



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 00636**

(22) Data de depozit: **12/09/2017**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/09/2022** BOPI nr. **9/2022**

(41) Data publicării cererii:
29/03/2019 BOPI nr. **3/2019**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE
CHIMICO-FARMACEUTICĂ - ICCF
BUCUREȘTI, CALEA VITAN NR.112,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **BUBUEANU ELENA CORINA,
STR.CETATEA DE BALTĂ NR.11-39, BL.31,
SC.C, ET.2, AP.50, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **POPA GABRIELA, STR.TEIUL DOAMNEI
NR.7, BL.31, SC.A, ET.2, AP.18, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CORNEA CĂLINA PETRUȚA,
STR.SERG.MUȘAT CONSTANTIN NR.1,
BL.16, SC.2, AP.25, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **ZAGREAN VALENTIN ALEXANDRU,
ȘOS.PANDURI NR.60, BL.A, SC.2, AP.67,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MUNTEANU LAURENȚIU,
STR.SACHELARIE NR.8A, SAT ZĂVOI,
ȘTEFĂNEȘTI, AG, RO;**
• **GRIGORE ALICE ELENA, BD.UVERTURII
NR.43, BL.1, AP.131, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PIRVU LUCIA CAMELIA, STR. BACIA
NR. 11A, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **IUKSEL RASIT, BD.DINICU GOLESCU
NR.37, BL.4, SC.B, AP.40, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PANTELI IRINA MINERVA,
STR.SPĂATARUL NICOLAE MILESCU
NR.46-48, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 2014/0356393 A1

(54) **COMPOZIȚII TERAPEUTICE NATURALE OBȚINUTE DIN
MACROMICETE ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTORA**



RO 133128 B1

1 Inventția se referă la compoziții terapeutice naturale obținute din macromicete, cu
acțiune antiinflamatoare, hipoglicemiantă și hipolipemiantă cu utilizare în industria farmace-
3 utică, de uz uman, cu administrare orală și procedee de obținere ale acestora realizate prin
extracția principiilor active, în două etape succesive, din speciile de ciuperci (macromicete)
5 *Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus* și *Laetiporus sulphureus*.

Este cunoscut faptul că în compoziția chimică a ciupercilor sunt cuprinși compuși
7 bioactivi care le conferă abilitatea de a exercita efecte benefice pentru organismele umane,
prin proprietăți antitumorale, imunomodulatoare, hipocolesterolemice, antibacteriale, anti-
9 virale, antidiabetice, antiinflamatorii (**Valverde și colab., 2015; Wasser, 2014**).

Este cunoscut că specia *Agaricus campestris* (fam. *Agaricaceae*) conține proteine
11 (Mendoza C.G. și colab., 1979) și aminoacizi - în special ergotioneina (**Woldegiorgis A.Z.
și colab., 2014**), polizaharide (Mendoza C.G. și colab., 1979), microelemente (Falandysz
13 J., 2008), polifenoli printre care acid galic, acid *p*-hidroxibenzoic și miricetin (Woldegiorgis
A.Z. și colab., 2014).

Este cunoscut potențialul antioxidant (Woldegiorgis A.Z. și colab., 2014),
15 hipoglicemiant (A. M. Gray and P. R. Flatt, 1998; Dilani D. De Silva și colab., 2012),
antimicrobian (Subrata Giri și colab., 2012) al speciei *Agaricus campestris*.

Este cunoscut că specia *Pleurotus ostreatus* (fam. *Pleurotaceae*) conține polizaharide
19 (glucan, proteoglican, polizaharid POPw, polizaharid POP, heteropolizaharide - PSPO-1a și
PSPO-14) (Subrata Giri și colab., 2012), proteine, aminoacizii: acid aspartic, treonina, serina,
21 acidul glutamic, prolina, glicina, alanina, cisteina, valina, metionina, izoleucina, leucina,
tirozina, fenilalanina, histidina, lizina și arginina (Yitzhak Hadar, And Ephraim 1986), acizi
23 grași (acid palmitic, acid stearic, acid oleic, acid linoleic) (Karine Pedneault și colab., 2007),
compuși polifenolici (acid *p*-cumaric, acid ferulic, acid galic, acid gentisic, acid *p*-hidroxi-
25 benzoic, acid homogentisic, miricetin și acid protocatehic) (I. Palacios și colab., 2011),
vitamine (α -tocoferol, β -caroten, vitamina C) (T. Jayakumar și colab., 2011).

