

REZUMAT

REALIZAREA EXTRACTELOR FINALE DIN SUB-PRODUSELE DE CĂTINĂ ȘI AFINE LA NIVEL DE LABORATOR. REALIZAREA DE SUPLIMENTE ALIMENTARE ȘI PRODUSE ALIMENTARE FUNCȚIONALE LA NIVEL DE LABORATOR

Activități conform planului de realizare a proiectului:

1. *Elaborarea tehnologiilor de obținere a celor două tipuri de produse suplimentare alimentare și produse funcționale la nivel pilot.*
2. *Amenajarea și pregătirea stației pilot pentru experimentări.*
3. *Cercetări experimentale de realizare a celor două produse*
4. *Evaluarea calităților suplimentelor alimentare și a produselor funcționale nou create, din punct de vedere fizico-chimice, nutrițional și microbiologic.*
5. *Soluții de ambalare a produselor nou create*
6. *Verificarea tehnologiilor propuse la scară industrială pentru suplimentele alimentare. Elaborarea documentației de brevetare și depunerea cererilor de brevet invenție.*
7. *Finalizarea studiilor de stabilitate a extractelor.*
8. *Finalizarea studiilor de stabilitate a produselor nou create.*
9. *Diseminarea rezultatelor către mediul științific prin publicarea rezultatelor sub forma de articole în reviste de specialitate de prestigiu (ISI) și prin participarea la evenimente științifice (conferințe, simpozioane, fîrguri).*

REZULTATE

1.Elaborarea tehnologiilor de obținere a celor două tipuri de produse suplimentare alimentare și produse funcționale la nivel pilot.

În România, suplimentele alimentare sunt reglementate prin Ordinul Ministerului Sănătății nr. 1069/2007, unde sunt definite ca „produse alimentare al căror scop este să completeze dieta normală și care sunt surse concentrate de nutrienți sau alte substanțe cu efect nutrițional ori fiziologic, separat sau în combinație, comercializate sub formă de doză, cum ar fi: capsule, comprimate (oblong și alte forme similare), pachete de pulbere, sticle cu picurător și alte forme asemănătoare de preparate lichide sau pulberi destinate consumului în cantități mici, măsurabile”. De asemenea se mai prevede ca etichetarea, prezentarea și reclama nu trebuie să atribuie suplimentelor alimentare proprietatea de prevenire, tratare sau vindecare a unei boli umane ori să facă referire la asemenea proprietăți.

Pe eticheta produsului trebuie să fie declarată cantitatea de nutrienți sau substanțe cu efect nutrițional ori fiziologic pentru o porție de produs recomandată pentru consumul zilnic – reprezintă valoarea medie obținută pe baza analizei produsului, efectuată de către producător.

În ultimele două decenii a crescut interesul pentru plantele medicinale și terapii naturale atât în țări dezvoltate, cât și în cele în curs dezvoltare.

Studiile de piață arată că populația optează preponderant pentru produsele naturale datorită beneficiilor recunoscute fitoterapiei (faptul că aceste produse naturale pot fi asociate cu un tratament alopatic, aducând organismului beneficii în acest caz, diminuând uneori, nu doar simptomele minore, ci chiar efectele adverse ale medicamentelor).

Industria farmaceutică și a suplimentelor alimentare se află într-o continuă dezvoltare, în special ramura fitoterapeutică care se axează pe dezvoltarea produselor destinate îmbunătățirii stării de sănătate, pe bază de plante dar și îmbunătățirea proceselor industriale de producție și de control a calității acestor produse. În acest sens se fac numeroase cercetări naționale și internaționale pe diferite specii de plante, pentru identificarea componentelor bioactive din compoziția lor, dar și pentru îmbunătățirea proceselor extractive și de testare a proprietăților lor biochimic. La finalizarea etapei 4, împreună cu echipa de cercetare s-au realizat două suplimente alimentare, unul pentru menținerea unui sistem venos sănătos, iar cel de al doilea pentru susținerea funcției cognitive normale și îmbunătățirea circulației vasculare cerebrale, caracterizate din punct de vedere fizico-chimic.

Suplimentul alimentar S1* a fost conceput pentru menținerea unui sistem venos sănătos, având un conținut bogat în substanțe biologice active, o combinație optimă de fitonutrienți care acționează sinergic în realizarea unei activități biologice specifice, pentru a asigura buna funcționare a întregului organism, având ca efect îmbunătățirea rezistenței vaselor de sânge, precum și refacerea țesutului conjunctiv. Această formulă contribuie la menținerea unui nivel optim de colagen în pereții vasculari și la buna funcționare a circulației sanguine, pentru îmbunătățirea calității vieții.

Cel de-al doilea supliment alimentar S2** contribuie la: îmbunătățirea funcțiilor cognitive și a capacității de memorare, ameliorarea afecțiunilor degenerative la nivel cerebral și a hiperagitației. De asemenea, produsul ajută la reducerea activității enzimelor responsabile cu degradarea acetilcolinei la nivel cerebral, menținerea echilibrului energetic normal și funcției cerebrale normale.

În această etapă, a-4-a finală, împreună cu echipa de cercetare a proiectului s-au elaborat tehnologiile de obținere a celor două tipuri de produse: suplimentele alimentare și produsele funcționale la nivel pilot, sub formă de capsule și batoane, utilizând extractele optimizate obținute în cadrul firmei Hofigal.
e și a efectelor asupra organismului uman.

2. Amenajarea și pregătirea stației pilot pentru experimentări.

În această etapă sunt prezentate fazele procesului tehnologic de obținere a produselor funcționale (batoane proteice, energizante și digestive), descrise în schema tehnologică de flux de mai jos:

1. Cântărire materii prime

Se cântăresc materiile prime vegetale folosind recipientele confecționate din inox, cu ajutorul Balanței *modelul – BE 04 CP (v. Figura 1)*



Fig. 3. Balanța modelul – BE 04 CP”

2. Măcinare/Tocare

În funcție de materiile prime utilizate, acestea sunt măcinate sau tocate.

- 2.1. Măcinarea se realizează cu ajutorul morii pentru măcinat plantă (*modelul – Remeco”*, confecționată din oțel inoxidabil).



Fig.4 Moara pentru mărunțit planta „modelul MMC 002– Remeco”

Parametrii tehnici de funcționare sunt:

- *Puterea instalată - 5 KW;*
- *Turație - 2500 rot/min;*
- *Tensiunea de alimentare - 380V-50Hz.*

- 2.2. Tocarea se realizeaza cu ajutorul unei mașinii electrice de tocat „*modelul – SKU: FWFC550”*



Fig. 5. Mașina electrică de tocat „modelul – SKU: FWFC550”

3. Preparare amestec batoane

Amestecul masei pentru prepararea batoanelor se face în vasul de omogenizare, prevazut cu paleți de teflon, care se rotesc circular până la omogenizarea liantului împreună cu ingredientele introduse.



Fig.6 *MIXER de AMESTECARE – DEGRIZE Modelul: 107.1*

4. Pregătirea celor trei tipuri de batoane (proteice, energizante și digestive) după următoarele rețete.

În cadrul proiectului de cercetare, împreună cu echipa Hofigal și partenerul IBA, s-au realizat trei rețete pentru produsele funcționale, așa cum au fost descrise în celelalte etape. Amestecul omogenizat se întinde pe planșeta de teflon a mașinii de presat și se presează cu tamburul de teflon până la obținerea grosimii dorite apoi de taie cu ajutorul unei lame de cuțit de la mașina de tăiere de capacitate 50 kg/h, la dimensiunea de 45 – 50 grame a batonului respectiv.

Tipurile de rețete de batoane se formează cu ajutorul următoarelor echipamente:

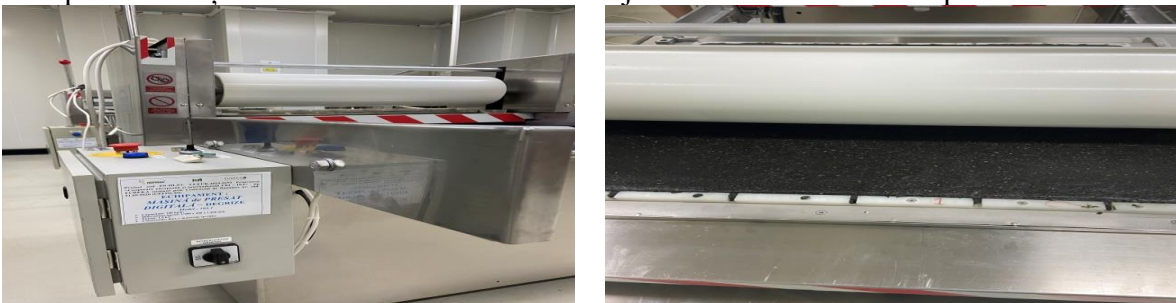


Fig. 7 *MAȘINĂ de PRESAT DIGITALĂ – DEGRIZE Modelul : 104.1*

După omogenizarea amestecului:



Fig. 8 *MAȘINA de TĂIAT – DEGRIZE Modelul: 105.1*

5. Ambalare primară batoane

Batoanele formate se ambalează în folie de Al/PE cu ajutorul mașinii de ambalat Degrize. Pe fiecare baton se imprimă lotul și data expirării cu ajutorul imprimantei cu ribon – LINX TT500 :



Fig.9 MAȘINA AMBALAT ȘI IMPRINTĂ CU RIBON – LINX TT500 –DEGRIZE Modelul: TT500

6. Ambalare colectivă

Batoanele de tip proteic, energizant și divestiv sunt ambalate primar în folie și inscripționate cu ingredientele și cantitatea conform legislației în vigoare, apoi sunt ambalate colectiv în cutii de carton ce conțin 20 U.C.

7. Depozitare

Cutiile de carton ce conțin tipurile de batoane sunt depozitate în Depozitul de Produs finit și sunt păstrate în condiții controlate de temperatură și umiditate

Condiții de depozitare sunt:

- temperatură: 15-25°C
- umiditate relativă: 40-60 %.

	<p style="text-align: right;">HOFIGAL Export Import SA Intrarea Serelor Nr. 2, Sector 4, București, România Tel: 021 334 51 35; Tel./Fax: 021 334 59 05 www.hofigal.eu</p> <p style="text-align: center;">Baton proteic nr. 1</p> <p>Ingrediente/100g produs: pastă de curmale fără sămbure, pastă de prune fără sămbure, extract concentrat apos de topinambur, șrot de cânepă degresat măcinat, șrot de soia înveliș degresat măcinat, semințe de dovleac măcinate, semințe de chia măcinate, biomasă Spirulină, extract concentrat apos de lemn dulce, extract de lămâie</p>
--	--

Fig. 10 Baton proteic nr.1

Batoanele proteice conțin de obicei cel puțin 10 grame de proteine, iar restul compoziției este alcătuit din procente diferite de carbohidrați și lipide (mai ales uleiuri vegetale), dar și săruri minerale, vitamine și creatină.



Fig. 11 Baton energizant nr.2

Batoanele energizante se recomandă a fi consumate înainte de antrenamentele intense. Batoanele energizante au un conținut mare de carbohidrați, care oferă un plus de energie în timpul efortului intens și susținut. Datorită cantităților mici de lipide sunt mai ușor de digerat și de asimilat.

