



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00114**

(22) Data de depozit: **15/03/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/08/2021 BOPI nr. **8/2021**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **CONSTANTINESCU-ARUXANDEI DIANA,
ȘOS.MIHAI BRAVU, NR.297, BL.15A, SC.A,
ET.1, AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **DIMITRIU LUMINIȚA, ALEEA BARAJULUI
BICAZ, NR.9, BL.M31, SC.B, ET.2, AP.408,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BĂRBIERU OTILIA GABRIELA,
STR.GHEORGHE DOJA, NR.5, BL.7A, SC.4,
ET.1, AP.62, GALAȚI, GL, RO;**
• **DEȘLIU-AVRAM MĂLINA, STR. GÂRLENI
NR. 4, BL. C85, SC. A, ET. 6, AP. 40,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BALA IOANA, STR. POIANA CU ALUNI,
NR.1, BL.4, SC.4, ET.4, AP.60, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **TRITEAN NAOMI,
STR. PERFECȚIONĂRII, NR.11, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **COMPOZIȚIE SINERGICĂ PE BAZĂ DE MIERE, PROCEDEU
DE OBTINERE A ACESTEIA ȘI PROCEDEU DE UTILIZARE
PENTRU PRODUSE DERMATOCOSMETICE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei compoziții sinergice utilizată pentru produse dermatocosmetice. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de: determinare spectrofotometrică a activității antioxidante de captare a radicalului 2,2-difenil-1-picrililhidrazil (DPPH) a unei probe de miere polifloră, efectuarea unui spectru Raman 532 nm pentru dozarea acidului ferulic și resveratrol dizolvați în solvent hidro-

fob, dozarea soluției uleioase de polifenoli și chitosan cu omogenizare prin ultrasonicare la o putere de 400 W, la temperatura de 30°C, rezultând o compoziție de miere cu structură omogenă și stabilitate microbiologică, compatibilă cu bazele grase din componența produselor dermatocosmetice.

Revendicări: 5



COMPOZIȚIE SINERGICĂ PE BAZĂ DE MIERE, PROCEDEU DE OBTINERE A
ACESTEIA ȘI PROCEDEU DE UTILIZARE PENTRU PRODUSE
DERMATOCOSMETICE

Prezenta invenție se referă la o compoziție sinergică pe bază de miere, la un procedeu de obținere a acesteia și la un procedeu de utilizare a respectivei compoziții pentru obținerea de produse dermatocosmetice.

Sunt cunoscute diferite compoziții pe bază de miere pentru utilizări cosmetice. Mierea este o materie primă importantă pentru cosmetice, fiind inclusă în Nomenclatura Internațională a Ingredientelor Cosmetice (INCI) ca produs hidratant / humectant / emolient (Gottschlack & McEwen, 2010). Mierea este utilă în produsele de îngrijire a pielii, iar aplicarea sa regulată contribuie la prevenirea îmbătrânirii pielii și la reducerea formării ridurilor (Pavlačková, Egner, Slavík, Mokrejš, & Gál, 2020). Mierea este utilizată în proporții variabile în funcție de tipul de cosmetice. În general, o concentrație relativ redusă (0,5–5%) este utilizată pentru spume de curățare, creme și emulsii. O concentrație mai mare de miere (10-15%) este utilizată pentru unguente. În intervalul de concentrații 1-10% mierea este cel mai frecvent utilizată în produse cum ar fi unguente pentru buze, lapte de curățat corp, creme sau geluri hidratante, produse pentru plaje, loțiuni tonice, șampoane și balsamuri. În concentrații de până la 70% mierea este utilizată pentru combinații măști de față (Burlando & Cornara, 2013).

În produsele cosmetice mierea îndeplinește atât funcția de matrice / ingredient de bază, cât și pe cea de ingredient activ, în special datorită activității sale antioxidante și antimicrobiene. Activitatea antioxidantă este datorată diferitelor tipuri de polifenoli, în special acizi hidroxicinamici și flavonoide (Kurek-Górecka, Górecki, Rzepecka-Stojko, Balwierz, & Stojko, 2020). Activitatea anti-microbiană a mierii poliflore este datorată unei combinații de polifenoli, care acționează asupra enzimelor implicate în metabolismul acizilor nucleici bacterieni (Nolan, Harrison, & Cox, 2019) și apă oxigenată, formată atât prin auto-oxidarea polifenolilor, cât și datorită glucozoxidazei din miere (Brudzynski, 2020), în sinergie cu acidul gluconic (Masoura, Passaretti, Overton, Lund, & Gkatzionis, 2020). Principalele dezavantaje ale mierii în produsele cosmetice sunt: (i) reproductibilitatea redusă a efectelor biologice datorită variabilității ridicate a mierii naturale (Hermanns et al., 2020); (ii) limitărilor induse în prelucrarea produselor cosmetice datorate stabilității microbiologice a mierii în funcție de activitatea apei

(Chen, 2019), și (iii) compatibilitatea redusă cu bazele grase / hidrofobe utilizate în produsele cosmetice (Mahesh, Fathima, & Veena, 2019).

