



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00662

(22) Data de depozit: 20/10/2022

(41) Data publicării cererii:  
30/04/2024 BOPI nr. 4/2024

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

(72) Inventatori:  
• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,  
BL.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• CONSTANTINESCU-ARUXANDEI DIANA,  
ȘOS.MIHAI BRAVU NR.297, BL.15A, SC.A,  
AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;

• TRITEAN NAOMI,  
STR. PERFECȚIONĂRII, NR.11, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• DIMA ȘTEFAN OVIDIU, STR.ODOBEȘTI,  
NR.5B-5C, BL.M7-M7B, SC.B, ET.6, AP.72,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• DIMITRIU LUMINIȚA,  
STR.SERG.GHEORGHE LĂȚEA, NR.8,  
BL.C52, SC.A, ET.3, AP.9, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• POPA TUDOR IOANA, ALEEA ILIOARA,  
NR.2, BL.PM30A, SC.B, ET.3, AP.50,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) COMPOZIȚIE PREBIOTICĂ, REGENERATIVĂ  
ȘI ANTIOXIDANTĂ ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE  
A ACESTEIA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei compoziții prebiotice și antioxidantă utilizată ca ingredient activ în produse funcționale. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: preparare a unei infuzii de frunze de ceai verde sau negru micronizat, adăugare de zahăr, polen monofloral și selenat de sodiu, inocularea infuziei în dulcitate cubiofilm/peliculă de cultură de Kombucha/SCOBY, cultivare statică a consorțiului SCOBY timp de 14 zile la temperatura de 25...28°C, recoltarea peliculei și procesare pentru obținerea de nanofibre celulozice, îndepărtarea grăunțioarelor de

polen, neutralizare filtrat și omogenizare nanoceluloză cu supernatant de Kombucha și uscarea prin pulverizare a suspensiei, rezultând o compoziție conținând per 100 g produs: 12,2...12,8 g nanoceluloză bacteriană, 0,164...0,216 g polifenoli totali exprimați ca echivalent acid galic și 4,9...4,95 mg seleniu zero valent, cu activitate prebiotică, regenerantă și antioxidantă cu acțiune prelungită datorită adezivității sale la mucoase.

Revendicări: 2



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <u>a 8022 0662</u>
Data depozit <u>2.0.10.2022</u>

RO 138074 A2

33

## COMPOZIȚIE PREBIOTICĂ, REGENERATIVĂ ȘI ANTIOXIDANTĂ ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTEIA

Prezenta invenție se referă la o compoziție prebiotică și antioxidantă destinată utilizării ca ingredient activ în suplimente nutritive, produse cosmetice și dispozitive medicale, ca și la un procedeu de obținere a acestei compoziții.

Sunt cunoscute diferite compoziții cu activitate prebiotică și antioxidantă. Cererea de brevet WO2022130294A1 se referă la o compoziție de carbohidrați, care cuprinde oligozaharide pectice și acid oligo-galacturonic din coaja de fructe, utilizabilă ca aditiv pentru formularea produselor alimentare. Compoziția de carbohidrați este utilă ca înlocuitor pentru zaharurile convenționale, care contribuie la menținerea caracteristicilor reologice (de textură) ale produselor alimentare, fără a crește conținutul caloric al acestora. În plus, compoziția de carbohidrați descrisă are potențial bioactiv, având activitatea antioxidantă și proprietăți prebiotice.

Cererea de brevet US2022233559 A1 revendică o compoziție pe bază de xilo-oligozaharide care includ și porțiunile terminale ale xilozei. Aceste porțiuni sunt esterificate cu acizi hidroxicinamici. Compoziția, cu efecte antioxidante și pre- și post-biotice este destinată utilizării ca supliment nutritiv și/sau ingredient alimentar funcțional, pentru îmbunătățirea sănătății digestive.

