



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 00236**

(22) Data de depozit: **19/04/2017**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/09/2022** BOPI nr. **9/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/10/2018 BOPI nr. **10/2018**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE- DEZVOLTARE
MEDICO-MILITARĂ "CANTACUZINO",
SPAIUL INDEPENDENȚEI NR.103,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **LUPU ANDREEA-ROXANA,
ALEEA OTESANI, NR.3, BL.OD 52-54,
SC.B, ET.4, AP.64, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **CREMER LIDIA, ȘOS.ȘTEFAN CEL
MARE, NR.44, BL.33A, SC.1, ET.8, AP.24,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **HEROLD AURORA, BD.IULIU MANIU,
NR.14, BL.13, SC.C, ET.5, AP.134,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DASCALU FANICA,
STR. ÎMPĂRATUL TRAIAN, NR.3, BL.B12,
SC.1, ET.5, AP.23, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 110035 B1; CN 105685982 A

(54) **SUPLIMENT ALIMENTAR ANTIOXIDANT PE BAZĂ DE ORZ
VERDE ȘI PROCEDU DE OBȚINERE A ACESTUIA**

Examinator: **biochimist BABALIGEA IRINA**



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 132849 B1

1 Invenția se referă la un supliment alimentar antioxidant obținut din orz verde, și la
procedeul de producere a acestuia, destinat menținerii și îmbunătățirii stării de sănătate.

3 Stresul oxidativ și consecințele acestuia constituie o problemă de permanentă
actualitate în contextul unui stil de viață din ce în ce mai solicitant și al unor factori de mediu
5 fizico-chimici din ce în ce mai agresivi. Utilizarea suplimentelor alimentare cu proprietăți
antioxidante poate fi benefică pentru restabilirea echilibrului între generarea radicalilor liberi
7 și protecția antioxidantă, cu consecințe în menținerea și/sau îmbunătățirea stării de sănătate.

9 Este cunoscut un procedeu de obținere a unui extract din *Hordeum vulgare* protejat
prin brevetul **RO 110035 B1**, (1989).

11 Procedeul constă în aceea că orzul verde (planta tânără, 20-25 cm înălțime) este
amestecat cu soluție tampon fosfat salin, după care se centrifughează. Supernatantul
13 rezultat este supus reglării de pH, urmat de filtrare sterilizantă, liofilizare, apoi amestecare
cu apă sterilă (apirogena) și o nouă filtrare sterilizantă.

15 Un dezavantaj important al acestui procedeu constă în faptul că produsul intermediar
obținut, fiind liofilizat, se supune acțiunii oxigenului din aer, ceea ce duce la o scădere a
capacității antioxidante, pierderile neputând fi recuperate la reluarea ulterioară a liofilizatului
17 în apă. În plus, există o serie lungă de operații, metoda de obținere este costisitoare și prin
utilizarea tamponului fosfat se introduc în produsul finit compuși chimici suplimentari,
19 scăzând puritatea extractului.

21 Deși sucul plantelor (în forma lichidă) conține majoritatea compușilor activi cu efect
în menținerea și îmbunătățirea stării de sănătate, cea mai obișnuită metoda de obținere a
suplimentelor alimentare pe baza de orz constă în obținerea unei pulberi prin: a) extragerea
23 cu ajutorul unor solvenți a unor categorii de compuși prezenți în plantă; b) obținerea sucului
vegetal prin presare și liofilizarea lui ulterioară.

25 Deși în continuare vor fi evidențiate soluții specifice de acest tip existente în stadiul
tehnicii cu menționarea dezavantajelor punctuale, menționăm faptul că principalele
27 dezavantaje de principiu ale suplimentelor alimentare obținute prin aceste metode sunt:

29 - prin utilizarea solvenților se obține doar o parte din componentele benefice ale
plantei. În plus, solvenții desfac compuși macromoleculari al căror efect pentru sănătate este
mai puternic decât suma efectelor moleculelor componente rezultate în urma acțiunii
31 solvenților;

33 - prin procedeul de obținere al pulberii, cât și prin faptul că produsul finit este supus
oxigenului atmosferic, efectul antioxidant diminuează rapid. În plus, pentru a evita
degradarea rapidă (datorată tot oxigenului), este necesară utilizarea de aditivi și/sau
35 conservanți;

37 - suplimentarea acestor produse cu complexe de minerale și vitamine potențează
anumite efecte benefice, dar impun necesitatea unor studii riguroase (*in vitro* și *in vivo*)
pentru stabilirea eficacității și a eventualelor efecte secundare, precum și precauții privind
39 modul de utilizare (administrarea dozei recomandate de supliment poate duce la depășirea
dozei zilnice recomandate pentru un anumit compus, de exemplu vitamină sau oligo-
41 element).

43 Astfel, în ceea ce privește existența în stadiul tehnicii a unor extracte sub formă de
pulbere, sunt cunoscute procedee de obținere a unor extracte vegetale, respectiv fracțiuni
insolubile, preparate din plante verzi comestibile (exemplu: orz) și condiționate sub formă de
45 pulbere protejate prin brevetele **US 6022573 A** și respectiv **US 5876773 A**.

47 Procedeele de obținere constau în obținerea sucului vegetal prin stoarcerea plantelor
comestibile proaspete (exemplu: orz), transformarea sucului în pulbere uscată și îndepăr-
tarea din pulberea uscată a componentelor solubile în apă. Materialele verzi sunt obținute
49 prin extracții ulterioare cu solvent organic polar și apoi folosite drept aditivi alimentari.

RO 132849 B1

| | |
|--|----------------------|
| Dezavantajul constă în faptul că aceste extracte vegetale, obținute în scopul utilizării lor ca aditivi alimentari, sunt obținute prin extracție cu solvenți organici (etanol sau acetonă). | 1 |
| În domeniul sucurilor vegetale liofilizate, sunt cunoscute sucuri obținute prin presarea plantelor verzi, produse care sunt condiționate sub formă de pulberi uscate, brevet US 5407696 A . | 3 5 |
| Procedeele are la bază obținerea unor sucuri prin presarea frunzelor verzi și apoi procesare pentru a se obține pulberi uscate. Aceste produse nu conțin aditivi, au conținut scăzut de clor și nitrați (care sunt toxici pentru om). Produsele au palatabilitate și stabilitate îmbunătățite. | 7 9 |
| Dezavantajul constă în costul ridicat al obținerii pulberilor și riscul scăderii în timp a capacității antioxidante sub acțiunea oxigenului atmosferic. | 11 |
| Sunt de asemenea cunoscute pulberi obținute din suc verde de plante, care nu prezintă gust și pot fi stocate pentru perioade lungi de timp brevet US 5445869 A . | 13 |
| Procedeele are la bază adăugarea unui amestec de minerale naturale alcaline solubile în apă peste un suc vegetal verde obținut prin stoarcerea plantelor verzi comestibile; ulterior se reglează pH-ul în domeniul 6-9, după care sucul obținut se liofilizează. | 15 |
| Dezavantajele constau în: a) utilizarea reactivilor chimici pentru reglarea pH-ului; b) în sucul verde obținut natural din plante comestibile se adaugă diverse minerale din surse neprecizate; c) transformarea sucului de orz în pulbere (produsul finit fiind supus acțiunii oxigenului atmosferic, capacitatea antioxidantă scade în timp). | 17 19 |
| Se cunoaște de asemenea un procedeu de obținere a unor compuși purificați (pentapeptide) dintr-un extract de frunze de orz verde și caracterizarea lor, brevet US 5705486 A . | 21 23 |
| Frunzele de orz verde sunt liofilizate și apoi transformate în pulbere fină care se suspendă în apa cu agitare puternică și încălzire pentru a extrage materialul activ; urmează centrifugare pentru a îndepărta materialul solid, iar extractul obținut se supune cromatografiei de înaltă performanță (HPLC) pentru a fi fracționat. Se utilizează diverși solvenți precum acid trifluoracetic sau acetonitril. Frațiunile obținute se liofilizează în vederea testării. | 25 27 |
| Inventatorul recomandă utilizarea acestor pentapeptide pentru a inhiba agregarea plachetelor sanguine umane. Din frunze de orz verde au fost obținute molecule biologice active, respectiv două pentapeptide care și-au dovedit proprietatea de a inhiba <i>in vitro</i> agregarea indusă de ADP a plachetelor izolate din sânge uman. Aceste peptide ar putea fi utilizate pe cale i.v. împreună cu un carrier farmaceutic acceptat (apă distilată, tampon fosfat). | 29 31 33 |
| Un dezavantaj al produsului obținut prin această metodă constă în pierderea acțiunii benefice complexe data de plantă ca întreg. Unele efecte biologice benefice pentru organismul uman se datorează unor complecși ai unora dintre compușii care se găsesc în planta de interes sau în părți ale acesteia, neputând fi asigurate de compușii individuali. Compușii izolați și purificați au o acțiune specifică, asemănător medicamentelor, administrarea lor impunând precauții legate de doză și mod de administrare. | 35 37 39 |
| Un alt dezavantaj al produsului obținut prin metoda menționată este acela că proprietățile antiagregante plachetare sunt argumentate științific doar prin studii <i>in vitro</i> , realizate pe celule izolate din sânge uman. În organismul viu agregarea plachetară este un proces menținut în limite fiziologice prin mecanisme complexe de control. Deviațiile semnificative într-un sens sau altul (stimularea sau inhibarea agregării plachetare) pot avea consecințe majore pentru starea de sănătate și viața individului. De aceea administrarea compușilor cu efect antiagregant plachetar se face în condiții stricte, pe baza rezultatelor unor studii <i>in vivo</i> riguroase. | 41 43 45 47 |

RO 132849 B1

1 Sunt cunoscute suplimente nutriționale de uz uman, care constau în diferite com-
binații de vitamine și minerale cu caracter antioxidant, împreună cu extracte/tincturi obținute
3 din plante (orz verde, ginkgo biloba). Brevet nr. **WO/1998/000026**.

