

Invenția se referă la domeniul farmaceutic, și anume la un preparat din larve de *Tenebrio molitor* cu acțiune antioxidantă, la un procedeu de obținere a acestuia și la un produs farmaceutic pe baza lui.

Procedeele de obținere a preparatelor entomologice care manifestă efect benefic în tratamentul hiperplaziei benigne de prostată includ mai multe etape, principalele fiind: selectarea materiei prime în corespundere cu scopul și destinația preparatului; colectarea materiei prime destinate extragerii substanțelor bioactive; extragerea principiilor de valoare terapeutică din materia primă în condiții care asigură păstrarea structurilor native și a activității înalte a principiilor bioactive componente; fabricarea formelor farmaceutice corespunzătoare destinației preparatului medicamentos.

Este cunoscut un preparat entomologic obținut din pupe și larve de ultima vârstă de *Lymantria dispar* și procedeu de obținere a compoziției farmaceutice sub formă de supozitoare sau ovule, pentru tratarea hemoroizilor, adenomului de prostată, fibromului uterin [1]. Conform sursei indicate, fabricarea compoziției farmaceutice include următoarele etape de lucru: colectarea pupelor și larvelor de ultima vârstă ale omizii păroase a stejarului (*Lymantria dispar*) de pe tulpinile stejarilor și ale plopilor afectați; spălarea materialului biologic și resuspendarea lui în soluție fiziologică; filtrarea și esorarea materialului biologic; opțional – congelarea materialului până la utilizarea ulterioară; măcinarea materialului până la particule de 9...12μm; filtrarea prin filtrul Bucker cu placă având 200 orificii pe cm²; atomizarea în vid a extractului obținut la temperatura de 130...140°C la intrare și 85...90°C la ieșire sau liofilizarea lui timp de 24...30 ore cu obținerea substanței active pentru producerea formei farmaceutice; fabricarea compoziției farmaceutice ce constă din 1% de substanță biologic activă sub formă de extract de *Lymantria dispar*, 82% de unt de cacao, 10% de apă distilată, 2,68% de helix, 2% de laurat, 1,3% de 2-bromo-2-nitropropan, 1% de poligliceril-4 izostearat cetil PEG/PPG dimeticane 10/1 și 0,02% de dial; condiționarea acestei formule prin topirea și omogenizarea amestecului obținut cu temperatura de 60°C și turnarea ei în forme de supozitoare sau ovule și ambalarea lor pentru stocarea ulterioară.

Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea, că materialul biologic este obținut prin colectare din natură, în așa mod fiind imposibil controlul asupra componenței substanței active. Afară de aceasta colectarea materialului biologic din natură nu permite de a planifica un anumit volum de producere, fiind dependent de condițiile de mediu și de fluctuațiile numerice a speciei *Lymantria dispar*.

Mai este cunoscut un preparat entomologic antiinflamator și antioxidant, destinat tratamentului hiperplaziei benigne de prostată, și procedeu de obținere a lui [2]. Conform celor indicate în descriere, preparatul entomologic antiinflamator și antioxidant obținut din larvele de insecte din ordinul Lepidoptera, genul *Lymantria* prin mărunțirea lor în soluție fiziologică până la formarea unei mase omogene, filtrarea acesteea și eliminarea apei prin liofilizare, conține următoarele componente: proteine – 265,0...292,0 mg/g; lipide – 140,0 mg/g, colesterol – 0,1 mg/g; trigliceride – 90,0 mg/g, amilază – 5,1 UI/g, lipază – 100,0 mUI/g, antioxidanți – 16,86 mg/g, aminoacizi esențiali și semiesențiali – 379,7 mg/g. Acțiunea antioxidantă a preparatului este determinată de compușii antioxidanți hidrosolubili ce se manifestă prin inhibarea peroxidării lipidelor [2].

Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că nu este indicată procedura de cultivare a insectelor în scopul obținerii biomasei de larve, substanța activă este extrasă cu apă, din care cauză preparatul conține doar componente antioxidante hidrosolubile. De asemenea, nu este descrisă tehnologia de fabricare a formei medicamentoase finale, menționându-se doar ca forma finală farmaceutică este cea de supozitoare rectale.