Cererea de brevet RO135698 A0 protejează o compoziție nutraceutică cu efect antioxidant și prebiotic utilizată ca aditiv alimentar pentru o gamă de produse finite din industria alimentară. Compoziția, conform invenției, este constituită în procente masice din 0,1...3% lactoferină bovină, 0,1...3% zahăr de cocos, 0,1...8% inulină, 0,5% fosfat de calciu, procentele fiind raportate la 100 g produs alimentar prelucrat gata de consum, pe bază de cereale (în stare solidă pentru micul dejun), băuturi pe bază de lapte (gata de consum), băuturi pe bază de lapte fermentat (inclusiv băuturi de tip iaurt), băuturi nealcoolice (aromatizate), produse pe bază de iaurt, produse pe bază de brânză (nematurată), înghețată, prăjituri și produse de patiserie, bomboane, gumă de mestecat.

Cererea de brevet RO135559 A0 prezintă un aliment sub formă de baton alimentar hipoglicemic cu efecte antioxidante și prebiotice amplificate utilizat ca adjuvant în dieta hipocalorică și la un procedeu de obținere. Alimentul conform invenției este constituit din 15...35% pulbere din fructe de pădure cu un conținut de 15...20% afine, 1,5...3,5% merișor, 2,0...3,5% cătină, 2,0...3,0% coacăze negre, cu substanța uscată de minim 20%, 50...70% bază de extracție formată din sirop de malț și miere în raport de 3

: 1, 5...15% semințe de chia, 0,5...1,5% sâmburi de caise și alune măcinate, 1,0...2,0% glazură formată din unt de cacao, ulei de cocos și masă de cacao în raport 1 : 1 : 1, 2,0...3,0% pudră de cacao care înglobează semințele de chia și 0,001...0,005% sare de Himalaya, alimentul condiționat sub formă de batoane glazurate având următoarele valori nutriționale pentru 100g baton: 380...450 kcal valoare energetică, 20...40% glucide, 10...22% grăsimi, 4...14% fibre, 1...15% proteine și 0...0,3% sare. Procedul conform invenției are următoarele etape: a) obținerea amestecului format din fructe de pădure cu substanță uscată 15...30% și sare de Himalaya, macerarea acestuia timp de 24..48 ore și uscarea la o temperatură cuprinsă între 40...45°C timp de 1...3 zile, urmată de mărunțire mecanică până la stadiul de pulbere fină, b) extracția polifenolilor dintr-o altă șarjă de reziduu umed de fructe de pădure cu 10 volume de etanol 50...70% timp de 24...48 ore la temperatura camerei, urmată de extracția polizaharidelor cu 10 volume de apă distilată timp de 3...6 ore la 90...100°C, concentrarea la 60°C și purificarea polizaharidelor prin precipitare cu etanol 70...80%, centrifugare la 10000...15000 rpm și în final concentrare prin evaporare la 37°C, c) înglobarea amestecului de polifenoli și polizaharide, d) prepararea bazei de extracție, e) obținerea compoziției vâscoase, f) porționarea compoziției sub formă de batoane, glazurare, ambalare în pungi și depozitare la temperaturi de sub 10°C.

Cererea de brevet CN108611242 A expune o compoziție de băuturi bogată în seleniu, care este un amestec de infuzie de ceai negru cu oțet de mere și pireu de banane, ca și o metodă de preparare a acesteia. Băutura este preparată din următoarele substanțe în procent din greutate: 3-8% în greutate pudră de ceai negru bogat în seleniu, 20-30% în greutate banane, 20-40% în greutate oțet de mere și restul de apă de băut.

Cererea de brevet RO134936 A2 descrie o compoziție de hidrogel cu rol cosmeceutic pentru reglarea microbiomului pielii. Compoziția, conform invenției, este constituită din 20...25% o fază internă de particule solide de alginat acoperite cu chitosan cu un conținut minim de 1010 unități formatoare de colonii din *Lactobacillus paracasei*, eventual în amestec cu *L. rhamnosus*, și 75...80% o fază externă de hidrogel format din 2,5% hidrolizat proteic de pește, 1% acid ascorbic, 1,5% prebiotic, 0,3% clorură de calciu, 1% glicerină, 1% PEG 6000, 0,7% carbomer, 1% conservant natural din extract concentrat de sâmburi de grapefruit, 0,3% sorbat de potasiu, respectiv, trietanolamină, 0,5% fenoxietanol, respectiv, ulei esențial de imortele, precum și apă distilată.

