



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.05.2013** BOPI nr. 5/2013

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

(73) Titular:

- 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.D 5, SC.3, ET.3, AP.40, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- NEAGU GEORGETA, STR.SIMION MEHEDIȚI NR.4, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- VULTURESCU VIRGINIA CRISTIANA, PRELUNGIREA GHENCEA NR.128, BL.C 5, SC.C, ET.8, AP.110, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- ALBULESCU RADU NICOLAE AUREL, STR.ROȘIA MONTANĂ NR.6, BL.O 7, SC.C, ET.2, 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. A 3, SC.1, ET.8, AP.33, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- ALBULESCU LUCIAN, STR.ROȘIA MONTANĂ NR. 6, BL.O 7, 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.A 2, SC.6, ET.4, AP.88, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- POPESCU IONELA-DANIELA, STR.LOTRIOARA NR.20, BL.V 39, SC.1, AP.9, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
- TĂNASE CRISTIANA, CALEA 13 SEPTEMBRIE NR.126, BL.P 34, SC.1, AP.30, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- RĂDUCAN ELENA, STR.FREDERIC CHOPIN NR.27, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 125699 B1; RO 120950 B1

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



RO 127270 B1

1 Inventția se referă la un bioproduct flavonoidic, vegetal și la procedeul de obținere a
acestuia, cu utilizare în industria fitofarmaceutică.

3 Este cunoscută, în literatura de specialitate, importanța compușilor flavonoidici, ca
principii active vegetale, ce se mențin în atenția cercetărilor în domeniul științelor vieții, prin
5 abordarea de aspectele multiple, începând de la studii privind relația structură chimică -
activitate biologică, până la elucidarea mecanismelor de acțiune la nivel molecular.

7 Datele din literatură evidențiază complexitatea și multitudinea efectelor biologice ale
flavonoidelor, activitatea antioxidantă, antiinflamatorie, imunomodulatoare, neuroprotectoare,
9 cardioprotectoare, antiosteoporotică, antimutagenă, antineoplazică, antiangiogenetică,
apoptotică, antimetastazantă, antitumorală și antivirală. Astfel, acești compuși naturali s-au
11 dovedit a fi inhibitori ai activării transcripționale a enzimelor COX-2 și iNOS (apigenina,
luteolina, quercetina), inhibitori ai fosfatidil-inozitol (PI)3-kinazei (quercetina), puternici
13 inhibitori ai producției de IL-4 și IL-13 de către bazofile (luteolina și apigenina), inhibitori ai
citocromului P-450 (apigenina, luteolina, quercetina), inhibitori ai metaloproteinazelor din
15 matricea extracelulară (luteolina, apigenina, quercetina), inhibitori ai Nf-KB (quercetina).

Potențialul apigeninei de a inhiba creșterea și de a iniția apoptoza a fost observat într-o
17 varietate de linii celulare, ceea ce denotă faptul că acest flavonoid reprezintă un agent
chimiopreventiv și/sau chimioterapeutic promițător în profilaxia și terapia cancerului. În ceea
19 ce privește efectul antiproliferativ, exercitat față de progenitorii medulari ai celulelor sangvine
normale și leucemice, s-a constatat că quercetina a fost eficientă, în concentrații mici, în
21 majoritatea cazurilor de leucemie acută micloidă și în toate cazurile de leucemie acută
limfoidă.

23 De asemenea, sunt cunoscute procedee de obținere a compușilor flavonoidici prin
extracție, cum ar fi macerarea, percolarea și extracția solid-lichid.

25 Studiile farmacologice *in vivo* au evidențiat acțiunea luteolinei de a inhiba toxicitatea
indusă de lipopolizaharide (LPS) și expresia moleculelor proinflamatorii.

27 Specia vegetală *Crataegus monogyna* Jacq. conține un complex de compuși
flavonoidici a căror acțiune antioxidantă diminuează producerea afecțiunilor cardiovasculare,
29 în special, a aterosclerozei, datorită inhibării peroxidării LDL.

Din literatura de brevete în domeniu, sunt cunoscute următoarele documente:

31 **RO 125699 B**, care se referă la un produs antioxidant de natură vegetală și la
procedeul de obținere a acestuia. Produsul antioxidant este constituit dintr-un complex de
33 compuși polifenolici, cu conținut de 25...30% flavonoide exprimate în rutozidă și 25...30%
acizi polifenol carboxilici, exprimați în acid cafeic, izolați din amestecul de *Crataegi sp. flores*
35 *et folium*, *Salviae sp. herba* și *Cichorii herba*, în raport 1 : 1 : 1 m/m/m, cu 82...160 indice de
protecție.