Este cunoscut că specia *Pleurotus ostreatus* are proprietăți antioxidante determinate
27 pe diferite modele experimentale *in vivo* și *in vitro* pentru polizaharidele PSPO-1a și PSPO-
29 4a (Fengguo Xia și colab., 2011) și pentru compuși polifenolici (Patricia A. Fontes Vieira și
colab., 2013; Shu-Yao Tsai și colab., 2009), imunomodulatoare/antitumorale prin compoziția
31 în polizaharide, hipocolesterolemice și hipotriglicemice (Inga Schneider și colab., 2011)
și antiinflamatoare (Qi Yang și colab., 2012).

Este cunoscut că specia *Laetiporus sulphureus* (fam. *Polyporaceae*) conține proteine
33 (lectine) (Hexiang Wanga și colab., 1998), acizi grași polinesaturați (α -, γ - și δ -tocoferoli),
35 acizii organici (acidul oxalic și citric) (Petrovic J și colab., 2014), compuși volatili (Sylvie
Rapiora și colab., 2000), polizaharide (laminaran și fucomanogalactan) (Olennikov DN și
37 colab., 2011), poliene (acid laetiporic - pigment oranj principal) (Roland W.S. Werbera și
colab., 2004; Paolo Davoli, Adele Mucci și colab., 2005), enzime (Jae-Won Lee și colab.,
39 2009), compuși fenolici (quercetin, kaempferol, (+)-catcchin, acizii *p*-cumaric, galic, cafeic,
și clorogenic) (Olennikov DN și colab., 2011).

Este cunoscut că specia *Laetiporus sulphureus* are proprietăți antioxidante atribuite
41 conținutului său în polizaharide și compuși polifenolici (Aziz Turkoglu și colab., 2007;
43 Olennikov DN și colab., 2011; Seong-Eun Kim, și colab., 2012; Klaus A. și colab., 2013;
Petrovic J. și colab., 2014), antitumorale datorate prezentei lanostenelor, (grup de
45 triterpenoide tetraciclice derivate din lanosterol) cât și exopolizaharidelor (Rios J.L., și colab.,
2012; Leon F., și colab., 2008; Ming Yeou Lung, și colab., 2011), antimicrobiene (Rabin
47 Gyawali, Salam A. 2014).

RO 133128 B1

Brevetul **WO 2001027305 (A1)** - 2001-04-19, descrie o nouă și distinctă tulpină de ciuperci (*Basidiomycete*) și un proces de creștere în cultura submersă, specific o tulpină nouă de specie din genul *Pleurotus* cu concentrații superioare un compuși biologic activi, cu exemplificare în compuși cu proprietăți de scădere a colesterolului, ca lectine, proteine, aminoacizi esențiali, vitamine și polizaharide.

Cererea de brevet **RO 129336 (A2)** 2011-08-10, face referire la produse bioprotective din ciuperci și procedee pentru obținerea acestora, din genul *Pleurotus* cu utilizare ca suplimente funcționale și/sau energizate, care au o acțiune antitumorală. antiinflamatoare, anti-colesterolemică, antireumatismală și energizantă.

Brevetul **UA 83530 (C2)** 2008-07-25 descrie o metodă de producere a unui complex proteine - polizaharide obținut prin extracție din ciuperca *Pleurotus ostreatus* cu acțiune hipolipemiantă.