5 Procedeele de fabricație pentru fiecare component utilizat se bazează pe amestecarea
și omogenizarea perfectă a ingredientelor active, utilizând un solvent cu rol de carrier (apă,
uleiuri, agenți pentru gust, conservanți, coloranți), conform tehnicilor convenționale.

7 Dezavantajele constau în utilizarea de aditivi/conservanți pentru evitarea degradării
accelerate a produselor finite, care în acest caz nu mai pot fi considerate produse 100%
9 naturale.

11 Un preparat sub formă de amestecuri nutriționale recomandate persoanelor diabetice
este protejat în brevetul **US 20150098930 A1**.

13 Astfel de preparate sunt formulate sub formă de pulberi, tablete sau lichide și sunt
utilizate ca suplimente orale în alimentația curentă, în special pentru persoane cu
predispoziție sau diagnosticate cu diabet. În combinații se regăsesc vitamine, minerale și
15 fitonutrienți, un rol important fiind atribuit pulberii obținute din orz verde.

17 Dezavantajul major al acestor produse constă în aceea că amestecul de principii
active, optim pentru persoane diabetice, nu este benefic (și uneori este chiar dăunător)
pentru persoane cu diferite particularități metabolice.

19 Sunt de asemenea comercializate pe piața românească, europeană și/sau internațio-
nală o serie de suplimente alimentare a căror sinteză o facem în cele ce urmează.

21 Astfel, este cunoscut un extract de orz verde, fabricat de PlantExtrakt, România,
condiționat în flacoane aseptice, la care producătorul nu specifică aditivii/conservanții
23 conținuți în extract.

25 Dezavantajele constau în lipsa informațiilor privind compoziția produsului și efectele
acestuia, cât și în faptul că flaconul de 100 ml odată deschis, permite degradarea accelerată
a extractului de orz. Totodată, producătorul recomandă consumul produsului diluat în apă
27 (1 lingură extract în 100 ml apă).

29 Sunt cunoscute de asemenea mai multe suplimente alimentare sub formă de pulbere
de orz verde care se comercializează în România prin farmacii, magazine naturiste sau
magazine online sub formă de: Orz verde pulbere; Pulbere din orz verde; Bio orz verde;
31 Pulbere de orz verde - bază pentru băuturi. Iarbă de orz. Aceste produse au la bază orzul
verde uscat și mărunțit, uneori până la stadiul de pulbere.

33 Dezavantajul constă în faptul că aceste suplimente utilizează iarba de orz în
întregime, deci inclusiv celuloza care nu este solubilă în apă. Toate au indicația de a fi
35 utilizate cu apă, fără a se putea obține un preparat omogen. În plus, expunerea prelungită
a pulberii de orz la acțiunea oxigenului din atmosferă, scade proprietățile sale antioxidante.

37 Este cunoscut și un Extract din suc de orz verde forte condiționat sub formă de
capsule, al cărui dezavantaj constă în prelucrarea și concentrarea sucului de orz verde
39 pentru a se ajunge la o pulbere ce se încapsulează, procedee industriale care nu pot păstra
toate proprietățile nutriționale ale sucului de orz.

41 În ceea ce privește produsele comercializate pe piața internațională, facem referire
la un supliment alimentar denumit Barley Green, obținut din orz verde pe bază rețetei Dr.
43 Hagiwara care are la bază suc de orz verde condiționat sub formă de pulbere împreună cu
orez brun, și al cărui dezavantaj constă în expunerea pulberii la aerul atmosferic, cu
45 scăderea proprietăților antioxidante în timp, și respectiv mai multe suplimente alimentare
produse și comercializate în SUA sau Europa: Green Magma, Green Barley Powder, Green
47 Barley "Salad in a Glass", Organic Barley Grass Juice Powder, Mega Green, Barley Grass
Juice Powder, Barleygreen, Barley Grass, principalul lor dezavantaj constând în diminuarea

RO 132849 B1

În timp a capacității antioxidante, datorită degradării produsului sub acțiunea oxigenului din aerul atmosferic. O altă metodă de valorificare a orzului verde constă în obținerea de compuși înalt purificați (exemplu: peptide) cu o acțiune specifică. Produsele obținute prin aceste metode depășesc sfera suplimentelor nutritive și se apropie de cea a medicamentelor, validarea lor necesitând studii complexe și riguroase *in vitro* și *in vivo*, inclusiv studii clinice.

Problema tehnică a invenției constă în obținerea unui supliment alimentar stabil din punct de vedere al capacității antioxidante, prin aplicarea unui procedeu de producere eficient care conduce la obținerea unui produs 100% natural, fără aditivi și conservanți.

În scopul eliminării dezavantajelor menționate, suplimentul alimentar antioxidant pe bază de orz verde conform invenției, păstrează practic toți aminoacizii prezenți în sucul de orz verde respectiv acid aspartic, acid glutamic, serina, glicina, histidina, arginina, alanina, prolina, tirozina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, lizina, și triptofan, esențiali în menținerea și creșterea capacității antioxidante exprimată prin activitate de tip superoxid dismutaza și peroxidaza, respectiv de epurare a radicalilor de oxigen. Suplimentul alimentar antioxidant pe bază de orz verde fortifică organismul în condiții de stres, efort fizic și psihic prin conținutul în compuși biochimici: proteine totale și glucide, respectiv oligoelemente.

Într-un prin aspect, invenția se referă la un supliment alimentar antioxidant lichid pe bază de orz verde care conține 0,033% în greutate acid aspartic, 0,038% în greutate acid glutamic, 0,018% în greutate serină, 0,022% în greutate glicină, 0,005% în greutate histidină, 0,014% în greutate arginină, 0,067% în greutate treonină, 0,037% în greutate alanină, 0,018% în greutate prolină, 0,012% în greutate tirozină, 0,026% în greutate valină, 0,018% în greutate izoleucină, 0,026% în greutate leucină, 0,015% în greutate fenilalanină, 0,026% în greutate lizină, și respectiv 0,003 g/100 g triptofan, opțional cu adăugare de proteine totale, glucide, gluten și oligoelemente.

Într-o variată de realizare, suplimentul alimentar antioxidant conține suplimentar, în scopul fortifierii organismului în condiții de stres, efort fizic și psihic, 0,56% în greutate proteine totale, 2,5% în greutate glucide, și gluten sub limita de detecție, 2,92 μg/100 g vitamina B9 (acid folic), 5,7 mg/100 g vitamina C (acid ascorbic), respectiv oligoelemente: 2 mg/L fosfor anorganic, 4170 mg/kg potasiu, 295 mg/kg calciu, 239 mg/kg sodiu, 128 mg/kg magneziu, 1,25 mg/kg mangan.

