apoi filtrarea. spalarea si esorarea cu acetona si alcool etilic. rezultand un bioprodus flavonoidic vegetal.