Batoanele energizante conțin: pastă de curmale și pastă de prune, diferite fructe uscate care conferă gust de merișoare sau suc de afin. Batonul energizant este special creat pentru a veni în întâmpinarea nevoilor nutriționale ale sportivilor.

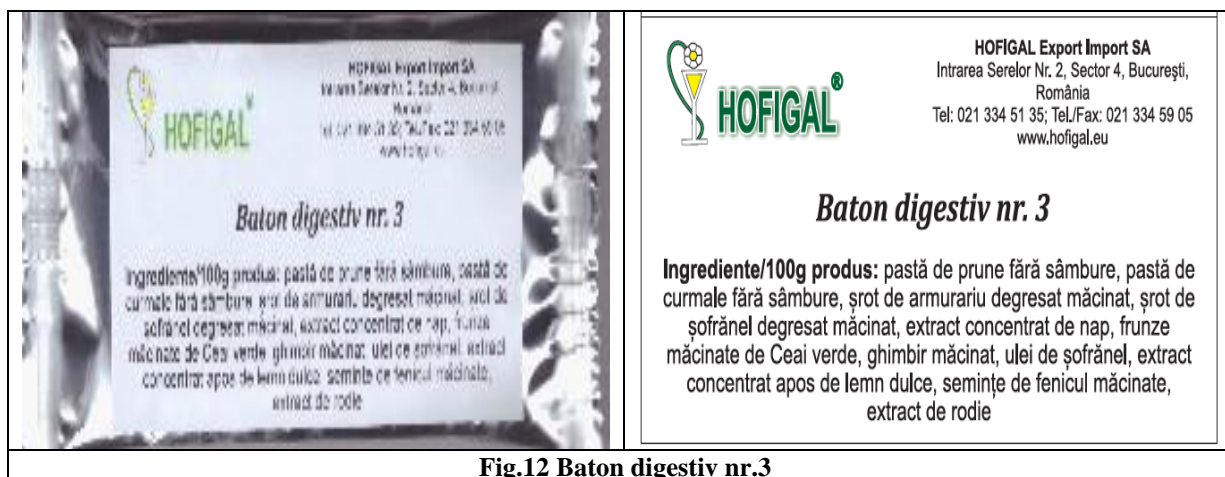


Fig.12 Baton digestiv nr.3

3. Cercetări experimentale de realizare a celor două subproduse (suplimente alimentare)

3.1. Evaluarea in vitro a unui supliment alimentar S1* pentru menținerea unui sistem venos sănătos și care să susțină circulația periferică.

3.1.1. Evaluarea citotoxicității și efectul asupra viabilității/proliferării celulare prin metodele MTS și LDH

3.I.2. Evaluarea capacității de vasodilatator prin măsurarea nivelului de molecule de NO₂⁻ eliberat în mediul de cultură al celulelor în urma tratamentului cu supliment alimentar S1- Testul cu Griess reagent*

3.I.3 Evaluarea capacității de vasodilatator a suplimentului alimentar S1 prin măsurarea nivelului intracelular de molecule NO formate în urma tratamentului celulelor cu suplimentul alimentar S1* -testul DAF-FM .*

S1. Supliment alimentar pentru menținerea unui sistem venos sănătos și care să susțină circulația periferică.*

Prezenta descriere a suplimentului alimentar S1* se referă la realizarea unui produs fitoterapeutic, sub formă de capsule care conține extract din coajă de portocale (*Citrus sinensis*), șrot de afin (*Vaccinium myrtillus*), pulbere de centella (*Centella asiatica*) și *Acerola* - fructe bogate în vitamina C, pentru îmbunătățirea rezistenței vaselor de sânge precum și procedeele de obținere precum și demonstrarea eficacității prin testări in vitro pe diverse culturi de celule.

3.I. Evaluarea in vitro a unui supliment alimentar S1* pentru menținerea unui sistem venos sănătos și care să susțină circulația periferică.

Bolile cardiovasculare sunt caracterizate și printr-o disfuncționalitate a capacității celulelor endoteliale de a produce oxidul nitric (NO). Studii științifice au demonstrat că o diminuare a biodisponibilității NO produs în celulele endoteliale poate genera disfuncția endotelială și induce o tensiunea arterială alterată caracteristică unor boli cardiovasculare [1–3]. Astfel, efectul vasodilatator a unui supliment alimentar presupune capacitatea acestuia de a induce/regla producerea de NO în celule endoteliale la un nivel la care să stimuleze menținerea unui sistem venos sănătos și să susțină circulația periferică [4].

În organismul uman, NO este sintetizat continuu în celulele endoteliale de enzimele de tip NO sintetaze, care catalizează reacția dintre aminoacidul L-arginină și NADPH (nicotinamid adenin dinucleotid fosfat) în prezența oxigenului [5]. Odată sintetizate, moleculele de NO difuzează din celulele endoteliale în vasele de sânge, acționând ca vasodilatatori, fiind considerați principalii mediatori în procesele de vasodilatație din organismul uman [6]. De asemenea, moleculele de NO pot inhiba agregarea și aderența trombocitelor, reglează circulația sângelui și acționează ca moleculă de semnalizare în sistemul nervos [7,8].

Astfel, dacă un supliment alimentar este capabil să stimuleze sinteza de NO în celulele endoteliale atunci folosirea lui în dietă poate aduce beneficii pentru sistemul circulator și nervos.

3.I.1. Evaluarea citotoxicității și a efectului asupra viabilității/proliferării celulare prin metodele MTS și LDH. Prepararea probelor și controalelor s-a efectuat conform și ISO 10993-5:2009 „Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity”.

Materiale și metode. Linia standardizată de celule umane de tip endotelial, EA.hy926 (ATCC CRL-292) a fost menținută în cultură, folosindu-se mediu de cultura de tip Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) de la Lonza, suplimentat cu 10 % ser fetal bovin (Gibco) și 1% antibiotic antimicotic (Gibco).

Culturile celulare au fost incubate la 37°C și în atmosferă de 5% CO₂, iar experimentele s-au realizat pornind de la o densitate celulară de 10,000 celule/godeu pe placa cu 96 de godeuri. Toate experimentele au fost repetate de trei ori, probele și controalele au fost lucrate în triplicat la fiecare testare. Viabilitatea celulară a fost evaluată cu kitul CellTiter 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay (MTS), Promega, prin adăugarea a 20 μL reactiv/godeu, apoi, după o perioadă

de incubare de 3 ore a fost citită densitatea optică (DO) la 490 nm cu cititorul de plăci Elisa BIOBASE-EL10. Numărul de celule viabile este proporțional cu DO citită. Au fost realizate experimente de evaluare a viabilității celulare (test MTS) în prezența suplimentului alimentar S1 și a citotoxicității (test LDH) indusă de S1 pe celulele Ea.hy926 tratate pe intervalele de timp de 24, 48 și 72 de ore, la 5 diluții diferite: D30, D100, D300, D1000 și D3000 realizate din soluția stock de supliment alimentar S1 de 100 mg/ml. Pentru determinările fondului se adaugă mediul de cultură și suplimentul S1 la diluțiile de lucru în godeurile plăcii cu 96 de godeuri.

Principiul metodei MTS: Testul MTS este un test non-radioactiv de determinare a capacității de proliferare/viabilitate celulară *in vitro*, prin metoda reducerii MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], de către celulele viabile și cu capacitate proliferativă.

Prelucrearea datelor experimentale

- Densitățile Optice înregistrate la 490 nm (DO) se transferă într-un document Excell și se prelucrează statistic datele experimentale obținute.
- Pentru probele realizate în triplicat se calculează valoarea medie, abaterea standard a mediei (SD) și coeficientul de variație (CV). Este acceptată valoarea CV sub 10%.
- Viabilitate (%) = $100 \times ((DO_{490} \text{ Probă} - DO_{490} \text{ Fond}) / (DO_{490} \text{ Control pozitiv} - DO_{490} \text{ Fond}))$

Rezultate la evaluarea efectului suplimentului alimentar S1 asupra viabilității/proliferării celulelor endoteliale prin metoda MTS

În figura 13 sunt prezentate rezultatele obținute, astfel se poate observa că pentru cea mai mare concentrație de supliment alimentar (D30) viabilitatea celulelor scade pentru intervalele de tratament de 48 și 72 de ore la valori de 66%, respectiv 55% din valoarea obținută pentru celulele control, netratate. În primele 24 de ore de tratament, suplimentul alimentar S1 la diluția D30 duce la scăderea viabilității celulare la aproximativ 84 %, o valoare acceptabilă. Pentru celelalte diluții testate D100-D3000 se poate observa că viabilitatea celulelor endoteliale nu este semnificativ afectată pentru niciunul din intervalele de timp testate. Pentru D100 viabilitatea celulară scade de la 100% la primele 24 de ore de tratament, la o viabilitate de aproximativ 80% pentru 72 de ore de tratament, aceasta fiind o valoare acceptabilă pentru testările *in vitro*.

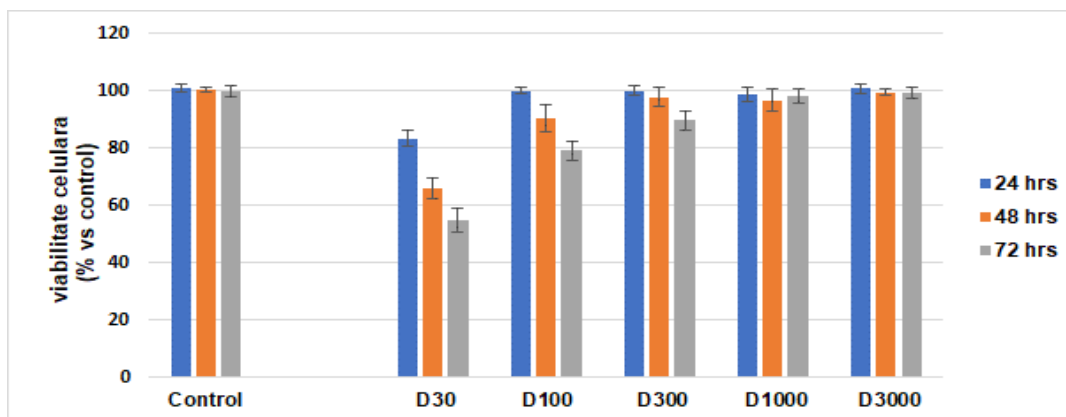


Fig.13. Viabilitatea celulelor endoteliale la tratamentul cu diferite concentrații de supliment alimentar S1* pe intervalele de timp de 24, 48 și 72 de ore

Pentru diluțiile D300-D3000, valorile obținute variază între 90-100 % pentru toate intervalele de timp testate.

Evaluarea citotoxicității suplimentului alimentar S1* prin testul LDH

Principiul metodei LDH: Testul LDH (lactat dehidrogenaza) este o metodă bazată pe testarea integrității membranei celulare prin determinarea cantității de LDH eliberat în mediu. Distrugerea membranei celulare, în prezența unei cantități toxice de compus de testat, duce la eliberarea în mediul de cultură a LDH. Nivelul ridicat de LDH, unul dintre cei mai utilizați markeri pentru studiul citotoxicității, indică un profil toxic al compusului testat pe celule. Pentru realizarea testului LDH s-a utilizat kitul CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega.