Cererea de brevet RO 132749 A2 se referă la o compoziție mucoadezivă pentru menținerea și/sau re-echilibrarea microflorei vaginale. Compoziția, conform invenției, este constituită în părți în greutate din 50...80 părți soluție apoasă formată din 20...60% copolimer de tip Poloxamer P407, 1...5% nanoceluloză bacteriană, eventual, 5...10% chitosan, respectiv 0,1...5% pulbere de cactus, 5...20 părți în greutate compuși post biotici de tip acid lactic și acid citric, eventual 2...6 părți în greutate uleiuri esențiale alese dintre ulei esențial de cimbru și arbore de ceai, respectiv 5...10 părți în greutate oligozaharide prebiotice alese dintre inulină și fructo-oligozaharide, și 4...10 părți în greutate extracte hidrogliceroalcoolice de concentrație 50% alese dintre merișor și semințe de struguri.

Brevetul US9808497 B2 dezvăluie o compoziție care cuprinde un concentrat de prune și/sau prune și una sau mai multe oligozaharide prebiotice, nedigerabile, solubile în apă. Opțional, unul sau mai mulți îndulcitori cu conținut scăzut de calorii, un antioxidant, senozide de calciu sau extract din *Senna* sp., PEG-3350, lemn dulce, cacao, cafea, arome de ceai; se adaugă arome de fructe și condimente, gelatină, agar-agar, caragenan, pectină sau pudră de cacao. Alte ingrediente pot fi prezente sub formă de suplimente alimentare, cum ar fi vitaminele solubile în apă, vitaminele solubile în lipide; aminoacizi, maltodextrină, resveratrol, cofeină, suplimente minerale sau produse cunoscute ca având un efect de adjuvant natural pentru inducerea somnului sau pentru utilizare ca laxativ. Sunt posibile o varietate de formulări, cum ar fi premix-uri, sau produse nutraceutice de tipul un laxativ + băutură energizantă, sau batoane energizante, sau ca supliment prebiotic în probiotice de tip iaurturi, sau sub formă de gume, ciocolată, bomboane și deserturi.

Dezavantajul comun al compozițiilor descrise mai sus este limitarea lor la o singură aplicație, ca supliment nutritiv sau ca ingredient activ al unor produse cosmetice sau dispozitive medicale cu rol în reglarea sănătății pielii și/sau a mucoaselor.

Sunt cunoscute și diferite alte compoziții care au utilizări multiple, ca ingrediente în special compoziții pe bază de polifenoli, acizi hidroxicinamici, antociani și/sau flavonoide. Polifenolii sunt larg utilizați în formulări de produse cosmetice (de Lima Cherubim et al., 2020; Zillich et al., 2015), ca și în suplimente nutritive, nutraceutice și alimente funcționale (Cory et al., 2018). Acizii hidroxicinamici au atât aplicații cosmetice (Taofiq et al., 2017), cât și aplicații nutraceutice (Silva & Batista, 2017). Antocianii se regăsesc ca ingrediente active în nutraceutice (Salehi et al., 2020; Zhu et al., 2016) și cosmetice (Diaconeasa et al., 2020). Flavonoidele au de asemenea efecte

benefice ca ingrediente active în suplimente nutritive și nutraceutice (Egert & Rimbach, 2011; Li et al., 2022) și în produse cosmetice (Obaid et al., 2021). Compozițiile prebiotice și antioxidante cu polifenoli / acizi fenolici / flavonoide și, eventual, oligo/polizaharide prebiotice au de obicei aplicații multiple.

