



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01151**

(22) Data de depozit: **14/11/2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/12/2015** BOPi nr. **12/2015**

(41) Data publicării cererii:
30/08/2013 BOPi nr. **8/2013**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ELECTROCHIMIE ȘI MATERIE
CONDENSATĂ - INCEMC TIMIȘOARA,
STR.DR.AUREL PĂUNESCU PODEANU
NR.144, TIMIȘOARA, TM, RO**

(72) Inventatori:
• **ȘTEFĂNUȚ MARIANA NELA,
STR.EMILE ZOLA NR.86, TIMIȘOARA, TM,
RO;**

• **CĂȚA ADINA ELENA, NR.197,
COMUNA BRĂNIȘCA, HD, RO;**
• **POP OANA RALUCA, STR.BOCȘA NOUĂ
NR.12, BOCȘA, CS, RO;**
• **TĂNASIE DAN CRISTIAN,
STR.MIHAI EMINESCU NR.1,
CARANSEBEȘ, CS, RO;**
• **BALCU IONEL, CALEA ARADULUI NR.10,
AP.59, TIMIȘOARA, TM, RO;**
• **BOC IOAN DANIEL, STR.IRIS NR.21,
BLB 13, ET.2, AP.12, TIMIȘOARA, TM, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**RO 106508 B1; RO 123136 B1;
RO 121369 B1; RO 125693 B1;
RO 110036 B1**

(54) **SUPLIMENT NUTRITIV CU PROPRIETĂȚI
HIPOGLICEMIANTE ȘI ANTIOXIDANTE, ȘI PROCEDEU
DE OBTINERE A ACESTUIA**



RO 128709 B1

Invenția se referă la un supliment nutritiv cu proprietăți hipoglicemizante și antioxidante, și la un procedeu de obținere a acestuia, pentru utilizare în industria alimentară și farmaceutică.

Este cunoscut faptul că diabetul zaharat se caracterizează clinic, prin polifagie, polidipsie și poliurie și, din nefericire, este din ce în ce mai des semnalat la copii. Apariția stresului oxidativ, ca o consecință a hiperglicemiei, este un fapt certificat de multe studii și joacă un rol esențial în fiziopatologia diabetului, în asociere cu depresia sistemului celular de apărare antioxidativă și producerea crescută de specii reactive de oxigen. Aportul de antioxidanți naturali în organism contribuie la menținerea sănătății, dar și la prevenirea sau limitarea unor maladii prin blocarea procesului de formare a radicalilor liberi.

Principiile active și posibilitățile de valorificare a unor specii vegetale autohtone au atras atenția cercetătorilor. Astfel au apărut diverse produse comercializate ca produse fitofarmaceutice, produse medicamentoase, suplimente alimentare sau suplimente nutritive naturale din fructe de pădure: afine (RO 115224 B1), afine și cătină (RO 121369 B1), coacăze negre, mure, fragi și zmeură (RO 123136 B1), fructe imature de *Mormordica charantia* L. (RO 116044 B), dar și din teci de fasole, frunze de afin, dud alb și mesteacăn (RO 106508 B1), frunze de afin, ridichi, salvie, mesteacăn, păpădie, cicoare, lemn dulce, coriandru, soc și teci de fasole (RO 125693 B1) și din plante și rădăcini de cultură: hrean, țelină, pătrunjel, morcov, varză, salată, ridichi și lămâie (RO 120123 B1).

Evidențierea efectelor hipoglicemizante și angioprotectoare ale mirtilinelor a condus la apariția de preparate farmaceutice elaborate: DIFRAREL (Franța) și DIFEBIOM (România), utilizate ca adjuvanți în tratamentul formelor ușoare de diabet, pentru reducerea dozelor de insulină în formele grave ale bolii sau în tratamentul afecțiunilor asociate acestei boli, Ciulei I., Grigorescu E., Stănescu U., "*Plante medicinale, fitochimie și fitoterapie*", (Tratat de farmacognozie, vol. 1, Editura Medicală, București, 1993, pp. 474-484).

Aceste preparate nu se mai produc, dar au apărut alte produse noi, comercializate ca suplimente nutritive naturale, cum ar fi: ERIDIAROM (Plantarom, Cluj), COMPLET ANTIOXIDANT și FITODIAB (S.C. Hofigal SA), DAITAB (Laboratoarele Star International), care au la bază extract total de afin și altele, produse bazate pe plante exotice, combinate uneori cu plante autohtone cum ar fi DIABETIN (Laboratoarele Medica) bazat pe *Mormordica*, ginseng alb și teci de fasole și DIABECON (Laboratoarele Himalaya) care conține *Gymnema sylvestre*.

Purificarea antocianilor se poate efectua prin modificarea pH-ului (6,5...9), precipitare, spălare cu metanol și acetonă, urmată de uscare (RO 110036 B1).

Soluțiile tehnice menționate mai sus prezintă următoarele dezavantaje:

- utilizarea materiilor prime uscate cu un conținut mic de substanțe active;
- timp de extracție îndelungat;
- productivitate redusă și spații extinse de depozitare (ex. macerare).