Brevetul **US 6759049 (B2)** 2004-07-06 se încadrează în domeniul farmaceutic și dietetic, făcând referire la o compoziție farmaceutică și/sau dietetic bazată pe ciuperci, caracterizată prin faptul că conține una sau mai multe specii de ciuperci comestibile (selectate dintre speciile *Armillaria mellea*, *Agaricus bisporus*, *Boletus edulis*, *Cordyceps sinensis*, *Coriolus versicolor*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceus*, *Hypsizygus marmoreus*, *Auricularia auricula-Judae*, *Phellinus linteus*, *Pleurotus ostreatus*, *Grifola frondosa*, *Agaricus campestris*, *Lentinus edodes*, *Tremella fuciformis* și *Volvariella volvacea*) și chitosan, cu proprietăți terapeutice.

Brevetul **US 20140356393 (A1)** 2014-04-12, descrie o compoziție pentru tratamentul și prevenția hiperlipidemiei, care conține extract apos de *Laetiporus sulphureus* ca ingredient activ și la un medicament sau supliment alimentar care conține extracte.

Brevetul **CN 103961379 (A)** 2014-08-06 face referire la un extract obținut din *Laetiporus sulphureus* și la compusul acid B trametenloic cu activitate antiinflamatoare, ce poate fi utilizat în artrita reumatoidă cronică și acută, hepatita cronică și acută, mastita sau alte afecțiuni inflamatorii.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unor compoziții naturale obținute din macromicete și un procedeu de obținere a acestor compoziții terapeutice.

Compozițiile terapeutice naturale conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că sunt obținute din macromicete, de uz oral, uman, cu acțiune antiinflamatoare, hipoglicemiantă, hipolipemiantă, fără reacții adverse sau efecte secundare, cu utilizare ca adjuvant în terapia diabetului și în terapiile hipolipemiante care se prezintă sub forma unor soluții, de culoare brună, cu gust amar și miros aromat, cu conținut de 2,93...3,92 g/100 g polifenoli totali exprimați în acid galic.

Procedeul de obținere a compozițiilor terapeutice conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că se realizează prin extracția materiei prime constituite din corpuri de fructificație ai ciupercilor *Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus*, *Laetiporus sulphureus*, în raport de 2:1:1 m/m/m cu acetat de etil (raport materie primă/solvent 1/10 m/v, se încălzește la temperatura de fierbere a solventului și se refluxează timp de 1 h, se răcește, se filtrează, se concentrează soluția extractivă la 60°C și presiune de 72-75 mmHg și se reia în alcool etilic 50%v/v, urmată de uscarea rezidului de materie primă și extracția cu alcool etilic/apă în raport de 1:1 v/v, la temperatura de fierbere a solventului și se refluxează timp de 1 h, se filtrează, se concentrează soluția extractivă la temperatura de 60°C și presiune de 72-75 mmHg și se reia în alcool etilic 50%v/v și se concentrează.

Produsele naturale conform invenției sunt obținute fie prin extracția, în două etape succesive, a principiilor active din amestec de materie primă (macromicete *Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus*, *Laetiporus sulphureus* în raport de 2/1/1m/m/m, respectiv

RO 133128 B1

1 1/2/1m/m/m, fie prin asocierea a 3 extracte, individuale, selective (în raport de 2/1/1 v/v/v;
1/2/1 v/v/v), obținute prin două extracții succesive din materiile prime individuale. Pentru
3 ambele variante prima extracție se efectuează cu acetat de etil raport materie prima/solvent
1/10 m/v și a doua extracție cu alcool etilic 50% v/v, raport materie primă/solvent 1/10 m/v.

