



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00459

(22) Data de depozit: 07/07/2017

(41) Data publicării cererii:
30/03/2018 BOPI nr. 3/2018

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
DIN BUCUREȘTI, BD. MĂRĂȘTI NR.59,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• VAMANU EMANUEL,
ALEEA VALEA CĂLUGĂREASCĂ NR.3,
BL.A 10, SC.D, ET.2, AP.53, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• SÂRBU IONELA, STR.BĂICULEȘTI 21,
BL.D13, SC.A, ET.5, AP.21, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• POP OCTAVIAN, STR.SĂSAR 23,
BAIA SPRIE, MM, RO;
• POP ERDELYI ANDREA, BD.BUCUREȘTI
28, AP.17, BAIA MARE, MM, RO;
• ENE MIHAELA, STR. CUPOLEI 2, BL.105,
SC.C, ET.8, AP.102, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) PRODUS BIOACTIV DIN CIUPERCI SĂLBATICE
COMESTIBILE, PENTRU ÎMBUNĂTĂȚIREA AMPRENTEI
MICROBIOTEI COLONULUI

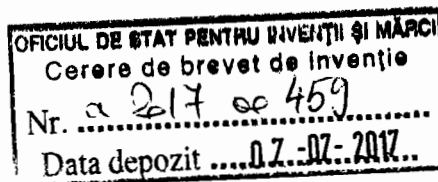
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un produs bioactiv utilizat în patologiile nutriționale și cardiovasculare, pentru îmbunătățirea amprentei microbiotei colonului. Produsul conform invenției este constituit din extract sub formă atomizată de ciuperci din genul *Boletus sp.*, *Pleurotus ergyngii*, *Armillaria mellea* și *Tuber melanosporum*,

într-un raport 30:7:2:1, și 7% maltodextrină, produsul având un conținut de compuși fenolici de 7,8 μg/ml echivalent acid galic, și o activitate antioxidantă totală de peste 90%.

Revendicări: 1





Produs bioactiv din ciuperci sălbatice comestibile pentru îmbunătățirea amprentei microbiotei colonului

Invenția se referă la un produs biologic activ bazat exclusiv pe utilizarea extractului atomizat din bazidiocarful uscat al următoarelor specii de ciuperci sălbatice comestibile (recoltate din flora spontană a României): specii diferite din genul *Boletus*, *Pleurotus eryngii*, *Armillaria mellea* și *Tuber melanosporum*. Produsul se adresează corectării dereglării microbiotelor (amprente microbiene), efect asociat patologiilor nutriționale (de exemplu, diabet) și cardiovasculare. Odată cu administrarea se obține și o creștere a capacității antioxidante de la nivelul colonului, datorită compoziției în compuși bioactivi a ciupercilor, cu rol în combaterea efectelor determinate de stresul oxidativ.

Problemele cauzate de către aceste două patologii sunt bine cunoscute și reprezintă unele din cauzele principale de mortalitate la ora actuală. Patologiile sunt asociate cu un dezechilibru la nivelul microbiotei colonului. Formula de produs propusă își propune un control al microbiotei acestor grupuri țintă de populație, prin stimularea multiplicării tulpinilor favorabile (tulpini din genurile *Lactobacillus* și *Bifidobacterium*), ca mijloc direct de acțiune împotriva creșterii glicemiei și colesterolului din sânge.

Intervenția asupra microbiotei pentru controlul și diminuarea efectelor negative ale unor patologii cu incidență ridicată reprezintă o noutate în domeniul suplimentelor funcționale și conduce la obținerea unui produs inovativ, fără toxicitate, bazat pe materii prime indigene.

Nu au fost identificate brevete care să se utilizeze pentru controlul microbiotei colonului. În schimb, studiul publicat în PLoS One. 2016; 11(12): e0167754, a descris efectul pe care îl exercită extractul apos bazat pe miceliul *Agaricus blazei* Murill (82.4%), *Hericeum erinaceus* (14.7%) and *Grifola frondosa* (2.9%) asupra tumorilor de la nivelul intestinului subțire și al colonului șoarecilor.

Brevetul US20140294997 A1 se referă la controlul greutateii și al creșterii capacității metabolice prin administrarea unui produs/extract din fructe de pădure. Produsul acționează prin



Reactor US AMVB
Prof. univ. dr. Sorin Mihai Cimpeanu
Conf. Emanuel Varșanu

controlul structurii compoziției microbiotei, reducerea microbiotei nedorite în scopul scăderii greutatei corporale și nivelului glucozei din sânge.

Formula propusă poate avea unele dezavantaje prin aceea că materia primă (ciuperca) are o compoziție variabilă, în funcție de substratul pe care crește, arealul geografic de unde este recoltată, sezon etc. Astfel, formula propusă se bazează, în principal, pe componenta fenolică, care are o semnătură chimică similară în cadrul aceleiași specii. Formula produsului inovativ constă dintr-un extract atomizat, care păstrează nealterată compoziția în compuși bioactivi, limitând degradarea acestora în timpul păstrării.

