



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00178

(22) Data de depozit: 01/04/2020

(41) Data publicării cererii:
26/02/2021 BOPI nr. 2/2021

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "CAROL DAVILA"
BUCUREȘTI, STR. DIONISIE LUPU, NR.37,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• DINU MIHAELA, STR. ȘOIMĂREȘTILOR
NR. 19, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• ANUCEANU ROBERT, STR. MOȚOC
NR. 2, BL. P3, SC.3, AP. 72, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• NEGREȘ SIMONA, ȘOS. GIURGIULUI
NR.121, BL.5, SC.2, AP.44, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;

• OLARU OCTAVIAN TUDOREL,
STR. MAȘINA DE PÂINE, NR.37, BL.2,
SC.1, ET.1, AP.5, SECTOR 2, BUCUREȘTI,
B, RO;
• ȘEREMET OANA, CALEA GIULEȘTI,
NR.43, BL.14A, SC.1, ET.6, AP.23,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• ANGHEL ADRIANA IULIANA,
STR. SOLD. N. SEBE NR. 5, BL. S24,
AP. 36, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• HOVANEȚ MARILENA VIORICA,
STR. CĂLINULUI NR. 13, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• DINU-PIRVU CRISTINA ELENA,
STR.GHEORGHE LAZĂR NR.10, ET.1,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **EXTRACT DE ORIGINE VEGETALĂ PENTRU TRATAMENTUL
DIABETULUI ZAHARAT DE TIP II ȘI METODĂ DE OBȚINERE
A ACESTUIA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui extract de origine vegetală pentru tratamentul diabetului de tip II. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de uscare și măcinare a frunzelor de ridiche (*Raphanus sativus L.*), extracție repetată de 3 ori, câte 30 min, cu un amestec de apă și etanol, în proporții cuprinse între 30:70 și 70:30 (v/v), în raport produs vegetal: solvent de 1:10, concentrare la temperatură și presiune scăzută și

liofilizare la temperaturi mai mici de -50°C, rezultând o pulbere higroscopică, amorfă, de culoare verde închis, având un conținut de polifenoli totali de minimum 35 mg/g echivalenți acid galic, cu efect hipoglicemiant.

Revendicări: 2
Figuri: 4

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 2020 00178 ...
Data depozit .01.04.2020....

Descrierea invenției

Titlul invenției:

Extract de origine vegetală pentru tratamentul diabetului zaharat de tip II și metodă de obținere a acestuia.

Domeniul tehnic la care se referă invenția:

Prezenta invenție se referă la un extract vegetal util în tratamentul diabetului zaharat de tip II și la metoda de obținere a acestuia.

Stadiul tehnicii:

Diabetul zaharat reprezintă un grup de afecțiuni care au în comun creșterea glicemiei peste nivelurile normale(1). În principal, diabetul este clasificat în 2 mari tipuri:

- a) diabetul de tip 1 (autoimun sau idiopatic) și
- b) diabetul de tip 2 (cauzat de rezistența la insulină, defecte ale secreției de insulină sau ambele) (1,2). La acestea se adaugă alte două grupuri, atipice:
 - a) alte forme de diabet, determinate de alte cauze (de ex. deficiențe genetice ale funcționării celulelor beta, deficiențe genetice în acțiunea insulinei, afecțiuni ale pancreasului exocrin, cum ar fi fibroza chistică, diabetul indus medicamentos ori chimic – de exemplu în urma tratamentului anti-HIV/SIDA sau post-transplant) și
 - b) diabetul zaharat gestațional (diabet diagnosticat în cursul sarcinii, care nu este în mod clar diabet) (2,3).

Diferența *biologică* între primele două tipuri, 1 și 2, constă în faptul că primul este consecința unui defect genetic inevitabil, care modifică metabolismul organismului, pe când al doilea este cauzat de un defect metabolic, provocat de mediu sau în mod inconștient, chiar de pacient, defect care declanșează un defect genetic latent. Diferența *psihologică* între cele două tipuri constă în faptul că la diabetul de tip 1, pacientul este conștient de timpuriu că are o boală gravă, în vreme ce în cazul celui de tip 2, pacientul conștientizează adesea gravitatea bolii abia cu ocazia primei crize (4). În cazul unora dintre pacienți, încadrarea într-unul din cele două tipuri, 1 sau 2, este dificilă și poate necesita perioade îndelungate de timp până la clarificarea adevăratului diagnostic (3).

În ultimele decenii s-a înregistrat o creștere aproape explozivă a cazurilor de diabet de tip 2. În numai câteva decenii, numărul cazurilor de diabet la nivel mondial a crescut de la 30 de milioane la 250 de milioane (cât erau încă estimate într-o carte publicată în anul 2008 (5)) și apoi la peste 400 de milioane (în prezent; interval de incertitudine 340-536 milioane). În cursul ultimilor 25 de ani, prevalența diabetului s-a dublat în Statele Unite și a crescut de 3-5 ori în unele țări asiatice (6).

S-a presupus că această creștere explozivă a prevalenței diabetului zaharat de tip 2 (DZ2) în ultimele decenii este legată de modificările din alimentație și activitatea fizică, însă un rol important le este recunoscut și influențelor ereditare, numeroase studii fiind efectuate în vederea identificării factorilor genetici care influențează susceptibilitatea organismului la diabet și obezitate (7). Studiile observaționale de tip cohortă au indicat că respectarea tiparelor alimentare „sănătoase“ tinde să se asocieze cu un risc mai redus al DZ2, în timp ce aderarea constantă la tipare alimentare „nesănătoase“ se asociază cu un risc crescut de DZ2 (8,9).

