



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 00526

(22) Data de depozit: 01.06.2011

(41) Data publicării cererii:
30.01.2012 BOPI nr. 1/2012

(71) Solicitant:
• **DUCA ALINA,**
BD. PICTOR NICOLAE GRIGORESCU
NR. 36, BL. S1, SC. B, AP. 58, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **MIHELE DANA MIHAELA,**
STR. FOIȘORULUI NR.1, BL.V51, AP, 119,
SC.4, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **DUCA ALINA,**
BD. PICTOR NICOLAE GRIGORESCU
NR. 36, BL. S1, SC. B, AP. 58, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **MIHELE DANA MIHAELA,**
STR. FOIȘORULUI NR.1, BL.V51, AP, 119,
SC.4, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) SUPLIMENT ALIMENTAR

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un supliment alimentar sub formă de ciocolată cu semințe decojite de dovleac și fructe de cătină, cu acțiune antihelmintică, antioxidantă și vitaminizantă. Suplimentul conform invenției este constituit din 32% zahăr, 20% unt de cacao, 16% lapte praf integral cu 26% grăsime, 3,2% lactoză, 6,752% zer

pudră, 1,6% unt din lapte, 10% fructe de cătină (*Hippophae fructus*), 10% semințe decojite de dovleac (*Curcubita pepo*) și 0,448% lecitină.

Revendicări: 3



48

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MARCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2011 00526
Data depozit ... 01-06-2011

SUPLIMENT ALIMENTAR

INTRODUCERE

Aromatizantii sunt produse sau preparate care se adauga in alimente cu scopul de a le conferi, modifica sau intensifica o anumita aroma.

Directiva 88/388/EC¹ pentru aromatizantii de uz alimentar si materii prime se aplica pentru modificarea gustului si / sau mirosului.

Conform normelor in vigoare, aromatizantii sintetici sunt admisi pentru aromatizarea produselor zaharoase, de patiserie, inghetata, margarina, bauturi alcoolice distilate.

Pentru ciocolata se utilizeaza diversi aromatizanti sintetici, dintre care amintim: aroma de lamaie, portocale, vanilie, capsuni, rom, lapte-lamaie, cocos, cirese.

S-au efectuat numeroase cercetari privind toxicitatea unor aromatizanti sintetici^{2,3,4,5}.

Cercetarile noastre anterioare ne-au condus la concluzia ca dupa o administrare repetata timp de 14 zile de aroma de portocale si de lamaie, in doze de 0.05 mg / 20g greutate corporala, la soarece, acestea afecteaza atat functia hepatica cat si cea renala⁶.

De asemenea in urma administrarii repetate pe termen lung a aromei de portocala cod FOIDN01 si a aromei de lamaie cod FLIDN01, creste activitatea transaminazelor serice, a ureei sanguine, a creatininei serice si a lipidelor serice. Examenul histopatologic pe fragmente de ficat si rinichi prelevate de la animalele tratate pe termen lung cu aromatizantii luati in studiu confirma afectarea functiei hepatice si a functiei renale⁷.

Studiul actiunii citotoxice asupra culturilor celulare de fibroblaste la soarece dupa administrarea aromei de lamaie arata ca aceasta are un efect moderat citostatic la dilutii mai mici de 1/2000, dar devine marcant citotoxica la dilutia 1/1000. Aroma de portocale este mult mai toxica decat cea de lamaie, manifestand citotoxicitate la dilutii mai mari (1/4000 fata de 1/1000)⁸.

Tinand cont de riscul degenerarii maligne prin utilizarea aromatizantilor, orientarea pe plan mondial este ca folosirea lor sa se faca pe principiul substantelor admise in urma unor examene toxicologice existente. Aditivii alimentari sunt substante chimice adăugate produselor alimentare cu scopul de a le îmbunătății sau menține valoarea nutritivă, de a le modifica însușirile organoleptice și a le crește calitatea (aromatizante). În funcție de rezultatele obținute se stabilesc dozele zilnice admisibile⁹.

