



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **14.11.2011**

(41) Data publicării cererii:  
**30.08.2013** BOPI nr. **8/2013**

(71) Solicitant:

• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
ELECTROCHIMIE ȘI MATERIE  
CONDENSATĂ - INCEMC - TIMIȘOARA,  
STR.DR.AUREL PĂUNESCU PODENAU  
NR.144, TIMIȘOARA, TM, RO

(72) Inventatori:

• STEFĂNUȚ MARIANA NELA, E.ZOIA 86,  
TIMIȘOARA, TM, RO;

• CĂTA ADINA ELENA,  
COMUNA BRĂNIȘCA NR. 197,  
Hunedoara, HD, RO;  
• POP OANA RALUCA, STR. BOCȘA NOUĂ  
NR. 12, BOCȘA, CS, RO;  
• TĂNASIE DAN CRISTIAN,  
STR. MIHAI Eminescu NR. 1,  
CARANSEBEŞ, CS, RO;  
• BALCU IONEL, CALEA ARADULUI NR.10,  
AP.59, TIMIȘOARA, TM, RO;  
• BOC IOAN DANIEL, STR. IRIS NR. 21,  
BL. B13, ET. 2, AP. 12, TIMIȘOARA, TM, RO

### (54) SUPLIMENT NUTRITIV CU PROPRIETĂȚI HIPOGLICEMIANTE ȘI ANTIOXIDANTE, ȘI UN PROCEDEU PENTRU OBȚINEREA ACESTUIA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un supliment nutritiv cu proprietăți hipoglicemante și antioxidante, și la un procedeu pentru obținerea acestuia. Suplimentul conform inventiei cuprinde 20...40 părți *Vaccinium myrtillus L.*, 30...40 părți *Rubus fruticosus L.* și 30...40 părți *Morus nigra L.*, părțile fiind exprimate în volume. Procedeul conform inventiei constă în extracția antocianinelor, cu alcool etilic 80% acidulat cu 0,1% HCl, din fructe de *Vaccinium myrtillus L.*, *Rubus fruticosus L.* și *Morus nigra L.*, la un raport fructe:solvent de 1:4, într-un câmp ultrasonor la 59 kHz, timp de 10...60 min, la o

temperatură de 23...27°C, după care amestecul este filtrat, se evaporă la vid la 34...40°C, până la eliminarea completă a alcoolului, concentratul rezultat este centrifugat și supernatantul este purificat, rezultând extractul brut, care este spălat cu acetat de etil și se purifică prin cromatografie, rezultând un concentrat de antocianine care se evaporă la vid, se caracterizează și, în final, se amestecă în proporțiile stabilite, și se omogenizează pentru obținerea suplimentului alimentar.

Revendicări: 2

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 conjuinate în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENTII SI MARCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a. 2011 col 51
Data depozit 14-11-2011

## SUPLIMENT NUTRITIV CU PROPRIETĂȚI HIPOGLICEMIANTE ȘI ANTIOXIDANTE ȘI UN PROCEDEU PENTRU OBȚINEREA ACESTUIA

Invenția se referă la un supliment nutritiv cu proprietăți hipoglicemante și antioxidante și la procedeul de obținere al 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 stress-ului 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 antioxidantă și producerea crescută de specii reactive de oxigen. Aportul de antioxișanti 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 (brevet de invenție RO 115224 B1), afine și cătină (brevet de invenție RO 121369 B1), coacăze negre, mure, fragi și zmeură (brevet de invenție RO 123136 B1) fructe imature de *Mormordica charantia* L. (brevet de invenție RO 116044 B), dar și din teci de fasole, frunze de afin, dud alb și mesteacăn (brevet de invenție RO 106508 B1), frunze de afin, ridichi, salvie, mesteacăn, păpădie, cicoare, lemn dulce, coriandru, soc și teci de fasole (brevet de invenție RO 125693 B1) și din plante și rădăcini de cultură: hrean, țelină, pătrunjel, morcov, varză, salată, ridichi și lămâie (brevet de invenție RO 120123 B1).

Evidențierea efectelor hipoglicemante și angioprotectoare ale mirtilinelor a condus la apariția de preparate farmaceutice elaborate: DIFRAREL (Franța) și DIFEBOIM (Romania), 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., și Materie Condensată, Institutul de Cercetări de Cereale și Legume, Timișoara.

