



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00239

(22) Data de depozit: 05/05/2020

(41) Data publicării cererii:
30/12/2020 BOPI nr. 12/2020

(71) Solicitant:
• SANIMED INTERNATIONAL IMPEX
S.R.L., ȘOS. BUCUREȘTI MĂGURELE
NR. 70F, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
BIORESURSE ALIMENTARE-IBA
BUCUREȘTI, STR.DINU VINTILĂ NR.6,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• TIHĂUAN BIANCA MARIA,
STR.CODRII NEAMȚULUI, NR.5-7, BL.B,
AP.46, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• BĂRBOI GHEORGHE,
ALEEA POLITEHNICII, NR.8, BL.3BIS, SC.2,
ET.3, AP.17, BUCUREȘTI, B, RO;
• KAMERZAN CRINA - MARIA,
ALEEA SANDULEȘTI, NR.5, BL.E 15, SC.1,
ET.10, AP.54, BUCUREȘTI, B, RO;
• ONISEI TATIANA, BLV.TRAIAN, NR.11,
BL.A1, SC.C, ET.1, AP.31, PIATRA NEAMȚ,
NT, RO;
• BELC NASTASIA, STR.FLUVIULUI,
NR.14, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• ȘERBANEA FLOAREA,
STR. ING. CRISTIAN PASCAL, NR.10,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• MATEESCU CRISTINA,
STR. DOAMNA OLTEA, NR.39, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) IMUNOBOOST-SUPLIMENT ALIMENTAR CU PROPRIETĂȚI
IMUNOMODULATOARE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un supliment alimentar cu proprietăți imunomodulatoare. Suplimentul, conform invenției, este sub formă de plic unidoză de 30 g, constituit din 16,2 g colagen bovin hidrolizat, pulbere, 10,2 g pulbere de gălbenuș de ou și zer de colostrum liofilizat, 1 g extract total liofilizat din părți aeriene de *Echinacea purpurea*, cu 4% echinozide, respectiv, pulbere din

extract de fructe de *Vaccinium myrtillus*, cu 40% proantocianidine, 0,2 g lăptișor de matcă, și în rest, agenți antiaglomeranți, îndulcitor alimentar, potențiator de aromă și conservant uzuali.

Revendicări: 1



DESCRIEREA INVENȚIEI

57

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 826 ep 239
Data depozit ...05-05-2020...

Titlul invenției

***ImunoBoost* - supliment alimentar cu proprietăți imunomodulatoare**

Invenția se referă la un supliment alimentar cu proprietăți imunomodulatoare, formulat prin includerea unor combinații optimizate funcțional între principii active de origine vegetală cu acțiune antioxidantă și de origine animală cu acțiune imunomodulatoare demonstrată *in vitro*, utilizabil sub formă de pulbere buvabilă, care, pe lângă aportul nutritiv, ajută la menținerea unui status imunitar echilibrat sau la intensificarea acestuia. Invenția se încadrează în categoria de suplimente alimentare care vizează îmbunătățirea nutriției, suplimentarea regimului alimentar cu surse concentrate de nutrienți cu efect fiziologic de stimulare și îmbunătățire a funcției imunitare.

Stadiul actual al cunoașterii

Un factor decisiv pentru o viață sănătoasă și echilibrată îl reprezintă alimentația. Aceasta nu se limitează doar la consumul de alimente, acestea nefiind suficiente în menținerea echilibrului de care organismul are nevoie. Traiul în societatea actuală vine cu numeroase avantaje, dar și destule dezavantaje. Stresul cotidian, oboseala, vârsta sau diferitele afecțiuni, influențează starea de sănătate a fiecărui om în parte. Există însă efecte negative mult mai evidente și care se instalează mai rapid asupra principalei bariere de apărare a organismului, sistemul imunitar. Ca urmare, imunitatea populației este tot mai scăzută. Categoriile de vârstă cele mai afectate sunt seniorii (65 ani +). Legătura dintre nutriție și imunitate în cazul vârstnicilor evidențiază faptul că malnutriția, chiar și forma de malnutriție în cadrul căreia o persoană suferă de un deficit de vitamine sau minerale, reprezintă o gravă problemă, la nivel mondial. Persoanele în vârstă au tendința de a aborda un regim alimentar lipsit de varietate, astfel se consideră că suplimentele alimentare pot ajuta persoanele în vârstă să își mențină sistemul imunitar sănătos. De aceea, prevenirea unui cumul de efecte care contribuie la scăderea imunității (factori biotici și abiotici) reprezintă o preocupare de interes, cu beneficii valoroase.