Experimentele de citotoxicitate s-au realizat pornind de la o densitate celulară de 10,000 celule/godeu pe placa cu 96 de godeuri. A fost măsurat LDH-ului eliberat în mediul de cultură al celulelor crescute în diferite concentrații de supliment alimentar S1 pe 3 intervale de timp, de 24, 48 și 72 de ore. Controlul pozitiv este reprezentat de celule netratate care se lizează pentru a obține cantitatea maximă de LDH eliberată de celule endoteliale, iar controlul este reprezentat de celulele netratate. Se preiau 50 μL de mediu de cultură din godeurile cu celule tratate și controale, peste care se adaugă 50 μL substrat LDH, apoi probele sunt lăsate 30 de minute la întuneric pentru realizarea reacției. Reacția enzimatică este oprită prin adăugarea a 50 μL de soluție stop. Se citește densitatea optică a soluțiilor de probe, controlului negativ și pozitiv la lungimea de undă de 490 nm, la cititorul de plăci Elisa BIOBASE-EL10. Valorile experimentale obținute pentru eliberarea LDH la soluțiile de probă reprezintă citotoxicitate ireversibilă indusă de tratamentul cu suplimentul alimentar aplicat celulelor.

Prelucrarea datelor experimentale

- Densitățile Optice înregistrate la 492 nm (DO) se transferă într-un document Excell și se prelucrează statistic datele experimentale obținute.
- Pentru probele realizate în triplicat se calculează valoarea medie, abaterea standard a mediei (SD) și coeficientul de variație (CV). Este acceptată valoarea CV sub 10%.
- Citotoxicitate (%) = $100 \times [(DO490) \text{ Proba} - (DO490) \text{ Fond}] / [(DO490) \text{ Control celule lizate} - (DO490) \text{ Fond}]$

Rezultatele obținute la evaluarea citotoxicității suplimentului alimentar S1* la tratamentul pe celulele endoteliale sunt prezentate în Figura 14.

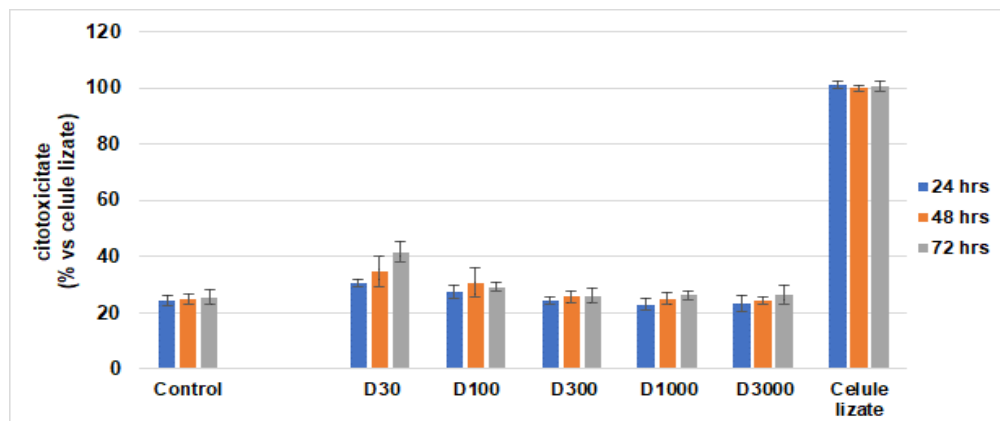


Fig.14. Citotoxicitatea indusă de suplimentul alimentar pe celulele endoteliale, pe intervalele de timp de 24, 48 și 72 de ore

Suplimentul alimentar S1* induce o toxicitate de aproximativ 2 ori mai mare decât controlul, celule netratate, la diluția D30 pe intervalul de timp de 72 de ore de tratament. Pentru

celelalte diluții valorile LDH-ului eliberat la tratamentul cu suplimentul alimentar S1 sunt asemănătoare cu cele prezentate de celulele control, netratate.

3.I.2. Evaluarea capacității de vasodilatator prin măsurarea nivelului de molecule de NO_2^- eliberat în mediul de cultură al celulelor în urma tratamentului cu supliment alimentar S1- Testul cu Griess reagent

Sistemul de reactiv Griess măsoară nitritul (NO_2^-), unul dintre cei doi produși primari de descompunere stabili și nevolatili ai oxidului de azot (NO). Oxidul nitric este un mesager fiziologic important și o moleculă prezentă în multe sisteme biologice, inclusiv țesuturile imunologice, neuronale și cardiovasculare. Acest test se bazează pe o reacție de diazotare care a fost descrisă inițial de Griess în 1879.

Principiul metodei: Sistemul de reactiv Griess se bazează pe o reacție chimică care utilizează sulfanilamidă și diclorhidrat de N-1-naftiletildiamină (NED) în condiții acide (acid fosforic). Acest sistem detectează NO_2^- într-o varietate de matrici lichide biologice și experimentale, cum ar fi plasmă, ser, urină și mediu de cultură al celulelor. Kitul folosit este Griess Reagent System, G2930, de la Promega. Limita de detecție a metodei este de 2,5 μM (125 pmol) nitriți utilizând protocolul descris mai jos:

Protocol de lucru:

Pentru cuantificarea speciilor reactive de nitrogen din mediul de cultură al celulelor este nevoie de o curbă standard cu diferite concentrații de nitrit de Na diluat în mediul de cultură folosit pentru celulele EA.hy926.

Pregătirea curbei de referință. Pentru fiecare test trebuie pregătită o curbă de referință standard pentru nitritul de Na, care va permite cuantificarea precisă a nitriților din probele biologice. Soluțiile de nitrat de Na se prepară astfel:

- se prepară 1 ml dintr-o soluție de nitrit de Na de concentrație 100 μM diluând soluție stock de 0,1 M furnizată de kit cu mediu DMEM fără roșu de fenol pentru celulele EA.hy926;
- se prepară prin diluție serială încă 6 soluții de nitrit de Na cu următoarele concentrații 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 și 1,56 μM . Câte 50 μl din fiecare soluție preparată se adaugă în godeurile destinate curbei standard, iar concentrația 0 μM este reprezentată de soluția de mediu de cultură fără adaos de nitrit de Na. Se lucrează în triplicat.

Pregătirea probelor experimentale

- 2.5×10^5 celule de endoteliale Ea.hy926 sunt însămânțate în fiecare godeu al unei plăci cu 24 de godeuri. Celulele sunt lăsate să adere 24 de ore, apoi prin schimbarea mediului de cultură inițial cu mediu DMEM fără ser fetal se va realiza sincronizarea celulelor.
- după sincronizarea celulelor (24 de ore) mediul este îndepărtat și se aplică 300 μl de mediu de cultură DMEM fără roșu de fenol, cu ser fetal 3% cu tratament de supliment alimentar S1 la diluțiile D100-D3000. Controlul negativ este reprezentat de celule netratate;
- după încă 24 de ore de tratament, mediul de cultură al celulelor (300 μl) este colectat în tuburi sterile și se centrifughează la 10 000 g.
- se adaugă câte 50 μl /godeu din fiecare probă experimentală și controlul, se lucrează în triplicați;
- folosind o pipetă multicanal, se distribuie câte 50 μl de soluție de sulfanilamidă la toate probele experimentale și godeurile care conțin seria de diluții pentru curba de referință standard a nitriților;
- se incubează 5–10 minute la temperatura camerei, ferit de lumină;

- folosind o pipetă multicanal se distribuie 50 μ l de soluție NED în toate godeurile;
- se incubează la temperatura camerei timp de 5–10 minute, ferit de lumină. Soluțiile își schimbă culoarea în violet/magenta;
- se măsoară DO la 540 nm și se reprezintă grafic valorile medii ale citirilor realizate pentru curba standard. În figura 15 este reprezentată curba standard obținută la unul dintre experimentele realizate;

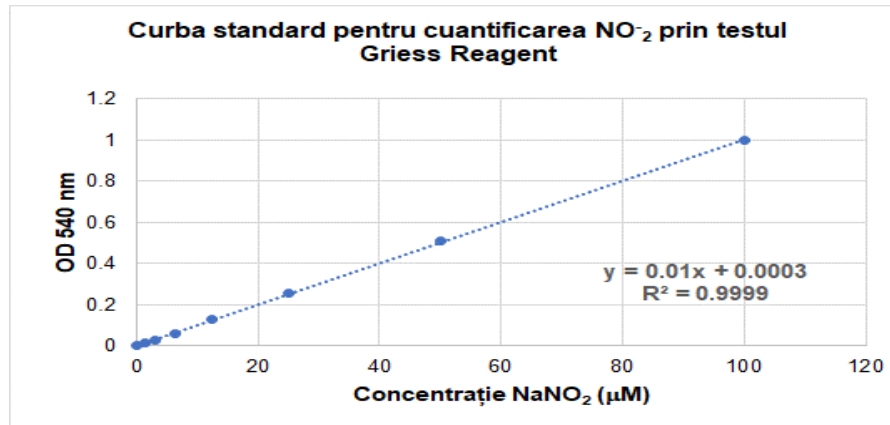


Fig.15. Curba standard a soluției de Na NO₂ la diferite concentrații (μM)

- se calculează valoarea medie de DO a fiecărei probe experimentale, și apoi se determină concentrația de nitriți din fiecare probă experimentală prin rapoartarea la curba de referință.

Astfel, pentru evaluarea capacității de vasodilatator a suplimentului alimentar S1 s-a măsurat nivelul de nitriți pe care celulele endoteliale îl produc la tratamentul cu supliment alimentar pe un interval de 24 de ore. Rezultatele finale ale probelor au fost raportate la celulele control, netratate, și sunt prezentate în figura 16.

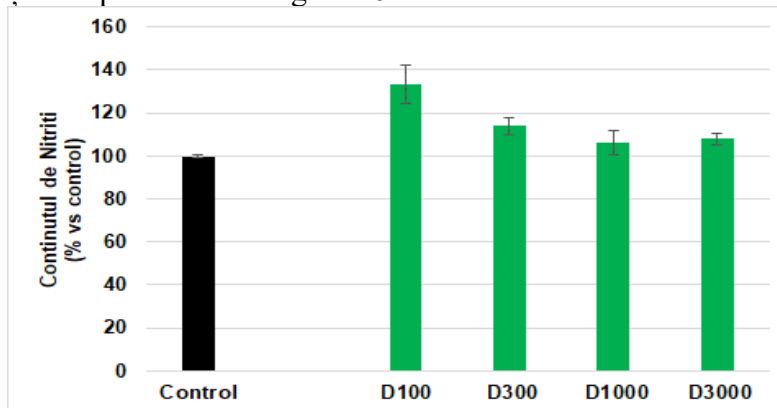


Fig. 16. Evaluarea capacității de vasodilatator a suplimentului alimentar S1* prin testul Griess Reagent

Se poate observa că suplimentul alimentar S1* are capacitatea de a crește cantitatea de nitriți eliberați de celulele endoteliale în mediul de cultură direct proporțional cu creșterea concentrației de supliment alimentar S1 folosit pentru tratarea celulelor. La concentrația cea mai mare (reprezentată de D100) se observă că avem un o creștere a concentrației de nitriți eliberați în mediul de celulele endoteliale tratate cu aproximativ 40 % mai mare comparativ cu controlul, celule netratate.

