



(11) **RO 125699 B1**

(51) Int.Cl.

A61K 36/537 (2006.01),

A61K 36/734 (2006.01),

A61K 36/28 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00120**

(22) Data de depozit: **05.02.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.05.2011** BOPI nr. **5/2011**

(41) Data publicării cererii:

30.09.2010

BOPI nr. **9/2010**

(73) Titular:

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

(72) Inventatori:

• **PINTILIE GABRIELA VIORICA,
STR.SACHELARIIE VISARION NR.16,
BL.118A, AP.27, SECTOR 2, BUCUREȘTI,
B, RO;**
• **PÎRVU LUCIA CAMELIA,
CALEA VĂCĂREȘTI NR.338, BL.15, SC.2,
ET.4, AP.43, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **ALEXANDRU NICOLETA,
CALEA CRÂNGAȘI NR.23, BL.13, SC.2,
ET.2, AP.22, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **NICULESCU MIHAI, BD.CAMIL RESSU
NR.54, BL.C17, SC.1, AP.10, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **ALBULESCU MIHAELA EMILIA,**

**STR.ROȘIA MONTANĂ NR.6, BL.7, SC.C,
ET.2, AP.125, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**

• **BĂNICĂ ELENA, STR.RIPICENI NR.4,
BL.11, AP.42, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;**

• **ARMATU ALICE ELENA, BD.UVERTURII
NR.43, BL.1, SC.D, ET.2, AP.131,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **BUBUEANU ELENA-CORINA,
STR.CERNIȘOARA NR.43, BL.012, SC.A,
AP.19, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **DRĂGHICI ELENA,
STR.ALEEA FIZICIENILOR NR.8, BL.3D,
SC.2, AP.73, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**

• **COLCERU- MIHUL
SVETLANA-GABRIELA,
STR.RÂMNICU SĂRAT NR.29, BL.11A1,
ET.10, AP.42, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

RO 120950 B1; RO 112741 B;

RO 120529 B1

(54)

PRODUS ANTIOXIDANT DE NATURĂ VEGETALĂ ȘI PROCEDEU DE OBTINERE



RO 125699 B1

Invenția se referă la un produs antioxidant de natură vegetală și la procedeul de obținere a acestuia, cu utilizare în industria fitofarmaceutică.

Din literatura de brevete în domeniu, sunt cunoscute următoarele documente: **RO 120950**, **RO 112741** și **RO 120529**.

Brevetul **RO 120950** se referă la o compoziție imunomodulatoare de origine vegetală și la procedeul de obținere a acesteia; compoziția este constituită din 0,625 părți extract uscat din *Herba Echinacea*, *Herba Epilobii*, *Usnea barbata*, *Folium Urticae* și *Herba Alchemillae* și 0,375 părți extract uscat din *Herba Hyperici* și *Folium cum Flores Crataegi*, părțile fiind exprimate în greutate. Procedeul de obținere constă în aceea că, în prima etapă, se obține un extract uscat din amestecul de *Herba Echinacea*, *Herba Epilobii*, *Usnea barbata*, *Folium Urticae* și *Herba Alchemillae* în raport de 30: 20: 17: 20: 13, care se extrage de 2 ori cu câte 7 părți apă, la temperatura de 70...80°C, timp de 6 respectiv 4 h, după care, a doua soluție se concentrează până la un reziduu de minimum 5%, apoi cele două soluții extractive se reunesc și se atomizează după adăugarea a 3% aerosil și a 60% lactoză față de cantitatea de substanță uscată extrasă, iar în a doua etapă se obține al doilea extract din amestecul de *Herba Hyperici* și *Folium cum Flores Crataegi* în raport de 50: 50, prin dubla extracție în 6, respectiv, 4 părți alcool 60°C și 1,5 părți apă, la temperatura de 60...70°C, timp de câte 4 h, după care soluțiile extractive se concentrează la minimum 60% din volumul inițial al acestora, apoi se atomizează după adăugarea a 5% aerosil și aproximativ 40% lactoză față de cantitatea de substanță uscată extractă; în faza finală cele două extracte obținute se asociază în raportul arătat în prima etapă și se condiționează în mod cunoscut.