Din literatura de specialitate este cunoscut faptul că imunomodularea reprezintă o modalitate de reglare intrinsecă sau provocată a inițierii, duratei și nivelului răspunsului imun și poate fi selectivă (când stimularea se traduce într-un răspuns față de unul sau mai mulți antigeni)

și neselectivă (fără a direcționa activitatea celulelor stimulate către un antigen specific). Sistemul imunitar oferă o mare varietate de ținte abordabile în (imuno)modulare, pentru profilaxia prin imunonutriția.

Rolul activ al nutriției și suplimentării în susținerea și menținerea homeostaziei imune pentru diferite grupuri de indivizi este curent evidențiat în literatură, pornind de la teme cu conotații medicale cum este imunonutriția, până la recent studiatele alimente funcționale, sau la suplimentele alimentare cu funcționalitate dirijată.

Imunitatea scăzută se manifestă prin vulnerabilitate în fața infecțiilor, deteriorarea celulelor, inflamații și alte probleme grave de sănătate, din aceste motive imunomodularea cu ajutorul suplimentelor alimentare vizează manipularea sistemului imunitar pentru a controla consecințele unor afecțiuni, ale infecțiilor și a altor efecte negative asupra sănătății.

Suplimentele alimentare pot completa dieta normală, ca surse concentrate de nutrienți sau alte substanțe cu efect nutrițional ori fiziologic, susținând astfel organismul. Găsirea soluțiilor naturale de echilibrare a răspunsului imunitar a reprezentat, în ultima perioadă, obiectul de studiu al tot mai multor cercetări (Wichers 2009; Agyei and Danquah 2012; Hartmann and Meisel 2007).

Problema pe care o rezolvă invenția, soluții tehnice, avantaje

Suplimentul alimentar *ImunoBoost*, conform invenției, este destinat consumului uman, în vederea menținerii unui status imunitar echilibrat, sau al intensificării acestuia, pentru combaterea efectelor infecțiilor, pentru menținerea homeostaziei și implicit a funcțiilor intrinseci de apărare a organismului față de acțiunea radicalilor liberi, a toxinelor și a stresului, precum și pentru accelerarea proceselor de vindecare și recuperare după răceli, gripe și infecții ale tractului respirator.

Formula suplimentului alimentar propus spre brevetare conține principii active/componente de natură animală și vegetală.

Principiile active/ componentele de natură animală sunt reprezentate de **hidrolizatul de colagen**, obținut printr-un procedeu documentat în literatura de specialitate (Alkayali 1997; Schmidt et al. 2016; Shoulders and Raines 2009; Asghar and Henrickson 1982; Gomez-Guillen et al. 2011), de **lăptișorul de matcă**, ale cărui proprietăți imunomodulatoare sunt demonstrate științific (Pasupuleti et al. 2017; Cova 2013; Cornara et al. 2017; K. Wolska et al. 2019)(Pasupuleti et al. 2017; Cova 2013; Cornara et al. 2017; K. Wolska et al. 2019) și un **ingredient bogat în**



imunoglobuline IgY și IgG, obținut printr-un procedeu de îndepărtare a grupărilor lipidice (și obținerea unei concentrații scăzute de colesterol) din **gălbenușul de ou** și suplimentarea acestuia din urmă cu **zer din colostrum bovin**, urmată de liofilizarea amestecului (Mine 2007).