Conform invenției, compoziția suplimentului funcțional destinat controlului microbiotelor deregulate conține (sub formă atomizată) extract apos din *Boletus sp.*, *Pleurotus eryngii*, *Armillaria mellea* și *Tuber melanosporum*. Aceste ciuperci sunt în raport de 30:7:2:1, la care se adaugă în 7% maltodextrină, ca excipient farmaceutic.

Formula atomizată din ciuperci sălbatice comestibile are următoarele efecte asupra/la nivelul microbiotei colonului uman: adjuvant în disfuncții ale microbiotei colonului cauzate de patologii cardiovasculare și boli nutriționale (diabet), corectare a metabolismului microbial prin echilibrarea amprentei microbiene a microbiotei, stimulare a multiplicării tulpinilor favorabile din colonul uman.

Ciupercile comestibile din flora spontană reprezintă o sursă naturală de compuși bioactivi (acizi fenolici, în principal) și acționează pentru menținerea echilibrului microbial din colonul uman. Prezența unei microbiote favorabile, stabile reprezintă o garanție a unei stări de sănătate corespunzătoare, rezultând o reechilibrare a funcțiilor fiziologice normale. Formula propusă este un produs funcțional și reprezintă o modalitate lipsită de toxicitate și efecte secundare negative, în scopul multiplicării tulpinilor favorabile din genul *Lactobacillus* și *Bifidobacterium*. Caracteristicile metabolice pe care le determină demonstrează că prezența unor compuși bioactivi (compuși fenolici) determină o legătură directă a profilului fermentativ de la nivelul colonului cu numărul tulpinilor favorabile. Acest supliment alimentar furnizează un substrat natural care stimulează procesele fermentative și reducerea acțiunii microbiotei patogene. Reechilibrarea microbiotei previne efectele flatulenței prin reducerea sintezei unor compuși ce determină senzația de balonare.



Reactor USAMVB

Prof. Univ. dr. Sorin Mihai Cimpeanu

Conf. Emanuel Varmanu

Extractul atomizat a fost realizat conform următoarelor etape:

1. Ciupercile (*Boletus sp.*, *Pleurotus eryngii*, *Armillaria mellea* și *Tuber melanosporum*) se recoltează, se sortează, se spală și se usucă în current de aer până la greutate uscată. Apoi se dozează amestecul de ciuperci în raport de 30:7:2:1 și se mărunțesc.
2. Se amestecă cu enzimă de extracție (Viscozyme L, Novozyme, Danemarca) în proporție de 3 mL/kg și se supun procesului de extracție în turboextractor (concepție și producător Hypericum Impex SRL) timp de 3 ore, la 40°C.
3. Extractul 1 se obține prin presarea amestecului cu o presă cu tambur.
4. Resturile de ciupercă se introduc într-un infuzor cu abur la 120°C, iar Extractul 2 se obține identic ca Extractul 1.
5. Se amestecă mecanic Extractul 1 și 2 și soluția se decantează.
6. Decantatul se filtrează prin filtre mecanice cu porozitate mare (fabricate din tablă de inox austenitic cu diametrul între 0,5 și 1 mm) și sunt folosite pentru filtrarea soluției care urmează a se introduce în atomizor.
7. Lichidul rezultat se amestecă mecanic cu 70 g de maltodextrină (indice de dextroză 17%) până la omogenizare totală.
8. Amestecul rezultat se atomizează (Spray-Dry, Niro, Danemarca) și se colectează pulberea rezultată.
9. Cu o mașină de dozare capsule se realizează (se umplu) capsule enterosolubile (gastrorezistente), cu o greutate medie de 240 mg/capsulă.

Formula produsul propus prezintă o activitate inventivă nouă, atât prin compoziția sa, cât și prin modul de acțiune la nivelul colonului uman. Astfel, invenția propusă prin această cerere de brevet îndeplinește condițiile esențiale de brevetabilitate, în mod cumulativ: invenția să fie nouă, să implice o activitate inventivă și să aibă aplicabilitate industrială. Procedul de obținere al formulei de supliment nutritiv, ca obiect al invenției brevetabile, implică o derulare logică prin materia primă indigenă, lipsa toxicității, parametrii și mijloacele tehnice utilizate. Astfel, un specialist cu competențe corespunzătoare în domeniu nu are cum să ajungă la această formulă inovativă și nu are cum să reproducă efectele. Formula de produs propusă are un efect și un element, cel puțin, tehnic nou, esențial în momentul în care se administrează.



Reactor USAMVB,
Pr. 10/15/2017, Ing. Mihai Cimpeanu

Conf. Emanuel Vamanu

umane) care este specific persoanelor sau grupurilor de persoane care îl vor utiliza. Utilizarea strictă a cunoștințelor din stadiul tehnicii nu elimină posibilitatea de a reproduce efectul *in vitro/in vivo*, tehnologia necesară demonstrării efectului biologic fiind un unicat în România.