Într-un alt aspect, invenția se referă la un procedeu de producere a suplimentului alimentar antioxidant și a variantei de realizare a acestuia care cuprinde etapele de: recoltare a orzului verde când plantele au maximum 25 cm înălțime, spălarea, tocarea plantelor, ambalarea masei de orz verde; congelarea sacilor de orz verde într-o cameră frigorifică, la temperatura de $-10 \pm 5^{\circ}\text{C}$ și răsucirea sacilor după 24 h pentru o congelare uniformă, timpul minim de depozitare în camera frigorifică fiind de 6 luni; decongelarea lentă a masei de orz verde, la temperatura mediului ambiant și presarea sa cu ajutorul unei prese hidraulice la presiunea de 80 atm, obținându-se sucul de orz verde; centrifugare a sucului de orz verde timp de 20 min la 2500-3000 rpm și temperatura de $+4^{\circ}\text{C}$, controlându-se ulterior pH-ul supernatantului astfel încât dacă valorile obținute nu se încadrează în intervalul de 5,0-7,0 sucul de orz se aruncă; degrosizarea sucului de orz verde prin filtrare la o presiune de 0,5 atm și depozitarea sucului rezultat la $+4^{\circ}\text{C}$ în container de sticlă, peste noapte; supunerea sucului de orz verde degrosizat la filtrări succesive prin 5 membrane filtrante din nitroceluloză, într-o ordine dată de dimensiunea porilor: 1,2 μm, 0,8 μm, 0,65 μm, 0,45 μm, 0,2 μm și cu o presiune de filtrare de 0,2-0,5 atm, cu efectuarea controlului integrității filtrului; filtrare sterilizantă în mediu steril asigurat de hota cu flux laminar, prin membrana filtrantă de NC, 0,2 μm, folosind un aparat de filtrare cu filtrul montat, autoclavat în prealabil 30 min la 115°C , 0,7 atm și presiunea de filtrare sterilizantă de 0,2-0,5 atm.

RO 132849 B1

1 Principalul avantaj al produsului obținut prin procedeul de fabricație propus de noi față
de cel obținut prin procedeul brevetat în 1989 (Brevet **RO 110035B1**) constă în aceea că are
3 în compoziție ansamblul aminoacizilor existenți în sucule de orz verde. Determinările
biochimice efectuate pe produsul obținut de noi au dus la identificarea a nouă aminoacizi în
5 plus față de produsul corespunzător brevetului **RO 110035 B1** și anume: serina, glicina,
histidina, arginina, treonina, alanina, tirozina, leucina și triptofanul (tabelul 1). Studii *in vivo*
7 au demonstrat ca marea majoritate a aminoacizilor enumerați sunt implicați în reducerea
stresului oxidativ [1-12]. Metodele utilizate pentru caracterizarea biochimică a suplimentului
9 alimentar antioxidant obținut conform prezentei invenții au permis atât identificarea
aminoacizilor, ci și cuantificarea lor.

11 Alte avantaje ale produsului supliment alimentar antioxidant realizat conform invenției,
pe bază de orz verde sunt:

- 13 - stabilitate din punct de vedere al capacității antioxidante;
- compoziție și proprietăți similare cu cele ale suculei proaspăt de orz verde;
- 15 - puritate ridicată, fără aditivi sau conservanți.

Procedeul de fabricație conform invenției, elimină dezavantajele menționate anterior,
17 prin aceea că în scopul păstrării aminoacizilor existenți în sucule de orz verde, se are în
vedere congelarea rapidă, imediat după recoltarea, spălarea și tocarea plantelor de orz
verde. Scăderea temperaturii este asociată cu o mai bună stabilitate a compușilor biochimici,
19 în timp ce temperatura crescută este asociată cu degradarea acestora. De asemenea,
variațiile repetate de temperatură (caracteristice mediului natural) induc modificări ale
21 moleculelor și de cele mai multe ori degradarea acestora. Congelarea reduce atât
metabolismul celulelor plantei, cât și cel al eventualelor microorganisme asociate plantelor
23 de orz, scăzând și capacitatea acestora de a degrada compușii bioactivi (inclusiv aminoacizi)
prezenți în orzul verde.

Filtrările succesive (mai ales filtrarea sterilizantă) duc la eliminarea bacteriilor care,
27 pentru procesele metabolice proprii, ar putea utiliza o parte din aminoacizii existenți în sucule
de orz verde, fenomen care influențează calitatea produsului finit (supliment alimentar
29 antioxidant).

În vederea realizării conformității cu atingerea unor parametri funcționali, calitativi și
31 cantitativi ai procesului de fabricație, pe parcursul sau se realizează secvențe de controale
active.

Procedeul de fabricație conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- 33 - elimină procesul de liofilizare folosit în tehnologia de fabricație corespunzătoare
brevetului **RO 110035 B1** de importanță, mai ales pentru că se înlătură posibilitatea degra-
35 dării moleculelor antioxidante sub acțiunea oxigenului din aer. Liofilizarea (proces complex
de sublimare în vid) este asociată cu expunerea produsului de interes la factori chimici (în
37 scopul protejării anumitor componente ale acestuia) și fizici (variații de temperatură,
congelare, aport controlat de căldură, presiune), fiecare dintre aceștia favorizând degradarea
39 parțială a produsului. În timpul liofilizării, compușii chimici și biochimici interacționează între
ei într-un mod diferit față de condițiile normale, consecința fiind degradarea unor compuși
41 existenți în produsul inițial și formarea unor compuși noi. Înlăturarea etapei de liofilizare
poate justifica identificarea în suplimentul alimentar antioxidant propus spre brevetare a unor
43 aminoacizi suplimentari (majoritatea lor având activitate antioxidantă), comparativ cu
produsul ce a rezultat prin aplicarea brevetului **RO 110035 B1**;

- elimină operația de amestecare a suculei de orz cu tampon fosfat salin (TFS), ceea
47 ce asigură conservarea calităților nutritive ale suculei natural de orz verde, similar cu cele
ale plantei în starea sa proaspătă. În acest fel, se elimină și introducerea unor aditivi chimici
49 în sucule de orz, acesta având în final nealterată concentrația de aminoacizi față de sucule
proaspăt, respectiv o capacitate antioxidantă îmbunătățită comparativ cu produsul obținut
51 prin procedeul de fabricație corespunzător brevetului **RO 110035 B1/1989**;

RO 132849 B1

- este facil de implementat, cu costuri relativ scăzute și efecte majore privința calității produsului antioxidant obținut prin aplicarea sa. 1

Se dau în continuare câte un exemplu de realizare pentru suplimentul alimentar pe bază de orz verde, procedeul său de fabricație și respectiv metoda de utilizare, în legătură și cu fig. 1...3 care reprezintă: 3
5

- fig. 1, etapele principale ale procedeului de fabricație a unui supliment alimentar antioxidant pe bază de orz verde; 7

- fig. 2, supliment alimentar antioxidant - studii de stabilitate: a) condiționarea în fiole de sticlă vs condiționarea în flacoane de plastic; b) variația capacității antioxidante în funcție de temperatura de stocare; 9

- fig. 3, capacitatea de epurare a radicalilor hidroxil corespunzătoare probelor provenite din 8 loturi de supliment alimentar antioxidant (producția anului 2015). 11

Caracterizarea suplimentului alimentar antioxidant pe bază de orz verde este dată în tabelul 1 în care se precizează conținutul său în aminoacizi și respectiv în tabelul 2 în care se precizează conținutul în compuși biochimici (proteine, glucide, gluten) și oligoelemente. 13
15

Conținutul în aminoacizi corespunzător suplimentului alimentar antioxidant propus spre brevetare 17

Tabelul 1 19

| Parametru testat | Valoarea corespunzătoare suplimentului alimentar antioxidant propus spre brevetare | Metoda | Aminoacizi identificați în suplimentul alimentar corespunzător brevetului RO 110035 B1 |
|-----------------------|--|---------------------------------|--|
| Compoziție aminoacizi | | PB-53/HPLC ed. II of 30.12.200 | |
| Acid aspartic | 0,033% | | DA |
| Acid glutamic | 0,038% | | DA |
| Serina | 0,018% | | - |
| Glicina | 0,022% | | - |
| Histidina | 0,005% | | - |
| Arginina | 0,014% | | - |
| Treonina | 0,067% | | - |
| Alanina | 0,037% | | - |
| Prolina | 0,018% | | DA |
| Tirozina | 0,012% | | - |
| Valina | 0,026% | | DA |
| Izoleucina | 0,018% | | DA |
| Leucina | 0,026% | | - |
| Fenilalanina | 0,015% | | DA |
| Lizina | 0,026% | | DA |
| Triptofan | 0,003 g/100 g | PB-136/HPLC ed. I of 06.02.2012 | - |

RO 132849 B1

În indicarea metodelor utilizate în tabelul 1 se folosesc următoarele acronime: PB - Procedura Badawcza (pol., Procedura de cercetare), HPLC - High Performance Liquid Chromatography

De asemenea, caracterizarea biochimică a produsului a evidențiat vitamine (A, B9, C), glucide, oligoelemente (K, Na, Ca, Mg, Mn, P). SOD Natural conține substanțe micromoleculare cu activitate enzimatică de tip superoxid dismutază (SOD) și de tip peroxidaza. Conținutul fiecărei vitamine (existența în mod natural în sucul de orz verde buvabil) este sub doza zilnică recomandată (DZR) [13-19], ținând cont de modul de administrare recomandat de producător (2-4 fiole/zi).