Colostrul bovin este o sursă terapeutică valoroasă în sprijinirea sistemului imunitar, deoarece din punct de vedere al principiilor active, colostrul bovin este o sursă importantă de imunoglobuline (G, A, M), lactoferină, oligozaharide și PRP (polipeptide bogate în prolină). Aceste substanțe joacă un rol crucial în dezvoltarea sistemului imunitar. Proprietățile imunotropice ale colostrumului (și ale substanțelor din componența lui) îl recomandă ca fiind un ingredient funcțional cu proprietăți imunomodulatoare.

Colostrul uman este prima formă de lapte matern produs după naștere și este foarte bogat în imunoglobuline, peptide antimicrobiene (lactoferina și lactoperoxidaza) și alte molecule bioactive, inclusiv factori de creștere importanți pentru nutriția, creșterea și dezvoltarea nou-născuților și pentru sistemul imunitar pasiv (Playford, Macdonald, and Johnson 2000).

Colostrul bovin este produs în primele zile după fătare. Această formă de lapte prezintă un profil nutrițional și imunologic cu o compoziție diferită de forma “matură” a laptelui. Conține macronutrienți (proteine, carbohidrați, oligozaharide, grăsimi) și micronutrienți (vitamine și minerale), factori imunologici (IgA, IgG, IgM), factori de creștere (EGF, TGF, IGF, VEGF, GH), compuși antimicrobieni și substanțe imunomodulatoare precum colistrinina și polipeptide bogate în prolină (PRP – “prolyine-rich polypeptide”).

Colostrul bovin este folosit ca supliment alimentar în alimentația nou-născuților și a adulților cu sistemul imunitar compromis, pentru tratarea sau prevenirea infecțiilor enterice cu diverși patogeni.

Colostrul bovin poate fi obținut în cantități mari și nu produce efecte secundare atunci când este administrat omului. Acesta este preluat timp de câteva ore după nașterea vițeilor, de la vaci ținute sub supraveghere zootehnică, într-un mediu controlat și igienic, fără expunere la pesticide. Colostrul colectat în primele 24 ore după fătare conține cantitatea cea mai mare a substanțelor anterior enumerate (Godhia and Patel 2013).

Studii recente indică utilizarea colostrului pentru prevenirea infecțiilor în organismul uman. În 2001, He și colaboratorii au condus un studiu pentru a obține informații sigure privind efectele imunomodulatoare ale colostrului bovin după administrarea la indivizi sănătoși (He și *colab.*, 2001).

Colostrul reprezintă un produs natural cu importanță majoră pentru sportivi. Studiile din literatura de specialitate arată că utilizarea acestuia accentuează constituirea masei musculare, arderea grăsimilor, stimularea funcției imune (care de obicei scade după exerciții fizice intense), scurtarea timpului de recuperare și accelerarea vindecării rănilor (El-Loly 2007).

Oul este un aliment complet, având o mare valoare nutrițională. Este folosit ca aliment atât în scopuri dietetice, cât și în alimentația normală, deoarece oferă o sursă calorică moderată (aproximativ 150 kcal / 100 g), proteine de calitate, versatilitate culinară excelentă și un cost economic scăzut. Oul este, de asemenea, relativ bogat în compuși liposolubili și, prin urmare, poate reprezenta un adaos nutritiv în dieta persoanelor de toate vârstele și poate juca un rol deosebit de util în alimentația persoanelor expuse riscului aportului scăzut de nutrienți, cum sunt vârstnicii, femeile însărcinate și copiii. În plus, oul poate fi consumat în întreaga lume, fără restricții de utilizare din motive religioase. Industria suplimentelor alimentare utilizează oul pentru formulări cu funcționalități diverse, în special dirijate către suplimentarea de proteine, dar și pentru imunomodulare (Miranda și colab., 2015). Componentele bioactive din ou, incluzând fosfolipide, colesterol, luteină, zeaxantină și proteine, au implicații importante în fiziopatologia numeroaselor boli cronice și în răspunsul imun la leziuni acute (Andersen, 2015).