14-11-2011

Plante medicinale, fitochimie și fitoterapie, (Tratat de farmacognosie, vol.1, Ed. Medicală, București 1993, pg. 474-484).

Aceste preparate nu se mai 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 S.A.), 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 (brevet de invenție RO 110036 B1).

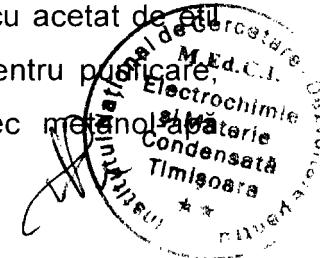
Soluțiile tehnice menționate mai sus prezintă următoarele dezavantaje:

- 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 hipoglicemante și antioxidantă din fructe indigene, proaspete sau congelate.

Suplimentul nutritiv, conform invenției, elimină dezavantajele menționate prin aceea că este alcătuit 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.

Procedeul, 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-sapătarie condensată Timișoara, într-o proporție de 1:100, la presiunea atmosferică, la temperatură de 20°C, la o viteză de 10 ml/min, și se recueillează eluantul purificat.



acidulată, din care rezultă un concentrat de antocianine care se supune evaporării sub vid până la îndepărarea 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 aplicare inventiei 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 inventiei, procedeul de obținere al 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 supranatantă este decantată și apoi supusă purificării.



### Purificarea

Extracția antocianinelor este întotdeauna însotită 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 îndepărțarea fenolilor cu molecule mici, fiecare extract crud se introduce pentru purificare, într-o coloană cu umplutură Amberlite XAD 7 și este spălat cu apă bidistilită 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 îndepărțarea completă a alcoolului și a fost caracterizat prin cromatografie HPLC-DAD și spectrofotometrie UV-VIS pentru evidențierea antocianinelor.

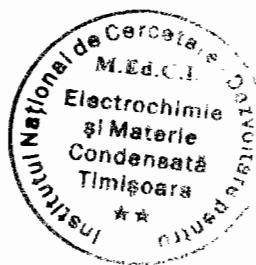
### Amestecarea și omogenizarea

Suplimentul nutritiv bogat în antocianine cu proprietăți hipoglicemante și antioxidantă 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.

#### Exemplu 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.



**Exemplu 2.**

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

**Exemplu 3.**

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

Produsul rezultat are următoarele caracteristici, prezentate în Tabelul 1:

**Tabelul 1.**

<b>Aspect</b>	lichid vâscos, roșu-violaceu, cu miros fructat
<b>Conținut de antocianine monomere</b>	5000...8000 mg/l eq Cianidin-3-glucozida
<b>Activitate antioxidantă</b>	100...130 eq Trolox/l
<b>Total fenoli</b>	13.000...17.000 eq acid galic/l
<b>Substanță uscată solubilă</b>	250...400 mg/g

*Teste clinice*

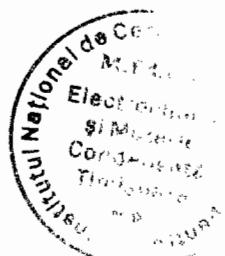
Compoziția suplimentului nutritiv conform invenției a fost stabilită în urma unor studii *in vitro* și *in vivo*. Testările clinice au fost efectuate pe loturi de şobolani cu semnificație statistică, masculi, în greutate de  $150 \pm 10$  g. Animalele provenite din crescătorie au fost aclimatizate timp de 2-3 zile în laborator, pentru a se obișnui cu noul habitat și cu regimul de hrană. Hrana utilizată este standardizată (INCDMI Cantacuzino, București), iar suplimentul nutritiv bogat în antocianine cu proprietăți hipoglicemiantă și antioxidantă este administrat în apa de băut. Pentru inducerea diabetului, şobolanilor li s-a injectat intraperitoneal o singură doză de 100 mg/kg de streptozotocină. Toți şobolanii cu o concentrație de glucoză în sânge  $\geq 200$  mg/dl au fost selectați și împărțiți în trei loturi: unul diabetic nefratat (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.



## Revendicări

1. Supliment nutritiv cu proprietăți hipoglicemiantă și antioxidantă **caracterizat prin aceea că** este alcătuit 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 etapă de extractie 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 extractie 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 elirinarea 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.



A handwritten signature is placed to the right of the stamp.