



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00204

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

(41) Data publicării cererii:
30/10/2023 BOPI nr. 10/2023

(62) Divizată din cererea:
Nr. a 2017 00636

(71) Solicitant:
• 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.SPĂȚAR NICOLAE MILESCU 46-48,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(54) COMPOZIȚII TERAPEUTICE NATURALE OBTINUTE
DIN MACROMICETE CU ACȚIUNE ANTIINFLAMATOARE,
HIPOGLICEMIANȚĂ ȘI HIPOLIPEMIANTA ȘI PROCEDEE
DE OBTINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei compoziții terapeutice cu acțiune hipoglicemiantă. Procedeu, conform invenției constă în etapele: extracție a principiilor active în două etape succesive, din speciile de ciuperci (macromicete) *Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus* și *Laetiporus sulphureus*, în raport masic 1:2:1 cu acetat de etil, raport materie primă/solvent de 1/10 m/v, încălzite la temperatura de fierbere a solventului și refluxare timp de 1 h, răcire, filtrare, concentrare a soluției extractive la 600°C și presiune de

72...75 mm Hg și reluare în alcool etilic 50%, uscarea rezidului de materie primă, extracție cu alcool etilic/apă în raport 1/1 v/v, filtrare, concentrare a soluției extractive, reluare în alcool etilic 50%, rezultând o soluție de culoare brună, cu gust amar și miros aromat, având un conținut de principii active din macromicete, de 2,93...3,87% g/100g polifenoli totali exprimați în acid galic.

Revendicări: 3

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2022 cu 204
Data depozit	12.09.2017

18

DESCRIEREA INVENTIEI

COMPOZITII TERAPEUTICE NATURALE OBTINUTE DIN MACROMICETE CU ACTIUNE ANTIINFLAMATOARE, HIPOGLICEMIANTA SI HIPOLIPEMIANTA SI PROCEDEE DE OBTINERE

Autori: Bubueanu Elena Corina, Popa Gabriela, Cornea Calina Petruta, Zagrean Valentin Alexandru, Munteanu Laurentiu, Grigore Alice Elena, Pirvu Lucia Camelia, Iuksel Rasi, Panteli Minerva

Domeniul tehnic la care se refera inventia

Inventia se refera la compozitii terapeutice naturale obtinute din macromicete cu actiune hipoglicemianta cu utilizare in industria farmaceutica, de uz uman, cu administrare orala si procedee de obtinere a acestora realizate prin extractia principiilor active, in doua etape succesive, din speciile de ciuperci (macromicete) *Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus* si *Laetiporus sulphureus*.

Stadiul tehnicii

Diabetul zaharat este o tulburare metabolica cauzata de cresterea nivelului de glucoza din sange, care afecteaza milioane de persoane. Daca nu este gestionat corespunzator, poate duce la complicatii care pun viata in pericol, insuficienta de organ si mortalitate. Cercetarile au recunoscut ca diabetul poate fi prevenit si gestionat prin respectarea unui stil de viata adecvat, care include dieta si exercitii fizice. Desi sunt disponibile o serie de medicamente sintetice pentru gestionarea acestei afectiuni, utilizarea lor pe termen lung este asociata cu multe efecte secundare. Acest lucru a mutat cercetarea catre plante medicinale si ierburi care sunt considerate a fi relativ sigure. Ciupercile comestibile apartin clasei potentialelor fitoterapii antidiabetice. Sunt bogate in compusi naturali precum fibre, polizaharide, fenolici si alcaloizi si sunt cunoscuti pentru efecte antidiabetice, antioxidante si antihiperlipidemice din cele mai vechi timpuri (Khursheed R, et al., 2020)

Specia *Agaricus campestris* (fam *Agaricaceae*) contine compusi chimici din diferite clase, respectiv polizaharide, polifenoli, aminoacizi, microelemente (Mendoza CG et al, 1979; Woldegiorgis A.Z. et al, 2014),

Este cunoscut faptul ca activitatea anti-diabetica a speciei *Agaricus campestris* se datoreaza eliberarii insulinei și activitatii asemanatoare insulinei a extractului (Gray and P R Flatt, 1998).

