



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 00917

(22) Data de depozit: 29.09.2010

(41) Data publicării cererii:
30.03.2012 BOPI nr. 3/2012

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
BUCUREȘTI, BD. MĂRĂȘTI NR.59,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• PAPUC CAMELIA PUIA, BD. UVERTURII
NR.87, BL. 014A, SC.C, ET.3, AP.61,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• NICORESCU VALENTIN RĂZVAN,
STR. VALEA OLTULUI NR.139-141, BL.A,
SC.2, AP.28, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• DURDUN NICOLETA CORINA,
STR. ION ȚICĂLOIU NR.44, BL.P36, AP.4,
CÂMPULUNG, AG, RO;
• GORAN GHEORGHE VALENTIN,
ALEEA HAIDUCULUI NR.1, BL.A3, SC.2,
AP.82, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• CRIVINEANU DELIA CARMEN,
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR.208, BL.V39,
SC.A, ET.1, AP.8, SECTOR 5, BUCUREȘTI,
B, RO

(54) CONSERVANT NATURAL CU ACTIVITATE ANTIOXIDANTĂ
PENTRU ULEIURI ALIMENTARE EXTRAS DIN FRUCTE DE
CĂȚINĂ (*HIPPOPHAE RHAMNOIDES*)

(57) Rezumat:

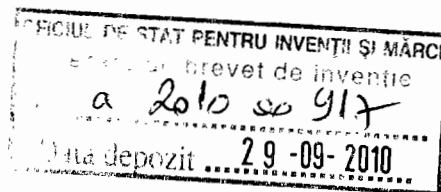
Invenția se referă la un produs cu activitate antioxidantă pentru uleiuri alimentare. Produsul conform invenției este un extras din fructe de cătină (*Hippophae rhamnoides*), cu un conținut de polifenoli de 5...10 g echivalent acid galic (EAG)/ 100 ml, fiind utilizat drept

conservant pentru aditivarea unor uleiuri alimentare într-un raport de 100 mg EAG:1000 ml ulei.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





27

DESCRIEREA INVENȚIEI CU TITLUL:

„CONSERVANT NATURAL CU ACTIVITATE ANTIOXIDANTĂ PENTRU ULEIURI ALIMENTARE EXTRAS DIN FRUCTE DE CĂȚINĂ (*HIPPOPHAE RHAMNOIDES*)”

Invenția se referă la un produs natural sub formă de soluție, cu proprietăți puternic antioxidante, indicat cu precădere la conservarea în timp a uleiurilor alimentare, ca o alternativă la antioxidanții de sinteză terț-butil-4-hidroxi-anisol (BHA) și 2,6-di-terț-butil-p-crezol (BHT).

Produsul realizat este constituit dintr-un concentrat de polifenoli extrași din fructul de cătină (*Hippophae rhamnoides*), de concentrație 5 g echivalent acid galic/100 ml, după spălare și uscare menajată. Pentru extracție s-a utilizat un solvent netoxic în care acești compuși sunt solubili, urmărind în același timp compatibilitatea extractului cu uleiurile vegetale alimentare.

Activitatea antioxidantă a preparatului a fost testată în laboratoarele U.S.A.M.V. București. Rezultatele obținute indică următoarele proprietăți antioxidante ale preparatului:

1. acționează ca și chelator al ionilor metalelor tranziționale, în special al ionului Fe^{2+} considerat un inițiator al oxidării lipidelor în reacția Fenton;
2. prezintă abilitatea de a anihila speciile reactive de oxigen și azot (radicalul hidroxil, anionul superoxid, peroxidul de hidrogen, anionul hipoclorit și oxidul nitric);
3. inhibă procesul de peroxidare lipidică a unei emulsii de acid linoleic;
4. inhibă procesul de peroxidare a fosfolipidelor extrase din creier de șobolan.

Pentru evaluarea proprietății de conservant natural pentru uleiuri alimentare în laboratoarele USAMV București au fost efectuate studii de stabilitate în condiții de oxidare accelerată și în condiții normale de depozitare pe diferite sortimente de ulei în prezența și în absența preparatului extras din cătină. Rezultatele obținute au demonstrat că, în condiții de oxidare accelerată (expunere la temperaturi ridicate - 65-80°C și la radiații UV) și în condiții normale de oxidare (25°C), la un adăug din extractul polifenolic (EP) de 2 ml extract/1000ml, uleiul are o stabilitate similară cu cea conferită de antioxidanții de sinteză BHA și BHT.