Evaluarea valorii biologice a formulei de produs funcțional s-a realizat printr-o serie de teste farmacologice *in vitro* (realizate la o concentrație standard de 1 mg/mL):

- Produsul funcțional atomizat destinat microbiotei umane manifestă o activitate antioxidantă totală de peste 90% și o putere de reducere de 0.27;
- Produsul funcțional atomizat destinat microbiotei umane are un conținut total de compuși fenolici de 7.8 μg/mL echivalent acid galic.

Pentru demonstrarea efectelor biologice asupra microbiotei umane s-au realizat o serie de teste *in vitro*, într-un sistem de simulare unicameral (Brevet 127801/2016), Faza 2. În aceste teste biologice *in vitro* s-a utilizat microbiotă obținută de la voluntari maturi, care suferă de disfuncții nutriționale (Experiment 1) și boli cardiovasculare (Experiment 2). Probele au fost obținute în urma prelevării de fecale, steril. Microbiota a fost reconstituită în apă peptonată, după 7 zile. Produsul (capsule gastrorezistente) a fost administrat după această perioadă, conform protocolului detaliat în brevetul 127801/2016.

Experiment 1:

Administrarea capsulelor a determinat o variație semnificativă a numărului de microorganisme nefavorabile, în primul segment tulpinile favorabile au scăzut cu maxim 1 UFC/mL. Odată cu trecerea în segmentul transversal și în colonul descendent, valoarea microorganismelor a variat din ce în ce mai puțin, cu maxim 0.5 UFC/mL. S-au determinat valori ridicate de amoniu și valori scăzute de lactat. Nivelul maxim de amoniu a fost identificat în colonul descendent, aproximativ 200 mg/L.

Numărul de microorganisme favorabile a fost mai redus, sub 7 UFC/mL în primul segment și s-a menținut constant în segmentul descendent. Amprenta tulpinilor nefavorabile nu a prezentat



Reactor USAMVB,
Prof. univ. Sorin Mihai Cimpeanu

Conf. Emanuel Yamani

schimbări semnificative (sub 0.5 UFC/mL). Cu toate acestea, activitatea metabolică a fost una mult mai intensă, comparativ cu aceeași microbiotă netratată.

Este de așteptat ca administrarea la acest grup țintă să determine balonare, flatulență, cu toate că raportul dintre tulpinile favorabile și cele nefavorabile a fost unul îmbunătățit. Administrarea ajută la fermentarea superioară a nutrienților și eliberarea unor componente biologice utile pentru stabilizarea amprente microbiotei distorsionate.

Experiment 2:

Administrarea capsulelor a determinat un efect pozitiv, prin creșterea cu peste 1 UFC/mL a numărului de tulpini favorabile. În schimb, creșterea a fost una graduală, cu un maxim înregistrat în ultimul segment. Scăderea pH în primul segment a fost una accelerată, fiind prezentă și o cantitate semnificativă de lactat. Amoniul a fost identificat în cantitate redusă, sub 50 mg/L. Amprenta microbiană a fost una mult îmbunătățită, fiind un produs util în corectarea disfuncțiilor microbiotei bolnavilor cardiovasculari. În această situație șansele de a dezvolta efecte secundare sunt nule, neexistând tendința acumulării de produși metabolici care să aibă o influență negativă.

Bibliografie

1. G. Hetland, D.M. Eide, J.M. Tangen, M.H. Haugen, M.R. Mirlashari, J.E. Paulsen, The *Agaricus blazei*-Based Mushroom Extract, Andosan™, Protects against Intestinal Tumorigenesis in the A/J Min/+ Mouse, PLoS One. 2016; 11(12): e0167754.
2. M.L. Heiman, D.P. Stull, J.W. Peno, Composition and use of a formulation to increase the ratio of gastrointestinal microbiota in phylum bacteroidetes to microbiota of firmuctes phylum, brevet US20140294997 A1.
3. S.G. Colceru-Mihul, S. Niță, A.E. Grigore, A. Vamanu, A. Andrieș, F. Rădulescu, D. Rughinis, C. Bazdoacă, E. Vamanu, R. Iuksel, Produs fitoterapeutic pentru reducerea afecțiunilor asociate proceselor de îmbătrânire și procedeu de obținere a acestuia, brevet 128193/2014.
4. Ș. Manea, V. Tamaș, I.G. Crețu, Compoziție fitoterapeutică pentru reechilibrării funcțiilor hepato-biliare, brevet 122802/2010.



Reactor USAMVB,
Prof. univ. dr. Sorin Mihai Cimpeanu

Conf. Emanuel Vamanu

Revendicare

Compoziție funcțională bazată pe extract atomizat, destinată echilibrării amprentei microbiotei bolnavilor cardiovasculari și a celor ce suferă de disfuncții nutriționale, caracterizată printr-o compoziție variată, de amestec de ciuperci din genul *Boletus sp.*, *Pleurotus eryngii*, *Armillaria mellea* și *Tuber melanosporum*, în raport de 30:7:2:1 și la care se adaugă în 7% maltodextrină, ca excipient farmaceutic.



Reactor USAMVB,
Prof. univ. dr. Sorin Mihai Cimpeanu

Conf. Emanuel Vamanu