Pentru a se reduce dezavantajul asociat reproductibilității reduse datorită variabilității ridicate a mierii au fost descrise diferite procedee de îmbogățire în ingrediente active, în special polifenoli. Așa cum s-a arătat și mai sus, principalele ingrediente active din miere sunt polifenolii, în special acizii fenolici și flavonoidele (Cianciosi et al., 2018) și proteinele, cu activitate enzimatică, de ex. glucozoxidaza, sau cu activitate antimicrobiană directă, cum este defensina-1 (López-Urbe, Fitzgerald, & Simone-Finstrom, 2017). Polifenolii, fiind mai ușor de extras și/sau de introdus în miere, sunt compușii utilizați preponderent pentru îmbogățirea mierii în vederea obținerea unei compoziții standardizate, cu activitatea biologică reproductibilă.

Mierea este un produs natural extrem de complex, un amestec de molecule cu o mare diversitate structurală și funcțională. Zaharidele care constituie baza mierii, respectiv fructoza, glucoza, și (într-o mică măsură) zaharoza, provenite din soluțiile de origine vegetală, nectar sau mană, sunt concentrate în fagurii din stup până la circa 82% substanță uscată. În această soluție suprasaturată, apa liberă este în cantitate foarte mică. Sistemul acesta molecular, atât de aglomerat în zonele cu apă liberă ("buzunare de apă"), determină formarea unor complexe ale principalelor ingrediente active, proteine – polifenoli, în care se manifestă predominant caracterul pro-oxidant al formelor chinonice ale polifenolilor (Brudzynski, Sjaarda, & Maldonado-Alvarez, 2013). Respectiv complexele polifenoli – proteine se asociază în particule coloidale. Desfacerea acestor particule coloidale complexe, care includ proteine biologice active, ca defensina și glucozoxidaza, complexate reversibil cu polifenoli, în nanostructuri bioactive se realizează prin diluarea mierii la aplicare și este esențială pentru manifestarea activității biologice specifice mierii, ca de ex. activitatea anti-microbiană (Brudzynski et al., 2017). Îmbogățirea mierii necesită deci introducerea polifenolilor exogeni fortifianți în acel spațiu molecular aglomerat, cu apă liberă în cantitate redusă, în care sunt formate particulele coloidale implicate în activitatea biologică a mierii.

Cererea de brevet EP3085356 A1 descrie un procedeu de obținere a mierii cu extracte de plante, în care difuzia ingredientelor extrase este favorizată de amestecarea mierii cu solvenți organici. Procedul include următoarele etape: extracția materialului vegetal, întreg sau măcinat, uscat sau proaspăt, cu un solvent organic; separarea părților de plante rămase neextrase de extractul lichid prin presare și filtrare; adăugarea mierii în extractul de plante, într-o proporție variind de la 10 la 90% în

greutate, cu agitare continuă; îndepărtarea excesului de solvent din amestecul de miere și extract de plante prin distilare sub vid la o temperatură sub 60°C, cu amestecare constantă, până când conținutul de apă din miere este sub 20%. Compoziția rezultată este alcătuită din extracte din muguri de conifere, genurile *Picea*, *Abies* sau *Pinus*, sau din extracte de plante medicinale - echinacea, sunătoare, roiniță, mentă, cimbru, salvie sau coajă de banane pentru gătit. Solvenții folosiți sunt etanol, propanol, izopropanol, acetat de etil, acetonă, propan sau hexan. În cazul procedurii descrise de cererea de brevet EP3085356 A1 omogenizarea este favorizată de folosirea soluțiilor de solvenți organici. Solvenții organici, în special cei miscibili cu apa, pot afecta stabilitatea particulelor coloidale și a complexelor proteine – polifenoli. Solvenții organici, propan sau hexan, care ar afecta mult mai puțin stabilitatea particulelor coloidale, pentru că nu ar influența disponibilitatea apei libere, au însă o acceptanță redusă din partea consumatorilor și nu pot fi utilizați pentru procesarea produselor ecologice / organice. De asemenea, procedeul prezintă dezavantajul utilizării unei etape de încălzire, care este consumatoare de energie și care favorizează formarea hidroxi-metil-furfural, HMF, un compus considerat ca reducând calitatea mierii (Shapla et al. 2018. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 35).