Cele mai importante riscuri asociate diabetului zaharat de tip II sunt riscul de deces prematur și riscul complicațiilor microvasculare și macrovasculare (10,11). Complicațiile micro- și macrovasculare ale DZ2 (printre care boala coronariană, boala cerebrovasculară, insuficiența cardiacă, boala vasculară periferică, boala renală cronică, retinopatia diabetică, neuropatia vegetativă cardiovasculară) au un impact masiv asupra calității vieții pacienților

respectivi, conducând la dizabilități și decese premature (11). Încă de la sfârșitul anilor 1970, studiul Framingham a indicat că riscul relativ de boală cardiovasculară pentru pacienții diabetici este dublu sau chiar mai mare în comparație cu pacienții fără diabet (12). Riscul de deces asociat diabetului, complicațiile acestuia, precum și evoluția progresivă a retinopatiei diabetice și deteriorarea acuității vizuale pot fi reduse prin controlul atent al tensiunii arteriale la pacienții cu DZ2 (13), de aceea societățile profesionale oferă ghiduri dedicate privind abordarea hipertensiunii la acest grup de pacienți (14,15).

Diabetul are un impact negativ considerabil asupra morbidității, mortalității și a cheltuielilor de sănătate într-o societate. Profilaxia, tratamentul și invaliditatea decurgând din riscurile asociate DZ2 conduc la o povară economică de dimensiuni considerabile la nivelul societății (10,16). Diabetul influențează capacitatea de muncă a pacienților afectați. S-a observat că rata de activitate în muncă scade rapid la pacienții cu diabet în comparație cu cei fără diabet, aceștia din urmă având o probabilitate semnificativ mai mare de dizabilitate, pensionare sau deces. În Franța s-a estimat că la pacienții cu vârste între 35 și 60 de ani, fiecare participant pierde în mediu 1,1 ani din forța de muncă în comparație cu un pacient fără diabet (17).

Estimările din țări occidentale (18–21) sau în curs de dezvoltare (22,23) dincolo de variațiile de la țară la țară și în metodologia de estimare a costurilor sau a aspectelor particulare analizate, converg în ideea că diabetul este o boală foarte costisitoare la nivel social.

Pentru abordarea terapeutică a hiperglicemiei din DZ2, trăsătura centrală a afecțiunii, care tradițional a făcut principalul obiect al intervențiilor terapeutice, Asociația Americană pentru Diabet (*American Diabetes Association*) și Asociația Europeană pentru Studiul Diabetului (*European Association for the Study of Diabetes*) au emis algoritmi de consens, exprimând o poziție comună transatlantică încă din anul 2006, actualizați de-a lungul timpului, cel mai recent în anii 2018 și 2019 (24,25). Prezentarea care urmează a tratamentului se bazează în principal pe acest document de consens, care se bazează pe literatura publicată anterior; unde este relevant, vom cita și alte articole științifice care au stat la baza recomandărilor din documentul de consens.

Principalele două ținte ale tratamentului pentru DZ2 constau în prevenirea sau întârzierea complicațiilor și menținerea calității vieții pacienților respectivi. Pentru aceasta documentul de consens recomandă controlul glicemiei și abordarea terapeutică a factorilor de risc cardiovascular, urmărirea regulată a pacienților și o abordare centrată pe pacient care să-l implice pe acesta în activitățile de autoîngrijire (25). Terapia antihiperglicemică în diabet are ca țintă obținerea unor valori ale HbA_{1c} considerate rezonabile (< 7,0% sau 53 mmol/mol) la majoritatea pacienților adulți cu o speranță de viață de peste 10 ani, pentru a se putea obține beneficii microvasculare, dar aceste ținte trebuie individualizate în funcție de particularitățile pacientului (preferințe și ținte ale acestuia, riscul de efecte adverse ale medicamentelor utilizate, fragilitatea pacientului, comorbidități) (25,26). Gestionarea stilului de viață, incluzând terapia nutrițională medicală, activitatea fizică, pierderea în greutate, consilierea pentru abandonarea fumatului și suportul psihologic sunt considerate aspecte de bază ale îngrijirii medicale în această afecțiune (25). Intervențiile privind stilul de viață sunt eficiente și sigure și, prin urmare, sunt recomandate ca o opțiune de primă linie de la momentul diagnosticului, precum și alături de tratamentul medicamentos la acei pacienți care necesită și medicație pentru reducerea glicemiei sau care necesită intervenții de chirurgie metabolică (25). Hiperglicemia pronunțată se asociază cu simptomele tipice ale DZ2 (urinare frecventă, sete, vedere încețoșată, fatigabilitate, infecții recidivante), iar ameliorarea acesteia nu doar reduce simptomele, dar diminuează și complicațiile pe termen lung ale bolii. Un bun control al glicemiei asigură reducerea substanțială și durabilă a complicațiilor microvasculare, cea mai mare reducere a riscului absolut provenind din îmbunătățirea glicemiei, iar o reducere

mai modestă din aducerea acesteia aproape de normal (25).

Există o varietate considerabilă de medicamente antidiabetice orale, dar **metformin** (din grupa biguanidelor), care reduce producția de glucoză la nivel hepatic și crește sensibilitatea la insulină (diminuează rezistența insulinică), rămâne încă tratamentul de primă linie (27), iar studii mai recente au sugerat că efectele benefice asupra mortalității și morbidității ar putea fi independente de efectul asupra glicemiei (28). Metformina nu are efecte adverse asupra greutății corporale și nici asupra sistemului cardiovascular, există o îndelungată experiență clinică (de exemplu, efectele cardiovasculare au fost investigate în 35 de studii clinice controlate, incluzând peste 7000 de pacienți) și nu induce hipoglicemie. Nu este însă lipsită de efecte adverse, inclusiv un risc ceva mai mare de hipoglicemie, și prezintă un număr considerabil de contraindicații (29–31).