Soluția cea mai apropiată de obiectele revendicate o constituie un preparat entomologic obținut din biomasa larvelor de prima vârstă de *Lymantria dispar* prin extracție hidro – etanolică. Larvele de limantrie sunt crescute în condiții de laborator pe un mediu compus din făină de grâu, mălai, masă vegetală uscată, lapte praf, drojzii uscate, glicerol și miere. Biomasa colectată de larve de *Lymantria dispar* de prima vârstă se spală cu 4 volume de apă distilată, repetând procedura de 4 ori. După aceasta biomasa se dispersează timp de 15 min într-o soluție de NaCl, 0,9%. Larvele se congelează. Biomasa congelată se supune decongelării prin aducerea treptată la temperatura camerei. Utilizând un mojar cu cuțite de inox biomasa se amestecă cu viteza de 5000 rotații pe minut și se fărâmițează până la particule cu dimensiuni de 9...12 μm. Masa obținută este în continuare supusă extragerii principiilor bioactive cu soluție hidro-etanolică de 20%. Extragerea durează 60 minute în condiții de temperatură constantă (18...20°C) la agitație permanentă pe un agitator orbital cu viteza de rotație de 280 rotații/min (alternativ 240...320 rotații/min), se separă de biomasă prin filtrare în vid, după care urmează liofilizarea extractului. În continuare se obține produsul farmaceutic sub formă de supozitoare rectale, care conține 60% extract liofilizat [3].

Dezavantajul complexului activ obținut prin extragere hidro-etanolică din larvele de limantrie constă faptul că acesta are forma finală de extract liofilizat, procesarea ulterioară a căruia duce la modificarea esențială a activității antioxidante a produsului final.

Dezavantajul procedurii constă în faptul, în calitate de materie primă pentru extragere se utilizează biomasa larvelor de prima vârstă, care se caracterizează prin dimensiuni mici, ceea ce implică scumpirea tehnologiei finale; se efectuează o singură extracție hidro-etanolică cu o durată de 60 min, din care cauză rămân nevalorificate unele dintre componentele active ale biomasei; mediul utilizat pentru creșterea larvelor diferă de la o partidă la alta, în special din conținutul masei vegetale utilizate, iar substanța activă este stocată în formă de liofilizat.

Dezavantajul produsului farmaceutic constă în aceea, că în componența lui intră o cantitate nejustificat de mare de extract liofilizat din larvele de limantrie, ceea ce ridică esențial costul produsului final.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui complex entomologic nou care să asigure o activitate antioxidantă specifică înaltă, a unui procedeu de obținere a acestuia, care include realizarea succesivă a

tuturor etapelor tehnologice: creșterea insectelor, obținerea extractului total (hidric și etanolic), obținerea complexului entomologic activ, controlul cantității și a calității biomasei obținute prin utilizarea unui mediu nutritiv artificial standardizat și în obținerea preparatului farmaceutic în baza acestui extract cu proprietăți antioxidante performante și eficiente în tratamentul hiperplaziei benigne de prostată.

Esența invenției constă în aceea, că se propune un preparat din larve de *Tenebrio molitor* cu acțiune antioxidantă, care conține în % mas: extract hidroalcoolic liofilizat din larve de *Tenebrio molitor* – 45...80 % și ulei de vaselină – restul și manifestă activitate de inhibiție a peroxidării lipoproteinelor CI50% de 16 mg/ml și a radicalului oxidului nitric CI50% de 20 mg/ml.

De asemenea, se mai revendică un procedeu de obținere a preparatului din larve de *Tenebrio molitor* cu acțiune antioxidantă, care constă în aceea că se cresc larvele de *Tenebrio molitor* pe un mediu artificial standardizat cu următoarea componență, în g/kg:

extract din porumb galben	86,0...98,0
extract din porumb roșu	72,0...84,0
amidon	500,0...540,0
zaharoză	10,2...12,5
maltoză	8,0...8,5
gleadină	20,0...22,0
tocoferol acetat (vitamina E)	0,010...0,015
vitamina C	0,080...0,085
riboflavină (vitamina B2)	0,0010...0,0015
pantotenat de calciu (vitamina B5)	0,004...0,008
tiamină (vitamina B1)	0,001...0,003
piridoxină (Vitamina B6)	0,005...0,008
biotină (vitamina B7)	0,001...0,003
niacină (vitamina B3)	0,0015...0,0020
NaNO ₃	0,6...0,8
KH ₂ PO ₄	1,2...1,5
NaCl	1,3...1,7
CaCl ₂	0,01...0,02
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,005...0,010
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,005...0,01
MnSO ₄ *5H ₂ O	0,007...0,010
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,0007...0,0010
FeCl ₃ *6H ₂ O	0,010...0,015
EDTA	0,006...0,007
apă purificată	300,0...230,0,