Galinaceele pot fi considerate mici "fabrici" pentru producția de anticorpi. O găină poate produce mai mult decât 22,5 g IgY pe an, din care 2 până la 10 % sunt anticorpi specifici.

În literatura de specialitate este demonstrat că imunoglobulinele (IgG și IgY) pot influența sistemul imunitar uman prin imunomodulare ca urmare a acțiunii unor peptide asociate cu imunoglobulinele (colostrine și respectiv yolkine (Polanowski, A, 2012, Zabłocka A, 2014, Abdou A, 2013). Aceste peptide care însoțesc imunoglobulinele pot traversa bariera intestinală, au rol imunomodulator și acționează indiferent de specia la care sunt administrate, fapt dovedit și în cazul subiecților umani. Având în vedere aceste aspecte, a fost obținut un **produs bogat în imunoglobuline (IgG din colostrum și IgY din gălbenuș) biologic funcționale**, procedeul de obținere fiind documentat de literatura de specialitate și utilizat în compoziția suplimentului propus spre brevetare.

Lăptișorul de matcă a fost acceptat și adesea folosit ca o substanță care sprijină sănătatea. Cercetările arată că proteinele din lăptișorul de matcă au funcții fiziologice imunomodulatoare, mediatore în cazul reacțiilor alergice precum și de stimulare a proliferării celulelor. Lăptișorul de

matcă este singura sursă cunoscută de **acid 10-hidroxi-2-decenoic (10-HDA)**, un compus cu proprietăți imunomodulatoare și antibacteriene (Boselli și colab., 2003).

Principiile active/ componentele de natură vegetală sunt reprezentate de *Echinacea purpurea* extract liofilizat standardizat în 4% echinacoside și *Vaccinium myrtillus* extract liofilizat din fructe standardizat în 40% proantocianidine.

Numeroase articole științifice au demonstrat **proprietățile imunomodulatoare și anti-inflamatoare** ale speciei *Echinacea purpurea*, efecte datorate diferitelor clase de metaboliți secundari reprezentați de alcamidele, derivați ai acizilor cafeici (echinacoside), polizaharide și glicoproteine.

S-a demonstrat ca acesta contribuie la funcționarea normală a sistemului de apărare a organismului, susține sănătatea tractului respirator, are un efect calmant și plăcut asupra gâtului, faringelui și corzilor vocale, susține sănătatea tractului urinar inferior. Componentele fenolice (echinacozidele) ale preparatelor de *Echinacea* sunt implicate în reducerea proceselor inflamatorii, fiind frecvent utilizate pentru **prevenirea și ameliorarea simptomelor infecțiilor** bacteriene și virale, deoarece exercită **activități antioxidante și anti-inflamatorii**, care susțin **proprietățile sale imunomodulatoare**.

Afinele sunt recunoscute pentru beneficiile lor pentru sănătate datorate antocianozidelor, reprezentative fiind mirtilinele a și b, împreună cu proantociani (monomeri și dimeri), taninurile (tanin catehic), flavonele (heterozidele cvercitolului și kemferolului), acid cafeic, compuși bioactivi utilizați drept **sursa naturală de antioxidanți** (care pot proteja de acțiunea radicalilor liberi) în produsele alimentare și nutraceutice (Camire 2000; Upton 2001; Mazza 2002; Park et al. 2007; Zafra-Stone și colab. 2007). A fost demonstrat și **efectul imunomodulator** al compușilor fenolici (Nijkamp și Parnham, 2011, Shi și colab., 2017), mai mult decât atât, multe studii documentează efectele anti-inflamatoare ale antocianinelor și a compusilor fenolici din afine (Karlsen și colab. 2007; Chen și colab. 2008; Dreiseitel și colab. 2008; Kim et al. 2009).

Fructele acestui arbust sunt o sursă bună cunoscută de antioxidanți care pot proteja de acțiunea radicalilor liberi, susțin sănătatea ochilor, acuitatea vizuală, funcția retinei și fluxul de sânge către ochi, de asemenea antocianozidele conținute pot contribui la stabilizarea nivelului sănătos de collagen.