Cererea de brevet WO 2017053708 A1 prezintă un procedeu de obținere a unei compoziții de miere îmbogățită cu componente vegetale prin infuzare. Mierea utilizată are un conținut de umiditate de 15% până la 19% (g/g). Procedeul include adăugarea unui material vegetal de infuzare în miere pentru a forma o compoziție de miere infuzată / îmbogățită în ingrediente active vegetale. Mierea poate fi uscată înainte de adăugarea materialului de infuzare, după adăugarea materialului de infuzare sau atât înainte, cât și după adăugarea materialului de infuzare. Materialul de infuzare este un extract apos sau un suc extras prin presare, din fructe, semințe, pielețe, tulpini, rădăcini sau frunze. În acest caz omogenizarea este favorizată de aplicarea unei soluții apoase. Riscul de fermentare este ridicat, inclusiv datorită faptului că mierea inițială are un nivel de umiditate de peste 17,2%. Reconcentrarea / uscarea mierii, necesară pentru menținerea stabilității microbiologice, este consumatoare de energie, produce HMF și determină denaturarea proteinelor co-implicate în acțiunea anti-microbiană a polifenolilor (Kwakman & Zaat, 2012, *IUBMB life*, 64, 48-55).

Cererea de brevet RU 2013156750 (A) se referă la un procedeu de obținere prin agitare viguroasă a unui produs care conține: miere – 96%, păstură - 2,0% și extract alcoolic din plante - 2,0%. Extractul alcoolic este reprezentat de extract de rădăcini de

lemn dulce, de boabe de păducel, de semințe de silimarină, de plante de oregano, de rădăcină de brusture sau de mătase de porumb. Procedul nu se poate aplica decât la proporții mici de extract în miere, iar folosirea alcoolului etilic afectează stabilitatea particulelor coloidale și a complexelor proteine – polifenoli și limitează utilizarea produsului rezultat final.

Cererea de brevet RO 130739 A0 prezintă un procedeu de îmbunătățire a activității antioxidante a mierii. Procedul constă în extragerea compușilor activi din afine de pădure liofilizate, după care extractul hidro-alcoolic antocianic este concentrat la vid și amestecat în miere de salcâm monofloră, într-o cantitate de 1 ... 10%, produsul rezultat având un conținut total de antociani totali de 8,6...74,8 mg / 100 g, de polifenoli totali de 41 ... 185,7 mg / 100 g și o activitate antioxidantă totală de 3 ... 22,8 mg echivalent acid ascorbic / 1 ml de produs. Dezavantajul procedurii rezultă din faptul că extractul de afine folosit este un extract total, care are un conținut foarte ridicat de oligo- și monozaharide provenite din afine. Omogenizarea extractului crud total de afine în miere este relativ dificil de realizat, datorită prezenței acestor oligo- și monozaharide în cantitate mare. Introducerea unei cantități semnificative de componente străine în miere afectează stabilitatea particulelor coloidale și a complexelor proteine – polifenoli.

Solvenți alternativi pentru extracția polifenolilor din materialul vegetal sunt uleiurile vegetale (Yara-Varón et al. 2017. *Molecules*, 22(9), 1474). O astfel de soluție, de utilizare a uleiului vegetal ca solvent alternativ la solvenții organici de tipul hexanului, este descrisă în brevetul US 7557146 B, pentru a extrage licopenul din diferite produse obținute prin procesarea tomatelor. O astfel de soluție tehnică, în care se utilizează uleiuri vegetale ca solvent pentru polifenoli, nu a fost însă utilizată pentru îmbogățirea mierii.

Mierea este considerată un exemplu de produs biologic care are caracteristici de solvent din componente naturale care exprimă un efect eutectic semnificativ – NaDES, **Natural Deep Eutectic Solvent** (a se vedea de ex. Liu et al. 2018, *Journal of natural products*, 81, 679-690). Denumirea de eutectic provine de la cuvântul grecesc *eútēktos* care semnifică ușor de topit, și se referă la efectul de reducere a temperaturii de topire a unor amestecuri de substanțe, care apare în cazul interacției dintre doi sau mai mulți compuși, aflați în amestec în rapoarte molare bine determinate.