37 Procedeul de obținere a produsului antioxidant de natură vegetală constă în aceea
că se supune extracției materialul vegetal, constituit dintr-un amestec alcătuit din *Crataegi*
39 *sp. flores et folium*, *Salviae sp. herba* și *Cichorii herba*, în raport 1 : 1 : 1 m/m/m, cu alcool
metilic într-un raport de 1/12 material vegetal/solvent de extracție, la reflux, timp de 3 h, iar
41 soluția extractivă se separă, se concentrează sub presiune redusă, până la un volum
corespunzător unui raport 1 : 1 v/m față de materialul vegetal, după care se diluează soluția
43 metanolică, concentrată, cu un volum egal de apă, se elimină alcoolul metilic prin distilare
sub presiune redusă, se menține soluția apoasă concentrată la temperatura de 5...10°C, timp
45 de 24 h, apoi se separă reziduu clorofilian, se spală soluția apoasă prin agitare cu solvenți
nepolari: clorură de metilen, cloroform, în raport de 1 : 1 v/v, se extrage soluția apoasă prin
47 agitare cu solvenți nepolari: acetat de etil, alcool n-butilic, în raport de 1 : 1 v-v, de 3 ori
succesiv, iar extractele organice reunite se concentrează sub presiune redusă, până la
49 reziduu sau se atomizează.

RO 127270 B1

RO 120950 B1 se referă la un complex bioactiv de acizi triterpenici, ce constă în aceea că are un conținut de acizi de minimum 90%, format din: minimum 75% acid ursolic, 10...15% acid oleanolic și 4...10% acizi triterpenici, cum ar fi: acid hidroxiursolic, acid hidroxi-oleanolic, acid betulinic, acid dehidrobetulinic, obținut sub formă de acizi în stare liberă sau ca săruri de tip Na, K, NH₄, prin extracție din următoarele specii de plante: *Salvia species*, *Lavandula species*, *Sambucus nigra* și *Crataegus species*, la procedeul de obținere a complexului bioactiv și la produse medicamentoase cu utilizări terapeutice.

Produsele cunoscute și procedeele de obținere a acestora prezintă o serie de dezavantaje, cum ar fi biodisponibilitatea scăzută a acestora și existența unor aspecte legate de toxicitate, în cazul procedeeelor.

Problema tehnică, obiectivă, pe care urmărește să o rezolve invenția, constă în obținerea unui bioprodus vegetal, flavonoidic, din *Crataegus monogyna* (Păducel), cu o biodisponibilitate superioară și o activitate antioxidantă cu valori mari.

Soluția la această problemă constă în punerea în evidență a compușilor flavonoidici, ca principii active vegetale, împreună cu acizii polifenolcarboxilici și polifenolii totali.

Bioprodusul flavonoidic, conform invenției, constă în aceea că are un conținut de 2,19...4,00% flavonoide exprimate în rutin, 2,36...6,00% acizi polifenolcarboxilici exprimați în acid cafeic, 3,07...13,96% polifenoli totali, exprimați în acid galic și o activitate antioxidantă cuprinsă între 95,76 și 99,5%, iar procedeul de obținere, conform invenției, constă în aceea că, înainte de etapa de extracție, se ultrasonează materialul vegetal, uscat și mărunțit, timp de 20...50 min, la o temperatură de 20...40°C, apoi are loc extracția, timp de 2...3,5 h, la temperatura de reflux a solventului, după care, se răcește extractul la temperatura de +5°C, se filtrează și se decolorează cu cărbune activ 1%, aplicând între 2 și 4 cicluri extractive, după care se realizează etapele de prelucrare, care cuprind: concentrarea la vid, la rapoarte cuprinse între 1 : 4 și 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 turația de 4000 rot/min, timp de 20 de min, apoi filtrarea, spălarea și esorarea cu acetonă și alcool etilic, rezultând un bioprodus flavonoidic, vegetal.

Bioprodusul flavonoidic, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

- are acțiune antioxidantă și rol modulator în proteomica stresului oxidativ;
 - prezintă caracteristici optime de citoprotecție și imunoprotecție;
 - procedeul permite o separare avansată a bioprodusului din extractul vegetal total.
- Se prezintă, în continuare, un exemplu de realizare a invenției.