Afinele sunt una dintre cele mai bogate surse naturale de antocianidine. Acești componenți polifenolici dau acestor fructe un conținut antioxidant ridicat, fiind considerați bioactivii cheie

responsabili pentru multe beneficii aduse sănătății. Deși afinele sunt cunoscute în general pentru îmbunătățirea vederii, i-au fost demonstrate efectele excepționale în scăderea glicemiei și reglarea nivelului lipidelor, proprietățile sale anti-inflamatorii reușind practic să devină un zid defensiv în apărarea organismului de stresul oxidativ.

Polifenolii (puternici antioxidanți) din afine ajută la prevenirea obezității prin inhibarea enzimelor digestive, (ex. lipază), reducând astfel absorbția grăsimilor. Avantajul antocianidelor, spre deosebire de alți bioflavonoizi, este că acestea sunt absorbite de către organism integral.

Importanța **principiilor active de natură vegetală** din compoziția formulei propuse spre brevetare constă în faptul că antioxidanții sunt absolut necesari pentru a controla reacțiile care eliberează radicalii liberi. Incluziunea în dietă a unor ingrediente cu proprietăți antioxidante optimizează funcționarea corectă a sistemului imunitar prezentând un rol protector împotriva infecțiilor bacteriene, virale sau parazitare. Antioxidanții au capacitatea de a modula sensibilitatea sau rezistența gazdei la agenții patogeni infecțioși, favorizând apărarea organismului împotriva atacului, având un rol esențial în întreținerea sănătății.

Exemplu concret de realizare a invenției

Prezentăm un exemplu concret de realizare a invenției:

Pentru obținerea a 30 g produs *ImunoBoost* (cantitate care reprezintă doza zilnică recomandată), se utilizează:

Colagen bovin hidrolizat (pulbere liofilizată) -16,2 g;

Pulbere din gălbenuș de ou și zer de colostrum liofilizat -10,2 g;

Extract total liofilizat din părți aeriene de *Echinacea purpurea*, cu 4 % echinacozide -1 g;

Pulbere din extract din fructe de *Vaccinium myrtillus*, cu 40 % proantocianidine -1 g;

Lăptișor de matcă - 0,2 g;

Agenți antiaglomeranti (stearat de magneziu/ E470b, dioxid de siliciu coloidal/ E551) - 0,9 g;

Îndulcitor (glicozide derivate din steviol/ E960) - 0,3 g;

Potențiator de aromă (aromă de portocale) - 0,1 g;

Conservant (sorbit de potasiu/ E202) - 0,1 g.

Operații tehnologice necesare obținerii produsului ImunoBoost

Formularea acestui suplimentului alimentar presupune obținerea unei structuri de tip pulbere conform formulei specifice propuse spre brevetare. Procedul controlat de formulare asigură distribuția corectă a principiilor active, concentrația corectă, gustul și stabilitatea produsului finit. În obținerea produsului denumit **ImunoBoost** sunt parcurse o serie de operații de prelucrare a materiei prime (măcinare, granulare, omogenizare). Inițial, are loc o **măcinare grosieră** a materiei prime utilizând o moară industrială. Echipamentul utilizat în procesul de măcinare minimizează interacțiunile cu materia de prelucrat, acesta fiind un aspect important impus de rigorile calitative care trebuie să fie respectate în industria alimentară. De asemenea, echipamentul este prevăzut cu un panou de automatizare pentru asigurarea acurateții dimensiunilor de granulație și optimizarea turației de lucru în funcție de materia primă de prelucrat. Macinarea fină este importantă pentru obținerea unor granulații specifice definitorii pentru pulberile buvabile astfel încât ulterior să nu existe zone eterogene sau aglomerări datorate fie uminidității relative, fie forțelor electrostatice. Mai specific, a fost utilizată o moară cu bile în vederea obținerii unor pulberi semifine/ mijlocii (sita V sau VI conform F.R. X), astfel încât acestea să se poată încadra în normele de producție ale suplimentelor alimentare. Avantajul reglării gradului de măcinare, precum și menținerea productivității la un nivel constant sunt caracteristici importante în asigurarea reproductibilității produselor. Echipamentul utilizat prezintă site care finalizează operațiunea de cernere, necesară fluxului tehnologic pentru îndepărtarea particulelor care nu se încadrează în granulația dorită. Următoarea etapă importantă o reprezintă operația de **cernere** prin sitare progresivă (cu 3 sau 5 nivele de sitare) se efectuează imprimând sitei o mișcare