3.I.3. Evaluarea efectului de vasodilatator al suplimentului alimentar S1* prin măsurarea nivelului de NO format intracelular

Pentru măsurarea nivelului de NO format în urma menținerii celulelor endoteliale în mediu de cultură suplimentat cu S1, s-a folosit compusul DAF-FM Diacetate (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate), D23844 de la firma Invitrogen.

DAF-FM este un reactiv care este utilizat pentru detectarea și cuantificarea concentrațiilor scăzute de oxid nitric (NO). Este capabil să pătrundă prin membrana celulară și nu prezintă fluorescență până când nu interacționează cu moleculele de NO intracelulare pentru a forma un compus de tip benzotriazol care devine fluorescent. Fluorescența DAF-FM a fost detectată cu microscopul de fluorescență Nikon TM, la Ex de 495 nm și Em la 515 nm.

Protocol de lucru

- celulele Ea.hy 926 au fost însămânțate în vase Ibidi (40 000 celule) au fost lăsate să adere 24 de ore;
- după aderarea celulelor mediul de cultură a fost înlocuit cu mediu DMEM fără ser fetal pentru a se realiza sincronizarea celulelor pentru a obține un semnal uniform;
- după alte 24 de ore, mediul de cultură a fost schimbat cu mediu cu 3% ser fetal și diferite concentrații de supliment alimentar S1 (D30-D3000);
- celulele au fost lăsate peste noapte (aproximativ 18 ore) cu tratament, după care au fost spălate cu soluție tampon PBS și s-a adăugat soluția de DAF-FM 5 μM;
- celulele au fost lăsate în incubator timp de 30 de minute, apoi au fost spălate cu soluție PBS și fixate cu soluție paraformaldehidă 4%.
- au fost colectate imagini la microscopul de fluorescență (câte 500 de celule pentru fiecare situație experimentală), controlul este reprezentat de celulele netratate.

În figura 17 sunt prezentate imagini reprezentative colectate la microscopul de fluorescență. Se poate observa că celulele control prezintă un semnal de fluorescență dat de DAF-FM legat la speciile de NO.

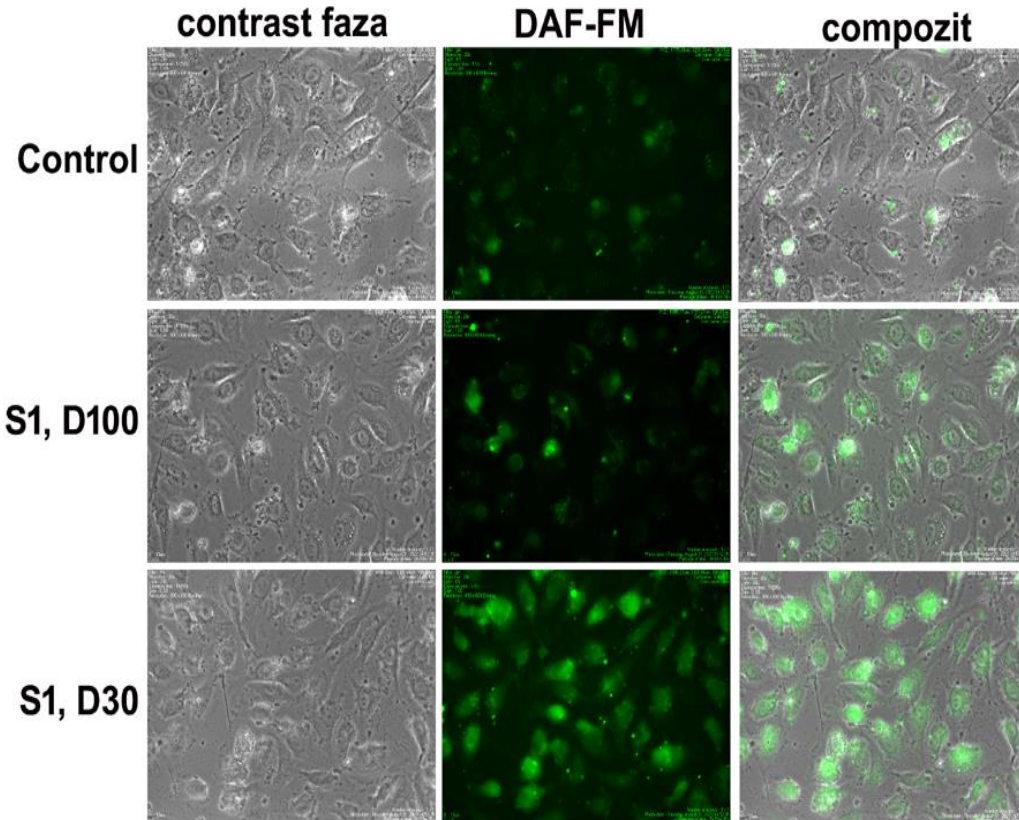


Fig. 17. Evaluarea efectului de vasodilatator a suplimentului S1*, intracelular prin colorarea cu DAF-FM a speciilor de NO⁻

În cazul celulelor tratate cu supliment alimentar S1 la diluțiile D30 și D100 semnalul de fluorescență este mult mai puternic, pentru D30 fiind cel mai ridicat.

3.II. Evaluarea in vitro a unui supliment alimentar S2** pentru susținerea funcției cognitive normale și îmbunătățirea circulației vasculare cerebrale

3.II. Evaluarea in vitro a unui supliment alimentar S2** pentru susținerea funcției cognitive normale și îmbunătățirea circulației vasculare cerebrale

3.II.1. Evaluarea citotoxicității și efectul asupra viabilității/proliferării celulare prin metodele MTS și LDH

3.II.2. Evaluarea capacității antioxidante celulare a suplimentului alimentar S2** - testul DCFH-DA

3.II.3 Evaluarea capacității antioxidante celulare a suplimentului alimentar S2** - testul CellROX green.

S2.** Supliment alimentar pentru susținerea funcției cognitive normale și îmbunătățirea circulației vasculare cerebral.

Prezenta descriere a suplimentului alimentar S2** se referă la realizarea unui produs fitoterapeutic, sub formă de capsule care conține extract de rodie (*Punica granatum*), extract de rozmarin (*Rosmarinus officinalis*), extract standardizat de curcuma (*Curcuma longa*), pulbere de coama leului (*Hericium erinaceus*) precum și procedeul de obținere și testarea eficacității prin testări in vitro pe diverse culturi de celule.

Un supliment alimentar care să susțină funcția cognitivă normală și să îmbunătățească circulația vasculară, prezintă printre altele activitate antioxidantă și biocompatibilitate cu celule neuronale [9]. Capacitatea acestor suplimente de a reduce stresul oxidativ, prin reducerea speciilor reactive de oxigen (SRO) poate preveni apariția bolilor neurodegenerative [10].

Biocompatibilitatea suplimentului alimentar a fost evaluată prin investigarea efectului acestuia asupra viabilității celulelor neuronale (testul MTS) și prin testarea citotoxicității suplimentului alimentar (testul LDH), studii *in vitro*. Pentru evidențierea capacității suplimentului alimentar S2** de susținere a funcției cognitive normale și de îmbunătățire a circulației vasculare cerebrale, a fost investigată activitatea antioxidantă a acestuia, prin evaluarea capacității lui de a neutraliza SRO pe celule de neuroni.

Testările *in vitro* s-au realizat pe linia celulară de neuroblastom uman, SH-SY5Y (ECACC) care a fost diferențiată în celule cu caracteristici de neuroni maturi, prin tratamentul cu acid retinoic de concentrație 10 μM , timp de 5 zile [10,11]. S-a observat că în urma tratării celulelor SH-SY5Y cu mediu de cultură DMEM suplimentat cu 3% ser fetal și acid retinoic 10 μM , celulele de neuroblastom se diferențiază în celulele de tip neuroni maturi prin apariția prelungirilor. Modificările morfologice care apar în urma diferențierii cu acid retinoic: apariția prelungirilor de tip dendrite și axoni și micșorarea corpului celular (soma) și o încetinire a proliferării celulare, așa cum se observă în figura 18.

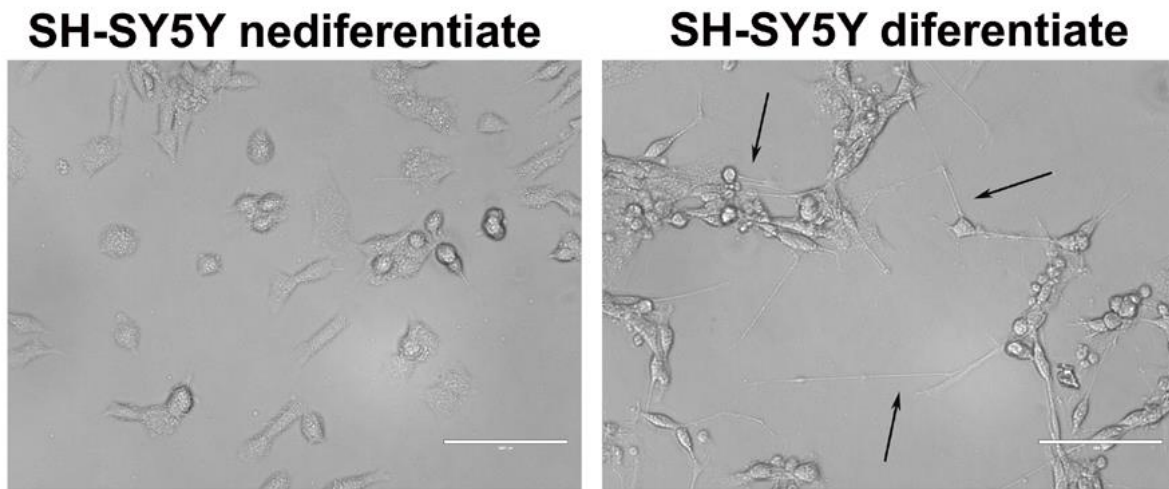


Fig. 18. Celule SH-SY5Y nediferentiate (stânga) și celule SH-SY5Y diferențiate după tratamentul timp de 5 zile cu acid retinoic 10 μM (dreapta)

Pentru ca un supliment alimentar să susțină funcția cognitivă este necesar ca acesta să mențină comunicarea dintre celulele neuronale care se realizează prin intermediul prelungirilor de tip axonic și dendritic.