Alimentele care contin aromatizati pot constitui în anumite condiții factori favorizanți ai apariției maladiei canceroase. Comparativ cu alte căi de expunere la riscul cancerigen, alimentele sunt de 1000 000 de ori mai des implicate în apariția cancerului comparativ cu expunerea pulmonară și de 1000 de ori față de expunerea pielii.

Deși substanțele cancerigene alimentare sunt consumate în cantități mici de-a lungul anilor, efectul lor este cumulativ, boala apărând după mai mulți ani. Maladia canceroasă se constituie sub acțiunea combinată a diverși factori endogeni (vârstă, sex, factori genetici, boli preexistente etc.) și factori de mediu.

Aceștia din urmă sunt în relație de cauzalitate cu carcinogeneza în proporție de 60–90%^{10,11}. Dintre toți factori de mediu, alimentația pare a avea un rol hotărâtor în apariția și evoluția tumorilor maligne. Importanța alimentației în carcinogeneza este subliniată de cantitatea apreciabil mai mare a factorilor carcinogeni vehiculați pe cale enterală comparativ cu cantitatea introdusă pe celelalte căi de pătrundere a substanțelor carcinogene (piele și plămân).

Raportul dintre cantitatea de carcinogeni introduși în organism cu alimentele și cantitatea pătrunsă prin plămâni și respectiv piele este de 1000000/1000/1¹². Caracteristic pentru produsele alimentare este faptul că acestea sunt consumate pe parcursul întregii vieți, expunând astfel organismul contactului îndelungat cu substanțe cancerigene.

În lucrarea de față, ținând cont de cele menționate anterior ca majoritatea aromatizantilor utilizați pentru produsele zaharoase prezintă într-o anumită concentrație hepatotoxicitate, ne-am propus înlocuirea acestora cu produse naturale care le pot conferi pe lângă efect aromatizant și o acțiune terapeutică benefică.

Astfel, am optat pentru obținerea unui supliment alimentar sub formă de ciocolată care în loc de aromatizanti sintetici să conțină semințe de Cucurbita pepa (dovleac) și Hippophae fructus (fructe de cătină).

Se cunoaște faptul că semințele de Cucurbita pepa prezintă acțiune antihelmintică¹³ și acțiune în hipertrofia benignă de prostată¹⁴.

Semințele de dovleac sunt bogate în ulei gras (34-54%), aminoacizi, flavonozide, vitamine A, E, F, saruri minerale, dintre care în cantități mari mari menționăm zincul, magneziul și fierul. Uleiul de dovleac este compus în principal din acizi grași (palmitic, stearic, oleic, linoleic), tocoferoli, carotenoide, clorofila și fitosteroli^{13,14}.

Hippophae fructus (fructele de catina) prezinta o actiune antiscorbutica, antiinflamatoare, antioxidanta, cicatrizanta, antiulceroasa¹³ datorata compozitiei chimice foarte complexe a acestora. Astfel, fructele de catina sunt bogate in vitamina C, pana la 150 mg%, carotenoide (α - si β - carotene), criptoxantina, lycopina, fizalena, zeaxantina, vitaminele B₁, B₂, PP, P (heterozide ale quercetolului, kaempferolului si izoramnetolului), acid folic, provitamine D, vitamina E, proantociani, lipide (gliceride ale acidului palmitic, oleic, linolic, linoleic), triterpene (acid ursolic si oleanolic), catecol.

Determinarea activitatii antioxidante: eficacitatea fructelor de catina (Hippophae fructus) a fost masurata prin metoda chemiluminiscentei¹⁵ cu ajutorul echipamentului Chemiluminometer – Turner BioSystem (USA).

Determinarea actiunii antihelmintice a semintelor de Cucurbita pepa (dovleac)

Se stie ca incidenta bolilor parazitare este in crestere in toata lumea si frecvent la copii. Dintre helmintii cu incidenta cea mai mare la om, amintim: Enterobius (oxiuri), Ascaris lumbricoides, Trichuris trichiura, Taenia, Necator americanus.