de vibrare continuă, prin care pulberea vine în contact cu ochiurile sitei, fiind astfel determinată uniformitatea pulberilor.

Operația de **omogenizare** permite obținerea de amestecuri de pulberi. Pentru asigurarea uniformității este utilizat omogenizatorul de pulberi tip „Y”, echipament de mixare care corespunde normelor impuse în formularea suplimentelor alimentare. Construcția din inox este prevăzută cu tancuri ce permit alimentarea aparatului cu orice tip de pulberi, fiind posibilă omogenizarea atât a ingredientelor de natură animală cât și a celor de natură vegetală și a excipienților. Evacuarea produsului se face printr-o valva de evacuare după terminarea programului setat din panoul de automatizare cu care este prevăzut aparatul.

Operațiunea de **transport** a pulberilor este realizată în condiții speciale astfel încât să nu provoace o contaminare a acestora, iar pierderile tehnologice să fie minimizate. Se utilizează o instalație de transfer pneumatic pentru a nu încălca mediul de lucru cu pulberi, iar transportul pulberilor între secții se realizează cu ajutorul un container destinat transportului de pulberi. **Ambalarea primară** este esențială în asigurarea îndeplinirii criteriilor de conservare a valorilor comerciale a unui produsului pe toată filiera de producere a acestuia cuprinsă între procesarea materiilor prime, prelucrarea, condiționarea, distribuția, comercializarea și consumul acestuia. Ambalarea se face în pungi pre-formate din materiale compatibile cu produsul finit, de tipul film M-PET / PE gold / silver. După ambalarea primară produsul se află sub formă de plicuri unidoză, intacte, închise ermetic, **ambalate secundar** câte 10 într-o cutie de carton personalizată. Elementele de identificare ale produsului (lot) sunt vizibil și lizibil imprimate pe fiecare plic, iar cele referitoare la compoziția și recomandările de utilizare ale produsului sunt înscrise pe etichetă, care va fi aplicată pe ambalajul secundar (cutie). **Depozitarea** produsului se face în spații curate și uscate, bine aerisite, fără animale rozătoare sau insecte, în cutii de carton, sigilate cu banda adezivă, ferite de lumina directă a soarelui, la o temperatură de max. 25°C cu o umiditate relativă a aerului de 65 – 75%. Conform legislației în vigoare, spațiile de depozitare sunt situate departe de surse care degajă mirosuri pătrunzătoare ce pot afecta calitatea ingredientulelor funcționale și este menținută starea de curățenie prin dezinfectare și deratizare. Depozitarea se face pe loturi, în ordinea datei de fabricație. **Transportul** produsului (supliment alimentar) se face în vehicule curate, în condiții care asigură integritatea ambalajelor și menținerea calității acestuia. Fiecare lot este însoțit la livrare de declarația de conformitate, întocmită conform dispozițiilor legale în vigoare. **Durabilitatea** minimală a produsului (supliment alimentar) este de 2 ani de la data

fabricației. Acest termen se referă la produsul ambalat, depozitat și transportat în condițiile prevăzute de prezentul standard de firmă și decurge de la data fabricației.

Controlul calității reprezintă o activitate esențială pentru procesul de fabricație a suplimentelor alimentare, etapele cheie fiind prelevarea probelor, realizarea specificațiilor tehnice stabilite, analiza și elaborarea documentației care garantează că testele necesare și relevante au fost efectuate, că materialele și produsele finite nu sunt eliberate până când calitatea lor nu a fost declarată ca fiind corespunzătoare.