3.II.1. Evaluarea citotoxicității și efectul asupra viabilității/proliferării celulare prin metodele MTS și LDH

Pentru testarea viabilității celulelor neuronale în prezența tratamentului cu suplimentul alimentar S2**, culturile celulare de SH-SY5Y au fost incubate la 37°C, în atmosferă de 5% CO₂, și au fost crescute în mediu complet de cultură Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) care conține printre altele 4,5 g glucoză/L, la care s-a adăugat 10% ser fetal bovin și 1% antibiotic-antimicotic. Pentru observarea schimbărilor morfologice care apar la menținerea celulelor

diferențiate în mediul de cultură cu supliment alimentar, s-au însămânțat celule de neuroblastom în godeurile unui plăci cu 24 godeuri. Diferențierea celulelor de neuroblastom în celule de tip neuroni maturi s-a realizat prin schimbarea mediului inițial și adăugarea unui mediu de diferențiere care conține: DMEM cu 3% ser fetal bovin și 10 μ M soluție acid retinoic. Mediul de diferențiere a fost schimbat la fiecare 48 de ore. După 5 zile de diferențiere celulele au fost tratate cu supliment alimentar S2** la diferite concentrații. Controlul au fost celulele diferențiate dar netratate cu supliment. Se poate observa din figura 19 că tratamentul cu o concentrație mare de supliment alimentar (D300) duce la moartea celulară la 24 de ore de tratament. Celulele devin rotunde și își pierd prelungirile. La tratamentul cu diluția D6000, celulele diferențiate în neuroni își mențin prelungirile și formează o populație mai omogenă de neuroni maturi comparativ cu celulele diferențiate dar netratate cu supliment alimentar, S2**. Se poate afirma în urma acestor experimente că suplimentul alimentar S2** la diluția D300 este toxic pentru celulele neuronale, iar la diluțiile mai mari nu afectează morfologia celulele neuronale și susține funcția cognitivă prin păstrarea conexiunii dintre celulele de tip neuroni.

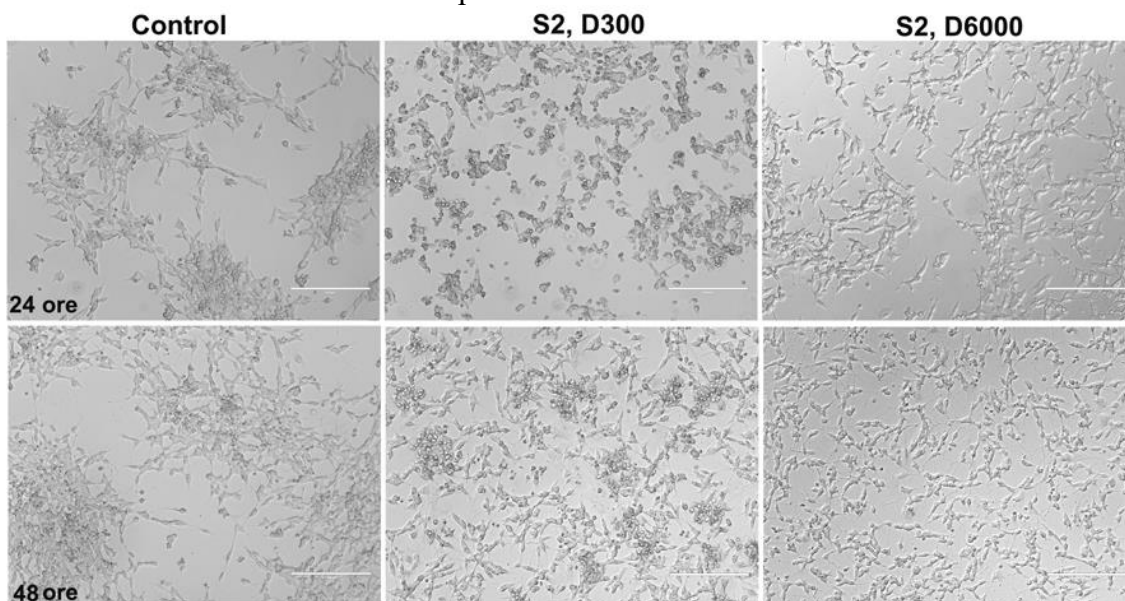


Fig. 19 Celulele SH-SY5Y diferențiate tratate cu diferite concentrații de supliment alimentar S2, observate la microscopul cu contrast de fază

Pentru experimentele de testare a viabilității s-au însămânțat celulele la o densitate celulară de 30,000 celule/godeu pe placă cu 96 de godeuri. Prepararea probelor și controalelor s-a efectuat conform ISO 10993-5:2009 „Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity”.

Suplimentul alimentar a fost diluat în mediul de cultură DMEM cu 3 % ser fetal și au fost testate următoarele diluții: D1000, D3000, D6000 și D10000 din soluția stock de supliment alimentar de 100 mg/ml. Probele și controalele au fost lucrate în triplicat la fiecare testare. Experimentele de viabilitate au fost repetate de trei ori și s-au realizat la doi timpi de tratament de 24 și 48 de ore. Viabilitatea celulară a fost evaluată cu kitul MTS (Promega) prin adăugarea a 20 μ L reactiv/godeu, iar după o perioadă de incubare de 3 ore a fost citită densitatea optică (DO) la 490 nm. Valoarea densității optice este direct proporțională cu numărul de celule viabile. Rezultatele obținute la probe se raportează la valorile obținute la celule netratate, control, așa cum se poate observa în figura 20.

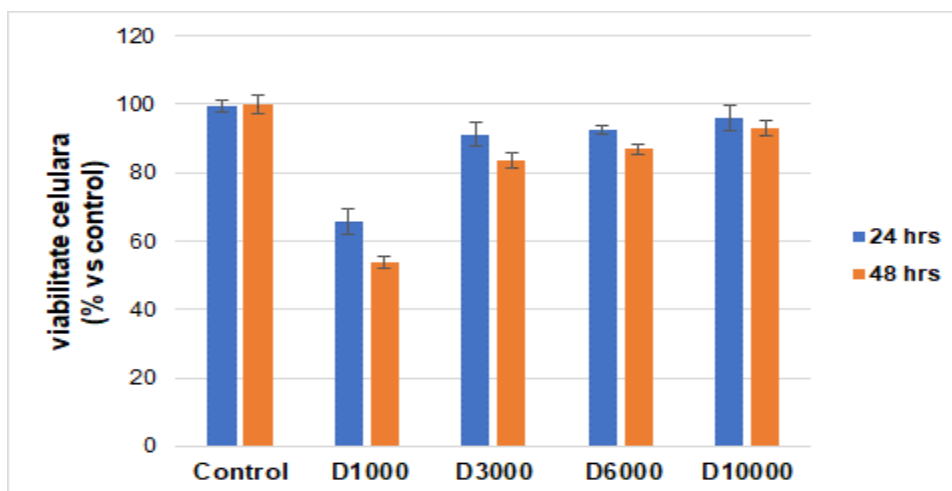


Fig. 20. Viabilitatea celulelor neuronale la tratamentul cu diferite concentrații de supliment alimentar pe intervalele de timp de 24 și 48 de ore

Din figura 20 se poate observa că suplimentul alimentar S2** afectează viabilitatea celulelor neuronale la diluția D1000 pentru ambii timp de tratament de 24 și 48 de ore, valorile obținute fiind de 65%, respectiv 55%. Pentru celelalte diluții testate D3000-D10000, viabilitatea celulelor neuronale aflate sub tratament cu suplimentul alimentar S2 are valori cuprinse între 80-100%.

Evaluarea potențialului citotoxic al suplimentului alimentar pe celule neuronale

Potențialul citotoxic al suplimentului alimentar a fost măsurat cu kitul LDH, Promega. Celulele de neuroblastom au fost diferențiate în godeurile plăcilor de 96 de godeuri (30000 celule/godeu) și la 24 de ore de la aderența lor a început procesul de diferențiere. A fost măsurată cantitatea de LDH eliberat în mediul de cultură de celulele neuronale tratate cu supliment alimentar la diluțiile: D1000, D3000, D6000 și D10000. Reacția enzimatică dintre LDH din mediul de cultură (50 μ L/godeu) și substrat (50 μ L) se realizează la întuneric timp de 30 de minute, după care se adaugă a 50 μ L de soluție stop. Valorile densității optice (DO) de la 490 nm citite pentru probe se raportează la valorile citite pentru controlul pozitiv care este reprezentat de celule lizate pentru a cuantifica LDH-ul total al celulelor netratate. Control este reprezentat LDH-ul eliberat în mediul de cultură de celulele netratate. Citotoxicitatea măsurată la celulele tratate cu diferite concentrații de supliment reprezintă citotoxicitate ireversibilă indusă de suplimentul alimentar S2** aplicat pe celulele neuronale. În figura 21 sunt prezentate rezultatele obținute pe cele două intervale de timp pe care a fost testată citotoxicitatea suplimentului alimentar S2**. Suplimentul alimentar S2** la diluția D1000 induce eliberarea unei cantități de LDH de aproximativ 2.5 ori mai mare decât controlul, celule netratate, pe intervalul de timp de 48 de ore de tratament. La 24 de ore de tratament la D1000, citotoxicitatea este de aproximativ 1.6 ori mai mare decât controlul. Pentru celelalte diluții (D3000-D10000) valorile LDH-ului eliberat sunt asemănătoare cu cele prezentate de celulele control, netratate.

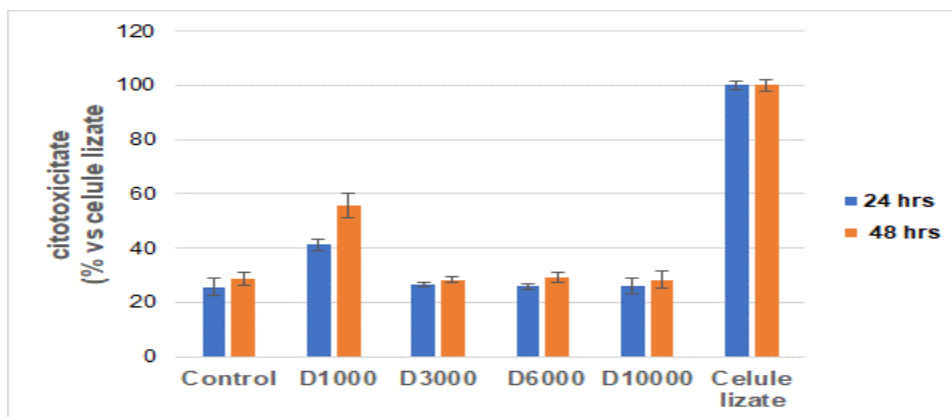


Fig. 21. Citotoxicitatea indusă de suplimentul alimentar S2** pe celulele neuronale

În concluzie, suplimentul alimentar la diluțiile D3000 -D10000 nu afectează viabilitatea celulelor neuronale și nu induce toxicitate pe intervalele de timp de tratament investigate.

3.II.2. Evaluarea capacității antioxidante a suplimentului alimentar S2** - testul DCFH-DA

Pentru testarea activității celulare antioxidante a suplimentului alimentar pe celule de neuroblastom diferențiate în neuroni s-a folosit kitul OxiSelect™ Celular Antioxidant Kit (CellBiolabs).