Determinările efectuate pe ulei de soia, foarte bogat în acizi grași polinesaturați (PUFAs) susceptibili la procesul de oxidare, au demonstrat că preparatul nostru inhibă formarea stereoizomerilor peroxidici trans-trans, susceptibili de instalarea unor procese

cancerigene la consumatori. Astfel, scanarea probelor de ulei pe domeniul de lungimi de undă 200 – 320 nm și aplicarea metodei spectroscopiei derivate a demonstrat că raportul dienei conjugate *cis,trans/trans,trans* este mai mare în cazul utilizării preparatului extras din cătină decât în cazul utilizării antioxidanților sintetici.

Toate aceste rezultate demonstrează că preparatul polifenolic obținut din fructul de cătină protejează uleiurile contra procesului de oxidare și suplimentar, are un efect benefic asupra sănătății consumatorilor.

În scopul măririi perioadei de valabilitate a uleiurilor alimentare, în uleiuri se introduc compuși de sinteză cu activitate antioxidantă. Cei mai cunoscuți antioxidanți utilizați pentru inhibarea procesului de rănire a uleiurilor sunt BHT, BHA și BHQ.

Dezavantajele utilizării acestor antioxidanți rezultă din efectele negative pe care acești compuși le exercită asupra sănătății consumatorilor. Literatura de specialitate indică multiple efecte negative exercitate de către antioxidanții sintetici atât asupra animalelor de experiență, cât și a omului. Acești antioxidanți sunt toxici pentru ficat și rinichi, pot cauza alergii, astm bronșic, hiperactivitate, creșterea colesteroliei, se pot combina cu alte substanțe din alimente cu formarea unor compuși cu potențial carcinogenic (Ito, 1986; Tatematsu, 1987, Katsumi, 1989; Hou, 2003; Prior, 2004). Deoarece s-a înregistrat apariția tumorilor maligne la nivelul unor organe interne la șobolani de experiență hrăniți cu alimente conservate cu BHT și BHA, în țări precum Japonia și alte câteva țări din Europa, utilizarea acestor antioxidanți sintetici a fost restricționată.

Efectele sanogene ale fructului de cătină - cătina albă (*Hippophae rhamnoides L.*) este un arbust fructifer din flora spontană a Europei și Asiei. Încă din cele mai vechi timpuri, fructele de cătină au fost utilizate în scop terapeutic.

Este bine cunoscut faptul că fructele de cătină sunt bogate în vitaminele A, C, E, K, bioflavone, licopine, acizi organici, kaemferol, trigliceride, glicerofosfolipide, fitosteroli, compuși polifenolici și minerale. Conținutul ridicat în vitaminele A, C, E, bioflavone, polifenoli, caroteni și seleniu (Guliyev, 2004) imprimă fructelor de cătină un puternic efect antioxidant (Rosch, 2003; Papuc, 2008; Papuc, 2009). Se cunoaște că polifenolii din cătină, în special flavonoidele, precum și mineralele, provitaminele și vitaminele au numeroase efecte benefice asupra sănătății consumatorilor, cele mai importante efecte fiind înregistrate în terapia cancerului, bolilor cardiovasculare, ulcerului și cirozei hepatice.

Terapia cancerului. Studiile efectuate pe extracte obținute din fructul de cătină, bogate în flavonoide, au demonstrat că aceste extracte au activitate anti-cancer și cresc imunitatea nespecifică la animalele de experiență (Yu, 1993; Zhong, 1989). Cercetările

efectuate pe pacienți care au fost supuși radioterapiei au relevat efectul protector al polifenolilor (flavonoidelor) din cătină asupra măduvei osoase față de distrugerile provocate de radiații (Agrawala, 2002). Introducerea uleiului de cătină în mâncarea șoarecilor tratați cu doze mari de 5-FU (substanță cu efect chimioterapic) a determinat refacerea rapidă a sistemului homeopoietic (Chen, 2003).

Terapia bolilor cardiovasculare. Administrarea a 10 mg flavonoide extrase din cătină de 3 ori pe zi, timp de 7 zile la 128 de pacienți cu afecțiuni cardiovasculare, a determinat reducerea nivelului colesterolemiei, îmbunătățirea activității cordului, reducerea anginei pectorale (Zhang, 1987). De asemenea, polifenolii extrași din cătină reduc apariția trombozelor și îmbunătățesc circulația sângelui (Cheng, 2003).

Terapia ulcerului gastric. Polifenolii din cătină normalizează secreția sucului gastric și reduc inflamația prin controlarea mediatorilor pro-inflamatori (Xing, 2002).