Solvenții eutectici sunt cunoscuți pentru capacitatea lor de a solubiliza polifenoli (Ruesgas-Ramón et al. 2017. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65, 3591-3601). Brevetul SUA 9 441 146 B include mierea ca unul din exemple de solvenți

eutectici care pot fi utilizați pentru extragerea materialelor biologice, dar nu revendică utilizarea mierii pentru extracția polifenolilor din material vegetal, revendicând alți solvenți eutectici asemănători – ca de ex. lactoză, glucoză și apă într-un raport molar de 5:1:2 sau acid malic acid, alanină și apă într-un raport molar de 1:1:3. Solvenții eutectici au fost utilizați și pentru a extrage polifenolii din uleiurile vegetale (García et al. 2016. *Food chemistry*, 197, 554-561).

Extracția materialului vegetal direct în miere este revendicată de cererea de brevet CN 107836684 A. Procedul descris de această invenție implică recoltarea materialului vegetal, respectiv flori, și îndepărtarea impurităților, uscarea și măcinarea florilor, adăugarea pulberii de flori la miere și încălzirea la 110-115°C, efectuarea unei scurte agitări, timp de 10-60 s, urmată de răcirea rapidă la temperatura camerei și macerarea la temperatura camerei timp de 7 zile. Separarea mierii de materialul vegetal se face prin încălzire și filtrare. În final mierea îmbogățită cu extracte din flori este uscată la 40-60°C, până când conținutul de apă este de 20-22% și greutatea specifică este de 1,32-1,34. Produsul final păstrează aroma specifică a diferitelor tipuri de flori și include fitonutrienți valoroși pentru menținerea stării de sănătate a omului. Etapele de încălzire repetată afectează stabilitatea particulelor coloidale și a complexelor proteine – polifenoli și favorizează producerea de HMF. Iar etapa de filtrare, destinată să înlăture materialul vegetal fin măcinat, reduce semnificativ și conținutul de polen din miere. Polenul este însă un indicator de calitate pentru miere, deoarece conferă o valoare biologică suplimentară mierii și este esențial pentru a verifica originea botanică și geografică a mierii (Bogdanov et al. 1999. *Bee World*, 80, 61-69), deci reducerea conținutului de polen din miere reprezintă un alt dezavantaj al acestui procedeu.

Sunt cunoscute și o serie de procedee prin care mierea este amestecată direct cu diferite materii prime vegetale, care sunt lăsate apoi să se macereze în miere. Invenția se referă la un supliment alimentar pe bază de miere. Cererea de brevet RO 132420 A0 descrie un produs constituit din 74 ... 97% miere și, pentru restul, polen uscat și / sau propolis și eventual pulberi și tincturi de plante medicinale selectate dintre *Chlorella*, *Spirulina*, lucernă, grâu verde, orz, ovăz, floarea-pasiunii, hamei, rădăcină de valeriană, lavandă, cuișoare, pelin, menta, oregano, cimbru, cătină, curcuma, eucalipt, ulei esențial de levănțică, mentă sau ceai. Brevetul RO 120683 B1 revendică un produs constituit din 30 ... 50 părți în greutate granule proaspete de polen entomofil care nu sunt tratate termic și 50 ... 70 părți în greutate miere de albine tratată termic, care se

obține prin macerarea polenului în miere timp de 7 - 8 zile, la o temperatură cuprinsă între 10 și 25°C. Dezavantajul comun al acestor procedee de macerare cu lăsarea materialului vegetal în miere este asociat reducerii stabilității mieri ca urmare a introducerii unor hidrocoloizi (fibre vegetale) în cantitate mare. Hidrocoloizii sunt cunoscuți pentru capacitatea lor de a funcționa ca absorbenti de umiditate în amestecurile de dizaharide cu apă (Van der Sman, 2013. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 186-194). Absorbția de apă din atmosferă determină creșterea activității apei și reducerea stabilității microbiologice. În plus, materialul vegetal lăsat în miere modifică substanțial comportamentul mieri ca ingredient pentru cosmetice.