Derivații de sulfonil uree (gliburid-glibenclamid, glipizid, gliclazid, glimepirid), sunt cele mai vechi medicamente care stimulează secreția de insulină, sunt eficiente, dar tind să crească greutatea corporală, prezintă risc de hipoglicemie, precum și o rată de insuficiență cardiacă mai mare decât a altor medicamente (25,32). Riscul de hipoglicemie pare să fie mai mic în cazul **metilglinidelor**, cunoscute și ca **glinide** (repaglinidă, nateglinidă), care sunt și ele secretagoge pentru insulină, dar ele necesită administrare mai frecventă. Și glinidele tind să crească greutatea corporală (25,33).

Tiazolidindionele (pioglitazona, rosiglitazona) activează factorul de transcriere cunoscut sub denumirea de receptorul γ activat de proliferatorul peroxizomilor (*peroxisome proliferator-activated receptor γ* , PPAR- γ) (34) și par să aibă efecte hipoglicemice mai durabile decât metformina și sulfonilureele (25). Rosiglitazona nu mai este disponibilă în prezent în UE, autorizația de punere pe piață fiind suspendată în anul 2010 ca urmare a suspiciunilor de creștere a riscurilor cardiovasculare (inclusiv infarct miocardic și insuficiență cardiacă congestivă) (35,36). Pioglitazona pare să nu prezinte risc de hipoglicemie, dar există îngrijorări privind potențiala creștere a riscului de cancer al vezicii urinare (25,37), precum și alte efecte tipice clasei (creștere în greutate, retenție de fluide, risc crescut de fracturi osoase) (25).

Agoniștii receptorului GLP-1 (exenatidă, liraglutidă, lixisenatidă) acționează similar GLP-1 din organism (stimulând secreția de insulină, suprimând secreția de glucagon și reducând apetitul), însă au un timp de înjumătățire mult mai mare decât peptida endogenă (care are o durată de existență foarte mică) (38). Principalul avantaj este că reduc greutatea corporală, modest la majoritatea pacienților, dar semnificativ la o parte dintre ei; în schimb, greața și voma, în special la începutul tratamentului, le limitează utilizarea, persistând încă și o îngrijorare referitoare la un posibil risc de pancreatită (25). Administrarea parenterală ridică probleme suplimentare, dar pacienții par să prefere agoniștii GLP-1 inhibitorilor orali de DPP4 (39–41).

Inhibitorii de dipeptidil-peptidază 4 (DPP-4) (sitagliptină, vildagliptină, saxagliptină, linagliptină, alogliptină) cresc indirect efectul GLP-1, dar au avantajul administrării pe cale orală. Riscul de hipoglicemie este redus (ca și la agoniștii GLP-1), dar eficacitatea este mai degrabă modestă și nu reduc greutatea corporală (dar nici nu o cresc) (25,42). Există astăzi dovezi de calitate ridicată care arată că cel puțin unii (dar nu toți) dintre inhibitorii DPP cresc riscul de spitalizare asociat insuficienței cardiace (43).

Inhibitorii transportorului sodiu-glucoză 2 (SGLT2) (empagliflozin, dapagliflozin, canagliflozin, sotagliflozin) cresc excreția urinară a glucozei, reducând astfel glicemia și îmbunătățind parametrii glicemici (44,45). Pe lângă beneficiile directe legate de controlul glicemiei, multiple studii clinice au demonstrat beneficii cardiovasculare și renale, precum și

alte efecte benefice, de exemplu în steatoza hepatică non-alcoolică (44,45).

Inhibitorii de α -glucozidază (acarboza, viglitol, vogliboză) și **sechestrantii acizilor biliari** (colesevelam) sunt puțin utilizați atât în Europa, cât și în SUA, iar agonistul amilinei, **pramlintidă**, este utilizat la pacienții tratați intens cu insulină, de regulă cu diabet zaharat de tip 1; în SUA bromocriptina este utilizată și ca agent antihyperglicemic, deși mecanismul de acțiune și beneficiile exacte ale acesteia sunt neclare (25).

Deoarece deficiențele funcționale ale celulelor beta pancreatice tind să se agraveze în timp, la mulți pacienți devine necesar tratamentul cu **insuline**. Chiar și în stadiile avansate ale bolii, majoritatea pacienților mențin însă o secreție reziduală de insulină, astfel încât nu sunt necesare scheme de tratament complexe ca la pacienții cu DZ1(25). Majoritatea pacienților pot fi tratați cu o insulină „bazală“, asigurând o concentrație relativ constantă a insulinei în cursul zilei și al nopții, care va inhiba formarea hepatică a glucozei între mese și în cursul somnului. Se pot utiliza insuline cu acțiune intermediară (NPH=neutral protamine Hagedorn) sau cu acțiune de lungă durată (insulină glargină, insulină detemir). Cele din urmă au un risc ceva mai redus de hipoglicemie nocturnă și de creștere în greutate, dar sunt mai scumpe. La unii pacienți, din cauza reducerii treptate, tot mai accentuate a secreției endogene de insulină, va fi necesară administrarea unei insuline de scurtă durată (analogi insulinici – insulină lispro, insulină aspart, insulină glulisină), imediat înainte de masă, pentru controlul mai bun al hyperglicemiei postprandiale (25).

Această scurtă trecere în revistă a tratamentului diabetului evidențiază marea varietate de antidiabetice disponibile în terapie, și în același timp limitele de eficacitate ale acestora, precum și efectele adverse care adesea le fac inacceptabile pe termen lung. Din acest motiv, identificarea de noi medicamente, cu un profil de siguranță mai bun și eficacitate cel puțin comparabilă celor actuale, rămâne o preocupare constantă a cercetărilor științifice. Multiple soluții terapeutice au fost propuse spre brevetare, atât bazate pe o varietate de substanțe chimice de sinteză, cât și extracte vegetale. Deoarece prezenta invenție se referă la un extract vegetal, în cele ce urmează ne vom referi la brevetele anterioare bazate pe extracte vegetale destinate tratamentului diabetului. O investigație computerizată EspaceNet cu cuvintele cheie „diabetes” și „extract” a returnat peste 100.000 de rezultate. O inventariere completă a acestora ar fi pur și simplu imposibilă. Menționăm că o mare diversitate de specii vegetale, din unități taxonomice foarte diferite au fost propuse anterior, de la diverse specii de ferigi (46,47), la gimnosperme (48), dicotiledonate (49,50) sau monocotiledonate (51,52).