Principiul metodei:

OxiSelect™ Celular Antioxidant Kit – CAA (Green Fluorescence) este un test care măsoară activitatea antioxidante într-un mediu celular standard. Acest mediu reprezintă temperatura, pH-ul, absorbția, metabolismul și eficacitatea antioxidanților dintr-o întreaga celulă. Testul folosește un colorant fluorescent care poate penetra membrana celulară: 2', 7'-Dichlorodihidrofluorescin diacetat (DCFH-DA). Acest colorant, pătrunde în citoplasma celulară și este deacetilat de esterazele celulare la 2', 7'-diclorodihidrofluorescină neinfluentă (DCFH), care este apoi rapid oxidat de radicalii liberi din celulă la 2', 7'-diclorodihidrofluorescein (DCF), un produs cu un semnal de fluorescență foarte ridicat. Intensitatea fluorescenței acestui compus este proporțională cu nivelurile de SRO din celule. Efectul diferiților compuși antioxidanți asupra formării DCF poate fi măsurat și comparat cu un compus standard cu acțiune antioxidantă, Quercetina. Cu cât produsul de testat are activitate antioxidantă mai mare, cu atât semnalul dat de compusul DCF este mai mic, apropiat de semnalul înregistrat pentru controlul pozitiv (Quercetina).

Protocol de lucru:

- celulele de neuroblastom SH-SY5Y au fost cultivate la o densitate de 60,000 celule/godeu pe o placă cu 96 de godeuri, specială pentru citirile de fluorescență; și au fost crescute până au ajuns confluență de 90-95%;
- ajunse la confluență mediul celular inițial a fost schimbat cu mediul de diferențiere (DMEM cu 3% ser fetal bovin și 10 μM acid retinoic pe o perioadă de 5 zile;
- după diferențiere celulele au fost spalate de 3 ori cu câte 100 μl de soluție 1x de PBS steril, apoi au fost pre-incubate cu 50 μl de soluție 1x de colorant DCFH-DA, și 50 μl de mediu fără ser cu tratamentul corespunzător de supliment alimentar S2**. Controlul pozitiv - soluția de Quercetină a fost aplicată la o concentrație de 250 μM, iar controlul negativ celule netratate cu S2**. Controlul

pentru citirile de fond au fost godeuri cu celule cu colorant și, dar fără soluție de inițiator de radicali liberi;

- placa a fost ținută la incubator timp de 2 ore, apoi soluția de mediu cu tratament și DCFH-DA a fost îndepărtată și fiecare godeu a fost spălat de 3x cu câte 100 μl de soluție de 1x PBS steril;
 - s-a adăugat o soluție de 100 μl Inițiator de Radicali Liberi, concentrație 1x în godeurile de probă și 100 μl de soluție de 1x PBS steril, pentru godeurile folosite pentru citirile de fond;
- Citirile de fluorescență s-au realizat la cititorul de plăci Elisa Zenyth Athos, folosind filtre de excitație la 480 nm și de emisie la 530 nm. Citirile s-au făcut la fiecare 5 minute, timp de 60 de minute, conform metodei descrise

Prelucrarea datelor experimentale

Datele colectate la citirile de fluorescența pentru probe au fost transferate într-un document Excel și au fost prelucrate astfel:

- din valorile citite pentru probe se extrage valoarea citita pentru fond-ul corespunzător, se calculează pentru fiecare proba în triplicat, valoarea medie, abaterea standard a mediei (SD) și coeficientul de variație (CV). Este acceptată valoarea CV sub 10%.
- s-a reprezentat grafic valoarea relativă de fluorescență funcție de timp pentru fiecare probă analizată, controlul negativ (celule fără antioxidant) și controlul pozitiv (celulele tratate cu Quercetină), Figura 22.

Probele s-au lucrat în triplicați, și experimentele au fost realizate de 3 ori. Se poate observa că în cazul celulelor controlul, netratate cu supliment alimentar S2**, valorile la citirile de fluorescență (URF) sunt cele mai mari, speciile reactive de oxigen generate de soluția de inițiator de radicali liberi neputând fi reduse.

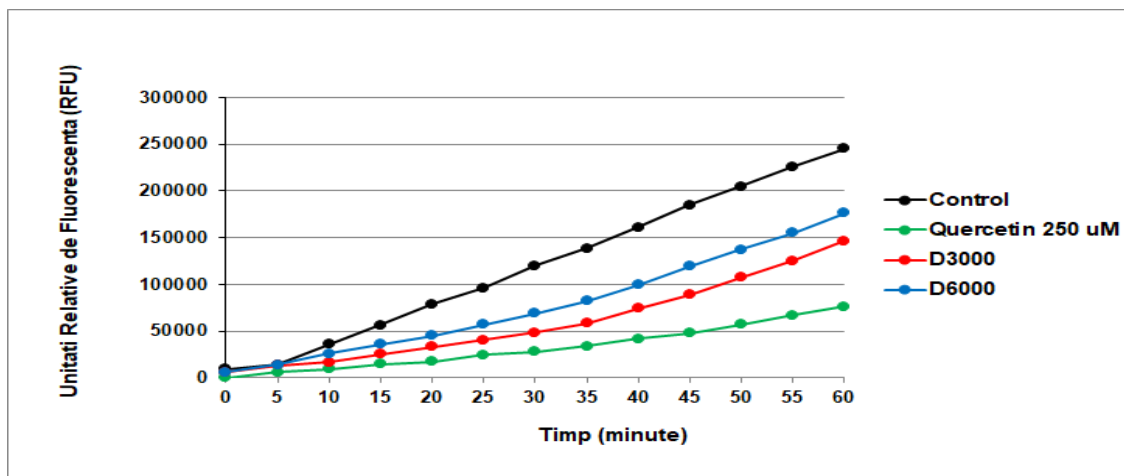


Fig. 22 Capacitatea antioxidantă celulară a suplimentului alimentar S2** evaluată pe celule neuronale, exprimată în unități relative de fluorescență (URF)

Pentru celulele tratate cu diferite diluții de supliment alimentar S2** valorile relative de fluorescență sunt mai mici decât cele obținute la celulele netratate, capacitatea celulară antioxidantă a suplimentului alimentar S2** crescând odată cu creșterea concentrației utilizate la tratamentul celulelor neuronale. Comparativ cu controlul pozitiv, soluția de Quercetină 250 μM, suplimentul alimentar S2** la diluțiile testate are o capacitate antioxidantă celulară mai mică.

3.II.3 Evaluarea capacității antioxidante a suplimentului alimentar S2** prin măsurarea nivelului intracelular de SRO - testul CellROX green

Capacitatea antioxidantă a suplimentului alimentar S2** a fost pusă în evidență și prin testul cu CellROX green. Acest reactiv prezintă mai multe avantaje față de coloranții tradiționali de dihidroclorofluoresceină, DCFH-DA, care a fost prezentat anterior. Reactivul CellROX Green emite semnal de fluorescență mai puternic atunci când este oxidat de speciile reactive de oxigen, celulele pot fi fixate în soluție de paraformaldehidă, și semnalul dat de reactivul legat la SRO persistă și 24 de ore după aplicare în celule.

Protocol de lucru

- celulele de neuroblastom au fost însămânțate în vase cu diametru de 35 mm, și au fost lăsate 24 de ore să adere, după care a început procesul de diferențiere (timp de 3 zile);
- în mediul de cultură al celulelor s-a adăugat tratamentul cu supliment alimentar S2 la diluțiile D3000 și D6000 peste noapte (aproximativ 18 ore); pentru controlul negativ au fost folosite celule netratate;
- celulele au fost ținute în incubator timp de 16 ore, apoi mediul de cultură cu tratamentul a fost îndepărtat, și s-a adăugat reactivul CellROX Green la o concentrație de 5 μ M;
- celulele au fost ținute în incubator la 37⁰C timp de 45 minute;
- după acest tratament, celulele au fost spălate cu PBS 1x, și s-a adăgat soluție H₂O₂ la concentrație de 200 μ M în toate probele, inclusiv în celulele control și au fost lăsate pentru încă 2 ore în incubator pentru a se genera specii reactive de oxigen;
- apoi celulele au fost spălate în PBS 1x, fixate în soluție de paraformaldehidă 4% și observate la microscopul de fluorescență Nikon TM.

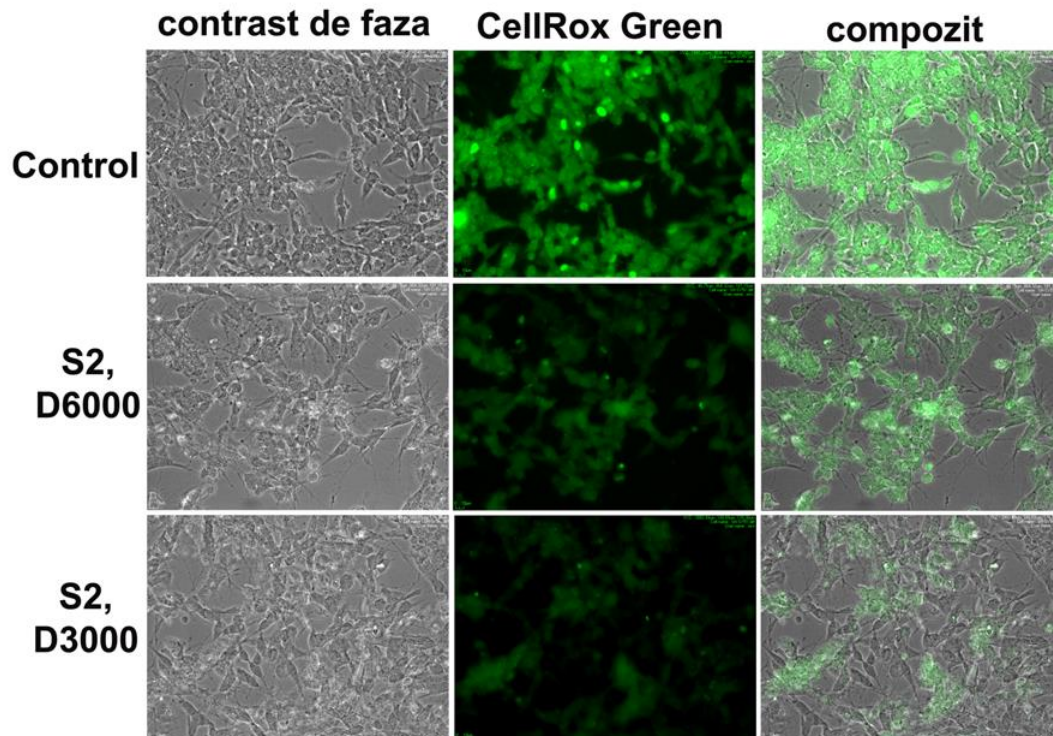


Fig. 23. Evaluarea activității antioxidante celulare cu reactivul CellRox pe celulele neuronale, stimulate pentru stresul oxidativ cu H₂O₂ (200 μM). Imagini de microscopie de fluorescență colectate în contrast de fază și canalul verde, celule colorate cu reactivul CellRox

Imaginile colectate la microscopul de fluorescență au fost analizate și cum se observă din figura 11 pentru celulele control, netratate cu supliment alimentar S2**, speciile reactive de Oxigen produse în urma tratamentului cu H₂O₂ sunt reduse de acțiunea antioxidantă a suplimentului S2**, astfel semnalul de fluorescență este mult mai scăzut pentru celulele tratate cu S2** (D6000 și D3000).