Cel mai frecvent acesti helminti sunt tratati cu Albendazol, Mebendazol, Metronidazol, Tinidazol. Taenia solium este tratata cu Niclosamida. Aceste medicamente prezinta neajunsuri, fie din cauza scaderilor provocate de o doza insuficienta, fie din cauza efectelor secundare. Astfel, in cursul tratamentului cu Albendazol s-a observat o usoara crestere a transaminazelor serice si pot sa apara tulburari digestive. In doze mai mari de 1% poate sa apara leucopenia.

In lucrarea de fata am urmarit determinarea actiunii antihelmintice a Semintelor decojite de dovleac comercializate pe piata roamneasca (producator: S.C. SANO VITA S.R.L.).

MATERIAL SI METODA

Scopul prezentului studiu este de a investiga efectul antihelmintic al semintelor de Cucurbita pepe (dovleac) asupra râmei de pamant Lumbricus terrestris. Ca substanta etalon s-a utilizat Albendazolul, 20 mg/1 ml. Determinarea actiunii antihelmintice s-a efectuat pe emulsii 5% si 10% din semintele de Cucurbita pepe (dovleac).

Pentru testarea actiunii antihelmintice s-au utilizat doua metode:

Metoda I

Pentru determinarea actiunii antihelmintice a semintelor de dovleac s-a aplicat o tehnica de urmarire a letalitatii râmei (Lumbricus terrestris) pe o perioada de 7 ore, 24 ore, 48 ore si 72 ore^{16,17,18,19}. Se lucreaza pe cate 10 râme pentru fiecare proba, raportandu-se la apa distilata. Ca substanta de referinta s-a utilizat Albendazolul 20 mg/mL [Merck 7,5 mg/kg de 2x/zi]. Intr-o cutie Petri se introduc maximum 5 râme. I-a si a-II-a cutie Petri contin apa distilata. A-III-a si a-IV-a cutie Petri contin emulsie 5% din semintele de Cucurbita pepo. A-V-a si a - VI-a cutie Petri contin emulsie 10% din semintele de Cucurbita pepo. Se noteaza durata vietii râmelor. Dupa paralizia râmelor, se scoate fiecare râma, se spala cu apa distilata de 6 ori si se masoara timpul in care râma isi revine la motilitatea initiala sau moare.

REZULTATE

In urma determinarilor efectuate se constata ca emulsiile obtinute din semintele de Cucurbita pepo in concentratie de 10% dupa 7 ore produc o mortalitate de 10%, iar dupa 72 ore o mortalitate de 100% a viermelui Lumbricus terrestris. Albendazolul a produs moartea viermelui dupa 48 ore in procent de 100%. (Tabelul nr. 1).

Activitatea antihelmintica a emulsiilor din seminte decojite de dovleac (Cucurbita pepo)

Tabel nr. 1

Produs testat	Letalitate			
	7 h	24 h	48h	72h
Apa distilata	10%	10%	60%	70%
Albendazol ^[R] 20 mg/mL	15%	80%	100%	-
Emulsie seminte Cucurbita pepo 5%	0%	25%	40%	95%
Emulsie seminte Cucurbita pepo 10%	10%	30%	56%	100%

Metoda II

Constatand ca dupa 7 ore de la mentinerea râmelor in emulsie 5% si 10% din semintele de dovleac acestea au murit, prin aceasta metoda am urmarit timpul exact de paralizie (exprimat in secunde) si letalitate a acestora (exprimat in minute).

S-au luat in studiu emulsii din semintele de dovleac 5% si 10%, atat proaspete cat si uscate.

Pentru fiecare lot s-au luat cate 10 râme cu o lungime de 3-5 cm. Cu ajutorul cronometrului s-a masurat timpul de paralizie al fiecarei râme in parte si timpul in care acestea mor^{16,17,19}.

Paralizia râmei s-a determinat cand aceasta nu-si revine la motilitatea initiala dupa introducerea in apa. Rezultatele (Tabel nr.2 si Tabelul nr.3 si reprezentarea acestora grafica in Figura 1 si Figura 2) au fost comparate cu Solutia de Albendazol 0,4g/10mL.