5 Invenția prezintă următoarele avantaje:

7 - se diversifică gama de compoziții terapeutice naturale cu acțiune complexă
(antiinflamatoare, hipolipemiante și hipoglicemiante), obținute din ciuperci (macromicete),
care pot fi utilizate ca adjuvant în terapia diabetului și în terapiile hipolipemiante;

9 - produsul este practic netoxic și nu are reacții adverse sau efecte secundare;

11 - se utilizează o materie primă naturală accesibilă, de proveniență autohtonă,
regenerabilă;

13 - tehnologia poate fi realizată pe o instalație industrială de prelucrare a plantelor fără
a necesita o investiție deosebită;

15 - solvenții organici se recuperează și nu rezultă deșeuri toxice.

În continuare se prezintă un exemplu de realizare a invenției.

Exemplu

17 Materia primă constă în corpii de fructificație ai speciilor *Agaricus campestris*,
Pleurotus ostreatus și *Laetiporus sulphureus*, uscați și măcinați, sita III.

19 Fazele tehnologice pentru obținerea compozițiilor terapeutice naturale sunt
următoarele: Obținerea produselor naturale prin extracția principiilor active din amestec de
21 materie primă: Într-un vas de inox cu capacitate de 250 L, prevăzut cu gura de alimentare,
ștuț de evacuare, manta de încălzire, refrigerent de sticlă și sistem de agitare, se introduc
23 10 kg amestec de materie primă care constă în corpii de fructificație ai speciilor de ciuperci
Agaricus campestris, *Pleurotus ostreatus* și *Laetiporus sulphureus* în raport de a) 2/1/1
25 m/m/m, respectiv b) 1/2/1 m/m/m și 100 L acetat de etil, se încălzește amestecul la tempe-
ratura de fierbere și se agită continuu timp de 1 h cu refluxarea solventului. După terminarea
27 extracției I, se întrerupe încălzirea, iar după răcire soluția extractivă I, se filtrează. Soluția
extractivă I se concentrează la temperatura de 60°C și presiunea de 72-75 mm Hg pentru
29 eliminarea solventului și se reia în 10 L alcool etilic 50% v/v. Materia primă se scoate din vas
și se usucă. Materia primă uscată se reintroduce în vasul de extracție unde se introduc
31 pentru a doua extracție 100 L solvent alcool etilic/apă în raport de 1/1 v/v și se efectuează
extracția principiilor active în aceleași condiții, obținându-se soluția extractivă II, după
33 îndepărtarea deșeurilor de ciupercă. Soluția extractivă II se concentrează la temperatura de
60°C și presiunea de 72-75 mm Hg pentru eliminarea solventului și se reia în 10 L alcool
35 etilic 50% v/v. Soluțiile extractive I și II se reunesc și se concentrează până la un volum de
10 L. Se obțin câte 10 L compoziții terapeutice naturale obținute din ciuperci sub formă de
37 soluții de culoare brună cu gust amar și miros aromat, conținând a) 2,93...3,87% polifenoli
totali exprimați în acid galic, respectiv, b) 2,96...3,92% polifenoli totali exprimați în acid galic.

39 Obținerea produselor naturale prin extracția principiilor active din materii prime
individuale:

41 Într-un vas de inox cu capacitate de 250 L, prevăzut cu gura de alimentare, ștuț de
evacuare, manta de încălzire, refrigerent de sticlă și sistem de agitare, se introduc 10 kg
43 corpii de fructificație ai speciei de ciuperci *Agaricus campestris* sau *Pleurotus ostreatus* sau
Laetiporus sulphureus, 100 L acetat de etil, se încălzește amestecul la temperatura de fier-
45 bere și se agită continuu timp de 1 h cu refluxarea solventului. După terminarea extracției I,
se întrerupe încălzirea, iar după răcire soluția extractivă I, se filtrează. Soluția extractivă I se
47 concentrează la temperatura de 60°C și presiunea de 72-75 mm Hg pentru eliminarea
solventului și se reia în 10 L alcool etilic 50% v/v. Materia primă se scoate din vas și se