Produsul conține compuși cu activitate de epurare a radicalilor toxici de oxigen, prezintă proprietăți energizante, putând fi folosit ca supliment alimentar, fortifiant al organismului în condiții de stres, efort fizic și psihic.

Suplimentul alimentar obținut de noi este bine tolerat de organism și nu s-au semnalat reacții adverse. Analizele efectuate pe mostre au evidențiat un conținut de gluten sub limita de detecție a metodei (3 ppm).

Conținutul în compuși biochimici (proteine, glucide, gluten) și oligoelemente corespunzător suplimentului alimentar antioxidant propus spre brevetare

Tabelul 2

| Parametru testat | Valoarea corespunzătoare suplimentului alimentar antioxidant | Metoda | Doza zilnică recomandată (DZR) pentru adulți |
|----------------------------|--|----------------------------------|---|
| Proteine totale | 0,56% | Standard intern SR EN 25663:2000 | |
| Glucide | 2,5% | PB-287ed 1,27.09.2014 | |
| Vitamina B9 (acid folic) | 2,92 µg/100 g | PB-327ed 1,30.11.2015 | 0,4 mg (optim 1mg) |
| Vitamina C (acid ascorbic) | 5,7 mg/100 g | PB-135/HPLC, ed II / 15.09.2015 | 75 mg - femei 90 mg - bărbați |
| Fosfor anorganic | 2 mg/L | SREN ISO 10304-1:2009 | 800-1200 mg |
| Potasiu | 4170 mg/kg | SR EN ISO 15587-2:2003 | 40-100 mEq |
| Calciu | 295 mg/kg | SREN ISO 11885:2009 | 1000-1200 mg |
| Sodiu | 239 mg/kg | | 2300 mg |
| Magneziu | 128 mg/kg | | 320 mg - femei 420 mg - bărbați |
| Mangan | 1,25 mg/kg | | 10-12 mg pentru o persoană de 70 kg |
| Gluten | Nu a fost detectat | PB-139ed IV, 13.05.2013 | Contraindicat în cazul intoleranței la gluten sau bolii celiace |

În indicarea metodelor utilizate în tabelul 2 se folosesc următoarele acronime: PB - Procedura Badawcza (pol., Procedura de cercetare), HPLC - High Performance Liquid Chromatography, SR EN ISO - Standard Roman (SR); Normalisation Europeenne (EN); International Organization of Standardization (ISO).

RO 132849 B1

Deficiența Vitaminei B (acidului folic) este asociată cu o sinteză defectuoasă a ADN și perturbarea diviziunii celulare. Activitatea Vitaminei B9 din alimente depinde de eficiența absorbției și a transformării folaților în acid folic, dar și de greutatea moleculară relativă a acestora. Pentru o activitate biologică corespunzătoare, acidul folic este metabolizat la formele reduse de dihidrofolat, respectiv tetrahidrofolat. Există studii care sugerează ca un aport suficient de acid folic poate reduce concentrația plasmatică a homocisteinei, o substanță ce este recunoscută științific ca factor de risc pentru bolile de inimă [13, 20-22], Vitamina C (acidul ascorbic) este o substanță hidrosolubilă implicată în sinteza proteică, de exemplu sinteza colagenului (componenta structurală importantă a vaselor de sânge, tendoanelor, ligamentelor și oaselor) și a carnitinei (micromolecula esențială pentru transportul grăsimilor în mitocondrii unde are loc oxidarea majorității acestora). Acidul ascorbic îmbunătățește absorbția fierului din hrana de origine vegetală [23]. Organismul uman nu are abilitatea de a sintetiza Vitamina C, aceasta trebuind să fie procurată prin hrană [24]. Vitamina C este un antioxidant de mare eficiență, în special în mediul acid din stomac, fiind capabilă să blocheze producția unor compuși toxici precum nitrosaminele (majoritatea fiind carcinogene) [25]. Concentrațiile totale din țesuturi și plasma sunt strict controlate prin mecanisme de reglaj. Astfel, la dozele orale peste 1 g/zi, asimilarea Vitaminei C scade sub 50% și cea nemetabolizată se elimină prin urină [14]. Prin acțiunile sale complexe (incluzând susținerea funcțiilor imune și regenerarea tisulară), vitamina C constituie un agent terapeutic important în prevenirea și tratamentul cancerului, bolilor cardiovasculare, degenerării maculare și cataractei etc [23].

Fosforul (sub formă de fosfați) este un nutrient esențial implicat în ciclul energetic al organismului (prin moleculele de ATP), reglarea echilibrului acido-bazic, semnalizare celulară, mineralizarea oaselor și a dinților (ca parte componentă a hidroxiapatitei). Fosforul joacă un rol structural important intrând în componența fosfolipidelor membranare și a materialului genetic (ADN și ARN) [26]. Nivelul de fosfor din alimentația normală nu este periculos, în special datorită aportului adecvat de calciu și Vitamina D [27]. Majoritatea suplimentelor alimentare nu conțin doze semnificative de fosfor, menținând scăzut aportul acestui nutrient [28]. Suplimentarea cu fosfor ar putea juca un rol în eficiența calciului, prin reducerea riscului de apariție a osteoporozei [29, 30].

Potasiul este unul dintre electroliții organismului (alături de sodiu și clor) având atât funcții biochimice cât și electrice [31, 32]; joacă un rol esențial în transmiterea impulsului nervos, contracția ritmică a inimii și menținerea tensiunii arteriale în limite normale [33 - 35]. La nivel celular, potasiul, principalul cation prezent în organism, este implicat în sinteza proteică, metabolismul carbohidraților și glicogenogeneza. Acest element este disponibil într-o mare varietate de alimente (în special de origine vegetală) în stare proaspătă (fiind unul din cele mai solubile minerale, potasiul se pierde prin procesarea alimentelor). Nivelul seric normal de potasiu este în intervalul 3,5-5,0 mEq/L. Consumul de alimente/suplimente alimentare bogate în potasiu este important deoarece nu există metode eficiente pentru păstrarea potasiului în organism; chiar și în condițiile unui deficit de potasiu, rinichii continuă să excrete acest element. Deficiența sa este produsă cel mai probabil de o disfuncție renală [36].

Calciul se găsește în organism atât în țesuturile tari (oase, dinți) cât și în cele moi; mediază contracția musculară, vasodilatarea, funcția mușchilor, transmisia nervoasă, semnalizarea intracelulară, funcțiile secreției hormonale etc [37]. Absorbția și utilizarea calciului poate fi dependentă sau influențată de aportul alimentar de fosfor și Vitamina D, ca și de alți factori precum hormonul paratiroidian, calcitonina sau estrogenii. Este binecunoscut

RO 132849 B1

1 rolul calciului și a Vitaminei D din alimente în reducerea riscului sau întârzierea debutului
osteoporozei [38]. S-a demonstrat ca doze de calciu de 1000-2000 mg/zi pot încetini
3 scăderea densității minerale osoase, cu reducerea riscului apariției osteoporozei [38].

5 Sodiul este un element esențial pentru echilibrarea balanței hidro-electrolitice (la o
concentrație de 135-145 nmol/L), fiind important și pentru funcția celulară normală. Sodiul
7 joacă un rol direct în potențialul de acțiune necesar pentru transmiterea impulsurilor
nervoase și contracția musculară. Populațiile din Europa consumă excesiv sodiu (3-5 g/zi
față de necesitățile alimentare de 1,5 g/zi la adulți) [39].

9 Conținutul chimic și biochimic al produsului nostru explică efectul benefic al
produsului în menținerea stării de sănătate: echilibrarea balanței electrolitice și o bună
11 funcționare a sistemului nervos (sodiu, potasiu) [32-35], sistemului cardio-vascular (acid folic,
vitamina C, potasiu) [20-23, 32-35] sistemului osos (calciu, fosfor) [26, 37, 38], procese
13 antioxidante și susținerea funcțiilor imune (vitamina C) [23, 25], regenerare tisulară (vitamina
C, proteine) [23] etc.

15 Procedul de fabricație conform invenției, conține etape menite să păstreze cât mai
multe din principiile active ale plantei, astfel încât produsul finit să fie cât mai apropiat din
17 punct de vedere calitativ de sucul proaspăt de orz verde. În acest scop, imediat după
recoltare și tocare masa de orz verde este congelată, produsul finit este steril și este
19 condiționat în fiole de sticlă, ceea ce împiedică degradarea chimică și/sau microbiologică a
suplimentului alimentar obținut. Procedul de fabricație (fig. 1) este asociat cu etape de
21 control (intermediare și finale), astfel încât loturile neconforme să fie identificate din timp și
eliminate, ceea ce duce la eficientizarea procesului de producție și scăderea costurilor
23 asociate acestuia.