Dintre brevetele anterioare direct relevante pentru prezenta invenție, le menționăm pe cele care se referă la compozițiile care conțin indol-3-carbinol, izolat prin extracție și fracționare din mai multe specii de crucifere sau de sinteză (53). Alt brevet descrie un extract bogat în sulforafen, obținut din semințele de *Raphanus sativus* și o compoziție pe baza acestuia, pentru tratamentul diabetului, ca și al obezității și steatozei hepatice (54). În sfârșit, un altul menționează un decoct obținut dintr-o serie lungă de specii vegetale (incluzând orez, ridichi, dudu, *Prunella*, *Coptis*, castane de apă, *Angelica*, *Rehmannia* și altele) (55). Dacă primul s-a limitat la indol-3-carbinol (53), un derivat natural care se găsește în speciile de crucifere, ultimele două se limitează la extracte din semințele speciei *Raphanus sativus* L.. Date din literatură mai menționează utilizarea rădăcinilor (56, 57) sau a germenilor (eng. *sprouts*) de *Raphanus sativus* L. pentru potențialul efect antidiabetic (58). Soluția pe care o propune prezenta invenție nu se limitează la indol-3-carbinol, care este numai unul dintre constituenții prezenți în speciile de Brassicaceae și nici la semințele sau rădăcinile speciei *Raphanus sativus* L., așa cum au făcut-o brevetele menționate mai sus. Ceea ce se propune în prezenta invenție este utilizarea unui extract obținut din frunzele speciei de *Raphanus sativus* L.

M

Expunerea invenției. Rezumat

Prezenta invenție se referă la un proces de preparare a unui extract vegetal din frunzele speciei *Raphanus sativus* L., util în tratamentul diabetului zaharat de tip 2. Obținerea extractului implică următoarele etape:

- a) Colectarea materialului vegetal;
- b) Uscarea materialului vegetal în condiții controlate de temperatură și umiditate;
- c) Pulverizarea materialului vegetal uscat și cernerea acestuia printr-o sită cu dimensiuni optime ale ochiurilor;
- d) Extracția repetată a materialului pulverizat cu un amestec etanol:apă în proporții variind între 30: 70 și 70:30 (de preferință 50% v/v), la o temperatură de cca. 50 °C-70°C (de preferință 70°C), timp de o jumătate de oră la fiecare etapă de extracție;
- e) Concentrarea soluțiilor extractive obținute la etapa d) la temperaturi mai mici de 70 °C prin metode cunoscute (de exemplu cu ajutorul unui evaporator rotativ);
- f) Liofilizarea soluției concentrate obținute la etapa e) la temperaturi mai mici de -50 °C.

Extractul obținut poate fi administrat sub formă de comprimate, capsule, pulberi, supozitoare sau într-o formă farmaceutică lichidă.

Extractul obținut este utilizat în tratamentul diabetului zaharat de tip 2.

Expunerea detaliată a invenției.

Descrierea detaliată a prezentei invenții și exemplele furnizate aici sunt ilustrative, deoarece variate modificări și ajustări sunt posibile, acestea fiind ușor evidente pentru o persoană de specialitate în domeniu. Modurile de realizare prezentate în continuare sunt ilustrative și nu limitează descrierea invenției așa cum va fi prezentată în continuare. Extractul conform invenției conține kaempferol, miricetol și acid clorogenic și are un conținut de polifenoli totali de cel puțin 35 mg/g echivalenți acid galic.

Obținerea extractului conform invenției presupune următoarele etape:

1. Materialul vegetal, reprezentat de frunzele speciei *Raphanus sativus* L., rămas ca deșeu în urma comercializării rădăcinilor tuberizate, este purificat de corpurile străine de planta producătoare și de impurități.
2. Materialul vegetal se usucă în condiții adecvate de temperatură și umiditate, de preferat la umbră (temperaturi mai mici de 35°, umiditate sub 65%).
3. Frunzele uscate sunt supuse pulverizării prin măcinare și cernute printr-o sită cu dimensiunea ochiurilor de 250 μm.
4. Materialul vegetal se umectează cu un amestec etanol:apă (în proporții variind între 30: 70 și 70:30, de preferință 50% v/v), utilizând un raport de 3:1 (v/m) între solventul utilizat la umectare și produsul vegetal pulverizat.
5. Materialului vegetal astfel umectat se extrage de trei ori cu un amestec etanol:apă în proporții variind între 30: 70 și 70:30 (de preferință 50% v/v), la o temperatură de cca. 50 °C-70°C (de preferință 70°C), în raport produs vegetal: solvent de 1:10 (m/v), timp de o jumătate de oră la fiecare etapă de extracție, agitând din când în când;
6. Soluțiile extractive se filtrează, se reunesc și se concentrează prin metode cunoscute la temperaturi mai mici sau egale cu 70 °C, de exemplu cu ajutorul unui evaporator rotativ.
7. Soluția concentrată se supune apoi liofilizării la temperaturi mai mici de (-)50 °C, când se obține un extract care se prezintă sub formă de pulbere higroscopică, amorfă, de culoare verde închis.

Extractul uscat astfel obținut poate fi procesat pentru obținerea de medicamente sau suplimente alimentare, utilizând excipienți adecvați. Exemple de excipienți adecvați sunt: lactoza, celuloza microcristalină și derivații de celuloză, maltodextrinele, talcul, siliciul coloidal, polietilen-glicolul și derivații acestuia.