Mierea este susceptibilă la degradare microbiologică. În mod obișnuit activitatea apei în miere este mai mică de 0,6, ceea ce-i conferă stabilitate microbiologică, întrucât microorganismele se dezvoltă la o activitate a apei de peste 0,6. Dar această activitate a apei poate crește datorită proceselor de diluție a clusterelor / "buzunarelor" de apă sau datorită cristalizării ca urmare a extragerii clusterelor de apă (Subbiah, Blank, & Morison, 2020). În general, datorită stabilității microbiologice scăzute induse de mierea introdusă în emulsiile multiple apă-ulei sau ulei-apă, compozițiile pe bază de miere necesită o cantitate ridicată de agenți de conservare. Brevetul RU2589279 C1 prezintă o compoziție care include miere / extract de miere și ca agenți de conservare sorbat de potasiu, până la 0,3%, benzoat de sodiu, până la 0,5% și alcool benzilic, cel puțin 1%, de preferat 2%. Deși compoziția se revendică liberă de parabeni, proporția de conservanți chimici tinde să depășească 2%, ceea ce este dificil de acceptat de consumatorii avizați.

Cererea de brevet RO133390 A0 se referă la o compoziție de miere îmbogățită în polifenoli care are un conținut de polifenoli de cel puțin 600 mg echivalent acid galic per kg de miere și o activitate antioxidantă TEAC, de stingere a radicalului anionic ABTS, 2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolin-6-sulfonat), de cel puțin 300 echivalent μ mol trolox per 100 grame de miere. Procedul de obținerea este alcătuit din următoarele etape: măcinarea umedă a materialului vegetal și amestecarea cu apă; adăugarea unui amestec de enzime, alcătuit din hidrolaze care acționează asupra polizaharidelor din peretele celular și feruol-esteraze, urmată de extragerea asistată enzimatic a materialului vegetal în apă; ultrafiltrarea tangențială continuă a amestecului de material vegetal – apă – enzimă, începând din ora a 2-a, cu întoarcerea retentatului în masa de extracție asistată enzimatic; extracția în contracurent lichid-lichid pe contactor membranar a permeatului, cu ulei vegetal, la temperatura de 45°C, cu reîntoarcerea în

masa de permeat a permeatului extras; re-extracția uleiului vegetal în care s-au extras polifenoli în contra-curent lichid-lichid pe contactor membranar, față de mierea care se dorește a fi îmbogățită în polifenoli; recuperarea mierii îmbogățite în polifenoli, recuperarea uleiului vegetal și reutilizarea lui pentru un nou ciclu de extracție. Procedeu descris permite includerea polifenolilor exogeni fortifianți în acel spațiu molecular aglomerat, cu apă liberă în cantitate redusă, în care sunt formate particulele coloidale implicate în activitatea biologică a mierii, dar nu rezolvă problema compatibilității reduse a mierii cu bazele grase utilizate pentru realizarea emulsiilor cosmetice.

Pentru a realiza o compoziție cosmetică pe bază de miere și peptide bioactive, în formulări de tip creme și unguente, brevetul FR2957252 B1 utilizează selectiv miere de trifoi (*Trifolium repens*), miere de cimbru (*Thymus vulgaris*) sau miere de Manuka (*Leptospermum scoparium*) și diferiți alți excipienți, ca agenți activi de suprafață, agenți reologici, parfumuri, electroliți, regulatori de pH, antioxidanți, conservanți. Dezavantajul este restricționarea utilizării unor tipuri specifice de miere poliflorală, dificil de obținut și de implementat.

Sunt cunoscute diferite compoziții sinergice pe bază de acid ferulic și/sau acizi hidroxicinarnici înrudiți și resveratrol și, eventual, alte ingrediente. Brevetul KR 102182794 B1 prezintă o metodă de obținere a unei compoziții de resveratrol și acid ferulic acid prin emulsifiere ultrasonică și injecție de gaz sub presiune. Brevetul EP 2906037 (B1) revendică o compoziție antioxidantă sinergică formată dintr-un flavonoid, selectat din grupul constând din baicalină și taxifolin, acid ferulic și cel puțin un antioxidant suplimentar selectat din grupul constând din vitamina C și resveratrol, destinată utilizării în produse cosmetice. Cererea de brevet WO2020104533A1 se referă la utilizarea unei compoziții care include compuși bioactivi extrași din *Vitis vinifera* și *Vaccinium angustifolium*, amestecul cuprinzând: cel puțin 1% catechine și / sau epicatechine, procentul fiind raportat la greutatea totală a amestecului; cel puțin 5 ppm (părți per milion în amestec) de acid ferulic și cel puțin 200 ppm de resveratrol, ca doză unică la oameni sau animale, pentru a îmbunătăți sau a menține funcțiile cognitive. Acest tip de combinații sinergice nu au fost încă utilizate împreună cu mierea pentru produse cosmetice.