ulterior larvele de ultima vârstă se spală, se dezinfectează cu raze UV, se congelează la temperatura de -18°C, se decongelează până la nivelul temperaturii camerei, se omogenizează în omogenizator la viteza de 5000 rot/min până la obținerea particulelor cu dimensiuni de 9...12 μm, se extrage biomasa cu apă distilată în raport masic de 100 g de biomasa uscată la 2,0...2,1 l de apă distilată timp de 60...90 min la temperatura de 18...20°C la agitare pe un agitator orbital cu viteza de rotație de 240...320 rot/min, se separă extractul prin filtrare în vid și se concentrează prin evaporare în vid, biomasa se extrage repetat cu alcool etilic de 70% în raport de 1:5 respectiv în aceleași condiții, se separă extractul prin filtrare în vid, se concentrează prin evaporare în vid la temperatura de 40°C, se combină ambele extracte, se liofilizează și se amestecă cu ulei de vaselină.

Se mai revendică și un produs farmaceutic din larve de *Tenebrio molitor* cu acțiune antioxidantă sub formă de supozitoare rectale, care conține pentru un supozitor cu masa de 2 g:

preparat din larve de <i>Tenebrio molitor</i> cu acțiune antioxidantă	0,25 g
gliceride semisintetice	1,75 g

Produsul farmaceutic în baza acestei invenții va conține de la 45 la 80% extract entomologic total, iar în calitate de bază pentru supozitoare poate fi utilizat orice alt tip de material acceptat pentru asemenea produse.

Produsul farmaceutic poate include, de asemenea, extracte vegetale de calitate farmaceutică : de *Serenoa repens*, *Cucurbita pepo*, *Pygeum africanum*, *Urtica dioica*, *Xanthium strumarium*, etc sau/și alte substanțe cu efect antioxidant și antiinflamator ori cu acțiuni similare și/ori complementare și care nu modifică acțiunea componentelor active ale extractului entomologic.

Rezultatul tehnic al invenției, în comparație cu cea mai apropiată soluție, constă în faptul, că procedeu de obținere a preparatului medicamentos permite controlul cantității și calității biomasei entomologice obținute, valorifică componența biochimică unică a larvelor de *Tenebrio molitor*, iar aplicarea extracției hidrice și etanolice și combinarea extractelor, asigură obținerea substanței active - extract entomologic total liofilizat transferat în ulei de vaselină - cu activitate antioxidantă înaltă (pentru a obține inhibiția oxidării lipoproteinelor cu densitatea joasă la nivel de 50% este suficient de a aplica produsul în concentrația de 16 mg/ml, iar pentru inhibarea a 50% din radicalii oxidului nitric este nevoie 20 mg/ml).

Rezultatul tehnic obținut se datorează faptului, că procedeul include utilizarea biomasei larvelor de *Tenebrio molitor*, precum și toate etapele tehnologice: creșterea insectelor, obținerea extractului activ, prepararea substanței active și fabricarea preparatului medicamentos, ceea ce permite planificarea atât a cantității, cât și a calității produsului farmaceutic finit. Datorită creșterii insectelor în condiții controlate de crescătorie și raționului determinat, partidele de materie primă se caracterizează prin omogenitate și activitate antioxidantă stabilă și reproductibilă. Deasemenea rezultatul tehnic se mai datorează și faptului, că procedeul de extragere a substanțelor active din biomasa entomologică are loc în două etape, ceea ce asigură extragerea atât a compușilor antioxidanți hidrosolubili, cât și a celor liposolubili, ceea ce sporește acțiunea antioxidantă a acestui produs.

Exemplu de realizare a invenției.