Avantaje.

Invenția oferă o soluție pentru obținerea unui extract de origine vegetală dintr-un produs agricol secundar (frunzele de ridiche, *Raphanus sativus* L), util în tratamentul diabetului zaharat de tip 2. Specia este o plantă alimentară, utilizată (în Europa cel puțin, dar și în alte regiuni ale lumii) în principal pentru rădăcinile sale tuberizate și nu pentru frunze (57). De cele mai multe ori, frunzele sunt un produs secundar care se aruncă; prezenta invenție propune cel mai important avantaj al invenției, deoarece utilizând un produs secundar/deșeu, aplicarea ei este eficientă din punctul de vedere al costurilor. Procesul de obținere a extractului este simplu, durata de extracție nu este îndelungată, se utilizează un solvent larg utilizat în domeniu și relativ ieftin. În plus, este un extract obținut dintr-o plantă lipsită de toxicitate, având un profil de siguranță avantajos, confirmat de studiile non-clinice (v. *infra*).

În continuare se prezintă exemple de realizare a invenției:

Exemplu 1. Frunzele de *Raphanus sativus* L., rămase ca produs secundar de la pregătirea pentru comercializare a rădăcinilor tuberizate, se purifică de corpurile străine de planta producătoare și de impurități, apoi se usucă la temperaturi mai mici de 35° și umiditate sub 65%. Frunzele uscate se pulverizează prin măcinare, iar din pulberea obținută prin cernerea cu o sită cu dimensiunea ochiurilor de 250 μm se cântăresc 10 g. Această cantitate se umectează cu 30 ml etanol 50% (v/v), se lasă 5 minute în contact și apoi se adaugă încă 100 ml de solvent și se extrage de trei ori, timp de o jumătate de oră la fiecare etapă de extracție, la o temperatură de 70 °C, agitând din când în când. Soluțiile obținute se reunesc și se concentrează cu ajutorul unui evaporator rotativ la 70 °C, iar soluția apoasă concentrată rezultată se supune liofilizării la -53 °C. Se obțin 2,33 g de extract cu miros slab caracteristic, aspect de pulbere higroscopică, amorfă și culoare verde închis (randamentul de extracție 23,3%). Extractul conține kaempferol, miricetol și acid clorogenic și are un conținut de polifenoli totali (mg echivalenți acid galic/g extract) de 47,24 ± 0,8374 (media ± deviația standard).

Extractul astfel obținut nu a prezentat toxicitate asupra crustaceului *Artemia salina*, iar la testul pe *Daphnia magna* s-a observat o letalitate de 36% la concentrația de 1000 mg/L, ceea ce indică un nivel redus de toxicitate. De asemenea s-a evaluat toxicitatea pe șoareci de laborator, utilizând metoda „claselor de toxicitate acută” descrisă în ghidul OECD 423/1996 (59). Conform acestui ghid, extractul s-a încadrat în categoria 5 (DL₅₀ > 5000 mg/kg, p.o), în conformitate cu datele din Sistemul Global de Armonizare [*Global Harmonised System* (GHS) - ENV/JM/MONO(2001)6, 2001].

Evaluarea eficacității s-a realizat într-un experiment la șobolani albi, masculi, șușa Wistar, proveniți de la biobaza Universității de Medicină și Farmacie “Carol Davila” București. Temperatura și umiditatea în încăperea unde s-a efectuat cercetarea au fost de 21 - 24°C, respectiv 40 – 60%. Sursa de lumină a fost artificială, cu un ciclu de 12 h lumină și 12 h întuneric. Animalele au fost plasate în cuști de plexiglas cu acces la hrană și apă ad libitum.

Materiale

- Aloxan monohidrat (Sigma Aldrich, SUA). Aloxanul a fost dizolvat în apă distilată pentru preparate injectabile (Zentiva, România) pentru a obține o soluție de 13%.
- Metformin clorhidrat (Merck, Germania), soluție apoasă 1%

- Extract uscat din frunze de *Raphanus sativus* (RAPH), suspensie apoasă 5%
- Glucometru și teste CodeFree (SD Biosensor, Republica Coreea)

Metodă

Unei colectivități de șobolani i-a fost indus diabetul aloxanic prin administrarea unei doze de 130 mg/kg corp i.p. Anterior administrării animalele au fost ținute la post de hrană timp de 24 h. După 48 h a fost determinată glicemia prin puncționarea venelor cozii. Au fost selectate 50 de animale diabetice (glicemie \geq 200 mg/ dl sânge).

Au fost alcătuite 4 loturi, fiecare a 8 - 9 animale, care au fost tratate astfel:

- Lot M – apă distilată 10 ml/kg corp, p.o.
- Lot MET – metformin 100 mg/kg corp, sol. 1%, p.o.
- Lot RAPH – extract uscat din frunze de *Raphanus sativus*, 500 mg/ kg corp, susp 5%, p.o.
- Lot AMA - extract uscat de *Amaranthus rethroflexus*, 500 mg/kg corp, susp 5%, p.o.

Administrările s-au făcut o dată pe zi, pe parcursul a 13 zile. Determinarea glicemiei s-a făcut în inițial (ziua 1), înainte de prima administrare, și apoi în zilele 4, 7, 10 și 13, la 2 ore de la administrare.

Comparația efectului hipoglicemiant al extractelor sus menționate s-a făcut față de un lot martor normoglicemic, un lot martor hiperglicemic/ diabetic și față de un lot tratat cu o substanță de referință: metformin.

Calculul statistic s-a realizat utilizând GraphPad Prism v. 5.0. (GraphPad Software, SUA).