Autorii acestei invenții au găsit că mierea amplifică semnificativ synergismul dintre acidul ferulic și resveratrol.

Un dezavantaj suplimentar în utilizarea mierii pentru produse cosmetice este determinat de variabilitatea ridicată a mierii de albine, în special a celei poliflore (Isopescu et al., 2014; Scholz et al., 2020), care influențează reproductibilitatea efectelor mierii, pentru că, așa cum s-a precizat mai sus, activitatea biologică a mierii este determinată de conținutul de compuși bioactivi acumulați de albine din natură, în special polifenoli.

În plus, utilizarea mierii pentru amestecare cu bazele cosmetice grase presupune operarea la temperaturi de peste 50°C, pentru a menține fluiditatea componentelor hidrofoabe și a facilita formarea emulsiilor. Mierea expusă la peste 35-40°C accelerează formarea hidroximetilfurfuralului, HMF (Fallico, Zappala, Arena, & Verzera, 2004). HMF este un compus care este strict reglementat în miere - de ex. Directiva 2001/110/CE privind mierea. Formarea HMF afectează activitatea antioxidantă și antibacteriană a mierii (Stojkovic et al., 2021).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o compoziție pe bază de miere de diverse origini, inclusiv miere polifloră, care să aibă: (i) activități biologice, antioxidantă și antimicrobiană, reproductibile; (ii) o stabilitate microbiologică crescută și (iii) o compatibilitate crescută cu bazele grase utilizate pentru realizarea de creme cosmetice.

Este un alt obiect al acestei invenții de a descrie un procedeu prin care să se obțină o compoziție care să aibă reproductibile caracteristicile compoziției descrise mai sus.

Este un alt obiect al acestei invenții de a descrie un procedeu prin care compoziția pe bază de miere să fie utilizată pentru a realiza produse cosmetice fără a se încălzi mierea peste 35°C.

Compoziția sinergică pe bază de miere, conform invenției, are o activitate antioxidantă de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil, de cel puțin 35 mg echivalent acid ascorbic per 100 grame produs și este alcătuită din 88,2-90.2 grame miere polifloră, 8 – 10 grame amestec de solvenți hidrofoabi care conțin 0,4-0,5 grame acid ferulic și 0,016 – 0,02 grame de resveratrol și 1,8 grame chitosan.

Chitosanul este un chitosan provenit din ciuperci, are o masă moleculară de 260-280 kDa și un grad de deacetilare de 85-88%.

Amestecul de solvenți hidrobi este alcătuit din 75 grame cetil-palmitat și 25 grame acid oleic, sau din trigliceride caprice / caprilice.

Procedeul conform invenției implică următoarele etape.

- ✓ Determinarea spectrofotometrică a activității antioxidante de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil pentru o probă de miere polifloră;
- ✓ Efectuarea unui spectru Raman 532 nm și stabilirea relațiilor de proporționalitate între picul de la 630 cm^{-1} și activitatea antioxidantă de captare a radicalului DPPH;
- ✓ Dizolvarea prin ultrasonicare, timp de 5 min intermitent câte 30 s, la o putere de min 400 W, a 5 grame de acid ferulic și a 0,2 grame de resveratrol în 100 grame amestec de solvenți hidrofobi.
- ✓ Aducerea peste 882-902 grame de miere a 80 -100 grame de soluție uleioasă de polifenoli și a 18 grame de chitosan, în funcție de activitatea inițială antioxidantă de captare a radicalului DPPH a mierii poliflore, de la 2,4 la 2,8 mg echivalent acid ascorbic per 100 grame produs, și omogenizarea prin ultrasonicare timp de 5 min intermitent câte 30 s, la o putere de min 400 W, cu menținerea temperaturii la 30°C ;
- ✓ Repetarea etapelor de mai sus de câte ori este nevoie pe același tip de miere, pornind de la efectuarea unui spectru Raman, pentru a efectua un control rapid preventiv, care să permită dozarea polifenolilor dizolvați în solvent hidrofob în funcție de activitatea antioxidantă inițială a mierii.

Procedeul de utilizare a compoziției sinergice pe bază de miere constă în următoarele etape.