Creșterea insectelor din specia *Tenebrio molitor* include următoarele etape:

1. Pregătirea condițiilor pentru realizarea ciclului vital în crescătorie. Crescătorie de insecte prezintă camere cu suprafața de 15...20 m². Pereții sunt vopsiți cu o rășină specială care oferă posibilitatea dezinfectării cu soluții dezinfectante. Pe perimetrul camerei sunt amplasate rafturi cu cutii Rubbermaid obscure cu dimensiuni de 35 x 23 x 10 cm. Cutiile Rubbermaid constau din două compartimente imbricate. Peretele inferior al compartimentului superior este prezentat printr-un ecran de nailon standard nr.20 (850 μm). Temperatura în crescătorie se menține la 27°C, iar umiditatea la 75%. Se asigură condiții de întuneric.

2. Creșterea insectelor. Insectele mature în număr de 300-500 indivizi sunt plasați în compartimentul superior al cutii Rubbermaid, și sunt hrănite exclusiv cu tărâțe de grâu de calitate superioară. Apa este introdusă prin pulverizare de două ori pe săptămână (aproximativ câte 50 ml la cutie). Odată cu începutul ecloziunii, larvele de prima vârstă trec prin orificiile ecranului și nimeresc în compartimentul inferior al cutiei. Larvele tinere sunt colectate și plasate în cutii Rubbermaid care se deosebesc de primele prin faptul, că ecranul de nailon de separare a compartimentelor boxelor este nr.35 (500 μm). Prin aceste orificii trec excrementele larvelor, acestea fiind păstrate în condiții igienice bune. Larvele sunt crescute timp de 28 zile din momentul ecloziunii, perioadă în care sunt hrănite cu mediu nutritiv standardizat, cu următoarea componență:

Extract din porumb galben	86,0 g
Extract din porumb roșu	72,0 g
Amidon	500,0 g
Zaharoză	10,2 g
Maltoză	8,0 g
Gleadină	20,0 g
Tocoferol acetat (vitamina E)	0,010 g
Vitamina C	0,080 g
Riboflavina (vitamina B2)	0,0010 g
Pantotenat de calciu (vitamina B5)	0,004 g
Tiamină (vitamina B1)	0,001 g
Piridoxină (Vitamina B6)	0,005 g
Biotină (vitamina B7)	0,001 g
Niacină (vitamina B3)	0,0015 g.
NaNO ₃	0,6 g
KH ₂ PO ₄	1,2 g
NaCl	1,3 g
CaCl ₂	0,01 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,005 g
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,005 g
MnSO ₄ *5H ₂ O	0,007 g
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,0007 g
FeCl ₃ *6H ₂ O	0,010 g
EDTA	0,006 g
Apă purificată	300,00 ml

3. Obținerea extractului pentru produsul farmaceutic din biomasa de larve de ultima vârstă de *Tenebrio molitor*. Biomasa colectată de larve de *Tenebrio molitor* de ultima vârstă se spală cu 4 volume de apă distilată, repetând procedura de 4 ori apoi biomasa se dezinfectează cu raze UV. După aceasta biomasa se congelează la temperatura de -18°C. În această formă materia primă poate fi păstrată timp de 6 luni și utilizată în dependență de necesitate. Decongelarea larvelor se face prin creșterea treptată a temperaturii până la cea a camerei. În continuare biomasa este supusă omogenizării într-un omogenizator cu cuțite de inox la o viteză de 5000 rotații pe minut, astfel, ca particulele obținute să nu depășească dimensiunea de 9...12μm. Masa obținută este în continuare supusă extragerii principiilor bioactive hidrosolubile cu apă distilată. Pentru aceasta la 100 g biomasă (recalcul la biomasa absolut uscată) se adaugă 2000 ml de apă distilată. Extragerea durează 60 minute. Extractul se obține în condiții de temperatură constantă de 20°C la agitație permanentă pe un agitator orbital cu viteza de rotație de 280 rotații/min, se separă de biomasă prin filtrare în vid, după care se produce concentrarea lui prin evaporare în vid până la volumul de 250