Are loc o scădere a glicemiilor la administrarea extractului de interes, pe toată durata experimentului. Astfel, glicemia scade cu 39,85 % la ziua 4; 16,09 % la ziua 7; 41,42 % la ziua 10 și 26,43 % la ziua 13. Această scădere a fost semnificativă statistic în zilele a patra, a zecea și a treisprezecea (fig. 1-4).

Referințe bibliografice

1. Laasko M. Epidemiology of type II diabetes. In: Goldstein B, Mueller-Wieland W, editors. Type 2 Diabetes: Principles and Practice, Second Edition. New York (NY): Informa Healthcare; 2008. p. 1.
2. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. Diabetes Care. 2018;41(Suppl 1):S13–27.
3. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes--2013. Diabetes Care. 2013 Jan 1;36(Supplement_1):S11–66.
4. Kagan A. Type 2 Diabetes: Social and Scientific Origins, Medical Complications and Implications for Patients and Others. Jefferson (NC): McFarland & Company; 2010. p. 10.
5. Barnett A. Preface to the first edition. In: Barnett A, editor. Type 2 Diabetes. Oxford: Oxford University Press; 2008. p. vii.
6. Riobó Serván P. Obesity and diabetes. Nutr Hosp. 2013 Sep;28 Suppl 5:138–43.
7. Vimalaswaran KS, Loos RJF. Progress in the genetics of common obesity and type 2 diabetes. Expert Rev Mol Med. 2010 Feb 26;12:e7.

8. Jannasch F, Kröger J, Schulze MB. Dietary Patterns and Type 2 Diabetes: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *J Nutr.* 2017;147(6):1174–82.
9. Alhazmi A, Stojanovski E, McEvoy M, Garg ML. The association between dietary patterns and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *J Hum Nutr Diet.* 2014 Jun;27(3):251–60.
10. Yang W, Lu J, Weng J, Jia W, Ji L, Xiao J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China. *N Engl J Med.* 2010 Mar 25;362(12):1090–101.
11. Dal Canto E, Ceriello A, Rydén L, Ferrini M, Hansen TB, Schnell O, et al. Diabetes as a cardiovascular risk factor: An overview of global trends of macro and micro vascular complications. *Eur J Prev Cardiol.* 2019 Dec;26(2_suppl):25–32.
12. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation.* 1979 Jan;59(1):8–13.
13. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ.* 1998 Sep 12;317(7160):703–13.
14. Cryer MJ, Horani T, DiPette DJ. Diabetes and Hypertension: A Comparative Review of Current Guidelines. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2016 Feb;18(2):95–100.
15. Kai H. Blood pressure management in patients with type 2 diabetes mellitus. *Hypertens Res.* 2017 Aug;40(8):721–9.
16. Bommer C, Heesemann E, Sagalova V, Manne-Goehler J, Atun R, Bärnighausen T, et al. The global economic burden of diabetes in adults aged 20-79 years: a cost-of-illness study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5(6):423–30.
17. Herquelot E, Guéguen A, Bonenfant S, Dray-Spira R. Impact of diabetes on work cessation: data from the GAZEL cohort study. *Diabetes Care.* 2011 Jun;34(6):1344–9.
18. Janssen LMM, Hiligsmann MJC, Elissen AMJ, Joore MA, Schaper NC, Bosma JHA, et al. Burden of disease of type 2 diabetes mellitus: cost of illness and quality of life estimated using the Maastricht Study. *Diabet Med.* 2020 Feb 28;
19. Charbonnel B, Penfornis A, Varroud-Vial M, Kusnik-Joinville O, Detournay B. Insulin therapy for diabetes mellitus: treatment regimens and associated costs. *Diabetes Metab.* 2012 Apr;38(2):156–63.
20. Vandenhede H, Deboosere P, Stirbu I, Agyemang CO, Harding S, Juel K, et al. Migrant mortality from diabetes mellitus across Europe: the importance of socio-economic change. *Eur J Epidemiol.* 2012 Feb;27(2):109–17.
21. Kristensen T, Rose Olsen K, Sortsø C, Ejersted C, Thomsen JL, Halling A. Resources allocation and health care needs in diabetes care in Danish GP clinics. *Health Policy.* 2013 Nov;113(1–2):206–15.

22. Tuan Kiet Pham H, Tuyet Mai Kieu T, Duc Duong T, Dieu Van Nguyen K, Tran NQ, Hung Tran T, et al. Direct medical costs of diabetes and its complications in Vietnam: A national health insurance database study. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020 Feb 3;108051.
23. Liu X, Li C, Gong H, Cui Z, Fan L, Yu W, et al. An economic evaluation for prevention of diabetes mellitus in a developing country: a modelling study. *BMC Public Health.* 2013 Aug 7;13:729.
24. Buse JB, Wexler DJ, Tsapas A, Rossing P, Mingrone G, Mathieu C, et al. 2019 Update to: Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care.* 2020 Feb;43(2):487–93.
25. Davies MJ, D'Alessio DA, Fradkin J, Kernan WN, Mathieu C, Mingrone G, et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care.* 2018;41(12):2669–701.
26. American Diabetes Association. 6. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care.* 2018;41(Suppl 1):S55–64.
27. Sanchez-Rangel E, Inzucchi SE. Metformin: clinical use in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2017;60(9):1586–93.
28. Campbell JM, Bellman SM, Stephenson MD, Lisy K. Metformin reduces all-cause mortality and diseases of ageing independent of its effect on diabetes control: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev.* 2017 Nov;40:31–44.
29. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care.* 2012 Jun;35(6):1364–79.
30. Lamanna C, Monami M, Marchionni N, Mannucci E. Effect of metformin on cardiovascular events and mortality: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Obes Metab.* 2011 Mar;13(3):221–8.
31. Kamalinia S, Josse RG, Donio PJ, Leduc L, Shah BR, Tobe SW. Risk of any hypoglycaemia with newer antihyperglycaemic agents in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Endocrinol Diabetes Metab.* 2020 Jan;3(1):e00100.
32. Hirst JA, Farmer AJ, Dyar A, Lung TWC, Stevens RJ. Estimating the effect of sulfonylurea on HbA1c in diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia.* 2013 May;56(5):973–84.
33. Blicklé JF. Meglitinide analogues: a review of clinical data focused on recent trials. *Diabetes Metab.* 2006 Apr;32(2):113–20.
34. Nanjan MJ, Mohammed M, Prashantha Kumar BR, Chandrasekar MJN. Thiazolidinediones as antidiabetic agents: A critical review. *Bioorg Chem.* 2018;77:548–67.