Analiza calității produsului se efectuează periodic, cu regularitate, în scopul verificării consistenței procesului existent, corectitudinii specificațiilor curente, atât pentru materiile prime cât și pentru produsul finit, pentru a sesiza orice tendință și pentru a identifica modalitățile de îmbunătățire a produsului și procesului. Astfel de analize sunt efectuate și documentate ținând cont de evaluările anterioare.

Validarea curățării incintelor și echipamentelor de fabricație se realizează pentru a confirma eficacitatea procedurii de curățare. Argumentația în alegerea limitelor urmelor de produs, de agenți de curățare și de contaminare microbiană se bazează pe materialele folosite. Limitele stabilite sunt realizabile și verificabile. Sunt utilizate metode analitice validate a căror sensibilitate permite detectarea reziduurilor sau contaminanților. Limita de detecție pentru fiecare metodă analitică este suficient de sensibilă pentru a detecta nivelul stabilit de reziduu sau de contaminant acceptat.

Condițiile de admisibilitate pentru controlul microbiologic (aeromicrofloră și suprafețe) al incintelor și echipamentelor:

Proba aer: pentru spații de clasa C: 50 UFC/ m³; pentru spații de clas D: 100 UFC/ m³.

Probă suprafețe (placă 90mm): pentru spații de clasa C: 50 UFC/4 ore; pentru spații de clasa D: 100 UFC/4 ore; Număr de streptococi viridans/ m³ ≤ 1%; Număr de streptococi beta hemolitici/ m³: absenți; Număr de stafilococi/ m³: cat mai mic; Număr de colonii *E.coli*/ m³: absenți.

Se aplica metoda sedimentarii (metoda Omelianski). Se incubează la 37°C, 24 de ore.

Calculul numărului de microorganisme in volumul de aer se face utilizând formula:

$$NTG /m^3 = UFC \times 10000 / S \times C_T$$

Formularea produsului se face prin respectarea criteriilor de igienă și sanitație impuse de controlul calității, utilizând metode care permit evitarea unei contaminări. **Asigurarea sterilității** produsului formulat și ambalat se obține prin tratamentul cu radiații ionizante, la doze administrate

/ absorbite minim necesare asigurării sterilității, dar și corelat cu gradul de degradare al componentelor/ principiilor active.

Conform Regulamentului (UE) 1169/2011 privind informarea consumatorilor cu privire la produsele alimentare care stabilește cadrul legal din Uniunea Europeană, a fost elaborată eticheta suplimentului alimentar:

ImunoBoost – supliment alimentar cu principii active imunomodulatoare

Ingrediente/ doză: colagen bovin hidrolizat – 16,2 g; pulbere din gălbenuș de ou liofilizat - 10,2 g; extract total liofilizat din părți aeriene de Echinacea (*Echinacea purpurea*), cu 4 % echinacozide – 1 g; pulbere din extract din fructe de Afîn (*Vaccinium myrtillus*), cu 40 % proantocianidine – 1 g; lăptișor de matcă – 0,2 g; agenți antiaglomeranti (stearat de magneziu/ E470b, dioxid de siliciu coloidal/ E551); îndulcitor (glicozide derivate din steviol/ E960); potențiator de aromă (aromă de portocale); conservant (sorbit de potasiu/ E202).

Mod de utilizare: se consumă zilnic câte 1 plic unidoză, diluat în 100 ml apă, suc de fructe, lapte. A nu se depăși doza recomandată pentru consumul zilnic.

Formă de prezentare: cutie din carton cu 10 plicuri unidoză a câte 30 g pulbere buvabilă/ plic

Greutate netă: 300 g (10 plicuri x 30 g)

Atenționări: Suplimentele alimentare nu înlocuiesc o dietă variată, echilibrată și un stil de viață sănătos. A nu se lăsa la îndemâna și la vederea copiilor mici. A nu se consuma de către persoanele alergice la oricare dintre ingredientele produsului (ou, lăptișor de matcă). A nu se consuma de către femeile însărcinate sau care alăptează. Consumul excesiv poate avea efect laxativ. Produsul este destinat adulților!