ml. După aceasta urmează extracția cu alcool etilic de 70% a componentelor alcoolsolubile. Pentru extragere se utilizează biomasa rezultată din prima extracție. Pentru aceasta la biomasa rezultată se adaugă 500 ml de alcool etilic de 70%. Extracția se face timp de 60 min în condiții de temperatură constantă de 20°C la agitație permanentă în vase închise pe un agitator orbital cu viteza de rotație de 250 rotații/min. Extractul este separat de rezidul de biomasă prin filtrare în vid și este concentrat până la obținerea unui volum de 100 ml prin evaporare în vid. Extractul al doilea este adăugat la primul, iar pentru extractul comun sunt efectuate testele de determinare a activității antioxidante specifice. În cazul dat se aplică testul de inhibiție a oxidării lipoproteinelor cu densitatea joasă și cel de inhibiție a radicalului oxidului nitric. Pentru inhibiția oxidării lipoproteinelor la nivel de 50% este suficient de a aplica produsul în concentrația de 16 mg/ml, iar pentru inhibarea a 50% din radicalii oxidului nitric este nevoie 20 mg/ml. Apoi extractul comun este supus liofilizării cu obținerea rezultatelor următoare: pentru testul de inhibiție a oxidării LDL CI50%= 0,15 mg/ml, iar pentru testul de inhibiție a radicalului oxidului nitric CI50%=0,18 mg/m. Extractul total în continuare este liofilizat și condiționat în formă de complex entomologic activ în ulei de vaselină cu următoarea componență: extract entomologic total – 60 % și ulei de vaselină - 40%.

4. Prepararea produsului farmaceutic în formă de supozitoare rectale. Forma preferabilă a preparatului medicamentos în bază de extract entomologic, destinat tratamentului hiperplaziei benigne de prostată, este cea de supozitoare rectale. În calitate de bază de supozitoare s-au utilizat gliceridele semisintetice Suppocire. Raportul cantitativ în componența supozitoarelor a gliceridelor și a substanței active este de 0,25 g de complex entomologic activ în ulei de vaselină și 1,75 g de Suppocire. Baza de supozitoare este topită pe baie de apă la temperatura de 32...34°C, după care în ea este incorporat complexul entomologic activ în ulei de vaselină prin adăugare treptată și amestecare continuă. Masa de supozitoare obținută este ambalată.

În calitate de ambalaj primar pentru supozitoare se utilizează blistere, care se obțin din folie de polivinilclorură termoformată alveolară pentru supozitoare de marca PVC 100 alb/PE 30. În urma studiului de stabilitate desfășurat s-a stabilit că materialele și modul de ambalare alese asigură stabilitatea produsului medicamentos pe parcursul a 24 luni.

Exemplu de aplicare in vivo a produsului farmaceutic sub formă de supozitoare

Pacientul C.B., 62 ani, diagnosticul stabilit în baza investigațiilor complexe în conformitate cu algoritmul standard recomandat de Convenția internațională pentru Hiperplazia Benignă de Prostată (HBP) (Pais, 1997) – hiperplazie benignă de prostată, gradul II. Tratament: monoterapie cu supozitoare rectale cu complex activ entomologic (250 mg), un supozitor pe zi timp de 3 luni. Rezultatele investigațiilor efectuate inițial, după o lună și 3 luni de tratament sunt prezentate în tabelul 1. Pentru comparație se dau rezultatele medii ale unui studiu analogic pe un grup constituit din 20 pacienți cu vârsta între 54 și 78 ani, diagnosticați cu HBP în lipsa prostatitei cronice, care au fost supuși tratamentului cu supozitoare cu extract din Lymantria dispar în regim de monoterapie cu doza de 250 mg/zi, rectal [3].

Tabelul 1. Dinamica simptomelor HBP la monoterapia cu complex activ entomologic timp de 3 luni

	Parametrul monitorizat, unități de măsură	Inițial	După prima lună de tratament	După 3 luni de tratament	% ameliorare
Conform invenției	IPSS (International Prostate Symptom Score), puncte	18	16	11	38,8
	Volumul prostatei, cm ³	56	41	35	37,5
	Viteza maximală a jetului de urină, ml/s	8,4	12,0	14,5	72,6
Conform [3]	IPSS (International Prostate Symptom Score), puncte	17,8	14,7	12	32,5
	Volumul prostatei, cm ³	42,4	42,9	38,6	8,9
	Viteza maximală a jetului de urină, ml/s	10,3	12,3	13,5	31,1