Terapia cirozei hepatice. Polifenolii din cătină normalizează secreția enzimelor hepatice, acizilor biliari și markerilor sistemului imunitar implicați în inflamația și degenerarea ficatului. Suplimentar, polifenolii din cătină protejează ficatul împotriva distrugerilor provocate de toxicele chimice (Cheng, 1990).

În scopul reducerii riscurilor generate de antioxidanții sintetici se pot utiliza, ca alternativă la acești antioxidanți, polifenolii naturali extrași din cătină. Polifenolii din cătină prezintă activitate antioxidantă datorită: 1. capacității de chelatare a ionii metalelor tranziționale și 2. capacității de anihilare a radicalilor liberi (Rice Evans, 1995; Roginsky, 2005; Romero, 2008; Yen, 2003; Zeb, 2004; Zhao, 1997; Papuc, 2007). Proprietatea polifenolilor din cătină de a chelata ionii metalelor tranziționale este extrem de importantă deoarece acești ioni, în special ionul Fe^{2+} , în reacția Fenton și în reacții „Fenton like” pun în libertate cea mai agresivă specie reactivă de oxigen, și anume radicalul hidroxil ($HO\bullet$) care inițiază reacțiile înlănțuite de peroxidare lipidică prin scindarea homolitică a unei legături C – H din molecula unui acid gras (în special a unui acid gras polinesaturat).

Polifenolii din cătină prezintă și abilitatea de a anihila speciile reactive de oxigen ($HO\bullet$, $O_2\bullet^-$, H_2O_2 , $HOCl$), precum și radicalii peroxil (produși intermediari ai lanțului de peroxidare) care pot iniția la rândul lor un alt lanț de reacții de oxidare.

Produsul natural cu activitate antioxidantă propus de noi are efect benefic asupra consumatorilor deoarece:

- evită utilizarea antioxidanților sintetici care pot afecta sănătatea consumatorilor;
- inhibă procesul de formare a steroizomerilor peroxidici trans-trans;
- are un efect benefic asupra sănătății consumatorilor datorită conținutului ridicat în

flavonoide, caroteni, vitamine liposolubile și minerale.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este aceea că produsul natural cu activitate antioxidantă propus de noi este net superior antioxidanților sintetici din următoarele motive:

- introducerea în uleiurile alimentare a preparatului în concentrație de 100 ppm are același efect pe care îl au antioxidanții sintetici BHA și BHT introduși în concentrație dublă (200 ppm);
- preparatul este lipsit de toxicitate;
- preparatul conține pe lângă polifenoli și alți compuși cu efect benefic asupra sănătății consumatorilor (caroteni, vitaminele A, E și K, fitosteroli etc.);
- spre deosebire de antioxidanții sintetici BHT și BHA care favorizează formarea stereoizomerilor peroxidici trans-trans, preparatul nostru favorizează formarea stereoizomerilor cis-trans;
- preparatul are un preț de cost scăzut și este ecologic;
- adăugarea acestui produs în uleiurile alimentare va inhiba procesul de oxidare (râncezire), măbind perioada de valabilitate a uleiurilor și va avea un efect benefic asupra sănătății consumatorilor.

Forma de prezentare: soluție hidro-alcoolică ambalată în recipiente din sticlă brună de diferite volume.

Exemple de utilizare a produsului

Exemplul nr. 1 - efectul protector al preparatului obținut din fructe de cătină asupra procesului de oxidare a uleiului de soia. Testul oxidării accelerate la temperatură ridicată.

S-a adăugat produsul natural cu activitate antioxidantă în ulei de soia în raport 2:1000 și s-a agitat puternic. În paralel s-au preparat și probe de ulei cu BHT (200 ppm) și probe de control. S-au introdus probele la 62°C timp de 8 zile. După 2, 4, 6 și 8 zile s-au determinat următorii indicatori chimici de evaluare a gradului de peroxidare: *indicele de peroxid* (metoda descrisă de AOCS, 1985), *indicele de para-anisidină* (metoda descrisă de AOCS, 1997), *diencele conjugate* (metoda descrisă de IUPAC, 1979), *absorbanța în domeniul UV* (între 200 și 320 nm).

După 8 zile de expunere la 62°C a uleiului tratat cu preparatul obținut din fructe de cătină s-au obținut următoarele valori pentru indicii de caracterizare analitică a proceselor oxidative din uleiuri: indicele de peroxid: 111.0 ± 11.2 mEq/Kg, indicele de p-anisidină: 3.77 ± 0.76 ; în cazul tratării uleiului tratat cu BHT, valorile obținute au fost $115,00 \pm 13.1$ mEq/Kg, respectiv $4.10 \pm 0,31$.