14

Este cunoscuta compozitia chimica a *Pleurotus ostreatus* care cuprinde azot, proteine, glicogen, acizi grasi, polizaharide, compusi fenolici (Yitzhak Hadar, And Ephraim 1986; Janos Vetter , 2007; I. Palacios et al. 2011)

Este cunoscut ca extractul alcoolic obtinut din specia *Pleurotus ostreatus* are proprietati hipoglicemianta (Ravi B, Renitta et al 2013).

Este cunoscut faptul ca specia *Laetiporus sulphureus* contine cenusa, apa, proteine, grasimi, carbohidrati si vitamine (Palazzolo E, et al. 2012) si ca are proprietati antixodante, antitumorale si antimicrobiene (Petrović J, et al. 2014; Ming Yeou Lung, et al. 2011; Rabin Gyawali, Salam A. 2014)

Brevetul KR100936176B1 face referire la un exopolizaharid brut, produs in cultura lichida de *Laetiporus sulphureus* care are proprietati antidiabetice si antiproliferative.

Brevetele JP2006282634-A, KR845463-B1, CN109418959-A, JP2007320867-A descriu diferite preparate sau produse obtinute din ciuperci cu indicatii terapeutice diverse.

Prezentarea problemei tehnice

Problema pe care o rezolva inventia consta in realizarea de compozitii naturale obtinute din macromicete, de uz oral, uman, cu actiune hipoglicemianta, fara reactii adverse sau efecte secundare, cu utilizare ca adjuvant in terapia diabetului, care se prezinta sub forma unor solutii, de culoare bruna, cu gust amar si miros aromat, cu continut de 2,96...3,92% g/100g polifenoli totali exprimati in acid galic.

Compozitiile naturale conform inventiei sunt obtinute fie prin extractia, in doua etape succesive, a principiilor active din amestec de materie prima (macromicete *Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus*, *Laetiporus sulphureus* in raport de 1/2/1m/m/m, fie prin asocierea a 3 extracte, individuale, selective in raport de 1/2/1 v/v/v, obtinute prin doua extractii succesive din materiile prime individuale. Pentru ambele variante prima extractie se efectueaza cu acetat de etil raport materie prima/solvent 1/10 m/v si a doua extractie cu alcool etilic 50% v/v, raport materie prima/solvent 1/10m/v.

Inventia prezinta urmatoarele avantaje:

- se diversifica gama de compozitii terapeutice naturale cu actiune hipoglicemianta, obtinute din ciuperci (macromicete), care pot fi utilizate ca adjuvant in terapia diabetului;
- produsul este practic netoxic si nu are reactii adverse sau efecte secundare;
- se utilizeaza o materie prima naturala accesibila, de provenienta autohtona, regenerabila;
- tehnologia poate fi realizata pe o instalatie industriala de prelucrare a plantelor fara a necesita o investitie deosebita;

- solventii organici se recupereaza si nu rezulta deseuri toxice.

Exemplu de realizare a inventiei.

Materia prima consta in corpui de fructificatie ai speciilor *Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus* si *Laetiporus sulphureus*, uscata si macinata, sita III.

Fazele tehnologice pentru obtinerea compozitiilor terapeutice naturale sunt urmatoarele:

Obtinerea compozitiei naturale prin extractia principiilor active din amestec de materie prima:

Intr-un vas de inox cu capacitate de 250L, prevazut cu gura de alimentare, stut de evacuare, manta de incalzire, refrigerent de sticla si sistem de agitare, se introduc 10kg amestec de materie prima care consta in corpui de fructificatie ai speciilor de ciuperci *Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus* si *Laetiporus sulphureus* in raport de 1/2/1 m/m/m si 100L acetat de etil, se incalzeste amestecul la temperatura de fierbere si se agita continuu timp de 1 ora cu refluxarea solventului. Dupa terminarea extractiei I, se intrerupe incalzirea, iar dupa racire solutia extractiva I, se filtreaza. Solutia extractiva I se concentreaza la temperatura de 60°C si presiunea de 72-75 mm Hg pentru eliminarea solventului si se reia in 10L alcool etilic 50% v/v. Materia prima se scoate din vas si se usuca. Materia prima uscata se reintroduce in vasul de extractie unde se introduc pentru a doua extractie 100 L solvent alcool etilic/apa in raport de 1/1 v/v si se efectueaza extractia principiilor active in aceleasi conditii, obtinandu-se solutia extractiva II, dupa indepartarea deseului de ciuperca. Solutia extractiva II se concentreaza la temperatura de 60°C si presiunea de 72-75 mm Hg pentru eliminarea solventului si se reia in 10L alcool etilic 50% v/v. Solutiile extractive I si II se reunesc si se concentreaza pana la un volum de 10 L. Se obtin cate 10L compozitii terapeutice naturale obtinute din ciuperci sub forma de solutii de culoare bruna cu gust amar si miros aromat, continand 2,96...3,92% g/100g polifenoli totali exprimati in acid galic.

Obtinerea compozitiei naturale prin extractia principiilor active din materii prime individuale:

Intr-un vas de inox cu capacitate de 250L, prevazut cu gura de alimentare, stut de evacuare, manta de incalzire, refrigerent de sticla si sistem de agitare, se introduc 10kg corpui de fructificatie ai speciei de ciuperci *Agaricus campestris* sau *Pleurotus ostreatus* sau *Laetiporus sulphureus*, 100L acetat de etil, se incalzeste amestecul la temperatura de fierbere si se agita continuu timp de 1 ora cu refluxarea solventului. Dupa terminarea extractiei I, se intrerupe incalzirea, iar dupa racire solutia extractiva I, se filtreaza. Solutia extractiva I se concentreaza la temperatura de 60°C si presiunea de 72-75 mm Hg pentru eliminarea solventului si se reia in 10L alcool etilic 50% v/v. Materia prima se scoate din vas si se usuca. Materia prima uscata se reintroduce in vasul de extractie unde se introduc pentru a doua extractie 100 L solvent alcool etilic/apa in raport de 1/1 v/v si se efectueaza extractia principiilor active

in aceleasi conditii, obtinandu-se solutia extractiva II, dupa indepartarea deseului de ciuperca. Solutia extractiva II se concentreaza la temperatura de 60°C si presiunea de 72-75 mm Hg, pentru eliminarea solventului si se reia in 10L alcool etilic 50% v/v. Solutiile extractive I si II se reunesc si se concentreaza pana la un volum de 10 L. Se obtin cate 10L extract sub forma de solutie de culoare bruna cu gust amar si miros aromat, continand 1,57% polifenoli totali exprimati in acid galic pentru *Agaricus campestris*, 1,62% polifenoli totali exprimati in acid galic pentru *Pleurotus ostreatus* si 3,28% polifenoli totali exprimati in acid galic pentru *Laetiporus sulphureus*.

Compozitiile terapeutice naturale constau in asocierea celor trei extracte - *Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus*, *Laetiporus sulphureus* in proportie de 1/2/1 v/v/v, urmata de concentrarea solutiei la temperatura de 60°C si presiunea de 72-75 mm Hg pana la 10L. Se obtin cate 10L compozitii terapeutice naturale obtinute din ciuperci sub forma de solutii de culoare bruna cu gust amar si miros aromat, continand 2,96...3,92%g/100g polifenoli totali exprimati in acid galic.

Testari farmacotoxicologice

Compozitiile terapeutice naturale obtinute din ciuperci, testate sub aspectul toxicitatii dupa doza unica, administrate, ca atare, *per os* (prin gavaj intragastric) la sobolani Wistar, în volumul maxim administrabil pe cale orala de 40 ml/kgc nu au indus letalitate sau fenomene toxice, in perioada de observatie de 14 zile.