35. ***. Annex I. Scientific conclusions and grounds for suspension of the marketing authorisation presented by the European Medicines Agency [Internet]. [cited 2020 Mar 6]. Available from: <http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/h137.htm>
36. Pouwels KB, van Grootheest K. The rosiglitazone decision process at FDA and EMA. What should we learn? *Int J Risk Saf Med*. 2012;24(2):73–80.
37. Hampp C, Pippins J. Pioglitazone and bladder cancer: FDA's assessment. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2017;26(2):117–8.
38. Holst JJ. From the Incretin Concept and the Discovery of GLP-1 to Today's Diabetes Therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:260.
39. Elkinson S, Keating GM. Lixisenatide: first global approval. *Drugs*. 2013 Mar;73(4):383–91.
40. Samson SL, Garber A. GLP-1R agonist therapy for diabetes: benefits and potential risks. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2013 Apr;20(2):87–97.
41. Russell S. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: a review of direct comparisons of efficacy, safety and patient satisfaction. *Int J Clin Pharm*. 2013 Apr;35(2):159–72.
42. Deacon CF. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes: a comparative review. *Diabetes Obes Metab*. 2011 Jan;13(1):7–18.
43. Nassif ME, Kosiborod M. A Review of Cardiovascular Outcomes Trials of Glucose-Lowering Therapies and Their Effects on Heart Failure Outcomes. *Am J Cardiol*. 2019 Dec 15;124 Suppl 1:S12–9.
44. Kuchay MS, Farooqui KJ, Mishra SK, Mithal A. Glucose Lowering Efficacy and Pleiotropic Effects of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors. *Adv Exp Med Biol*. 2020 Feb 1;
45. Kalra S, Shetty KK, Nagarajan VB, Ved JK. Basic and Clinical Pharmacotherapy of SGLT2 Inhibitors: A Contemporary Update. *Diabetes Ther*. 2020 Mar 4;
46. Sung CJ, Rae KN, Joon KH, Hee LC. Composition for preventing or treating of diabetes or obesity comprising pteridophyta extracts as active ingredients. KR20130113626A, 2013.
47. Sun T, Wang T, Wang Y, Wang Y, Lu Y. Method and use for preparing novel medicine for treating diabetes prepared from tuber fern. CN101185662A, 2008.
48. Nam-Joon B, Sang-Zin C, Jin-Seok J, Soon-Hoe K, Sang-Jin L, Seul-Ki L, et al. Composition for the prevention or treatment of obesity or lipid related metabolic diseases. KR20110107625A, 2011.
49. Dov F. Herbal compositions for the treatment of diabetes and/or conditions associated therewith. DK2170360T3, 2015.

50. Sherman J. Medicinal composition for diabetes. AU6998196A, 1998.
51. Hirotoishi H, Ryiuuichi H, Masanori I, Yousuke I, Eriko M, Miyuki T, et al. Glycoside having 4-methylergost-7-en-3-ol skeleton and drug for ameliorating hyperglycemia. CA2533784A1, 2006.
52. Huang B, Cheng F, Zhang K, Zhu K, Zhao S, Xu X, et al. Application of sitsang *Scindapsus aureus* flower as well as extract thereof in the preparation of diabetes medicament. CN101181446B, 2008.
53. Sun PT. Composition for Preventing or Treating of Obesity, Hyperlipidemia, Fatty Liver or Diabetes Comprising Indole-3-carbinol Derivatives as Active Ingredients. KR20100070664A, 2013.
54. Sook CM, Ho CS, Jung JW, Won LK, Gwon SS, Jin SS, et al. Method for production of sulforaphene-enriched raphanus sativus seeds extracts and Food composition pharmaceutical composition animal medicines for weight and blood glucose control fatty liver prevention with the raphanus sativus seeds extracts therefrom. KR101907179B1, 2018.
55. Luo Q. Decoction medicament for treating diabetes and preparation method thereof. CN106822652A, 2017.
56. Shukla S, Chatterji S, Mehta S, Rai PK, Singh RK, Yadav DK, et al. Antidiabetic effect of *Raphanus sativus* root juice. *Pharm Biol.* 2011 Jan;49(1):32–7.
57. Banihani SA. Radish (*Raphanus sativus*) and Diabetes. *Nutrients.* 2017 Sep 14;9(9).
58. Taniguchi H, Kobayashi-Hattori K, Tenmyo C, Kamei T, Uda Y, Sugita-Konishi Y, et al. Effect of Japanese radish (*Raphanus sativus*) sprout (Kaiware-daikon) on carbohydrate and lipid metabolisms in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res.* 2006 Apr;20(4):274–8.
59. ***. OECD Guideline 423. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method [Internet]. [cited 2020 Mar 19]. Available from: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced_gl423.pdf

Revendicări

1. Extract obținut prin uscarea și măcinarea frunzelor de *Raphanus sativus* L., extracția repetată a acestora de trei ori, câte 30 de minute, cu un amestec de apă- etanol în proporții cuprinse între 30:70 și 70:30, de preferință 50:50 (v/v), în raport produs vegetal:solvent de 1:10, concentrare la temperatură și presiune scăzută și liofilizare la temperaturi mai mici de (-)50 °C, caracterizat printr-un conținut de polifenoli totali de cel puțin 35 mg/g echivalenți acid galic, în principal kaempferol, miricetol și acid clorogenic.
2. Extract conform revendicării 1 utilizat pentru tratamentul diabetului zaharat de tip 2.