Brevetul EP2999687 B1 descrie un procedeu de extracție a acidului ferulic prezent într-o fază apoasă, obținut prin tratarea a cel puțin unui material vegetal și care conține, de asemenea, polizaharide, procesul menționat cuprinzând cel puțin următoarele etape: 1) tratamentul respectivului material vegetal urmat de o separare solid / lichid pentru a recupera o fază solidă și o fază lichidă apoasă cuprinzând acidul ferulic și respectivele polizaharide, 2) tratamentul fazei lichide menționate pentru a separa selectiv, pe de o parte, polizaharidele și, pe de altă parte, acid ferulic prezent într-o fracție apoasă, 3) concentrația fracției apoase menționate care conține acidul ferulic astfel încât să recupereze un flux concentrat de acid ferulic, 4) recuperarea acidului ferulic sub formă solidă.

Cererea de brevet RO135149 A0 prezintă un procedeu alcătuit din următoarele etape: măcinarea umedă a materialului vegetal, determinarea activității antioxidante de captare a radicalului 2,2-difenil-1-picrililhidrazil (DPPH), față de care se dozează un amestec de enzime de extracție format din pectinază și feruloil-esterază, ultrasonicare repetată a substratului vegetal cu enzime, urmată de extracția sub-critică în contracurent, separarea materialului vegetal de extractul alcoolic și concentrarea până la 35% substanță uscată cu recuperarea etanolului, din care rezultă un extract având un conținut minim de 2,7 g resveratrol, 12,2 g acizi hidroxicinamici totali și 18,3 g oligozaharide pectice la 100 ml extract etanolic concentrat și o activitate antioxidantă de captare a radicalului DPPH de cel puțin 3,5 mg echivalent Trolox per g extract. Compoziția rezultată este destinată utilizării pentru produse cosmetice și nutraceutice.

Dezavantajul comun al unor astfel de compoziții este durata lor limitată de acțiune în timp. Pentru a crește durata de acțiune a diferitelor extracte au fost realizate formulări cu eliberare controlată. Cererea RO134737 A2 prezintă un procedeu de obținere a unor compoziții de ingrediente multifuncționale cu eliberare controlată pentru utilizare în industria alimentară. Procedeu, conform invenției, constă în gelifierea termică a compușilor activi din extractul din pieliță de struguri, având conținut ridicat în compuși flavonoidici într-o matrice de microîncapsulare din proteine de zer cu funcționalitate ridicată, modificare prin denaturare termică și reticulare enzimatică, rezultând hidrogeluri cu eficiență ridicată de încapsulare pentru compușii antocianici,

având un conținut de antociani monomerici totali de 6,69...9,82 mg echiv. malvidin 3-glucozid/100 g s.u. și activitate oxidantă de 38,74...45,19 mMol Trolox/g s.u.

Cererea de brevet US20200368168A1 descrie un procedeu de preparare a unor particule compozite prin electropulverizare, pentru a îmbunătăți stabilitatea polifenolilor, care include următoarele etape: pregătirea unui compozit pectină-silice; adăugarea de compuși polifenolici în compozitul pectină-silice pentru a prepara o soluție de bază; și electropulverizarea coaxială a soluției de bază și a soluției de acoperire pentru a prepara particule electropulverizate încărcate cu polifenoli.

Deși eliberează controlat polifenolii, compozițiile descrise până în prezent nu au o acțiune prelungită pentru că sunt îndepărtate de pe mucoase. Problema tehnică pe care o rezolvă această invenție este de a realiza o compoziție prebiotică, regenerantă și antioxidantă cu acțiune prelungită datorită adezivității sale la mucoase.

Compoziția prebiotică și antioxidantă conține per 100 g produs 12,2 – 12,8 grame de nanoceluloză bacteriană, 0,164 – 0,216 grame de polifenoli totali, exprimați ca echivalent acid galic, 90-92 mg de siliciu solubil exprimat ca  $H_4SiO_4$ , 14,7 – 14,85 mg seleniu, predominant sub formă de nanoparticule cu seleniu zerovalent, și are o activitate antioxidantă de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil, de cel puțin 1,2 mg echivalent Trolox per g compoziție, un index de mucoadezivitate determinat reologic de minim 55 și un scor al activității prebiotice față de *Lactobacillus johnsonii* ATCC 33200 de cel puțin 1,05.