- ✓ Obținerea unui amestec eutectic hidrofob prin omogenizarea la temperatura de 60°C a 10 moli de dodecanol, respectiv 1863,4 grame, cu 10 moli de acid capric, respectiv 1442,1 grame;
- ✓ Răcirea amestecului la 30°C și omogenizarea în acest amestec eutectic a compoziției pe bază de miere, în raport 30-40 grame compoziție de miere la 60-70 amestec eutectic.

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje.

- ✓ Crește activitatea biologică a mierii datorită adăugării unei combinații sinergice acid ferulic – resveratrol, a cărei activitate sinergică este amplificată de miere;
- ✓ Crește reproductibilitatea acestei activități biologice datorită dozării combinației sinergice acid ferulic – resveratrol în funcție de activitatea antioxidantă inițial existentă în miere;
- ✓ Permite ridicarea rapidă la scară datorită utilizării pentru controlul adaptativ de reglare de tip *feedforward* a unei metode spectroscopice rapide;
- ✓ Menține structura mierii, cu aglomerare ridicată de compuși bioactivi în zonele apoase, pentru că nu diluează mierea cu apă / solvenți hidrofilii și nu alterează structura

"buzunarelor de apă" implicate în formarea sistemelor complexe asociate activității biologice a mierii;

- ✓ Crește stabilitatea microbiologică a mierii, datorită activității antimicrobiene a chitosanului și a acidului ferulic și menținerii activității apei sub valoarea de 0,6;
- ✓ Crește compatibilitatea compoziției rezultate cu bazele grase datorită efectului emulgator al polifenolilor și al chitosanului;
- ✓ Permite omogenizarea mierii în baze grase la temperaturi mai mici de 35°C datorită utilizării ca bază grasă a unui amestec eutectic constituit din dodecanol și acid capric, amestecul eutectic reducând semnificativ temperatura de topire a ingredientelor.

În continuare se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o limita.

Exemplul 1. Se ia o probă de miere dintr-un lot dat de miere polifloră. Amestecul de reacție a constat în adăugarea a 100 μ l de probă și 100 μ l de soluție de radical DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil, 0,3 mM în etanol. Când DPPH reacționează cu un compus antioxidant, care poate dona hidrogen, acesta este redus, variind culoarea de la violet la galben deschis. Citirea absorbanței probei tratate se realizează la $\lambda=517$ nm după 30 min de reacție, folosind un spectrofotometru UV-VIS – de exemplu Chem-System UV-VIS absorbantă, StellarNet, Tampa, FL, US. Se lucrează în triplicat, cu un standard de acid ascorbic, față de care se raportează activitatea antioxidantă. Se efectuează spectre Raman 532 nm (pe un sistem Raman-532, Stellarnet, Tampa, FL, SUA) pe probe din același lot și se stabilesc relațiile de proporționalitate între picurile de la 630 cm^{-1} și activitatea antioxidantă de captare a radicalului DPPH. Activitatea inițială antioxidantă de captare a radicalului DPPH a lotului de miere polifloră este de 2,4 mg echivalent acid ascorbic per 100 grame produs.

Într-un pahar Berzelius de 250 ml se dizolvă prin ultrasonicare, timp de 5 min intermitent câte 30 s, la o putere de min 400 W, 5 grame de acid ferulic și a 0,2 grame de resveratrol în 100 grame amestec alcătuit din 75 grame cetil-palmitat și 25 grame acid oleic. Un exemplu de aparat de ultrasonicare folosit este VibraCell V505 (Sonic, Newtown, CT, SUA). Orice alt echipament de ultrasonicare cu caracteristici echivalente poate fi folosit.

Întrucât activitatea inițială antioxidantă de captare a radicalului DPPH a mierii poliflore este relativ redusă, de 2,4 mg echivalent acid ascorbic per 100 grame produs, se iau 882 grame de miere și se aduc într-un vas de inox de 2 litri termostatat. Peste aceste 882 grame de miere se aduc 100 grame de soluție uleioasă de polifenoli și 18

grame de chitosan. Se omogenizează prin ultrasonicare timp de 5 min, intermitent câte 30 s, la o putere de min 400 W, menținându-se temperatura sub 30°C.

Se repetă etapele de mai sus de câte ori este nevoie pe același tip de miere, pornind de la efectuarea unui spectru Raman, pentru a efectua un control rapid preventiv, care să permită dozarea polifenolilor dizolvați în solvent hidrofoab în funcție de activitatea antioxidantă inițială a mierii.

În compoziția rezultată se determină activitatea antioxidantă de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil. Această activitate antioxidantă este de 36,2 mg echivalent acid ascorbic per 100 grame produs.