4. Evoluția pieței de suplimente alimentare din România

Conform datelor Cegedim, piața de suplimente alimentare a înregistrat în ultimii 3 ani o creștere medie de aproximativ 15%, aceasta ridicându-se în 2017 la 315 milioane de euro. Anul trecut piața a avut o evoluție mai accelerată, de 22,5% față de anul anterior, pe fondul creșterii preocupării românilor pentru un stil de viață sănătos.

Legislația din România privind suplimentele alimentare

“În prezent, suplimentele alimentare care au în componență doar vitamine și minerale primesc pentru punerea pe piață un aviz de la Ministerul Sănătății, iar cele care conțin în compoziția lor: plante, nutrienți sau alte substanțe cu efect nutrițional ori fiziologic sunt notificate de către Institutul de Bioresurse Alimentare, aflat în subordinea Ministerului Agriculturii. Întrucât, conform dispozițiilor legale, suplimentele alimentare reprezintă o categorie aparte de produse alimentare (al căror scop este să completeze dieta normală și care sunt surse concentrate de nutrienți sau alte substanțe cu efect nutrițional ori fiziologic) este necesar ca și reglementările aplicabile acestora să fie respectate, deși – în opinia noastră – definirea unei categorii distincte, cu recunoașterea beneficiilor acestor produse asupra sănătății, este varianta de dorit. Într-adevăr, legislația actuală este pe alocuri, neclară, iar lipsa unor acțiuni reale de monitorizare poate reprezenta un obstacol în dezvoltarea sănătoasă a acestei piețe”.

Studiul Ipsos desfășurat pentru asociația europeană FSE (Food Supplements Europe) confirmă faptul că, pentru românii, utilizarea regulată a suplimentelor alimentare și vitaminelor reprezintă un instrument de menținere a **sănătății**, dar și un stimulent al **imunității**. Potrivit aceleiași cercetări, la nivel european, cele mai folosite suplimente alimentare din ultimul an au fost vitamina D (46%), vitamina C (36%), magneziu (33%), multivitamine sau minerale (29%), respectiv omega 3 și uleiuri de pește (19%), vitamina B sau complex de B -uri(17%), fier (14%) și calciu (14%), dintre care suplimentele cu multivitamine, vitamina D, produsele cu omega 3 și uleiurile de pește au fost administrate zilnic

Studiul arată că, față de media europeană, cel mai consumat supliment alimentar din România este vitamina C (64% dintre respondenți), urmată de magneziu (44%) și ulei de pește/Omega 3 (23%). Studiul arată că principalele motive pentru care românii iau suplimente alimentare sunt menținerea sănătății, a sistemului imunitar și pentru energie.

La nivel european, consumatorii iau suplimente alimentare la recomandarea medicului sau farmacistului. Și în România, 56% dintre respondenți urmează recomandarea medicilor, iar 52% a farmaciștilor, iar 70% au declarat că au încredere în informațiile oferite de companiile producătoare sau de distribuție de suplimente alimentare.

“Observăm din acest studiu că la nivelul Uniunii Europene majoritatea covârșitoare a consumului de suplimente alimentare se realizează în mod informat, de cele mai multe ori la recomandarea specialiștilor, dar și în urma parcurgerii cu atenție a informațiilor de pe eticheta produselor, ceea ce este un fapt îmbucurător.”, declară dr. Gerald Flintoacă-Filip, Secretar General în Patronatul Român al Industriei Suplimentelor Alimentare (PRISA) și membru în consiliul director al Food Supplements Europe.

Studiul a revelat totodată faptul că o pondere foarte mare, 85% dintre respondenți, la nivelul întregului eșantion de țări participante, urmează instrucțiunile de utilizare menționate pe eticheta suplimentului. De asemenea, 72% din participanții la studiu s-au arătat încrezători în siguranța și calitatea suplimentelor alimentare, doar 6% fiind în dezacord cu această mențiune.

Studiul a fost derulat de compania de cercetare IPSOS la solicitarea asociației europene Food Supplements Europe pentru a înțelege mai bine obiceiurile, atitudinea și practicile de consum ale suplimentelor în rândul europenilor. Acesta s-a desfășurat în perioada 17 martie-1 aprilie 2022, în 14 state membre europene: Belgia, Cehia, Danemarca, Germania, Spania, Franța, Italia, Cipru, Olanda, Polonia, România, Slovenia, Finlanda și Suedia. În total, au fost realizate 13,200 interviuri în cele 14 țări.

În ultimii ani, tot mai multe companii farmaceutice caută soluții pentru a reduce costurile de ambalare, care, cel mai adesea, sunt generate de: depozitarea materiilor prime, ambalaje care permit deteriorarea produselor, utilizarea cutiilor de carton de dimensiuni necorespunzătoare (supradimensionate în raport cu dimensiunea produselor). Ambalarea produsului este atât de importantă încât poate determina succesul de piață al produsului, mai ales dacă se ia în calcul faptul că o prezentare reușită a produselor comercializate are rol esențial în decizia de cumpărare.

Importanța ambalajelor este evidențiată nu numai de principalele funcții pe care le îndeplinesc precum conservarea și protecția produselor, mijloc de informare privind conținutul produsului, sau protejarea în cazul transportului, manipulării și depozitării.

Schimbările la nivelul situației socio-economice, precum și în stilurile de viață ale diferitelor grupe de populație au dus la nevoi nutriționale diferite și la schimbarea obiceiurilor alimentare. Astfel, consumatorii aleg să suplimenteze aportul anumitor nutrienți prin suplimente alimentare. Există o gamă largă de nutrienți și alte ingrediente care ar putea fi prezente în compoziția suplimentelor alimentare, incluzând, dar fără a se limita la acestea: vitamine, minerale, aminoacizi, acizi grași esențiali, fibre și diverse plante și extracte vegetale. Directiva 2002/46/CE referitoare la apropierea legislațiilor statelor membre privind suplimentele alimentare¹² realizează o armonizare parțială a normelor aplicabile introducerii pe piață a suplimentelor alimentare și stabilește norme specifice pentru vitaminele și mineralele utilizate ca ingrediente în fabricarea suplimentelor alimentare. În ceea ce privește stabilirea unor norme specifice aplicabile altor substanțe decât vitamine sau minerale utilizate în fabricarea suplimentelor alimentare, Comisia Europeană a concluzionat că nu este oportună stabilirea unor reguli specifice, luând în considerare că piața suplimentelor alimentare care conțin alte substanțe decât vitamine sau minerale este extrem de diversificată din punct de vedere al substanțelor utilizate și variază de la un stat membru la altul, ca urmare a obiceiurilor alimentare foarte diversificate, a existenței unor tradiții puternice privind utilizarea anumitor substanțe în unele state membre etc. Așadar, utilizarea altor substanțe decât vitamine sau minerale în fabricarea suplimentelor alimentare constituie obiectul normelor aflate în vigoare în legislațiile naționale și care se aplică în temeiul art. 34 - 3614 din Tratatul privind Funcționarea Uniunii Europene, fără să aducă atingere dispozițiilor comunitare cu aplicabilitate generală. Potrivit Directivei 2002/4615, suplimentele alimentare sunt produse alimentare al căror scop este de a suplimenta regimul alimentar și care reprezintă surse concentrate

de nutrienți sau alte substanțe cu efect nutritiv sau fiziologic, singure sau în combinație, comercializate sub formă de doză, respectiv în forme de prezentare cum ar fi: capsule, pastile, comprimate, pilule sau alte forme similare, pachete de pulbere, fiole de lichid, flacoane cu picurător și alte forme asemănătoare de preparate lichide sau pulberi destinate consumului în cantități mici, măsurabile. Potrivit aceleiași directive, prin nutrienți se înțeleg următoarele substanțe: (i) vitamine și (ii) minerale. Lista armonizată a vitaminelor și mineralelor ce pot fi utilizate în fabricarea suplimentelor alimentare, precum și formele acestora, sunt prevăzute în anexele I și II ale Directivei 2002/46. La nivel național, Ordinul Ministerului Sănătății 1069/2007 pentru aprobarea Normelor privind suplimentele alimentare¹⁶ reprezintă cadrul legal necesar aplicării Directivei 2002/46.

• Ordinul comun al Ministerului Agriculturii, Pădurilor și Dezvoltării Rurale, al Ministerului Sănătății și al Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor nr. 1228/2005 pentru aprobarea Normelor tehnice privind comercializarea suplimentelor alimentare predozate de origine animală și vegetală și/sau a amestecurilor acestora cu vitamine, minerale și alți nutrienți; • Ordonanța nr. 59/2006 privind utilizarea suplimentelor nutritive de către sportivi²¹ - stabilește cadrul legal privind utilizarea suplimentelor nutritive de către sportivi.

În calitate de produs alimentar, suplimentele alimentare sunt reglementate de texte legislative cu aplicabilitate generală care aparțin legislației privind siguranța alimentară. Totalitatea acestor dispoziții constituie un cadru legislativ substanțial, la nivelul Uniunii Europene existând o legislație reprezentată de peste 13022 de reglementări cadru pentru bunurile alimentare. Potrivit Ghidului suplimentelor alimentare pe bază de plante medicinale, aromatice și produse ale stupului, elaborat de Institutul Național de Cercetare Dezvoltare pentru Bioresurse Alimentare, 2018. În continuare sunt enumerate principalele acte normative care constituie cadrul legal național general privind produsele alimentare.

Concluzii

În această etapă au fost realizate următoarele cercetări experimentale:

- au fost elaborate tehnologiile de obținere a celor 2 tipuri de produse (suplimente alimentare și batoane) la nivel pilot;
- a fost amenajată și pregătită stația pilot pentru experimentări cu echipamentele existente și achiziționate prin acest proiect;
- s-au realizat la nivel pilot cele 2 tipuri de produse;
- s-a evaluat calitatea suplimentelor alimentare și a batoanelor nou create prin analizarea din punct de vedere fizico-chimic, nutrițional și microbiologic;
- s-a identificat modul de ambalare a produselor nou create;
- au fost verificate tehnologiile propuse pentru suplimentele alimentare la scară industrială.
- a fost elaborată documentația de brevetare și înregistrate cererile de brevet de invenție la OSIM;
- s-au finalizat studiile de stabilitate a extractelor concentrate și a produselor nou create;

Modul de diseminare al rezultatelor

Diseminarea rezultatelor catre mediul științific prin publicarea rezultatelor sub formă de articole în reviste de specialitate de prestigiu și prin participarea la evenimente științifice (conferințe, simpozioane, târguri, etc).