În faza 1 se recoltează orzul verde (aprilie-mai) când plantele au maximum 25 cm
25 înălțime. Ulterior plantele sunt spălate și tocate (se obțin fragmente de 2-3 cm), iar masa de
orz verde este ambalată în saci PVC (aproximativ 10 kg/sac) care sunt transportați rapid (sub
27 1 h) cu mașina frigorifică (temp $-10 \pm 5^{\circ}\text{C}$) la sediul central al INC Cantacuzino.

În faza 2 sacii de orz verde sunt stocați imediat după transport și congelați într-o
29 cameră frigorifică (Temp: $-10 \pm 5^{\circ}\text{C}$) special amenajată. După 24 h, sacii din camera
frigorifică se răsucesc pentru o congelare uniformă. Timpul minim de depozitare în camera
31 frigorifică până la prelucrare în procesul de producție este de 6 luni.

În faza 3 masa de orz verde este decongelată lent (la temperatura mediului ambiant)
33 și apoi presată cu ajutorul unei prese hidraulice ($p = 80 \text{ atm}$), obținându-se sucul de orz
verde.

În faza 4 sucul de orz verde este centrifugat (20 min la 2500-3000 rpm și temperatura
35 de $+4^{\circ}\text{C}$). Se controlează pH-ul supernatantului; dacă valorile obținute nu se încadrează în
37 intervalul 5,0-7,0 sucul de orz se aruncă.

În faza 5 sucul de orz verde este degrosizat prin filtrare (filtre Seitz T120, presiune
39 0,5 atm) și este depozitat la $+4^{\circ}\text{C}$ în container de sticlă, peste noapte.

În faza 6 sucul de orz verde degrosizat este supus unei serii de filtrări succesive prin
41 5 membrane filtrante din nitroceluloză (NC) în ordinea dată de dimensiunea porilor: 1,2 μm ,
0,8 μm , 0,65 μm , 0,45 μm , 0,2 μm . Presiunea de filtrare este 0,2-0,5 atm.

În faza 7 se realizează filtrarea sterilizantă în mediu steril (hota cu flux laminar) prin
43 membrana filtrantă de NC, 0,2 μm , folosind un aparat de filtrare Millipore cu filtrul montat,
45 autoclavat în prealabil 30 min la 115°C , 0,7 atm. Presiunea de filtrare sterilizantă este 0,2-0,5
atm. Se verifică integritatea filtrului.

47 Rezultă o serie de suc orz verde SOD NATURAL care este colectat în recipient de
sticlă cu filet autoclavat în prealabil la 121°C , 1 atm, 30 min.

RO 132849 B1

| | |
|--|----------------------|
| În hota cu flux laminar se recoltează steril probe SOD NATURAL pentru control (pH, aspect fizic, sterilitate, activități enzimatică tip SOD și tip peroxidaza) în tuburi etichetate în prealabil. Timpul de obținere a rezultatelor este de 14 zile. Determinarea activității de tip SOD și de tip peroxidaza se face prin metode cunoscute [40, 41]. | 1 3 |
| În faza 8 recipientul de sticlă ce conține SOD NATURAL steril se etichetează (data, seria, operator, volum) și se depozitează la temp $+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ pentru maximum 4 luni, în vederea fiolării. | 5 7 |
| În faza 9 SOD NATURAL este fiolat cu ajutorul unei linii de fiolare automate, într-un spațiu steril, dedicat și monitorizat corespunzător. Se utilizează fiole de sticlă farmaceutice, transparente, sterile, volum 5 ml. | 9 |
| Rezultă Supliment alimentar antioxidant steril, condiționat în fiole de sticlă de 5ml (ambalaj primar). Fiolele cu suplimentul alimentar antioxidant se controlează vizual și se elimină cele care nu corespund. | 11 13 |
| Probe de Supliment alimentar antioxidant sunt supuse controlului (pH, aspect fizic, sterilitate, activități enzimatică tip SOD și tip peroxidază). Suplimentul alimentar antioxidant se stochează în camera frigorifică la temperatura de $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ până la obținerea rezultatelor testelor de control (14 zile). | 15 17 |
| După control, fiolele cu Supliment alimentar antioxidant conform se etichetează și se pun în ambalaj secundar (folie plastic PVC pentru 10 fiole) și apoi în cutie de carton care a fost personalizată pentru acest produs. Fiecare cutie cu Supliment alimentar antioxidant (10 fiole/cutie) se etichetează, precizând seria și data de expirare. Cutiile cu Supliment alimentar antioxidant se depozitează la temp $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. | 19 21 |
| Necesitatea condiționării în fiole de sticlă și a respectării cu strictețe a condițiilor de păstrare este demonstrată de studiile de stabilitate (fig. 2). Condiționarea în flacoane de plastic (permeabile pentru moleculele de oxigen) duce la diminuarea rapidă (4 luni) a capacității de epurare a radicalilor peroxil (fig. 2a). Păstrarea suplimentului alimentar antioxidant la temperatura camerei ($20-25^{\circ}\text{C}$) este asociată cu o scădere accentuată a activităților de tip SOD și de tip peroxidază comparativ cu probe din același lot, păstrate la 4°C (fig. 2b). De asemenea, capacitatea de epurare a radicalilor peroxil variază invers proporțional cu temperatura, cea mai mică valoare a capacității antioxidante în acest caz înregistrându-se la 37°C (fig. 2b) [42]. | 23 25 27 29 |
| Condiționarea suplimentelor alimentare antioxidante în fiole de sticlă prezintă o serie de avantaje esențiale pentru păstrarea acelor proprietăți ale produsului utile în menținerea și îmbunătățirea stării de sănătate: | 31 33 |
| - fiind impermeabilă pentru gaze, vapori, lichide, sticlă împiedică degradarea moleculelor responsabile pentru activitatea antioxidante a produsului (aceste molecule fiind foarte sensibile la acțiunea oxigenului din mediul înconjurător), precum și a altor compuși utili; | 35 37 |
| - având o stabilitate chimică ridicată, sticlă nu interacționează cu suplimentul alimentar antioxidant obținut de noi și nu îi modifică proprietățile; | 39 |
| - pentru condiționarea suplimentului alimentar propus spre brevetare se folosesc fiole de sticlă sterile, închise etanș, care asigură păstrarea sterilității produsului și împiedică eventuala degradare a acestuia sub acțiunea microorganismelor; | 41 |
| - fiolele de sticlă folosite sunt transparente, permițând vizualizarea produsului și identificarea unor eventuale modificări ale acestuia (culoare, claritate etc). | 43 |
| În scopul testării suplimentare privind capacitatea antioxidantă, mai precis pentru evaluarea capacității de epurare a radicalilor peroxyl și hidroxil, se aplică metodele ORAC (Oxygen Radicals Absorbance Capacity), respectiv HORAC (Hydroxyl Radicals Absorbance Capacity). | 45 47 |

RO 132849 B1

1 Metoda ORAC pe care o utilizăm a fost adaptată și validată în laboratorul nostru.
2 Detaliile protocolului de lucru și studiile privind posibila stabilire a unui interval de variație față
3 de o valoare medie (comparativ cu un antioxidant standard) au fost publicate în articolele
4 noastre din 2013 și 2015 [42, 43].

5 Determinarea capacității antioxidante prin metoda HORAC s-a realizat cu ajutorul
6 unui kit standardizat, conform informațiilor producătorului (fig. 3). Datele prezentate
7 evidențiază diferențe nesemnificative ($< 10 \mu\text{M}$ acid galic) între loturile testate. Ținând cont
8 ca toate cele opt loturi testate provin din producția aceluiași an (2015), lipsa diferențelor
9 semnificative reflectă reproductibilitatea asociată unui proces tehnologic standardizat.

10 În scopul eliminării dezavantajelor menționate soluția propusă de noi include o
11 modalitate de utilizare care să asigure biodisponibilitatea optimă a principiilor active din
12 suplimentul alimentar obținut prin metoda descrisă mai sus.

13 Modul de utilizare a suplimentului alimentar obținut de noi este următorul: 2-4 fiole/zi
14 (5 ml/fiolă), băute cu 30 min înainte de masă. O cură completă durează 30 zile.

15 Stresul oxidativ joacă un rol important în acumularea leziunilor celulare și tisulare asociate
16 procesului de îmbătrânire [44-46]. Sinteza crescută de radicali liberi de oxigen se corelează
17 cu o capacitate scăzută a mecanismelor de detoxifiere celulară de a îndepărta acești radicali
18 toxici și de a împiedica astfel evoluția proceselor degenerative. Principala modalitate prin
19 care poate fi diminuat acest dezechilibru între formarea și neutralizarea radicalilor liberi de
20 oxigen, constă în aportul exogen de antioxidant. De aceea, în cele mai multe cazuri vârstnicii
21 au nevoie de doze mai mari de antioxidanți decât cei mai tineri. Excepțiile apar atunci când
22 activitatea antioxidantă poate interfera cu tratamente specifice unor patologii asociate sau
23 nu procesului de îmbătrânire.