Procedeu de obținere a acestei compoziții este alcătuit din următoarele etape:

- Prepararea unei suspensii de frunze de ceai negru, în raport de 7 -10 g în 1000 ml apă adusă la 90...95°C și micronizarea frunzelor de ceai și uniformizarea infuziei prin amestecarea viguroasă într-un omogenizator de înaltă presiune cu piston, prevăzut cu o valvă de tip muchie de cuțit, două cicluri la 250 MPa;
- Filtrarea infuziei rezultate și dizolvarea de zahăr cristal, în cantitate de 8 g la 100 ml de infuzie și răcirea infuziei îndulcite la temperatura camerei;
- Adăugarea de 15 mg de selenit și 50 g de polen multifloral la 1000 ml de infuzie și inocularea infuziei îndulcite și tratate cu biofilm / peliculă de cultură de Kombucha / SCOBY, 5 părți biomasă umedă la 100 de părți infuzie îndulcită și cultivare statică a consorțiului SCOBY timp de 14 zile la temperatura de 25-28°C;
- Recoltarea peliculei de Kombucha / SCOBY, îndepărtarea melanoidinelor prin spălare repetată cu două soluții alcaline, respectiv 1M și 4M NaOH, asistată de ultrasonare la o amplitudine de 60 μm și cu un aport specific de energie de 25 J, urmată

de clătirea intensivă cu apă distilată a peliculelor până la un pH apropiat de neutru (7,5 - 8), mărunțirea preliminară a peliculelor utilizând un tocător electric cu cuțite, prelucrarea mecanică avansată utilizând o moară coloidală pentru obținerea de microfibrile; fracționarea microfibrilelor celulozice la presiune de 1500 bari, utilizând un microfluidizator cu cameră diamantată în formă de Z, cu scopul obținerii de nanofibrile celulozice;

- Îndepărtarea grăuncioarelor de polen prin filtrare, neutralizarea filtratului la pH=7 și omogenizarea nanocelulozei cu filtratul de Kombucha neutralizat, în raport de 1 parte suspensie nanoceluloză la 10 părți supernatant, folosind un omogenizator cu piston, la o presiune de 500 bari, 2 treceri și uscarea prin pulverizare a suspensiei rezultate, la o temperatură de intrare de 140 - 145°C și la o temperatură de ieșire de 70-75°C.

Avantajele invenției sunt următoarele:

- Pulberea obținută are utilizări diverse, ca supliment nutritiv sau ca ingredient activ al unor produse cosmetice sau dispozitive medicale cu rol în reglarea sănătății pielii și/sau a mucoaselor;
- Efectul prebiotic și antioxidant este amplificat de interacțiunea dintre nanoparticulele de seleniu și polifenoli;
- Seleniu determină inhibarea producerii de melanoidine de către bacteriile acetice, iar acest fapt facilitează procesul de purificare a celulozei bacteriene, ca și procesul ulterior de obținere a nanocelulozei prin nanofibrilare;
- Siliciu eliberat din grăuncioarele de polen împreună cu nanoceluloza bacteriană are efect regenerativ;
- Produsele pe baza pulberii obținute au o acțiune prelungită datorită mucoadezivității recunoscute a nanocelulozei, care favorizează aderența la diferitele tipuri de mucoase, intestinală, vaginală, nazală, ca și pe piele.

Prezenta invenție este ilustrată prin următoarele exemple, care ilustrează invenția fără a o limita.

*Exemplu 1.* Se prepară într-un vas de sticlă termorezistentă o suspensie de frunze de ceai negru, 7 g în 1000 ml apă adusă la 90...95°C. Suspensia de frunze de ceai se micronizează și se uniformizează infuzia, prin amestecarea viguroasă într-un omogenizator de înaltă presiune cu piston (de ex. GEA Niro Soavi Arriete NS2006, Parma, Italia), prevăzut cu o valvă de tip muchie de cuțit, două cicluri la 250 MPa. Se filtrează infuzia rezultată pe filtru cu hârtie de filtru (Whatman™ nr. 1, Cytiva, Marlborough, MA, SUA). În suspensia rezultată se dizolvă zahăr cristal, în cantitate de