După 8 zile de expunere la 62°C a uleiului tratat cu preparatul obținut din fructe de

cătină, absorbanta la 232 nm (corespunzătoare dienelor conjugate) a fost 1,408, iar absorbanta la 268 nm (corespunzătoare trienelor conjugate) a fost 0,07, valori similare cu cele obținute pentru antioxidantul sintetic BHT.

Scanarea probelor de ulei pe domeniul de lungimi de undă 200 – 320 nm și aplicarea metodei spectroscopiei derivate a indicat o valoare a raportului dienelor conjugate cis,trans/trans, trans de 0,55 pentru uleiul tratat preparatul obținut din fructe de cătină și de 0,33 pentru uleiul tratat cu BHT.

Exemplul nr. 2 - Efectul protector al preparatului obținut din fructe de cătină asupra procesului de oxidare a uleiului de soia. Testul oxidării accelerate prin expunere la radiații UV

S-a adăugat produsul natural cu activitate antioxidantă în ulei de soia în raport de 2:1000 și s-a agitat puternic. În paralel s-au preparat și probe de ulei cu BHT (200 ppm) și probe de control. S-au introdus probele la radiații UV cu lungime de undă = 254 nm timp de 30 de minute. S-au determinat următorii indicatori chimici de evaluare a gradului de peroxidare: *indicele de peroxid* (metoda descrisă de AOCS, 1985), *indicele de para-anisidină* (metoda descrisă de AOCS, 1997), *dienele conjugate* (metoda descrisă de IUPAC, 1979), *absorbanta în domeniul UV* (între 200 și 320 nm).

Expunerea uleiului de soia tratat cu polifenoli din cătină și antioxidanți sintetici timp de 30 minute la radiația din domeniul UV cu lungimea de undă de 254 nm a evidențiat efectul protector contra procesului de peroxidare lipidică al preparatului polifenolic, similar cu cel exercitat de BHT. Astfel, pentru uleiul tratat cu preparat polifenolic indicele de peroxid a avut valoarea de $8,1 \pm 1,9$ mEq/kg, iar indicele de p-anisidină $0,51 \pm 0,17$. Pentru probele de ulei tratate cu BHT (200 ppm) indicele de peroxid a fost $8,5 \pm 2,3$ mEq/kg iar cel de p-anisidină $0,50 \pm 0,15$.

Absorbanțele înregistrate la 232 nm (corespunzătoare dienelor conjugate) și 268 nm (corespunzătoare trienelor conjugate) au fost 0,544, respectiv 0,114 pentru uleiul tratat cu preparatul obținut din fructe de cătină, și 0,704, respectiv 0,136 pentru probele tratate cu BHT.

Raportul dienelor conjugate cis,trans/trans,trans, pentru uleiul tratat cu preparatul obținut din fructe de cătină a avut valoarea $4,88 \times 10^{-5}$, iar cel pentru uleiul tratat cu BHT $4,62 \times 10^{-5}$.

Bibliografie citată:

1. Agrawala PK and Goel HC, Protective effect of RH-3 with special reference to radiation induced micronuclei in mouse bone marrow, *Indian Journal of*