Problema tehnică, propusă spre rezolvare de prezenta invenție, constă din obținerea unui supliment nutritiv cu proprietăți hipoglicemizante și antioxidante din fructe indigene, proaspete sau congelate.

Suplimentul nutritiv, conform invenției, elimină dezavantajele menționate prin aceea că este constituit din extracte purificate din *Vaccinium myrtillus* L. 20...40 părți, *Rubus fruticosus* L. 30...40 părți și *Morus nigra* L. 30...40 părți, părțile fiind exprimate în volume.

Procedeu conform invenției elimină dezavantajele menționate prin aceea că este alcătuit dintr-o primă etapă de extracție a antocianinelor din fructe alese de *Vaccinium myrtillus* L., *Rubus fruticosus* L. și *Morus nigra* L., în câmp ultrasonor, la 59 kHz, timp de 10...60 min, la 23...27°C, utilizându-se un raport masă fruct:volum agent de extracție de tip etanol 80% acidulat cu 0,1% HCl, de 1:4, după care extractul este filtrat și se supune evaporării sub vid, la

temperatura de 35...40°C, până la eliminarea completă a alcoolului, concentratul rezultat este centrifugat la 6000 rot/min, timp de 20 min, iar partea supranatantă este supusă purificării, rezultând extractul crud, care în continuare este spălat cu acetat de etil, pentru îndepărtarea fenolilor cu molecule mici și apoi introdus pentru purificare, într-o coloană cu umplutură, cu eluant metanol și/sau amestec metanol-apă acidulată, din care rezultă un concentrat de antocianine care se supune evaporării sub vid până la îndepărtarea completă a alcoolului și este apoi caracterizat prin cromatografie HPLC-DAD și spectrofotometrie UV-VIS, iar în final se efectuează amestecarea cu omogenizare a 20...40 părți *Vaccinium myrtillus* L., 30...40 părți *Rubus fruticosus* L. și 30...40 părți *Morus nigra* L., și condiționarea cu acid ascorbic și sorbat de potasiu, din care rezultă un produs lichid vâscos, roșu-violaceu, cu miros fructat, având un conținut de antocianine monomere de 5000...8000 mg/l.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- conținutul ridicat de antocianine asigură un efect hipoglicemiant semnificativ;
- conținutul ridicat de polifenoli asigură un puternic caracter antioxidant;
- temperaturi scăzute la extracție care nu permit deteriorarea compușilor activi din fructe;
- timp redus de extracție pentru un raport de 1:4 masă fruct:volum agent de extracție;
- randamente mari de extracție a antocianinelor;
- eliminarea fenolilor cu mase moleculare mici, a zaharurilor libere și a acizilor solubili;
- asigurarea unui raport riguros între compușii naturali extrași din fructe în etapa de amestecare-omogenizare;
- principiile active ale suplimentului propus nu au determinat modificări asupra aspectului exterior, comportamentului motor sau agresivității animalelor supuse testelor experimentale.

Conform invenției, procedeul de obținere a suplimentului nutritiv cuprinde trei etape: extracția, purificarea și amestecarea-omogenizarea.

Extracția

Extractul din fiecare fruct (proaspăt sau congelat, zdrobit în prealabil) a fost obținut prin metoda de extracție în câmp ultrasonor, la 59 kHz, timp de 10...60 min, la 23...27°C, în etanol 80% acidulat cu 0,1% HCl, utilizându-se un raport de 1:4 masă fruct:volum agent de extracție. După filtrare, extractul se supune evaporării sub vid, la temperatura de 35...40°C, până la eliminarea completă a alcoolului. Concentratul rezultat este centrifugat la 6000 rot/min, timp de 20 min, iar partea supranatantă este decantată și apoi supusă purificării.

Purificarea

Extracția antocianinelor este întotdeauna însoțită și de extracția unor acizi fenolici, zaharuri și taninuri, necesitând, la final, mai multe etape de purificare și separare. După ce a fost spălat cu acetat de etil pentru îndepărtarea fenolilor cu molecule mici, fiecare extract crud se introduce, pentru purificare, într-o coloană cu umplutură Amberlite XAD 7 și este spălat cu apă bidistilată acidulată (0,1% HCl), pentru eliminarea zaharurilor și acizilor solubili. Eluarea antocianinelor de pe coloană s-a realizat cu metanol și/sau amestec metanol-apă acidulată. Concentratul obținut a fost supus evaporării sub vid până la îndepărtarea completă a alcoolului și a fost caracterizat prin cromatografie HPLC-DAD și spectrofotometrie UV-VIS pentru evidențierea antocianinelor.

Amestecarea și omogenizarea

Suplimentul nutritiv bogat în antocianine cu proprietăți hipoglicemiant și antioxidante este alcătuit, conform invenției, prin amestecare și omogenizare sub agitare a unor părți inegale de extracte purificate din *Vaccinium myrtillus* L. 20...40 părți, *Rubus fruticosus* L. 30...40 părți și *Morus nigra* L. 30...40 părți, părțile fiind exprimate în volume.

Se dau, în continuare, 3 exemple de realizare a invenției.