Brevetul **RO 112741** descrie un procedeu de obținere a unui produs medicamentos cu acțiune hipoglicemiantă, alcătuit dintr-un amestec din plantele *Phaseoli fructus sine semine*, *Folium myrtilli*, *Folium mori*, *Radix cichorii*, *Folium salviae*, în proporție de 30: 20: 10: 10, se extrage de două ori cu 7, respectiv, 4 părți apă la 80°C, timp de 8 h, respectiv, 6 h, iar 10 părți tărâțe de grâu se extrag cu 10 părți apă, la 40°C și timp de 4 h, după care extractele apoase reunite se concentrează până la jumătate din volumul inițial, se standardizează prin adaosul de 3% aerosil și aproximativ 30% lactoză, față de substanța uscată extrasă și se atomizează, părțile fiind exprimate în greutate.

Brevetul **RO 120529** prezintă o compoziție antioxidantă pe bază de extracte naturale, pentru tratarea psoriazisului, ce constă în aceea că aceasta cuprinde flavonoide, terpenoide, alantoină și derivați antracenici, extrase la o temperatură cuprinsă între 30 și 60°C, din plantele: *Arctium lappa*, *Rumex acetosa*, *Urtica dioica*, *Viola tricolor*, *Calendula officinalis*, *Achillea millefolium*, *Equisetum arvense*, *Chelidonium majus*, *Salvia officinalis*, *Hypericum perforatum*, *Chamomillae flos*, *Borago officinalis*, *Cynara scolymu*, semințe de strugure negru, *Gallium molluga*, *Aristolochia clematitis*, *Symphytum officinalis*, *Rosa centifolia*, astfel alese, încât raportul dintre antioxidant/antifungic/cicatrizant/antihepatic/diuretic/tonic limfatic/antiinflamator/relaxant nervos să fie: 0...3: 0...3: 0...3: 0...1: 0...1: 0...1: 0...1: 0...3.

Este cunoscut că speciile de *Crataegus* (*C. monogyna*, *C. oxyacantha*) conțin polifenoli (vitexină, hiperozidă, rutină, acid clorogenic), compuși ce manifestă proprietăți antioxidante de intensități diferite.

Este cunoscut că speciile de *Salvia* (*S. sclarea*, *S. officinalis*) au în compoziția chimică constituenți polifenolici (carnosol, acid carnosic, apigenină, luteolină, derivați de acid cinamic) - constituenți a căror acțiune antioxidantă a fost dovedită experimental.

Este cunoscut că *Cichorium intybus* conține flavonoide - substanțe ce prezintă activitate antioxidantă.

Problema tehnică propusă spre rezolvare de prezenta cerere constă în realizarea unui produs antioxidant de natură vegetală.