Exemplu de realizare. Extracția vegetală. Materialul vegetal 200 g/probă, uscat și mărunțit conform *Farmacopeei*, se extrage în solvent alcool metilic: apă demineralizată 1:1 (v/v), într-un raport material vegetal : solvent având valori cuprinse între 1:10 și 1:20 (m/v).

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

Timpul de extracție a fost de 2...3,5 h, la temperatura de reflux a solventului. Extractul s-a răcit la temperatura de +5°C și s-a filtrat pe hârtie de filtru industrială. Filtratul obținut s-a supus operației de decolorare cu cărbune activ 1%.

Prelucrarea extractelor vegetale. Soluțiile hidroalcoolice, obținute în urma celor 2...4 cicluri de extracție, după operația de filtrare și decolorare, s-au reunit și s-au supus concentrării la vid, în rapoarte de concentrare diferite, cuprinse între 1:4 și 1:10 (v/v), față de filtratul total, până la obținerea unui extract concentrat, de culoare brun verzui. Operația de concentrare s-a realizat la temperatura de 40...60°C, utilizând un rotovapor tip Buchi B-480,

RO 127270 B1

1 prevăzut cu baie de apă termostată. Extractul concentrat a fost precipitat sub agitare, în
2 metanol acidulat, la un pH cuprins în intervalul 2,5...5,8. Raportul extract concentrat :
3 metanol a fost de 1:4...1:10 (v/v).

4 Procesul de agitare s-a realizat cu un agitator tip Multimixer MM 1000 Biosan, timp
5 de 15...45 min, la viteza de 200... 400 rot/min. Suspensia obținută s-a menținut la o
6 temperatură scăzută +5°C, timp de 48...72 h, după care s-a supus operației de centrifugare
7 la temperatura de 4°C, timp de 20 min, la o turație de 4000 rot/min. În urma procesului de
8 centrifugare, realizat cu centrifuga tip Universal 320 R (Hettich-Germania), prevăzută cu
9 sistem de răcire, s-a produs separarea unui precipitat, obținut prin filtrare la vid.

10 Precipitatul obținut în urma operației de filtrare s-a uscat la temperatura camerei,
11 s-a spălat succesiv cu acetonă și alcool etilic, și apoi s-a lăsat la esorat în alcool etilic, pentru
12 îndepărtarea completă a metanolului. Operația de spălare s-a repetat de trei ori, după care
13 s-a obținut o pulbere brun - verzuie, care a fost mojarată până la consistență foarte fină.

14 Determinările prin cromatografie în strat subțire de înaltă performanță (HPTEC) au
15 evidențiat prezența compușilor flavonoidici specifici: rutin, hiperozidă, apigenină, quercetină
16 și acid clorogenic.

17 Bioprodusul antioxidant are la bază principii active de tip - compuși flavonoidici, acizi
18 polifenolcarboxilici și polifenoli totali, extrase din specia vegetală *Crataegus monogyna* Jacq.

19 Bioprodusul flavonoidic, vegetal, conform invenției, prezintă o activitate antioxidantă
20 foarte ridicată, și prin mecanisme specifice contracarează efectele inflamatoare și aterogene
21 induse de stresul oxidativ la nivelul endoteliului vascular. Bioprodusul flavonoidic, vegetal,
22 prezintă, de asemenea, caracteristici optime de citoprotecție și imunoprotectiv.

23 Bioprodusul flavonoidic a fost obținut din specia vegetală *Crataegus monogyna* Jacq.,
24 printr-o tehnologie extractivă, nepoluantă, economică, eficientă și flexibilă, și a condus la
25 obținerea unui produs cu un înalt potențial profilactic și terapeutic.

26 *Rezultatele testării.* Bioprodusul flavonoidic, vegetal, realizat în urma elaborării
27 procedurii, a permis utilizarea ca supliment alimentar, cu recomandare în prevenția și
28 terapia afecțiunilor cardiovasculare și a altor afecțiuni mediate de mecanisme inflamatoare
29 și stres oxidativ.

30 Bioprodusul flavonoidic, antioxidant, prezintă un conținut de flavonoide (exprimat în
31 rutin) cuprins între 2,19 și 4,00%, acizi polifenolcarboxilici (exprimat în acid cafeic), cuprins
32 între 2,36 și 6,00% și polifenoli totali (exprimat în acid galic), cuprins între 3,07 și 13,96%.

33 Bioprodusul flavonoidic, vegetal, prezintă, de asemenea, o activitate antioxidantă,
34 determinată prin chemiluminescență, cu o valoare cuprinsă între 95,76 și 99,5%.