RO 133128 B1

usucă. Materia primă uscată se reintroduce în vasul de extracție unde se introduc pentru a 1
doua extracție 100 L solvent alcool etilic/apă în raport de 1/1 v/v și se efectuează extracția 3
principiilor active în aceleași condiții, obținându-se soluția extractivă II, după îndepărtarea 3
deșeurilor de ciupercă. Soluția extractivă II se concentrează la temperatura de 60°C și 5
presiunea de 72-75 mm Hg, pentru eliminarea solventului și se reia în 10 L alcool etilic 50% 5
v/v. Soluțiile extractive I și II se reunesc și se concentrează până la un volum de 10 L. Se 7
obțin câte 10 L extract sub formă de soluție de culoare brună cu gust amar și miros aromat, 7
conținând 1,57% polifenoli totali exprimați în acid galic pentru *Agaricus campestris*, 1,62% 9
polifenoli totali exprimați în acid galic pentru *Pleurotus ostreatus* și 3,28% polifenoli totali 9
exprimați în acid galic pentru *Laetiporus sulphureus*.

Compozițiile terapeutice naturale constau în asocierea celor trei extracte - *Agaricus 11*
campestris, *Pleurotus ostreatus*, *Laetiporus sulphureus* în proporție de a) 2/1/1 v/v/v și b) 11
1/2/1 v/v/v, urmată de concentrarea soluției la temperatura de 60°C și presiunea de 72-75 mm 13
Hg până la 10 L. Se obțin câte 10 L compoziții terapeutice naturale obținute din ciuperci sub 13
formă de soluții de culoare brună cu gust amar și miros aromat, conținând a) 2,93...3,87% 15
polifenoli totali exprimați în acid galic, respectiv, b) 2,96...3,92% polifenoli totali exprimați în 15
acid galic. 17

Testări farmacotoxicologice

Compozițiile terapeutice naturale obținute din ciuperci, testate sub aspectul toxicității 19
după doza unică, administrate, ca atare, per os (prin gavaj intragastric) la șobolani Wistar, 19
în volumul maxim administrabil pe cale orală de 40 ml/kgc nu au indus letalitate sau 21
fenomene toxice, în perioada de observație de 14 zile.

Pentru compoziția terapeutică naturală obținută din speciile de ciuperci *Agaricus 23*
campestris, *Pleurotus ostreatus* și *Laetiporus sulphureus* fie prin extracție din amestec de 23
materie primă în raport de 2/1/1 m/m/m, fie prin asocierea extractelor individuale în raport de 25
2/1/1 v/v/v efectul antiinflamator a fost evidențiat pe modelul edemului acut alabei de 25
șobolan indus cu caolin. Administrarea a fost realizată, ca atare, pe cale orală, în volum de 27
5 ml/kgc/zi timp de 15 zile consecutive, în ultima zi injectându-se substanța cu efect flogistic 27
după o oră de la ultima doză. Pentru proba testată s-a determinat la 3 h un efect procentual 29
antiinflamator de 90,67% comparativ cu lotul martor și o diminuare la 5 h (57,08%).

Efectul hipolipemiant a fost evidențiat prin metoda activității hipolipemiante la 31
șobolani. La administrarea orală a probei, ca atare, în volum de 5 ml/kgc, pe o durată de 15 31
zile la șobolani cu dieta hiperlipidică asociată, din rezultatele determinărilor se constată valori 33
constant mai scăzute ale colesterolului sanguin la 8 zile - 167 mg/dl și la 15 zile - 164 mg/dl) 33
față de lotul martor cu dieta hiperlipidică la 8 zile - 172 mg/dl și la 15 zile - 170mg/dl) și valori 35
mai scăzute ale nivelului trigliceridelor la 8 zile - 100 mg/dl și la 15 zile - 119 mg/dl, compara- 35
tiv cu lotul martor cu dieta hiperlipidică asociată la 8 zile - 114 mg/dl și la 15 zile - 147 mg/dl. 37