- Experimental Biology* 2002 May; 40 (5): 525-530.
2. Camelia Papuc, Cristiana Diaconescu, Nicorescu V., Carmen Crivineanu - Antioxidant properties of aromatic plant alcoholic extracts. *Romanian Biotechnological Letters*, vol. 12, nr. 6, pp. 3533-3537, 2007.
 3. Chen Y, et al., Study on the effects of the oil from *Hippophae rhamnoides* in hematopoiesis, *Chinese Herbal Drugs* 2003; 26(8): 572-575.
 4. Cheng J, et al., Inhibitory effects of total flavones of *Hippophae rhamnoides* on thrombosis in mouse femoral artery and in vitro platelet aggregation, *Life Sciences* 2003; 72(20): 2263-2271
 5. Cheng T, et al., Acute toxicity of flesh oil of *Hippophae rhamnoides* and its protection against experimental hepatic injury, *Journal of Traditional Chinese Medicine* 1990; 15(1): 45-47, 64.
 6. Guliyev B. V., Gul M., Yldirim A., *Hippophae rhamnoides* L.: chromatographic methods to determine chemical composition, use in traditional medicine and pharmacological effects. *Journal of chromatography B*, 2004, 821, 291-307.
 7. Hou D. X., 2003, Potential mechanism of cancer chemoprevention by anthocyanidin. *Current Advancements in Molecular Medicine*, 3, 149-1159.
 8. Ito N. , Hirose M., Fukushima S., Tsuda H., Tatematsu M., Asamoto M., 1986, Modifying Effects of Antioxidants on Chemical, *Carcinogenesis Toxicol Pathol*, 14, 315 - 323.
 9. Katsumi I., Shoji F., Tomoyuki S., Mikinobu O., Keisuke N., Nobuyuki I., 1983, Promoting activities of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of γ -glutamyl transpeptidase-positive foci development in the liver of rats, *Carcinogenesis*, 895-899.
 10. Papuc Camelia, Diaconescu Cristiana, Nicorescu V., Crivineanu Carmen - Antioxidant activity of polyphenols from Sea buckthorn fruits (*Hippophae rhamnoides*). *Revista de Chimie București*, vol. 59, nr. 4, pp. 392-394, 2008.
 11. Papuc Camelia, Nicorescu V., Crivineanu Delia Carmen, Goran G. - Phytochemical constituents and free radicals scavenging activity of extracts from sea buckthorn fruits (*Hippophae rhamnoides*). *Acta Horticulturae*, nr. 806, vol. 1, pp. 187-192, 2009.
 12. Prior R. L., 2004, Absorbtion and metabolism of anthocyanins: potential health effects. In M. Meskin , W. R. Bitlack, A. J. Davies, D. S. Levis, R. K. Radolph, *Phytochemicals: mechanism of action*, 1-19, Boca Raton, FL, CRC Press.

13. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. - The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res.*, 22, pp. 375-383, 1995.
14. Roginsky V., Lissi E. - Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 92, pp. 235-254, 2005.
15. Romero A.M., Doval M.M., Romero M.C., Sturla M.A., Judisl M.A. - Antioxidant properties of soya sprout hydrophilic extract. Application to cooked chicken patties, *EJEAFChem.*, 7(8), pp. 3196-3206, 2008.
16. Rösch D., Bergmann M., Knorr D., Kroh L. W., Structure-Antioxidant Efficiency Relationships of Phenolic Compounds and Their Contribution to the Antioxidant Activity of Sea Buckthorn Juice, *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51 (15), pp 4233-4239.
17. Tatematsu M., Tsuda H., Shirai T., Masui T., Ito N., 1987 Placental Glutathione S-Transferase (GST-P) as a New Marker for Hepatocarcinogenesis: In Vivo Short-Term Screening for Hepatocarcinogens, *Toxicol Pathol*, 15, 60 - 68.
18. Xing J, et al., Effects of sea buckthorn seed and pulp oils on experimental models of gastric ulcer in rats, *Fitoterapia* 2002; 73(7-8): 644-650.
19. Yen G., Chang Y., Su S. - Antioxidant activity and active compounds of rice koji fermented with *Aspergillus candidus*. *Food Chemistry*, 83, pp. 49-54, 2003.
20. Yu Let et al., Effects of Hippophae rhamnoides juice on immunologic and antitumor functions, 1993, *Acta Nutrimenta Sinica* 15(3): 280-283.
21. Zeb A., Chemical and nutritional constituents of sea buckthorn juice. *Pak. J. Nutr.*, 3, pp. 99-106, 2004.
22. Zhang M., et al., Treatment of ischemic heart diseases with flavonoids of Hippophae rhamnoides, *Chinese Journal of Cardiology* 1987; 15(2): 97-99.
23. Zhao Y., Fuheng W. - Sea buckthorn flavonoids and their medical value. *Hippophae*, 10, pp. 39-41, 1997.
24. Zhong Fei, et al., Effects of the total flavonoid of Hippophae rhamnoides on nonspecific immunity in animals, *Shanxi Medical Journal* 1989; 18(1): 9-10.

REVENDICARE PRIVIND INVENȚIA CU TITLUL:
„CONSERVANT NATURAL CU ACTIVITATE ANTIOXIDANTĂ
PENTRU ULEIURI ALIMENTARE EXTRAS DIN FRUCTE DE CĂȚINĂ
(*HIPPOPHAE RHAMNOIDES*)”

1. Conservant natural sub formă lichidă extras din fructe de cătină care împiedică oxidarea (râncezirea) uleiurilor alimentare caracterizat prin aceea că este constituit în principal din polifenoli în concentrație 5.....10 g echivalent acid galic/100 ml.