RO 128709 B1

Exemplul 1. Se colectează fructele de *Vaccinium myrtillus* L, *Rubus fruticosus* L. și *Morus nigra* L, care în prealabil au fost sortate, și se zdrobesc, după care se amestecă în raport de 1:4, cu agentul de extracție de tip etanol 80% acidulat cu 0,1% HCl și se supun unei etape de extracție asistată de ultrasunete în următoarele condiții: 59 kHz, timp de 10...60 min, la 23...27°C. După filtrare, agentul de extracție se elimină prin evaporare sub vid. Urmează purificarea în condițiile prezentate anterior și apoi procesul de amestecare și omogenizare sub agitare, a unor părți inegale de extracte purificate din *Vaccinium myrtillus* L. 20...40 părți, *Rubus fruticosus* L. 30...40 părți și *Morus nigra* L. 30...40 părți, părțile fiind exprimate în volume.

Exemplul 2. Suplimentul nutritiv bogat în antocianine conform invenției, obținut ca în exemplul 1, este condiționat cu 1% acid ascorbic.

Exemplul 3. Suplimentul nutritiv bogat în antocianine, obținut conform invenției și realizat ca în exemplul 2, este condiționat cu 0,05% sorbat de potasiu.

Produsul rezultat are următoarele caracteristici, prezentate în tabel.

Tabel

Aspect	lichid vâscos, roșu-violaceu, cu miros fructat
Conținut de antocianine monomere	5000..8000 mg/l eq Cianidin-3-glucozida
Activitate antioxidantă	100...130 eq Trolox/l
Total fenoli	13000...17000 eq acid galic/l
Substanță uscată solubilă	250...400 mg/g

Teste clinice

Compoziția suplimentului nutritiv conform invenției a fost stabilită în urma unor studii *in vitro* și *in vivo*. Testările clinice au fost efectuate pe loturi de șobolani cu semnificație statistică, masculi, în greutate de 150 ± 10 g. Animalele provenite din crescătorie au fost acclimatizate timp de 2...3 zile în laborator, pentru a se obișnui cu noul habitat și cu regimul de hrană. Hrana utilizată este standardizată (INCMI Cantacuzino, București), iar suplimentul nutritiv bogat în antocianine cu proprietăți hipoglicemice și antioxidante este administrat în apa de băut. Pentru inducerea diabetului, șobolanilor li s-a injectat intraperitoneal o singură doză de 100 mg/kg de streptozotocină. Toți șobolanii cu o concentrație de glucoză în sânge > 200 mg/dl au fost selecțati și împărțiți în trei loturi: unul diabetic netratat (lot martor), unul diabetic tratat cu metformin (medicament de sinteză) solubil în apa de băut și ultimul lot diabetic tratat cu supliment nutritiv bogat în antocianine.

Interpretarea statistică a rezultatelor a fost realizată cu ajutorul OriginPro 8 software, testul ANOVA. Nu s-au înregistrat modificări semnificative statistic asupra greutății corporale a animalelor și nu s-au observat modificări ale aspectului exterior, al comportamentului motor sau al agresivității animalelor tratate.

1. Supliment nutritiv cu proprietăți hipoglicemizante și antioxidante, **caracterizat prin aceea că este constituit din extracte purificate din *Vaccinium myrtillus* L. 20...40 părți, *Rubus fruticosus* L. 30...40 părți și *Morus nigra* L. 30...40 părți, părțile fiind exprimate în volume.**

2. Procedeu de obținere a suplimentului nutritiv definit la revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că este alcătuit dintr-o primă etapă de extracție a antocianinelor din fructe alese de *Vaccinium myrtillus* L, *Rubus fruticosus* L. și *Morus nigra* L. în câmp ultrasonor, la 59 kHz, timp de 10...60 min, la 23...27°C, utilizându-se un raport masă fruct:volum agent de extracție de tip etanol 80% acidulat cu 0,1% HCl, de 1:4, după care amestecul este filtrat și se supune evaporării sub vid, la temperatura de 35...40°C, până la eliminarea completă a alcoolului, concentratul rezultat este centrifugat la 6000 rot/min, timp de 20 min, iar partea supranatantă este decantată și apoi supusă purificării, rezultând extractul crud, care în continuare este spălat cu acetat de etil pentru îndepărtarea fenolilor cu molecule mici, fiecare extract crud spălat, se introduce pentru purificare, într-o coloană cu umplutură cu eluant metanol și/sau amestec metanol-apă acidulată, din care rezultă un concentrat de antocianine care se supune evaporării sub vid până la îndepărtarea completă a alcoolului și este caracterizat prin cromatografie HPLC-DAD și spectrofotometrie UV-VIS, iar în final, se efectuează amestecarea cu omogenizare a 20...40 părți *Vaccinium myrtillus* L, 30...40 părți *Rubus fruticosus* L. și 30...40 părți *Morus nigra* L, și condiționarea cu acid ascorbic și sorbat de potasiu, din care rezultă un produs lichid vâscos, roșu-violaceu, cu miros fructat, având un conținut de antocianine monomere de 5000...8000 mg/l.**