Evaluarea statistica a rezultatelor s-a facut prin testul t-student si ANOVA . Rezultatele obtinute se regasesc in Tabel nr.2 – pentru timpii de paralizie si Tabelul nr.3 – timpii letali.

REZULTATE

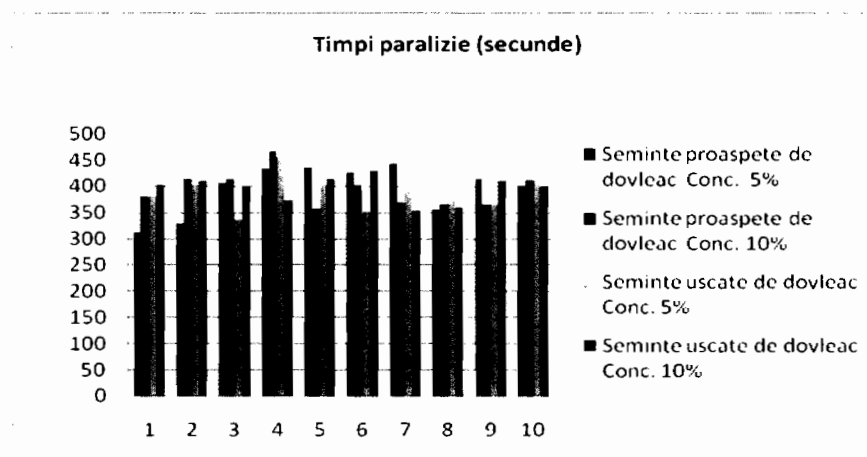
In urma determinarilor efectuate (testul t-student si ANOVA) se constata ca semintele proaspete cat si cele uscate prezinta actiune antihelmintica.

Timpii de paralizie rezultati in urma actiunii antihelmintice

Tabel nr. 2

Nr. Râma	Timpii paralizie (sec)			
	Seminte proaspete de dovleac		Seminte uscate de dovleac	
	Conc. 5%	Conc. 10%	Conc. 5%	Conc. 10%
1	312	382	382	402
2	330	415	402	410
3	406	415	336	400
4	433	466	455	374
5	435	358	403	415
6	425	402	352	430
7	443	370	432	354
8	356	366	418	360
9	415	365	365	410
10	400	413	412	399
Media	395.5	395.2	395.7	395.4
Deviatia standard	46.46	33.52876	36.96	24.74
Testul T	0.986765531		0.987028327	
F(Anova)	0.000274166		0.000454941	
P(Anova)	0.986971409		0.983217597	
F(Critic)	4.413873405			
t(Critic)	2.262157158			

Figura 1. Reprezentarea grafica aferenta timpilor de paralizie observati in Tabelul nr. 2.