80 g la litru de infuzie filtrată. Infuzia se răcește la temperatura camerei. Se adaugă 15 mg de selenit la 1 litru de infuzie și 50 grame polen multifloral. Se inoculează cu biofilm / peliculă de cultură de Kombucha / SCOBY, 5 părți biomasă umedă la 100 de părți infuzie îndulcită. Se cultivă consorțiul SCOBY timp de 14 zile la temperatura de 25°C. Se recoltează biofilmul / pelicula de Kombucha, care este format(ă) din celuloză bacteriană. Se îndepărtează melanoidinele prin spălare repetată cu două soluții alcaline, respectiv 1M și 4M NaOH, asistată de ultrasonare la o amplitudine de 60 μm și cu un aport specific de energie de 25 J (asigurate de ex. procesor ultrasonic UP50H, Hielscher, Teltow, Germania). Se clătesc intensiv cu apă distilată pelicule până la un pH apropiat de neutru (7,5 – 8). Se mărunțesc peliculele Kombucha utilizând un tocător electric cu cuțite (ca de ex. blende Bosch, Gerlingen, Germania). Se continuă prelucrarea mecanică avansată, utilizând o moară coloidală (ca de ex. MK 2000, IKA, Staufen, Germania), pentru obținerea de microfibrile de celuloză bacteriană. Microfibrilele de celuloză se fracționează la nanofibrile celulozice, utilizând un microfluidizator (de ex. LM10 Microfluidizer®, Microfluidics, Westwood, MA, SUA), cu cameră diamantată în formă de Z, operat la o presiune de 1500 bari.

Se îndepărtează grăuncioarele de polen prin filtrare. Filtratul obținut, care este de culoare roșiatică, datorită formării nanoparticulelor de seleniu zerovalent, se neutralizează cu hidroxid de sodiu până la pH-7. Se amestecă filtratul cu nanoceluloza obținută prin fibrilare. Se adaugă 100 grame de nanoceluloză, la 1000 ml supernatant de Kombucha. Se omogenizează folosind un omogenizator cu piston (de ex. GEA Niro Soavi Arriete NS2006, Parma, Italia), operat la o presiune de 500 bari. Se fac două treceri, pentru a fi omogenizate și nanoparticulele de seleniu în amestecul final. Compoziția rezultată se usucă prin pulverizare (de ex. pe un uscător prin pulverizare (ca de ex. Mini Spray Dryer S-300. Büchi, Flawil, Switzerland), la o temperatură de intrare de 140 - 145°C și la o temperatură de ieșire de 70-75°C.

Se ia circa un 1 gram din compoziția rezultată, care se cântărește cu precizie și se reconstituie cu 25 ml apă, prin ultrasonare (procesor ultrasonic UP50H, Hielscher, Teltow). În compoziția reconstituită rezultată se determină polifenolii totali cu reactiv Folin Ciocâlțeu (Ainsworth & Gillespie, 2007), celuloza totală prin metoda colorimetrică rapidă (Bauer & Ibáñez, 2014), siliciul solubil prin metoda colorimetrică (Coradin et al., 2002), seleniul - prin ICP-MS (Constantinescu-Aruxandei et al., 2018). Se exprimă per 100 grame produs. Se determină o cantitate de 12,2 grame de nanoceluloză



bacteriană, 0,164 grame de polifenoli totali, exprimați ca echivalent acid galic, 90-92 mg de siliciu solubil exprimat ca  $H_4SiO_4$ , și 14,7 mg seleniu pe 100 grame de produs.

Se determină în compoziția reconstituită activitatea antioxidantă prin metoda capacității antioxidante relative (Cheng et al., 2006). Rezultă o activitate de 1,25 mg echivalent Trolox per g compoziție. Se determină reologic (pe un reometru hibrid HR 30, TA Instruments, New Castle, DE, USA), la o rată de forfecare de  $33.9 s^{-1}$ , indicele de mucoadezivitate, conform metodei descrise recent (Černohlávek et al., 2021). Indicele de mucoadezivitate este 55,1. Compoziția rezultată este evaluată pentru activitatea prebiotică, conform metodei de raportare a creșterii pe mediu cu 1% compoziție prebiotică față de creșterea pe mediu cu 1% glucoză (Huebner et al., 2007), și se determină un scor al activității prebiotice față de *Lactobacillus johnsonii* ATCC 33200, de 1,05.