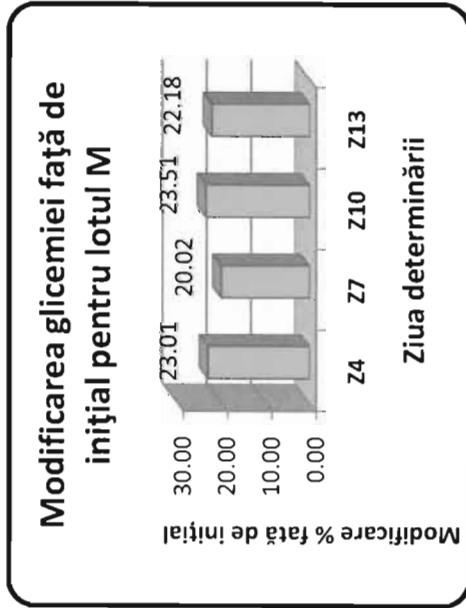


Figura 1. Reprezentare grafică a variației glicemiei la lotul martor, în comparație cu nivelul de la inițierea studiului (Z1).

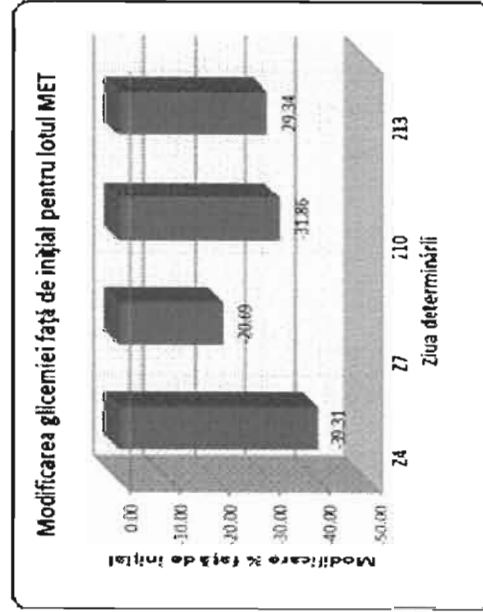


Figura 2. Reprezentare grafică a variației glicemiei la lotul tratat cu metformină, 100 mg/kg corp p.o. în comparație cu nivelul de la inițierea studiului (Z1).

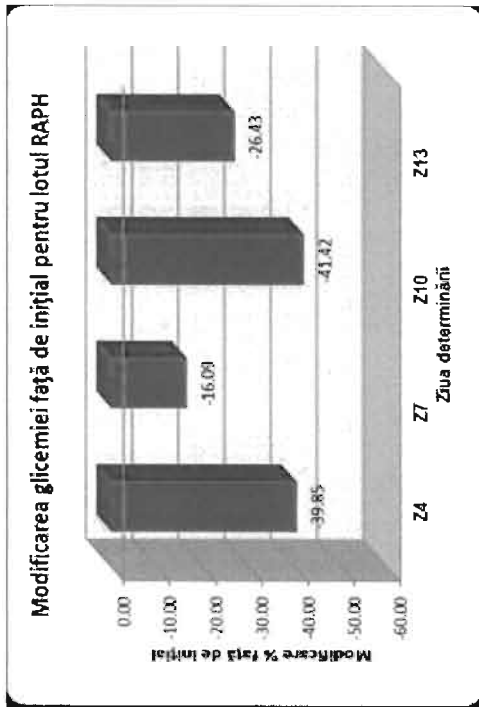


Figura 3. Reprezentare grafică a variației glicemiei la lotul tratat cu extractul de *Raphanus sativus* L., 500 mg/kg corp, susp. apoasă 5% p.o. în comparație cu nivelul de la inițierea studiului (Z1).

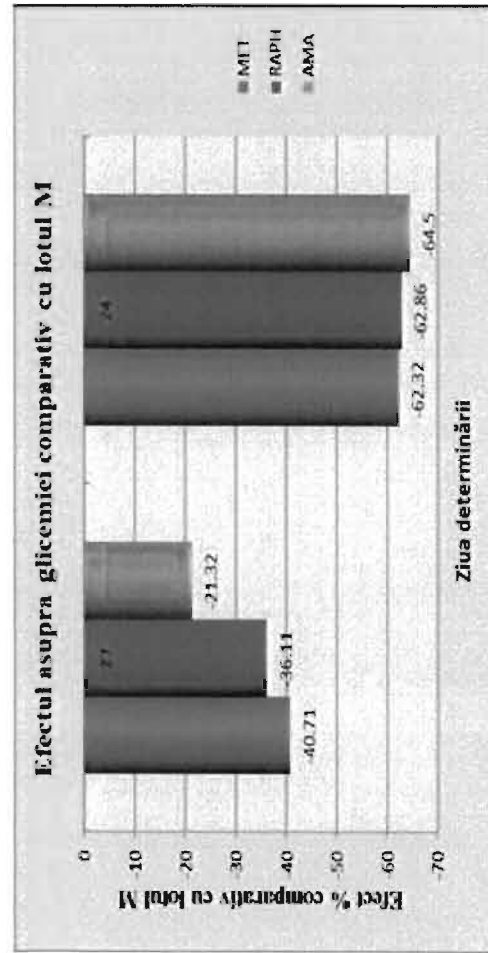


Figura 4. Reprezentare grafică a variației glicemiei la lotul tratat cu extractul de *Raphanus sativus* L. (RAPH), 500 mg/kg corp, susp. apoasă 5% p.o. în comparație cu lotul martor (M).