Participări la conferințe:

1. Conferința Internațională NUTRICON 2022, (Food Quality and Safety, Health and Nutrition) 08 - 10 June 2022, Ohrid, Republica Macedonia au fost prezentate **2 postere**:
 - *"Wastes from the manufacture of berries oil - A rich source of nutrients for use in food industry"* (Book of Abstracts - pg. 193-194). Autori: Livia Apostol, Mirela Elena Cucu, Iulia Elena Susman, Cristina Luntraru, Mihaela Neagu, Liviu Gaceu.
 - *"Evaluation of the antioxidant capacity of sea-buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries by-product extracts for further valorization"* (Book of Abstracts - pg. 123-124). Autori: Mihaela Neagu, Cristina Mihaela Luntraru, Adriana Florina Popescu, Justinian Andrei Tomescu, Livia Apostol.
3. Simpozionul "Food Technology International Symposium - Food Brokerage Event" – Spania - 11.05.2023 -12.05.2023: **prezentare orală**: *"Recovering nutritional value from berries by-products"*. Autori: Apostol, Mihaela Neagu, Cristina Manea, Justinian Andrei Tomescu, Mihai Bogdan Nicolcioiu, Nastasia Belc.
4. Conferința internațională - SICHEM 2022 Romania, 17– 18 Nov. 2022 - **Poster** cu titlul: *"Characterization of valuable nutraceutical compounds from Sea Buckthorn and Blueberry extraction leftovers destined for functional supplements enrichment"*. Autori: Justinian-Andrei TOMESCU, Livia APOSTOL, Theodor TRAUSAN-MATU, Georgeta ALEXANDRU, Alexandru SUCIU, Simona CRAPARESCU, Mihaela NEAGU -
5. Conferința națională, științifică și informală a Centrului de Economie Montană CE-MONT Vatra Dornei/INCE/Academia Română - **Prezentare orală** cu lucrarea *"Research on chemical composition of sea buckthorn wastes"*. Autori - L. APOSTOL, L. A. MIHAI, I. SMEU, M. NEAGU, C. LUNTRARU, L. GACEU. (16 septembrie - 17 septembrie 2021).

Articole publicate în reviste de specialitate de prestigiu

1. Articolul ISI (Factor de impact – **5,56**): titlul ***"Reclaim and Valorization of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) By-Product: Antioxidant Activity and Chemical Characterization"***. *Foods* **2022**, 11(3), 462; <https://doi.org/10.3390/foods11030462> .
Autori: Cristina Mihaela Luntraru, Livia Apostol*, Oana Bianca Oprea, Mihaela Neagu 1, Adriana Florina Popescu, Justinian Andrei Tomescu, Mihaela Multescu, Iulia Elena Susman, Liviu Gaceu
2. Articolul BDI: titlul ***"Researches on the chemical composition of wastes from the manufacture of berries"***, *Journal of EcoAgriTourism*, Vol. 17, no. 2, pag 77, 2021. https://rosita.ro/jeat/archive/2_2021.pdf. Autori: L. Apostol, L. A. Mihai, I. Smeu, S. Boba, M. Neagu, C. Luntraru, L. Gaceu.

3. Articolul ISI, aflat în evaluare la revista *Applied Sciences*, (Factor de impact – **2.838** Manuscript ID: applsci-2609064 - Title: **"Spectrophotometric determination of Antioxidant Activity and Bioactive Compound Content in Blueberry Byproducts"**. Authors: Mihaela Neagu, Justinian-Andrei Tomescu, Livia Apostol, Oana Bianca Oprea, Theodor Trausan Matu, Georgeta Alexandru, Liviu Gaceu.

Drepturile de proprietate intelectuală asupra lucrărilor protejate prin copyright, know-how și orice alt subiect, conceput, creat, generat, dezvoltat, măsurat și / sau estimat prin această colaborare se află în proprietatea

- HOFIGAL Export Import SA - 70%
- IBA București - 30%

- HOFIGAL Export Import SA a elaborat documentația și a depus cererea de brevet de invenție.

Domeniul de aplicare al invenției este cel destinat realizării de suplimente și produse alimentare cu potențial funcțional, contribuind la dezvoltarea pieței de produse sănătoase, cu aport de nutrienți esențiali și fibre dietetice.

Ca produse finite au rezultat la finalul proiectului 2 noi tipuri de produse alimentare:

- Două suplimente - unul pentru menținerea unui sistem venos sănătos și care să susțină circulația periferică, iar celălalt pentru susținerea funcției cognitive normale și îmbunătățirea circulației vasculare cerebrale.
- Trei formule de alimente funcționale sub formă de batoane cu diferite combinații de extracte, obținute de Hofigal și de partenerul din Spania, (batoane proteic, energizant și digestiv) Aceste produse sunt bogate în fibre alimentare, minerale și mai ales substanțe antioxidante.
- De asemenea, prin valorificarea celor două subproduse (șroturile obținute din prelucrarea fructelor de cătină și afine) au fost obținute de către Hofigal două extracte concentrate de mare valoare nutrițională, care pot fi utilizate și în formularea altor suplimente sau produse cu potențial funcțional.

Considerăm că gradul de atingere a rezultatelor estimate prin acest proiect a fost de 100%.

Proiectul va avea un impact pozitiv pentru ambele companii participante prin proiectarea și comercializarea de noi suplimente și alimente funcționale pentru compania românească (Hofigal Export Import) și produse alimentare funcționale și băuturi pentru compania spaniolă (AMC Innova).

Prin realizarea proiectului "NUTRIFRUCT" au fost obținute următoarele:

- Două extracte concentrate – extract de cătină și afine, obținute prin valorificarea deșeurilor de la prelucrarea celor două fructe;
- Două suplimente alimentare, obținute din extractele concentrate de cătină și afine în combinație cu două extracte (de rodii și citrice obținute de partenerul din Spania) și cu alte ingrediente. Unul pentru menținerea unui sistem venos sănătos și care să susțină circulația

periferică, iar celălalt pentru susținerea funcției cognitive normale și îmbunătățirea circulației vasculare cerebrale.

- Trei formule de alimente cu potențial funcțional (batoane) îmbogățite în compuși bioactivi din extractele celor două companii și alte ingrediente vegetale.

În concluzie prin acest proiect au fost transformate deșeuri rezultate din alte ramuri ale industriei alimentare în ingrediente funcționale și apoi utilizate în obținerea de suplimentele și alimentele funcționale cu următoarele beneficii: recuperarea unei surse bune de nutrienți, minimizarea cantității de subproduse, proiectarea de noi produse alimentare funcționale, suplimente, băuturi îmbogățite în compuși bioactivi.

Bibliografie

1. Umana, M., et al., Ultrasound-assisted extraction of ergosterol and antioxidant components from mushroom by-products and the attainment of a beta-glucan rich residue. *Food Chem*, 2020. 332: p. 127390 DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127390.
2. Farid Chemat, Natacha Rombaut, Anne-Gaëlle Sicaire, Alice Meullemiestre, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Maryline Abert-Vian, Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications A review, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
3. Mar Villamiel, J.V.G.-P., Antonia Montilla, Juan A. Carcel, Jose Benedito, *Ultrasound in food processing*. 2017: Wiley Blackwell.
4. Kashmira J. Gohil, Jagruti A. Patel, Anuradha K. Gajjar, *Pharmacological Review on Centella asiatica: A Potential Herbal Cure-all*, *Indian J Pharm Sci*. 2010 Sep-Oct; 72(5): 546–556.
5. https://www.sfatulmedicului.ro/Boli-ale-venelor/complicatiile-insuficientei-venoase-superficiale_18852
6. <https://www.cdt-babes.ro/articole/tulburarile-cognitive.php>
7. https://www.sfatulmedicului.ro/Boala-Alzheimer-si-alte-boli-degenerative/memoria-si-tulburarile-de-memorie_7634
8. G. Phani Kumar and Farhath Khanum, Neuroprotective potential of phytochemicals, *Pharmacogn Rev*. 2012 Jul-Dec; 6(12): 81–90.
9. David O. Kennedy, Emma L. Wightman, *Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain function*, *Advances in Nutrition*, Volume 2, Issue 1, January 2011, Pages 32–50
10. Pietro Gareri, Alberto Castagna, Antonino Maria Cotroneo, Salvatore Putignano, Giovambattista De Sarro, and Amalia Cecilia Bruni, The role of citicoline in cognitive impairment: pharmacological characteristics, possible advantages, and doubts for an old drug with new perspectives, *Clin Interv Aging*. 2015; 10: 1421–1429.
11. Patryk Jasielski, Faustyna Piędel, Mikołaj Piwek, Agata Rocka, Véronique Petit, and Konrad Rejdak, Application of Citicoline in Neurological Disorders: A Systematic Review, *Nutrients*. 2020 Oct; 12(10): 3113.
12. Angela Stockton, Andrea Zangara, Emad Al-Dujaili, Investigating the acute effect of pomegranate extract on indicators of cognitive function in human volunteers, *Nutraceuticals in Brain Health and Beyond*, 2021, Pages 141-154
13. Susan Y. Bookheimer, Brian A. Renner, Arne Ekstrom, Zhaoping Li, Susanne M. Henning, Jesse A. Brown, Mike Jones, Teena Moody, and Gary W. Small, Pomegranate Juice

Augments Memory and fMRI Activity in Middle-Aged and Older Adults with Mild Memory Complaints, Evid Based Complement Alternat Med. 2013;

14. Solomon Habtemariam, The Therapeutic Potential of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Diterpenes for Alzheimer's Disease, Evid Based Complement Alternat Med. 2016;

15. Risa Araki, Kazunori Sasaki, Hiroyuki Onda, Syunsuke Nakamura, Masahiro Kassai, Toshiyuki Kaneko, Hiroko Isoda and Koichi Hashimoto, Effects of Continuous Intake of Rosemary Extracts on Mental Health in Working Generation Healthy Japanese Men: Post-Hoc Testing of a Randomized Controlled Trial, *Nutrients* 2020, 12

16. Shrikant Mishra and Kalpana Palanivelu, The effect of curcumin (turmeric) on Alzheimer's disease: An overview, Ann Indian Acad Neurol. 2008 Jan-Mar; 11(1): 13–19

17. Gary W. Small, M.D., Prabha Siddarth, Ph.D., Zhaoping Li, M.D., Ph.D., Karen J. Miller, Ph.D., Linda Ercoli, Ph.D., Natacha D. Emerson, M.A., Jacqueline Martinez, M.B.A., M.S., Koon-Pong Wong, Ph.D., Jie Liu, Ph.D., David A. Merrill, M.D., Ph.D., Stephen T. Chen, M.D., Susanne M. Henning, Ph.D., R.D., Nagichettiar Satyamurthy, Ph.D., Sung-Cheng Huang, D.Sc., David Heber, M.D., Ph.D., Jorge R. Barrio, Ph.D., Memory and Brain Amyloid and Tau Effects of a Bioavailable Form of Curcumin in Non-Demented Adults: A Double-Blind, Placebo-Controlled 18-Month Trial, *Am J Geriatric Psychiatry* VOLUME 26, ISSUE 3, P266-277, MARCH 01, 2018
<https://www.wall-street.ro/articol/Companii/231588/marinela-popescu-secom-trenduri-si-obiceiuri-de-consum-ale-romanilor-pe-piata-de-suplimente-alimentare.html#gref>
<https://www.forbes.ro/valoarea-pie%C8%9Bei-de-suplimente-alimentare-din-rom%C3%A2nia-28-miliarde-lei-299536>

Director Proiect Eureka nr. 188/2020
CSII Dr. Mihaela NEAGU