Soluția constă în obținerea unui complex de compuși polifenolici și policarboxilici izolați din amestecul de <i>Crataegi sp. flores et folium</i> , <i>Salviae sp. herba</i> și <i>Cichorii herba</i> .	1
Produsul antioxidant de natură vegetală, conform invenției, este constituit dintr-un complex de compuși polifenolici cu conținut de 25...30% flavonoide exprimate în rutozidă și 25...30% acizi polifenolcarboxilici exprimați în acid cafeic, izolați din amestecul de <i>Crataegi sp. flores et folium</i> , <i>Salviae sp. herba</i> și <i>Cichorii herba</i> , în raport de 1: 1: 1 m/m/m, cu 82...160% indice de protecție, iar procedeul de obținere constă în aceea că se supune extracției materialul vegetal constituit dintr-un amestec alcătuit din <i>Crataegi sp. flores et folium</i> , <i>Salviae sp. herba</i> și <i>Cichorii herba</i> , în raport de 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 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 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 de 24 h, apoi se separă reziduul clorofilian, se spală soluția apoasă prin agitare cu solvenții nepolari: clorură de metilen, cloroform, în raport de 1: 1 v/v, se extrage soluția apoasă prin agitare cu solvenții 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 reziduu sau se atomizează.	3
Produsul antioxidant de natură vegetală, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:	5
- o foarte bună acțiune antioxidantă;	7
- un indice de protecție înalt, evaluat <i>in vitro</i> pe culturi de hepatocite ca fiind de 161,7%, comparativ cu 120%, 131,4% și 118,5% pentru produsele obținute separat din <i>Salvia sp.</i> , <i>Cichorium intybus</i> , respectiv, <i>Crataegus sp.</i>	9
În continuare, se prezintă pe larg invenția.	11
Produsul obținut în conformitate cu prezenta invenție se prezintă sub forma unei pulberi vegetale de culoare galben-brun, solubilă în alcooli, cu un conținut de compuși polifenolici alcătuit din acizi polifenolcarboxilici (25...30% m/m exprimat în acid cafeic) și flavonoide (24...30% m/m exprimat în rutozidă).	13
Procedeul de obținere a produsului constă în extracția materialului vegetal alcătuit din <i>Crataegi sp. flores et folium</i> , <i>Salviae sp. herba</i> și <i>Cichorii herba</i> în proporție de 1: 1: 1 m/m/m cu alcool metilic (raport material vegetal/solvent extracție 1:12 m/v), la reflux, timp de 3 h, separarea soluției extractive, concentrarea ei sub presiune redusă până la un volum corespunzător raportului 1: 1 v/m față de materialul vegetal, diluarea soluției metanolice concentrate cu un volum egal de apă, eliminarea alcoolului metilic prin distilare la presiune redusă, menținerea la temperatura de 5...10°C, timp de 24 h, a soluției apoase concentrate, separarea reziduului clorofilian, spalarea soluției apoase prin agitare cu solvenți nepolari (clorură de metilen, cloroform) (raport 1: 1 v/v) urmată de extracția lichid-lichid cu solvenți selectivi (acetat de etil, alcool n-butilic) în raport de 1:1 v/v de 3 ori succesiv și obținerea produsului prin concentrarea sub presiune redusă, până la reziduu, a extractelor organice reunite, sau prin atomizare.	15
Sunt prezentate în continuare 2 exemple de realizare a invenției.	17
Exemplul 1. Materialul vegetal utilizat constă din: flori cu frunze de păducel (<i>Crataegi sp. flores et folium</i> cu un conținut de 2,16% flavonoide, 0,57% acizi polifenolcarboxilici), iarbă de salvie (<i>Salviae herba</i> cu un conținut de 2,57% flavonoide, 0,41 % acizi polifenolcarboxilici) și iarbă de cicoare (<i>Cichorii herba</i> cu un conținut de 1,83% flavonoide, 0,30% acizi polifenolcarboxilici) amestecate în proporție de 1:1:1 m/m/m, în stare uscată și măcinate (sita I).	19

Fazele tehnologice sunt următoarele:

a) Extracția materialului vegetal

3 kg material vegetal se extrag prin agitare la reflux, timp de 3 h, cu 36 l alcool metilic. Se răcește amestecul și se separă soluția extractivă prin filtrare la presiune normală. Se obțin 30 l soluție extractivă metanolică.

b) Obținerea extractului apos declorofilat

Soluția extractivă metanolică (30 l) se concentrează la presiune redusă până la volumul de circa 3 l. Se adaugă 4 l apă și se continuă concentrarea la presiune redusă până la obținerea unui volum de 3 l soluție apoasă concentrată. Soluția se menține la temperatura de 5...10°C, timp de 24 h. Se separă reziduul clorofilian prin centrifugare timp de ½ oră la turația 2400 rot/min. Se obțin circa 2,8 l soluție apoasă. Soluția apoasă se spală prin agitare cu 1,2 l clorură de metilen. Se separă fazele. Rezultă circa 2,8 l extract apos declorofilat.