Pentru compoziția terapeutică naturală obținută din speciile de ciuperci *Agaricus 39*
campestris, *Pleurotus ostreatus* și *Laetiporus sulphureus* fie prin extracție din amestec de 39
materie primă în raport de 1/2/1 m/m/m, fie prin asocierea extractelor individuale în raport de 41
1/2/1 v/v/v, efectul hipoglicemiant a fost evidențiat prin testul activității hipoglicemiante la 41
șobolani nediabetici - testarea toleranței orale la glucoză. Administrarea s-a realizat ca atare 43
pe cale orală (gavaj intragastric) în volum de 5 ml/kgc/zi pe o perioadă de 15 zile, comparativ 43
cu lotul martor. Valorile medii ale glicemiei (mg/dl) la momentul 0 și la 1, 2, 4 h după 45
administrarea de glucoză 1 g/kgc pentru compoziția terapeutică naturală au fost menținute 45
la valori < 120 mg/dl astfel la momentul 0-116 mg/dl pentru compoziție terapeutică naturală,

RO 133128 B1

- 1 116 mg/dl pentru lot martor, la 1 h - 117 mg/dl pentru compoziție terapeutică naturală și
139 mg/dl pentru lot martor, la 2 h - 107 mg/dl pentru compoziție terapeutică naturală și
- 3 146 mg/dl pentru lot martor, la 4 h - 96 mg/dl pentru compoziție terapeutică naturală și
129 mg/dl pentru lotul martor.
- 5 *Aplicabilitate industrială*
Invenția poate fi aplicată atât în industria suplimentelor alimentare de uz uman, pentru
- 7 producția de produse naturale, cu administrarea orală, eficiente în prevenirea și terapia
diabetului și a hiperlipidemiilor.

RO 133128 B1

Revendicări

1. Compoziție terapeutică naturală de uz uman, sub formă de soluție de culoare brună, cu gust amar și miros aromat, cu administrare orală, realizată integral din specii de ciuperci, **caracterizate prin aceea că**, conține principii active din speciile *Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus* și *Laetiporus sulphureus* având 2,93...3,87% g/100 g polifenoli totali exprimați în acid galic. 3 5 7
2. Procedeu de obținere a compoziției terapeutice definite în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, se realizează prin extracția materiei prime constituite din corpii de fructificație ai ciupercilor *Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus*, *Laetiporus sulphureus*, în raport de 2:1:1 m/m/m cu acetat de etil (raport materie primă/solvent 1/10 m/v, se încălzește la temperatura de fierbere a solventului și se refluxează timp de 1 h, se răcește, se filtrează, se concentrează soluția extractivă la 60°C și presiune de 72-75 mmHg și se reia în alcool etilic 50%v/v, urmată de uscarea rezidului de materie primă și extracția cu alcool etilic/apă în raport de 1:1 v/v, la temperatura de fierbere a solventului și se refluxează timp de 1 h, se filtrează, se concentrează soluția extractivă la temperatura de 60°C și presiune de 72-75 mmHg și se reia în alcool etilic 50%v/v și se concentrează. 9 11 13 15 17
3. Procedeu de obținere a compoziției terapeutice definite în revendicarea 1, conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că**, se extrag separat corpii de fructificație ai speciilor *Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus*, *Laetiporus sulphureus*, prima extracție se realizează cu acetat de etil, raport materie primă/solvent 1/10 m/v, timp de 1 h, la temperatura de fierbere a solventului, se răcește, se filtrează, se concentrează soluția extractivă la 60°C și presiune de 72-75 mmHg, se reia în alcool etilic 50% v/v și se extrage a doua oară rezidul de materie primă uscată, cu alcool etilic 50% v/v, la un raport materie primă/solvent 1/10 m/v, timp de 1 h, la temperatura de fierbere a solventului, cu agitare continuă și se refluxează, se filtrează, se concentrează soluțiile pentru eliminarea solventului, acestea se reiau în alcool etilic 50% v/v urmată de combinarea celor trei extracte individuale în proporție de 2/1/1 v/v/v. 19 21 23 25 27



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 426/2022