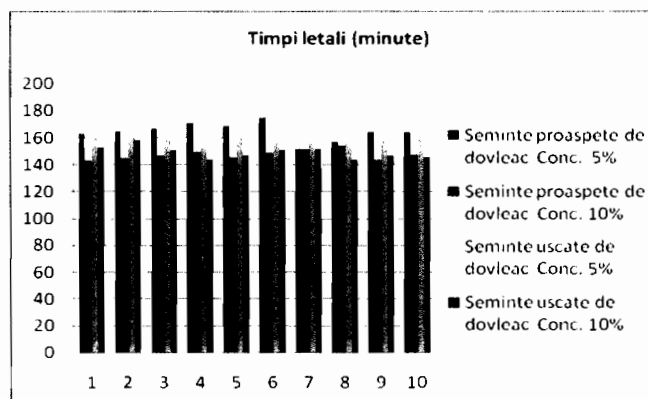


Timpii letali rezultati in urma actiunii antihelmintice

Tabel nr. 3

Nr. Rama	Timpii letali (min)			
	Seminte proaspete de dovleac		Seminte uscate de dovleac	
	Conc. 5%	Conc. 10%	Conc. 5%	Conc. 10%
1	163	143	175	153
2	165	145	165	158
3	167	147	163	151
4	171	150	165	144
5	169	146	161	147
6	175	149	166	151
7	152	152	164	152
8	157	154	163	144
9	164	144	158	147
10	164	148	171	146
Media	164.7	147.8	165.1	149.3
Deviatia standard	6.617317	3.521363	4.840799	4.473378
Testul T	0.000146982		1.07662E-05	
F(Anova)	50.83033419		57.46189258	
P(Anova)	1.21375E-06		5.23327E-07	
F(Critic)	4.413873405			
t(Critic)	2.262157158			

Figura 2. Reprezentarea grafica a timpilor letali observati in Tabelul nr. 3.



Pe baza datelor observate s-a calculat efectul acestora fata de martor (Albendazol 0,4g/10ml).

Se observa ca efectul fata de produsul martor are valori apropiate pentru toate tipurile de seminte (proaspete/uscate) si pentru diferitele concentratii aplicate, iar efectul nu este indepartat fata de valorile inregistrate la proba martor.

Semintele de dovleac proaspete in concentratie 10% au prezentat actiunea antihelmintica cea mai pronuntata (Tabel nr. 4 si Figura nr. 3) fata de cele cu o concentratie de 5% in cazul efectului privind timpii de paralizie.

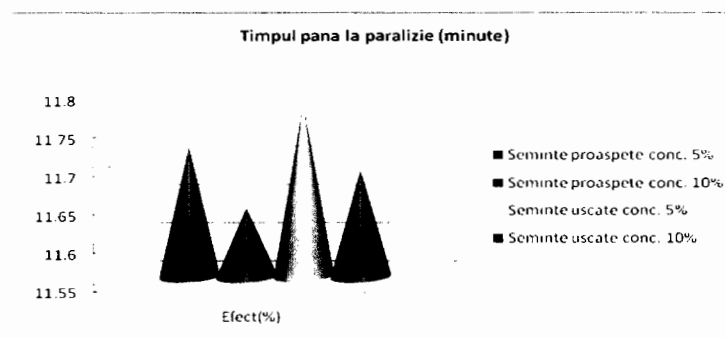
Pentru timpii letali (rezultatele se regasesc in Tabelul nr.5 si reprezentarea in Figura nr.4) valorile sunt apropiate (din punct de vedere al tipului de seminte si al concentratiilor aplicate) insa fata de proba martor (al carei efect s-a realizat in aproximativ 10 minute) valorile inregistrate sunt semnificativ mai mari.

Activitatea antihelmintica a solutiilor luate in studiu - efectul privind timpii pana la paralizie

Tabel nr.4

Activitatea antihelmintica a solutiilor luate in studiu				
Produs testat	Timpul pana la paralizie (min)			
	Media \pm DS	t-stud	p/albendazol	Efect(%)
Albendazol (0,4 g/10ml)	5' 54" \pm 1,19	-	-	-
Seminte proaspete conc. 5%	6' 35" \pm 0' 46"	0.98676553	0.986971409	11.72
Seminte proaspete conc. 10%	6' 25" \pm 0' 34"	0.98676553	0.986971409	11.64
Seminte uscate conc. 5%	6' 36" \pm 0' 37"	0.98702833	0.983217597	11.78
Seminte uscate conc. 10%	6' 35" \pm 0' 85"	0.98702833	0.983217597	11.69