24 Activitatea fizică fiind un modulator al balanței redox la nivel celular și tisular, cele
25 două extreme - activitatea fizică susținută, și inactivitatea - duc la generarea unor cantități
26 crescute de radicali liberi de oxigen cu efect inițial local și ulterior general, cu alterarea stării
27 de sănătate [47, 48]. Lucrul în condiții de stres susținut (activitate neuronală intensă și de
28 lungă durată), ca și lucrul în mediu toxic sau mediu cu radiații ionizante implică multiple
29 mecanisme intracelulare și extracelulare de generare a radicalilor liberi de oxigen [49-54].
30 Efectul acestora nu poate fi eficient contracarat de mecanismele antioxidante (suprasolicitate
31 într-un organism supus unor factori agresivi din mediul extern sau intern). Suplimentarea cu
32 antioxidanți endogeni diminuează stresul oxidativ și ajută organismul să reducă apariția sau
33 să repare leziunile induse de excesul de radicali liberi de oxigen. Doza zilnică de antioxidanți
34 trebuie corelată cu intensitatea stresului oxidativ prezent în organism.

35 Dinamica proceselor din organismul uman, mai precis desfășurarea neîntreruptă a
36 unor lanțuri de reacții redox este asociată cu necesitatea disponibilității permanente a unor
37 molecule cu efect antioxidant. Pe de altă parte, mecanismele de reglaj elimină surplusul de
38 molecule antioxidante introduse în organism prin alimentație, suplimente alimentare sau
39 compuși farmaceutici. În cazul în care aceste mecanisme de reglaj nu sunt eficiente,
40 antioxidanții nu sunt eliminați în mod corespunzător, se acumulează în exces și cresc riscul
41 unor patologii specifice. Echilibrul între producerea moleculelor prooxidante și eliminarea
42 acestora de către antioxidanți se menține prin aportul constant de cantități mici de
43 antioxidanți, nu prin administrarea pe termen scurt a unor doze mari de antioxidanți. Aceste
44 considerații justifică eficiența crescută în cazul administrării mai multor doze (volum mic)/zi,
45 timp de 30 zile, comparativ cu administrarea unei singure doze (volum mare)/zi pe termen
46 scurt (mai puțin de 30 zile). Metoda de utilizare asociată suplimentului alimentar antioxidant
47 obținut de noi răspunde problemei enunțate mai sus.

Fiind buvabil, suplimentul alimentar obținut de noi urmează aceeași cale ca și alimentele, fiind degradat parțial sub acțiunea sucurilor gastrice și intestinale, și apoi absorbit prin mucoasa intestinală. Interacția cu alimente prezente în stomac sau intestin ar putea duce la degradarea suplimentară a produsului, inclusiv a moleculelor răspunzătoare pentru acțiunea antioxidantă. Pentru a evita acest fenomen, recomandăm utilizarea suplimentului alimentar obținut de noi cu 30 min înainte de masă, timp necesar pentru degradarea parțială a produsului de către sucurile digestive și absorbția principiilor active în intestin.

Avantajele soluțiilor propuse de brevet au în vedere următoarele:

- creșterea stabilității produsului finit din punct de vedere al capacității antioxidante;
- obținerea unui supliment alimentar cu puritate ridicată, fără aditivi/ conservanți, cu compoziție și proprietăți similare cu cele ale sucului proaspăt de orz verde;
- procedeu de fabricație ieftin comparativ cu alte metode de fabricație a unor suplimente alimentare din/pe bază de orz verde;
- mod de utilizare care asigură biodisponibilitatea optimă a principiilor active.

Bibliografie

1. R. Sivakumar, P.V. Babu, C.S. Shyamaladevi, 2011, *Aspartate and glutamate prevents isoproterenol-induced cardiac toxicity by alleviating oxidative stress in rats*, Exp. Toxicol Pathol, 63(1-2): 137-42.
1. M. Wu, H. Xiao, W. Ren, J. Yin, B. Tan, G. Liu, L. Li, C.M. Nyavhoti, X. Xiong, G. Wu, 2014, *Therapeutic effects of glutamic acid in piglets challenged with deoxynivalenol*, PLoS One, 9(7):e 100591.
3. B. Matilla, J.L. Mauriz, J.M. Culebras, J. González-Gallego, P. González, 2002, *Glycine: a cell-protecting anti-oxidant nutrient*, US National Library of Medicine National Institutes of Health Nutr Hosp. 2002 Jan-Feb;17(1):2-9.
4. A.M. Wade, H.N. Tucker, 1998, *Antioxidant characteristics of L-histidine*, J Nutr. Biochem 9: 308-315.
5. P. Zheng, B. Yu, J. He, G. Tian, Y. Luo, X. Mao, K. Zhang, L. Che, D. Chen, 2013, *Protective effects of dietary arginine supplementation against oxidative stress in weaned piglets*, British Journal of Nutrition, 109, 2253-2260.
6. N. Kishnan, M.B. Dickman, D.F. Becker, 2008, *Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress*, Free Radic. Biol. Med., 15;44(4):671-81.Nov 12.
7. L-Tyrosine, Alternative Medicine Review Volume 12, Number 4 2007, 364-368.
8. E. Cojocar, N. Filip, C. Ungureanu, C. Filip, M. Danciu, 2014, *Effects of Valine and Leucine on Some Antioxidant Enzymes in Hypercholesterolemic Rats*, Health, 6, 2313-2321.
9. J. Zhao, Y. Liu, J. Jiang, P. Wu, W. Jiang, S. Li, L. Tang, S. Kuang, L. Feng, X. Zhou, 2013, *Effects of dietary isoleucine on the immune response, antioxidant status and gene expression in the head kidney of juvenile Jian carp (Cyprinus carpio var. Jian)*, Fish Shellfish Immunol, 35(2):572-80.
10. Y. Dong, Y. Bai, G. Liu, Z. Wang, J. Cao, Y. Chen, H. Yang, 2014, *The immunologic and antioxidant effects of L-phenylalanine on the uterine implantation of mice embryos during early pregnancy*, Histol Histopathol 29(10): 1335-42.
11. X.-Y. Li, Y. Liu, W.-D. Jiang, J. Jiang, P. Wu, J. Zhao, S.-Y. Kuang, L. Tang, W.-N. Tang, Y.-A. Zhang, X.-Q. Zhou, L. Feng 2016, *Co- and Post-Treatment with Lysine Protects Primary Fish Enterocytes against Cu-Induced Oxidative Damage*, PLoS ONE 11(1): e0147408. doi:10.1371/journal.pone.0147408.