c) Obținerea produsului bioactiv

Extractul apos declorofilat se extrage prin agitare, succesiv, de 3 ori, cu câte 3 l acetat de etil (saturat în prealabil cu apă, la timp de agitare ½ oră, timp de separare o oră). Se separă fazele. Extractele organice se reunesc și se concentrează sub presiune redusă (20 mm.col.Hg) până la eliminarea solventului și obținerea reziduului uscat. Reziduul se dizolvă în 0,5 l alcool etilic. Soluția se concentrează sub presiune redusă până la eliminarea solventului. Se obțin circa 38 g produs sub formă de reziduu uscat, de culoare brun deschis, cu un conținut de 25% m/m flavonoide (exprimat în rutozidă) și 26,55% m/m acizi polifenolcarboxilici (exprimat în acid cafeic).

Exemplul 2. Se utilizează același material vegetal ca în exemplul 1. Fazele a) și b) se realizează la fel cu cele descrise în exemplul 1.

c) Obținerea produsului bioactiv

Extractul apos declorofilat se extrage prin agitare, succesiv, de 3 ori, cu câte 3 l acetat de etil (saturat în prealabil cu apă, timp de agitare ½ oră, timp de separare o oră). Se separă fazele. Extractele organice se reunesc și se concentrează sub presiune redusă (20 mm col.Hg) până la eliminarea solventului și obținerea reziduului uscat. Reziduul se dizolvă în 1 l alcool etilic 20%. Soluția se supune atomizării în următoarele condiții: temperatura de intrare 125°C, temperatura de ieșire 60...62°C.

Se obțin circa 35 g produs sub formă de pulbere de culoare brun deschis, cu un conținut de 25% m/m flavonoide (exprimat în rutozidă) și 26,55% m/m acizi polifenol carboxilici (exprimat în acid cafeic).

Testări farmacologice preclinice

Rezultatele testărilor privind inocuitatea produsului bioactiv atestă lipsa de toxicitate a acestuia, demonstrată în experiment acut, prin administrare orală la șoareci albi Swiss a dozei de 5 g/kg.

Rezultatele testărilor privind activitatea antioxidantă a produsului, efectuate *in vitro* pe culturi de hepatocite și *in vivo* pe șobolani Wistar au demonstrat o certă acțiune antioxidantă a acestuia, produsul dovedind un indice de protecție de 161,7% în experimentul *in vitro*, respectiv, un procent de protecție cuprins între 82 și 97% dependent de doza administrată în experimentul *in vivo*.

1. Produs antioxidant de natură vegetală, **caracterizat prin aceea că** este constituit dintr-un complex de compuși polifenolici cu conținut de 25...30% flavonoide exprimate în rutozidă și 25...30% acizi polifenolcarboxilici exprimați în acid cafeic, izolați din amestecul de *Crataegi sp. flores et folium*, *Salviae sp. herba* și *Cichorii herba*, în raport de 1: 1: 1 m/m/m, cu 82...160% indice de protecție. 3 5 7
2. Procedeu de obținere a unui produs antioxidant de natură vegetală, **caracterizat prin aceea că** se supune extracției materialul vegetal constituit dintr-un amestec alcătuit din *Crataegi sp. flores et folium*, *Salviae sp. herba* și *Cichorii herba*, în raport de 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 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 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 de 24 h, apoi se separă reziduul clorofilian, se spală soluția apoasă prin agitare cu solvenții nepolari: clorură de metilen, cloroform, în raport de 1: 1 v/v, se extrage soluția apoasă prin agitare cu solvenții 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 reziduu sau se atomizează. 9 11 13 15 17 19