Se determină efectul regenerativ al compoziției rezultate prin utilizarea metodei leziunilor din culturi de celule - scratch-wound assay (Cory, 2011). Se pune în evidență efectul regenerativ al compoziției realizate.

*Exemplu 2.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu singura diferență că se folosesc 10 grame de ceai negru. Compoziția rezultată conține per 100 g produs 12,8 grame de nanoceluloză bacteriană, 0,216 grame de polifenoli totali, exprimați ca echivalent acid galic, 92 mg de siliciu solubil exprimat ca  $H_4SiO_4$ , 14,85 mg seleniu, predominant ca nanoparticule de seleniu zerovalent, și are o activitate antioxidantă de captare a radicalului DPPH, de 1,35 mg echivalent Trolox per g compoziție, un index de mucoadezivitate determinat reologic 58,2 și un scor al activității prebiotice față de *Lactobacillus johnsonii* ATCC 33200 de 1,09. Compoziția are, de asemenea, un efect regenerativ.

**Fișă bibliografică**

- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols*, 2(4), 875.
- Bauer, S., & Ibáñez, A. B. (2014). Rapid determination of cellulose. *Biotechnology and bioengineering*, 111(11), 2355-2357.
- Černohlávek, M., Brandejsová, M., Štěpán, P., Vagnerová, H., Hermannová, M., Kopecká, K., Kulhánek, J., Nečas, D., Vrbka, M., Velebný, V., & Huerta-Angeles, G. (2021). Insight into the Lubrication and Adhesion Properties of Hyaluronan for Ocular Drug Delivery. *Biomolecules*, 11(10), 1431. <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/10/1431>
- Cheng, Z., Moore, J., & Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(20), 7429-7436.
- Constantinescu-Aruxandei, D., Frîncu, R. M., Capră, L., & Oancea, F. (2018). Selenium analysis and speciation in dietary supplements based on next-generation selenium ingredients. *Nutrients*, 10(10), 1466.
- Coradin, T., Durupthy, O., & Livage, J. (2002). Interactions of amino-containing peptides with sodium silicate and colloidal silica: a biomimetic approach of silicification. *Langmuir*, 18(6), 2331-2336.
- Cory, G. (2011). Scratch-wound assay. In *Cell migration* (pp. 25-30). Springer.
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. *Frontiers in nutrition*, 5.
- de Lima Cherubim, D. J., Buzanello Martins, C. V., Oliveira Fariña, L., & da Silva de Lucca, R. A. (2020). Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *Journal of cosmetic dermatology*, 19(1), 33-37.
- Diaconeasa, Z., Știrbu, I., Xiao, J., Leopold, N., Ayvaz, Z., Danciu, C., Ayvaz, H., Stănilă, A., Nistor, M., & Socaciu, C. (2020). Anthocyanins, vibrant color pigments, and their role in skin cancer prevention. *Biomedicines*, 8(9), 336.
- Egert, S., & Rimbach, G. (2011). Which sources of flavonoids: complex diets or dietary supplements? *Advances in Nutrition*, 2(1), 8-14.
- Huebner, J., Wehling, R., & Hutkins, R. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 17(7), 770-775.
- Li, R.-L., Wang, L.-Y., Liu, S., Duan, H.-X., Zhang, Q., Zhang, T., Peng, W., Huang, Y., & Wu, C. (2022). Natural Flavonoids Derived From Fruits Are Potential Agents Against Atherosclerosis. *Frontiers in nutrition*, 9, 862277.
- Obaid, R. J., Mughal, E. U., Naeem, N., Sadiq, A., Alsantali, R. I., Jassas, R. S., Moussa, Z., & Ahmed, S. A. (2021). Natural and synthetic flavonoid derivatives as new potential tyrosinase inhibitors: A systematic review. *RSC advances*, 11(36), 22159-22198.
- Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Cappellini, F., Reiner, Ž., Zorzan, D., Imran, M., Sener, B., Kilic, M., El-Shazly, M., & Fahmy, N. M. (2020). The therapeutic potential of anthocyanins: current approaches based on their molecular mechanism of action. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1300.
- Silva, E. D., & Batista, R. (2017). Ferulic Acid and Naturally Occurring Compounds Bearing a Feruloyl Moiety: A Review on Their Structures, Occurrence, and Potential Health Benefits [Review]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(4), 580-616. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12266>
- Taofiq, O., González-Paramás, A. M., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives: Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives, a Review. *Molecules*, 22(2), 281. <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/2/281>
- Zhu, Y., Bo, Y., Wang, X., Lu, W., Wang, X., Han, Z., & Qiu, C. (2016). The effect of anthocyanins on blood pressure: A prisma-compliant meta-analysis of randomized clinical trials. *Medicine*, 95(15).
- Zillich, O., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P., & Kerscher, M. (2015). Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *International journal of cosmetic science*, 37(5), 455-464.