Figura nr. 3 Reprezentarea grafica a efectului privind timpul pana la paralizie



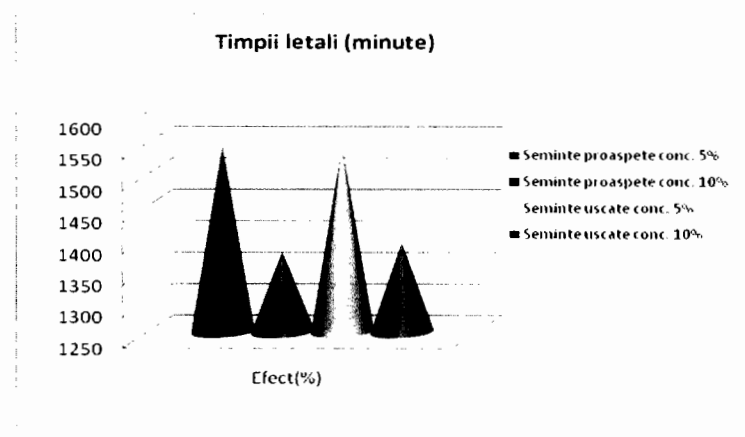
Activitatea antihelmintica a solutiilor luate in studiu - efectul privind timpii letali

Tabelul nr. 5

Activitatea antihelmitica a solutiilor luate in studiu				
Probus testat	Timpul pana la moarte (min)			
	Media \pm DS	t-stud	p/albendazol	Efect(%)
Albendazol (0,4 g/10ml)	10' 44" \pm 6,11	-	-	-
Seminte proaspete conc. 5%	164 ' -18 " \pm 6 ' 37 "	0.000146982	1.21375E-06	1547
Seminte proaspete conc. 10%	147 ' 48 " \pm 3 ' 31 "	0.000146982	1.21375E-06	1378
Seminte uscate conc. 5%	165 ' 6 " \pm 4 ' 50 "	1.07662E-05	5.23327E-07	1551
Seminte uscate conc. 10%	149 ' 78 " \pm 4 ' 88 "	1.07662E-05	5.23327E-07	1393

In figura de mai jos (Figura nr. 4) se observa faptul ca efectul (valoare procentuala) prin prisma timpilor de paralizie inregistrati (minute si secunde) prezinta o variatie (semnificativa) intre semintele proaspete si cele uscate , la concentratiile de 5% si 10% fata de proba martor (albendazol).

Figura nr. 4 Reprezentarea grafica a efectului privind timpii letali



EXEMPLE DE REALIZARE A INVENTIEI:

Exemplul 1

Supliment alimentar sub forma de ciocolata lapte (tableta de greutate 100g) alcatuit din:

zahar: 35,1%, lapte praf degresat: 23,4%, unt de cacao: 18%, masa cacao: 7,2%, unt din lapte: 3,6%, zer praf: 2,25%, **fructe de catina (Hippophae fructus): 5%, seminte decojite de dovleac (Cucurbita pepo): 5%**, emulsificator (lecitina): 0,45 %;

Nota: substanta uscata din lapte fara grasime (adica proteina din lapte introdusa = 11g): minimum 10%; grasime (continutul total in grasimi): 27,7875g;

Exemplul 2

Supliment alimentar sub forma de ciocolata lapte (tableta de greutate 100g) alcatuit din:

zahar: 31,2%, lapte praf degresat: 20,8%, unt de cacao: 16%, masa cacao: 6,4%, unt din lapte: 3,2%, zer praf: 2%, **fructe de catina (Hippophae fructus): 10%, seminte decojite de dovleac (Cucurbita pepo): 10%**, emulsificator (lecitina): 0,4 %.

Exemplul 3

Supliment alimentar sub forma de ciocolata alba (tableta de greutate 100g) alcatuit din::

zahar: 36%, unt de cacao: 22.5%, lapte praf 26% integral: 18%, lactoza: 3,6%, zer pudra: 7,596%, unt din lapte: 1,8%, **fructe de catina (Hippophae fructus): 5%, seminte decojite de dovleac (Cucurbita pepo): 5%**, emulsificator (lecitina): 0,504%.

Exemplul 4

Supliment alimentar sub forma de ciocolata alba (tableta de greutate 100g) alcatuit din::

zahar: 32%, unt de cacao: 20%, lapte praf 26% integral: 16%, lactoza: 3,2%, zer pudra: 6,752%, unt din lapte: 1,6%, **fructe de catina (Hippophae fructus): 10%, seminte decojite de dovleac (Cucurbita pepo): 10%**, emulsificator (lecitina): 0,448%.