Pentru compozitia terapeutica naturala obtinuta din speciile de ciuperca *Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus* si *Laetiporus sulphureus* fie prin extractie din amestec de materie prima in raport de 1/2/1 m/m/m, fie prin asocierea extractelor individuale in raport de 1/2/1 v/v/v, efectul hipoglicemiant a fost evidentiat prin testul activitatii hipoglicemiante la sobolani nediabetici- testarea tolerantei orale la glucoza. Administrarea s-a realizat ca atare pe cale orala (gavaj intragastric) în volum de 5 ml/kgc/zi pe o perioada de 15 zile, comparativ cu lotul martor. Valorile medii ale glicemiei (mg/dl) la momentul 0 și la 1, 2, 4 ore dupa administrarea de glucoza 1g/kgc pentru compozitia terapeutica naturala au fost mentinute la valori < 120 mg/dl astfel la momentul 0 – 116 mg/dl pentru compozitie terapeutica naturala, 116 mg/dl pentru lot martor, la 1 h – 117 mg/dl pentru compozitie terapeutica naturala si 139 mg/dl pentru lot martor, la 2h – 107 mg/dl pentru compozitie terapeutica naturala si 146 mg/dl pentru lot martor, la 4 h - 96 mg/dl pentru compozitie terapeutica naturala si 129 mg/dl pentru lotul martor.

Aplicabilitate industrială

Inventia poate fi aplicata atat in industria suplimentelor alimentare de uz uman, pentru productia de produse naturale, cu administrarea orala, eficiente in prevenirea si terapia diabetului.

COMPOZITII TERAPEUTICE NATURALE OBTINUTE DIN MACROMICETE CU ACTIUNE ANTIINFLAMATOARE, HIPOGLICEMIANTA SI HIPOLIPEMIANTA SI PROCEDEE DE OBTINERE

Autori: Bubueanu Elena Corina, Popa Gabriela, Cornea Calina Petruta, Zagrean Valentin Alexandru, Munteanu Laurentiu, Grigore Alice Elena, Pirvu Lucia Camelia, Iuksel Rasit, Panteli Minerva

REVENDICARE 1

Compozitie 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, caracterizată prin aceea că conține principii active din speciile *Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus* și *Laetiporus sulphureus* având 2,93.....3,87% g/100g polifenoli totali exprimați în acid galic.

REVENDICARE 2

Procedeu de obținere a compoziției terapeutice, definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** este realizat prin extracția materiei prime constituite din corpii de fructificație ai ciupercilor *Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus*, *Laetiporus sulphureus*, în raport de 1:2:1m/m/m cu acetat de etil, raport materie primă/ solvent 1/10 m/v, încălzite la temperatura de fierbere a solventului și refluxare timp de 1 oră, răcire, filtrare, concentrare a soluției extractive la 600C și presiune de 72-75mmHg și reluare în alcool etilic 50%v/v, urmată de uscarea rezidului de materie primă și extracția cu alcool etilic/apa în raport de 1:1 v/v, la temperatura de fierbere a solventului și refluxare timp de 1 oră, filtrare, concentrare a soluției extractive la temperatura de 600C și presiune de 72-75mmHg și reluare în alcool etilic 50%v/v, concentrare.

REVENDICARE 3

Procedeu de obținere a compoziției terapeutice, definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** se extrag separat corpii de fructificație ai speciilor *Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus*, *Laetiporus sulphureus* - extracția I cu acetat de etil, raport materie primă/ solvent 1/10 m/v, timp de 1 oră, la temperatura de fierbere a solventului, răcire, filtrare, concentrare a soluției extractive la 600C și presiune de 72-75 mmHg și reluare în alcool etilic 50%v/v și extracția II a rezidului de materie primă uscată, cu alcool etilic 50% v/v, raport materie primă/solvent 1/10 m/v, timp de 1 oră, la temperatura de fierbere a solventului, cu agitare continuă și refluxare, filtrare, concentrarea soluțiilor pentru eliminarea solventului, reluarea acestora în alcool etilic 50% v/v urmată de combinarea celor trei extracte individuale în proporție de 1/2/1 v/v/v.