RO 132849 B1

- 1 12. X. Mao, M. Lv, B. Yu, J. He, P. Zheng, J. Yu, Q. Wang, D. Chen, 2014, *The effect*
2 *of dietary tryptophan levels on oxidative stress of liver induced by diquat in weaned piglets*,
3 *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 5:49.
- 4 13. Institute of Medicine (IOM). 1998. *Dietary Reference Intakes for Thiamin,*
5 *Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline.*
6 Washington, DC: National Academy Press.
- 7 14. National Institutes of Health (NIH), Office of Dietary Supplements. 2013. *Vitamin*
8 *C. Dietary Supplement Fact Sheet.* [http://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-](http://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-HealthProfessional/)
9 [HealthProfessional/](http://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-HealthProfessional/).
- 10 15. Mayo Cline, [http://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/phosphate-](http://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/phosphate-supplement-oral-route-parenteral-route/description/drg-20070193)
11 [supplement-oral-route-parenteral-route/description/drg-20070193](http://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/phosphate-supplement-oral-route-parenteral-route/description/drg-20070193), accesat 8.12.2016.
- 12 16. Astle SM. Restoring electrolyte balance. *RN.* 2005;68:34-40.
- 13 17. Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium;
14 Institute of Medicine. *Dietary reference intakes for calcium and vitamin D.* Washington, DC:
15 The National Academies Press; 2011:35-74.
- 16 18. Mayo Clinic, [http://www.mayoclinic.org/rihealthy-lifestyle/nutrition-and-healthy-](http://www.mayoclinic.org/rihealthy-lifestyle/nutrition-and-healthy-eating/in-depth/sodium/art-20045479)
17 [eating/in-depth/sodium/art-20045479](http://www.mayoclinic.org/rihealthy-lifestyle/nutrition-and-healthy-eating/in-depth/sodium/art-20045479), accesat 8.12.2016.
- 18 19. NIH, Daily value reference for the dietary supplement label database,
19 <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Magnesium-HealthProfessional/>, accesat 8.12.2016.
- 20 20. Boushey C., Beresford S.A., Omenn G.S., Motulsky A.G. 1995. *A quantitative*
21 *assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits*
22 *of increasing folie acid intakes.* *JAMA.* 274:1049-1057.
- 23 21. den Heijer M.D., Koster T., Blom H.J., et al. 1996. *Hyperhomocysteinemia as a*
24 *risk factor for deep-vein thrombosis.* *N. Engl J. Med.* 334:759-762.
- 25 22. Malinow M.R. 1996. *Plasma homocyst(e)ine: a risk factor for arterial occlusive*
26 *diseases.* *J Nutr.* 126:1238S-1243S.
- 27 23. National Institutes of Health (NIH), Office of Dietary Supplements. 2013,
28 <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-Consumer/>, accesat 6.12.2016.
- 29 24. Higdon J. 2004. Vitamin C web page. Linus Pauling Institute website.
30 <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminC/>. (Updated 2013 by G Angelo.)
- 31 25. Tricker A.R., Preussmann R. 1991. *Carcinogenic N-nitrosamines in the diet:*
32 *oecurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential.* *Mutat Res.* 259:277-289.
- 33 26. Arnaud C.D., Sanchez S.D. 1996. Calcium and phosphorus. In: Ziegler EE, Filer
34 L.J., eds. *Present Knowledge of Nutrition.* 7th ed. Washington, DC: ILSI Press; 245-255.
- 35 27. Institute of Medicine (IOM). 1997. *Dietary Reference Intakes: Calcium,*
36 *Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride.* Washington, DC: National Academy
37 Press; 146-189.
- 38 28. Bailey R.L., Fulgoni V.L. III, Keast D.R., Dwyer J.T. 2011. *Dietary supplement use*
39 *is associated with higher intakes of minerals from food sources.* *Am J. Clin. Nutr.* 94:1376-
40 1381.
- 41 29. Heaney R.P., Nordin BEC. 2002. *Calcium effects on phosphorus absorption:*
42 *implications for the prevention and co-therapy of osteoporosis.* *J. Am Coli Nutr.* 21:239-244.
- 43 30. Heaney R.P., Weaver C.M. 2003. Calcium and vitamin D. *Endocrinol Metab Clin*
44 *North Am.* 32:181-189.
- 45 31. Oh M.S., Uribarri J. 1999. Electrolytes, water and acid-base balance. In: Shils
46 M.E., Olson J.A., Shike M., Ross C.A., eds. *Modern Nutrition in Health and Disease.* 9th ed.
47 Philadelphia: Lea and Febiger;105-139.

RO 132849 B1

32. Institute of Medicine (IOM). 2004. Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium Chloride, and Sulfate. Washington, DC: National Academy Press. 1
33. M. Vaseghi, K. Shivkumar, 2008, The Role of the Autonomie Nervous System in Sudden Cardiac Death. *Prog Cardiovasc Dis.*; 50(6): 404-419. 3
34. R. Gordan, J.K. Gwathmey, L.-H. Xie, 2015, *Autonomie and endocrine control of cardiovascular function*, *World J Cardiol*; 7(4): 204-214. 5
35. D.A. Sica, D.K. Wilson, 2007, Sodium, Potassium, the Sympathetic Nervous System, and the Renin-Angiotensin System. Impact on the Circadian Variability in Blood Pressure (Book chapter), *Blood Pressure Monitoring in Cardiovascular Medicine and Therapeutics*, Part of the series *Clinical Hypertension and Vascular Diseases* pp 203-223. 7
36. McLaren DS. 1999. Clinical manifestations of human vitamin and mineral disorders: a resume. In: Shils M.E., Olson J.A., Shike M., Ross C.A., eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 9th ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 485-503. 9
37. Institute of Medicine (IOM). 2010. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: National Academy Press. 11
38. Food and Drug Administration (FDA). 1994. Food labeling: health claims; calcium and osteoporosis. *Federal Register*. 58:2665-2681. 13
39. Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals, Scientific Committee on Food Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, European Food Safety Authority, Feb. 2006. 15
40. H.P. Misra, I. Fridovich, 1977, *Superoxide dismutase: a photochemical augmentation assay*, *Arch.Biochem.Biophys.*, 181(1):308-312. 17
41. Worthington Enzyme Manual. Peroxidase, 1993, Worthington Biochemical Corp, Lakewood, New Jersey, I.U.B.: 1.11.1.7, C.A.S.: 9003-99-0. 19
42. A.R. Lupu, L. Cremer, G. Ionescu, G. Szegli, A. Herold, M. Cristea, 2013, *The peroxy scavenger activity of the vegetal product Natural SOD measured using ORAC method*, *Romanian Biotechnological Letters*, 2013, 18(4): 8511-8520. 21
43. A.R. Lupu, L. Cremer, 2015, *Study to establish the acceptance range for peroxy radical scavenger capacity of Natural SOD*, *Romanian Archives for Microbiology and Immunology*, 74(3-4):91-98 23
44. B. Poljsak, I. Milisav, 2013, Cap 14. Aging, Oxidative Stress and Antioxidants, Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants, Ed. J A. Morales-González, InTech, ISBN 978-953-51-1123-8. 25
45. D.-F. Dai, Y.A. Chiao, D. J. Marcinek, H. H. Szeto3, P.S. Rabinovitch, 2014, Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan, *Longevity & Healthspan*, 3:6 27
46. S. Salini, 2014, Oxidative Stress and Psychological Disorders, *Current Neuropharmacology*, 12, 140-147. 29
47. K. Fisher-Wellman, R.J. Bloomer, 2009, Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history, *Dynamic Medicine*, 8:1 doi: 10.1186/1476-5918-8-1. 31
48. T. Debevec, G.P. Millet, V. Pialoux, 2017, Hypoxia-Induced Oxidative Stress Modulation with Physical Activity, *Front. Physiol.* 8:84, doi: 10.3389/fphys.2017.00084. 33
49. F.J. Kelly, 2003, Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects, *Occupational and Environmental Medicine*; 60:612-616. 35
50. R. Franco, R. Sánchez-Olea, E M. Reyes-Reyes, M. I. Panayiotidis, 2009, *Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Menage a Trois*, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674 (1-2), 3-22. 37

RO 132849 B1

- 1 51. S. Mena, A. Ortega, J.M. Estrela, 2009, *Oxidative stress in environmental-induced*
2 *carcinogenesis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,*
3 674(1-2): 36-44.
- 4 52. E. I. Azzam, J.-P. Jay-Gerin, D. Pain, 2012, *Ionizing radiation-induced metabolic*
5 *oxidative stress and prolonged cell injury, Cancer Lett.* 31; 327(0): 48-60.
- 6 53. J. Takaki, 2013, *Associations of Job Stress Indicators with Oxidative Biomarkers*
7 *in Japanese Men and Women, Int. J. Environ. Res. Public Health,* 10, 6662-6671.
- 8 54. Szumiel I., 2015, *Ionizing radiation-induced oxidative stress, epigenetic changes*
9 *and genomic instability. The pivotal role of mitochondria, International Journal of Radiation*
 Biology, 91(1): 32 pages.

RO 132849 B1

Revendicări

1. Supliment alimentar antioxidant lichid pe bază de orz verde, **caracterizat prin aceea că**, acesta conține 0,033% în greutate acid aspartic, 0,038% în greutate acid glutamic, 0,018% în greutate serină, 0,022% în greutate glicină, 0,005% în greutate histidină, 0,014% în greutate arginină, 0,067% în greutate treonină, 0,037% în greutate alanină, 0,018% în greutate prolină, 0,012% în greutate tirozină, 0,026% în greutate valină, 0,018% în greutate izoleucină, 0,026% în greutate leucină, 0,015% în greutate fenilalanină, 0,026% în greutate lizină, și respectiv 0,003 g/100 g triptofan, opțional cu adăugare de proteine totale, glucide, gluten și oligoelemente. 3 5 7 9
2. Supliment alimentar conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, acesta conține suplimentar 0,56% în greutate proteine totale, 2,5% în greutate glucide, și gluten sub limita de detecție, 2,92 μg/100 g vitamina B9 (acid folic), 5,7 mg/100 g vitamina C (acid ascorbic), respectiv oligoelemente: 2 mg/L fosfor anorganic, 4170 mg/kg potasiu, 295 mg/kg calciu, 239 mg/kg sodiu, 128 mg/kg magneziu, 1,25 mg/kg mangan. 11 13 15
3. Procedeu de obținere a suplimentului alimentar definit în revendicările 1 și 2 care cuprinde etapele de: recoltare a orzului verde când plantele au maximum 25 cm înălțime, spălarea, tocarea plantelor, ambalarea masei de orz verde; congelarea sacilor de orz verde într-o cameră frigorifică, la temperatura de $-10 \pm 5^{\circ}\text{C}$ și răsucirea sacilor după 24 h pentru o congelare uniformă, timpul minim de depozitare în camera frigorifică fiind de 6 luni; decongelarea lentă a masei de orz verde, la temperatura mediului ambiant și presarea sa cu ajutorul unei prese hidraulice la presiunea de 80 atm, obținându-se sucul de orz verde; centrifugare a sucului de orz verde timp de 20 min la 2500-3000 rpm și temperatura de $+4^{\circ}\text{C}$, controlându-se ulterior pH-ul supernatantului astfel încât dacă valorile obținute nu se încadrează în intervalul de 5,0-7,0 sucul de orz se aruncă; degrosizarea sucului de orz verde prin filtrare la o presiune de 0,5 atm și depozitarea sucului rezultat la $+4^{\circ}\text{C}$ în container de sticlă, peste noapte; supunerea sucului de orz verde degrosizat la filtrări succesive prin 5 membrane filtrante din nitroceluloză, într-o ordine dată de dimensiunea porilor: 1,2 μm, 0,8 μm, 0,65 μm, 0,45 μm, 0,2 μm și cu o presiune de filtrare de 0,2-0,5 atm, cu efectuarea controlului integrității filtrului; filtrare sterilizantă în mediu steril asigurat de hota cu flux laminar, prin membrana filtrantă de NC, 0,2 μm, folosind un aparat de filtrare cu filtrul montat, autoclavat în prealabil 30 min la 115°C , 0,7 atm și presiunea de filtrare sterilizantă de 0,2-0,5 atm. 17 19 21 23 25 27 29 31