## Revendicări

1. Compoziția prebiotică și antioxidantă conform invenției, **caracterizată prin aceea că** are următorul conținut per 100 g: 12,2 – 12,8 grame de nanoceluloză bacteriană, 0,164 – 0,216 grame de polifenoli totali, exprimați ca echivalent acid galic, 90-92 mg de siliciu solubil exprimat ca  $H_4SiO_4$ , 14,7 – 14,85 mg seleniu, predominant sub formă de nanoparticule cu seleniu zerovalent, și are o activitate antioxidantă de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, de cel puțin 1,2 mg echivalent Trolox per g compoziție, un index de mucoadezivitate determinat reologic de minim 55 și un scor al activității prebiotice față de *Lactobacillus johnsonii* ATCC 33200 de cel puțin 1,05.

2. Procedeu de obținere a compoziției conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: prepararea unei suspensii de frunze de ceai negru, în raport de 7 -10 g în 1000 ml apă adusă la 90...95°C și micronizarea frunzelor de ceai și uniformizarea infuziei prin amestecarea viguroasă într-un omogenizator de înaltă presiune cu piston, prevăzut cu o valvă de tip muchie de cuțit, două cicluri la 250 MPa; filtrarea infuziei rezultate și dizolvarea de zahăr cristal, în cantitate de 8 g la 100 ml de infuzie și răcirea infuziei îndulcite la temperatura camerei; adăugarea de 15 mg de selenit și 50 g polen monofloral la 1000 ml de infuzie și inocularea infuziei îndulcite și tratate cu biofilm / peliculă de cultură de Kombucha / SCOBY, 5 părți biomasă umedă la 100 de părți infuzie îndulcită și cultivare statică a consorțiului SCOBY timp de 14 zile la temperatura de 25-28°C; recoltarea peliculei de Kombucha / SCOBY, îndepărtarea melanoidinelor prin spălare repetată cu două soluții alcaline, respectiv 1M și 4M NaOH, asistată de ultrasonare la o amplitudine de 60 μm și cu un aport specific de energie de 25 J, urmată de clătirea intensivă cu apă distilată a peliculelor până la un pH apropiat de neutru (7,5 -8), mărunțirea preliminară a peliculelor utilizând un tocător electric cu cuțite, prelucrarea mecanică avansată utilizând o moară coloidală pentru obținerea de microfibrile; fracționarea microfibrilelor celulozice la presiune de 1500 bari, utilizând un microfluidizator cu cameră diamantată în formă de Z, cu scopul obținerii de nanofibrile celulozice; îndepărtarea grăuncioarelor de polen prin filtrare, neutralizarea filtratului și omogenizarea nanocelulozei cu filtratul de Kombucha, în raport de 1 parte nanoceluloză la 10 părți supernatant, folosind un omogenizator cu piston, la o presiune de 500 bari, 2 treceri și uscarea prin pulverizare a suspensiei rezultate, la o temperatură de intrare de 140 - 145°C și la o temperatură de ieșire de 70-75°C.