Reteta de preparare

Pentru prepararea suplimentului alimentar sub forma de ciocolata, se folosesc pe langa componentii de baza (masa de cacao, zahar si unt de cacao) si materiile prime: seminte de dovleac si fructe de catina.

Procesul tehnologic de fabricatie²⁰ (exemplu) - Masa de cacao in stare fluida corespunzatoare unei sarje este turnata intr-un melanjor, dupa care se pune cantitatea respectiva de lapte praf cu o parte din untul de cacao prevazut in reteta, apoi se pune cantitatea necesara de zahar formandu-se o pasta. Aceasta se trece la o prerafinare pe o broeza cu trei valturi. Produsul valtuit este din nou rostogolit in melanjor sau este adus intr-o masina de amestecat de unde este trecut din nou la a doua valtuire sau rafinarea propriu-zisa care se face pe o broeza cu cinci valturi dupa care se pune in conso. In cazul folosirii amestecatorului automat aceasta cumuleaza toate operatiile descrise mai sus pana la rafinare intr-una singura. In acest agregat masa de cacao este mai intai amestecata cu untul de cacao prevazut pentru a fi adaugat si apoi se adauga in primul rand zaharul pudra si ulterior laptele praf. Prin amestecarea intensa si frecarea ce are loc, din agregat iese o masa sub forma de pasta consistenta care trece la rafinare. La fabricarea ciocolatei cu lapte trebuie evitata o incalzire prea mare in general, temperatura nu trebuie sa depaseasca 60°C. De obicei, temperaturile normale de lucru la consare sunt de 50-55°C. La temperatura ridicata masa capata un gust neplacut datorita transformarilor ce se produc si devine mai vascoasa. Mularea ciocolatei sau modelarea este operatia prin care i se asigura produsului finit (ciocolatei) forma sa corespunzatoare. Mularea manuala se executa astfel: ciocolata temperata se scoate din temperatur intr-un bazin care se aseaza aproape de masa vibratoare. Formele folosite pentru mulare trebuie sa aiba o temperatura cu circa 2-3°C mai mica decat masa de ciocolata temperata, adica 27-29°C. Formele sunt umplute cu un strat de masa de ciocolata, dupa care se dozeaza cu ajutorul unui pistol dozator, semintele de dovleac si fructele de catina, iar la final se toarna alt strat de ciocolata. Forma umpluta cu masa de ciocolata, seminte de dovleac si fructe de catina se pune pe masa vibratoare sau masa trepidanta. Prin scuturarea formelor se elimina eventualele bule de aer din masa de ciocolata care in acelasi timp umple perfect formele. Racirea ciocolatei in forme dupa mulare reprezinta o operatie importanta in procesul tehnologic; de ea depind culoarea, luciul

si consistenta produsului. Racirea se face in instalatii frigorifice. Punctul de solidificare este cuprins intre 30-35°C si depinde de continutul in grasimi.

REVENDICARI

1. Suplimentul alimentar sub forma de ciocolata cu seminte decojite de dovleac (*Cucurbita pepo*) si fructe de catina (*Hippophae fructus*) **caracterizat prin aceea ca** in masa de ciocolata in loc de aromatizanti sintetici sunt introduse seminte de dovleac si fructe de catina in proportie de 10%.
2. Suplimentul alimentar sub forma de ciocolata obtinut conform revendicarii 1, **caracterizat prin aceea ca** masa de ciocolata este alcatuita din:
zahar: 32%, unt de cacao: 20%, lapte praf 26% integral: 16%, lactoza: 3,2%, zer pudra: 6,752%,
unt din lapte: 1,6%, **fructe de catina (*Hippophae fructus*): 10%, seminte de dovleac (*Cucurbita pepo*): 10%**, emulsificator (lecitina): 0,448%.
3. Suplimentul alimentar sub forma de ciocolata obtinut conform revendicarilor 1 si 2 este **caracterizat prin aceea ca** are actiune antihelmintica, antioxidanta, vitaminizanta si nu produce efecte secundare nedorite.