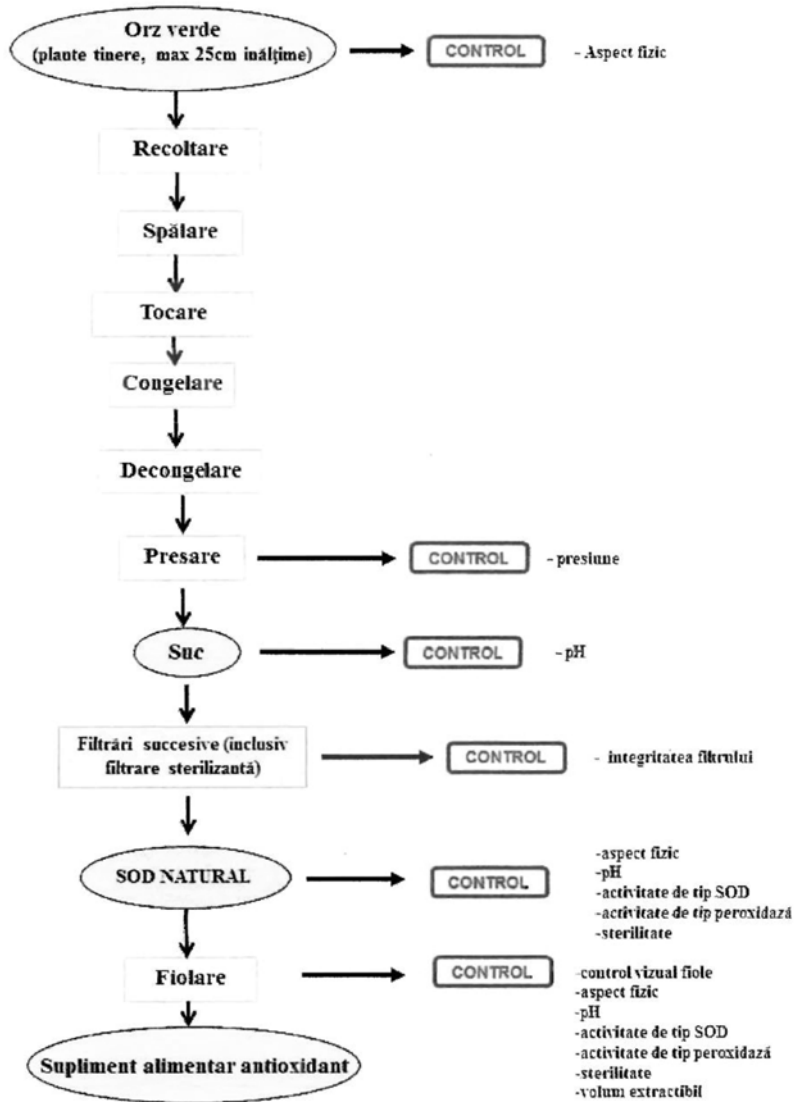
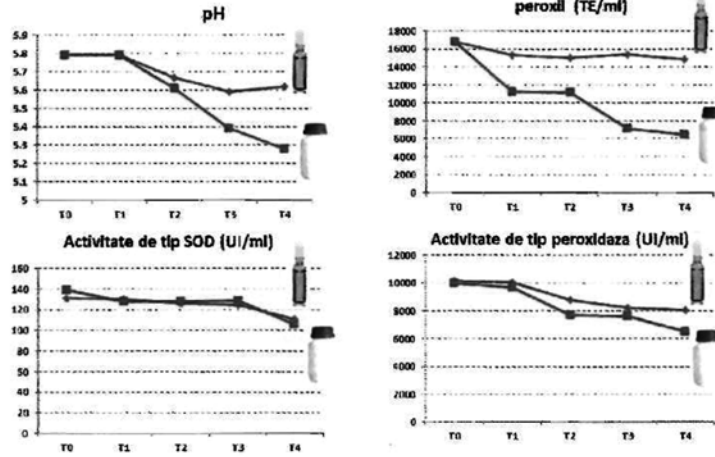


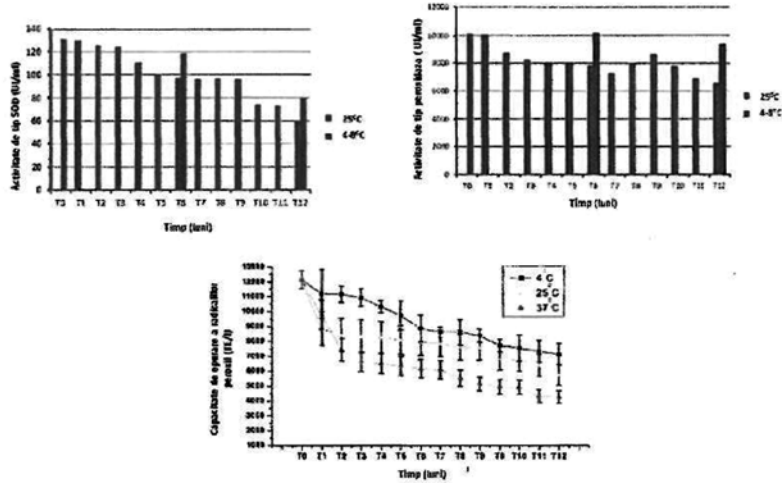
Fig. 1

Conditionare: fiole de sticla vs flacoane de plastic



a)

Conditii de stocare: 4-8°C



b)

Fig. 2

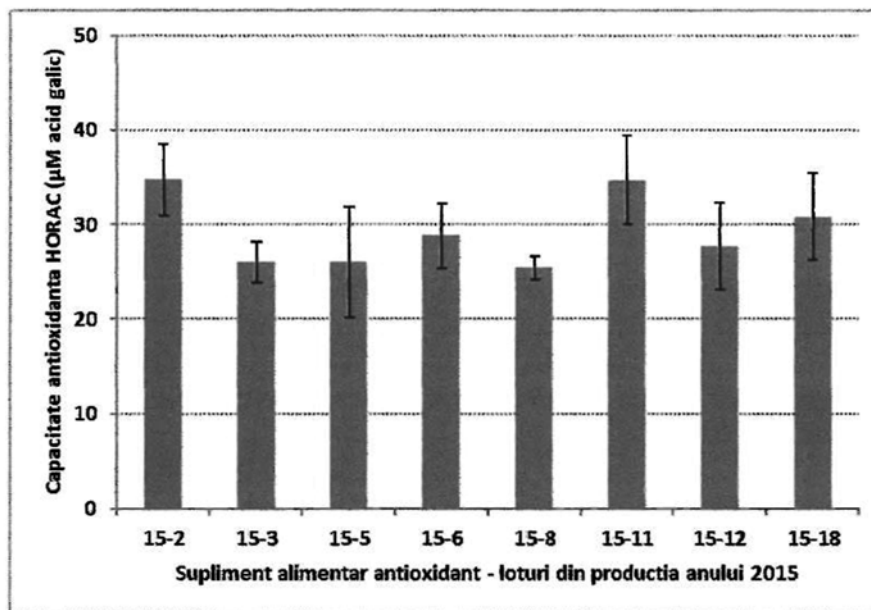


Fig. 3