Exemplu 2. Se lucrează ca în Exemplul 1, cu următoarele diferențe. Se determină o activitate antioxidantă de 2,8 mg echivalent acid ascorbic per 100 grame produs și se dozează 80 grame soluție uleioasă cu acid ferulic și resveratrol peste 902 grame miere. Amestecul de solvenți hidrofoabi este constituit din trigliceride caprice / caprilice. În compoziția rezultată se determină activitatea antioxidantă de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil. Această activitate antioxidantă este de 35,3 mg echivalent acid ascorbic per 100 grame produs.

Exemplul 3. Compoziția de miere rezultată din Exemplul 1 se utilizează pentru un produs dermatocosmetic. Într-un vas de inox de 3 litri termostatat se obține un amestec eutectic hidrofoab, prin omogenizarea la temperatură de 60°C a 10 moli de dodecanol, respectiv 1863,4 grame, cu 10 moli de acid capric, respectiv 1442,1 grame. După ce amestecul eutectic se formează se răcește la 30°C. Datorită formării unui amestec eutectic temperatura de topire a celor două componente scade semnificativ. În acest amestec eutectic la 30°C, în care nu mai există componente solide, ci numai componente lichide, se omogenizează compoziția pe bază de miere realizată conform Exemplu 1, în raport 30 grame compoziție de miere la 70 amestec eutectic.

Exemplu 4. Se lucrează ca în Exemplul 3, cu următoarele diferențe. Se omogenizează compoziția pe bază de miere realizată conform Exemplu 2, în raport 40 grame compoziție de miere la 60 amestec eutectic.

Revendicări

1. Compoziție sinergică pe bază de miere, conform invenției, **caracterizată prin aceea că** are o activitate antioxidantă de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil, de cel puțin 35 mg echivalent acid ascorbic per 100 grame produs și este alcătuită din 88,2-90.2 grame miere polifloră, 8 – 10 grame amestec de solvenți hidrofobi care conțin 0,4-0,5 grame acid ferulic și 0,016 – 0,02 grame de resveratrol și 1,8 grame chitosan.
2. Compoziție sinergică pe bază de miere, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** utilizează un chitosan provenit din ciuperci, care are o masă moleculară de 260-280 kDa și un grad de deacetilare de 85-88%.
3. Compoziție sinergică pe bază de miere, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** amestecul de solvenți hidrobi este alcătuit din 75 grame cetil-palmitat și 25 grame acid oleic, sau din trigliceride caprice / caprilice.
4. Procedeu de obținere a compoziției sinergice conform invenției, **caracterizat prin aceea că** implică următoarele etape: determinarea spectrofotometrică a activității antioxidante de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil pentru o probă de miere polifloră; efectuarea unui spectru Raman 532 nm și stabilirea relațiilor de proporționalitate între picul de la 630 cm^{-1} și activitatea antioxidantă de captare a radicalului DPPH; dizolvarea prin ultrasonicare, timp de 5 min intermitent câte 30 s, la o putere de min 400 W, a 5 grame de acid ferulic și a 0,2 grame de resveratrol în 100 grame amestec de solvenți hidrofobi; aducerea peste 882-902 grame de miere a 80 - 100 grame de soluție uleioasă de polifenoli și a 18 grame de chitosan, în funcție de activitatea inițială antioxidantă de captare a radicalului DPPH a mierii poliflore, de la 2,4 la 2,8 mg echivalent acid ascorbic per 100 grame produs, și omogenizarea prin ultrasonicare timp de 5 min intermitent câte 30 s, la o putere de min 400 W, cu menținerea temperaturii la 30°C; repetarea etapelor de mai sus de câte ori este nevoie pe același tip de miere, pornind de la efectuarea unui spectru Raman, pentru a efectua un control rapid preventiv, care să permită dozarea polifenolilor dizolvați în solvent hidrofof în funcție de activitatea antioxidantă inițială a mierii.
5. Procedul de utilizare a compoziției sinergice pe bază de miere pentru produse dermatocosmetice **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: obținerea unui amestec eutectic hidrofof prin omogenizarea la temperatura de 60°C a 10 moli de dodecanol, respectiv 1863,4 grame, cu 10 moli de acid capric, respectiv 1442,1 grame; răcirea amestecului la 30°C și omogenizarea în acest amestec eutectic a compoziției pe bază de miere, în raport 30-40 grame compoziție de miere la 60-70 amestec eutectic.