35 TESTĂRI FARMACOLOGICE

36 S-au analizat indicatorii de biosecuritate și eficacitate ai bioprodusului flavonoidic,
37 vegetal, proflav, prin metodologie modernă *in vitro*.

38 Ținând seama de efectele speciei *Crataegus monogyna* Jacq. la nivelul aparatului
39 cardiovascular - efecte antihipertensive și efecte cardioprotective - s-a elaborat un model
40 experimental adecvat, de investigare a interferenței fitoproduselor în mecanismele patologiei
41 cardiovasculare la om.

42 S-a utilizat un model experimental complex *in vitro*, de expunere a celulelor
43 endoteliale și a sângelui periferic integral în cultură, la extracte naturale, comparativ cu
44 substanțele etalon, cu acțiune cunoscută, pentru evaluarea următoarelor efecte la nivel
45 celular: viabilitate, citotoxicitate, contracararea stresului oxidativ și a mediatorilor inflamației
46 și a efectelor imunomodulatoare (răspunsul la mitogeni - pHA, LPS).

47 Astfel, s-au utilizat culturi de celule endoteliale, umane, linia HUVEC (human
48 umbilical vein endothelial cells), pentru aplicarea testelor de viabilitate/capacitate de
49 proliferare celulară, citotoxicitate. Rezultatele citoprotectoare la nivel endotelial și imun au
50 fost evidențiate în prezența bioprodusului, conform invenției, și sunt reproductibile în
51 sistemele experimentale utilizate.

RO 127270 B1

Evaluarea profilului citokinelor IL-1b, IL-6, TNF-a și IL-8 indică contracararea secreției de citokine proinflamatoare și mediatore ale mecanismelor patologice la nivel endotelial.	1
De asemenea, s-au utilizat culturi de sânge uman, periferic, integral, pentru evaluarea modulării profilului citokinelor prin tehnologie multiplex xMAP.	3
Analiza proteomică s-a realizat utilizând platforma SELDI-TOF-MS (Surface-Enhanced Laser Desorbition/Ionization - Time of Flight Mass Speetrometry, BioRad), sistem de desorbție-ionizare cu laser a moleculelor adsorbite selectiv pe suprafețe speciale, pentru evidențierea modificărilor profilului proteinelor, în screening-ul produselor obținute din plante.	5
Analiza proteomică realizată a indicat diferențe ale spectrelor proteinelor la nivelul mediatorilor afecțiunilor cardiovasculare: angiotensina, vimentina, actina și tubulina.	7
Bioprodusul flavonoidic, vegetal, a prezentat caracteristici optime de citoprotecție și imunoprotecție.	9
Studiul de toxicitate <i>in vivo</i> , respectiv, toxicitatea după doza unică, a evidențiat faptul că, în conformitate cu clasificarea Hodge-Steiner, s-a putut aprecia că bioprodusul flavonoidic testat nu prezintă toxicitate în condițiile experimentului.	11
Bioprodusul flavonoidic, conform invenției, are o largă aplicabilitate în industria farmaceutică, cât și ca supliment alimentar, având un înalt potențial profilactic și/sau terapeutic.	13
	15
	17

RO 127270 B1

Revendicări

1

3

1. Bioprodus flavonoidic, vegetal, **caracterizat prin aceea că** are un conținut de 2,19...4,00% flavonoide exprimate în rutin, 2,36...6,00% acizi polifenolcarboxilici exprimați în acid cafeic, 3,07...13,96% polifenoli totali, exprimați în acid galic și o activitate antioxidantă cuprinsă între 95,76 și 99,5%.

7

2. Procedeu de obținere a bioprodusului flavonoidic, vegetal, definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, înainte de etapa de extracție, se ultrasonează materialul vegetal, uscat și mărunțit, timp de 20...50 min, la o temperatură de 20...40°C, apoi are loc extracția, timp de 2...3,5 h, la temperatura de reflux a solventului, după care se răcește extractul la temperatura de +5°C, se filtrează și se decolorează cu cărbune activ 1%, aplicând între 2 și 4 cicluri extractive, după care se realizează etapele de prelucrare, care cuprind: concentrarea la vid la rapoarte cuprinse între 1 : 4 și 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 turația de 4000 rot/min, timp de 20 min, apoi filtrarea, spălarea și esorarea cu acetonă și alcool etilic, rezultând un bioprodus flavonoidic, vegetal.

9

11

13

15

17



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 451/2013