Condiții de păstrare: în ambalajul original, ferit de lumină și umiditate, la temperaturi de maximum 25°C.

Proprietățile fizico-chimice ale produsului și limitele de admisibilitate sunt:

Caracteristici	Condiții de admisibilitate	Metoda de analiză
Umiditate, max. %	7,0	Farmacopeea Română, Ed. X, Editura Medicală
Cenușă insolubilă în HCl 10 %, max. g/kg	2,0	Farmacopeea Română, Ed. X, Editura Medicală

Proprietățile microbiologice ale produsului și limitele de admisibilitate sunt:

Caracteristici	Condiții de admisibilitate	Metoda de analiză
Drojdii și mucegaiuri, ufc/g, max.	< 500	SR ISO 21527-1:2009
Număr total de germeni, ufc/g, max.	< 10 ⁵	SR EN ISO 4833-1:2014
<i>Escherichia coli</i> , ufc/g, max.	< 10	SR ISO 16649-2:2007
<i>Enterobacteriaceae</i> (ufc/g), max.	< 10	SR ISO 21528-2:2007
Stafilococ coagulază pozitiv, ufc/g, max.	< 10	SR EN ISO 6888-1:2002
<i>Salmonella</i> , prezență/25 g	absent/25 g	SR EN ISO 6579:2003

Proprietățile organoleptice ale produsului finit și condițiile de admisibilitate sunt:

Caracteristici	Condiții de admisibilitate
Aspect produs	Pulbere omogena, fără nuclee de aglomerare, fără semne de contaminare cu mucegaiuri sau fermentație, fără urme de insecte, acarieni sau alți paraziți, fără corpuri străine, fără produse fitofarmaceutice toxice
Culoare	Gălbui
Mucegăire, fermentare sau alte semne de alterare	Lipsă
Infestare	Lipsă
Corpuri străine	Lipsă
Gust	Dulce-acrișor, specific, fără gust străin (de mucegai, ranced etc.)
Miros	Plăcut, fructat (citric) dat de aroma folosită fără miros străin (de mucegai etc.)

Verificarea calității produsului (supliment alimentar) se face în cadrul unui laborator specializat, prin efectuarea de analize organoleptice, fizico-chimice și microbiologice, conform metodelor specificate în prezentul standard de firmă. Conținutul în metale grele și hidrocarburi aromatice policiclice trebuie să fie în limitele stabilite de reglementările în vigoare (Regulamentul 1881/2006). Verificarea se face pe loturi de produs.

Efectul fiziologic al suplimentului alimentar rezidă din evaluările realizate *in vitro* prin testarea activității antimicrobiene și a capacității de aderență și fagocitoză a ingredientelor, care arată faptul că toate probele testate au stimulat capacitatea de aderență a celulelor de *Staphylococcus aureus* la membrana leucocitară și au activat fagocitele, stimularea semnificativă a capacității de fagocitoză observându-se în special la echinacea și ou.

În ceea ce privește efectul prebiotic de stimulare a creșterii și aderenței la substratul celular sensibil (celule Hep2) a 3 tulpini de bacterii lactice testate (*Lb brevis*; *Lb plantarum*; *Lb*

rhamnosus), s-a demonstrat, prin analiza *patternului* de aderență (localizat, difuz, agregativ) și valoarea indicelui de aderență (%), cel mai eficient ingredient fiind extractul de echinacea. Astfel, pentru ingredientele de origine vegetală, în principal a fost demonstrată o acțiune probiotică, aceasta fiind un aspect pozitiv atunci când este ținută funcția imunitară a organismului.

Demonstrarea **efectului imunomodulator al suplimentului alimentar**, a fost efectuată prin analiza pe model animal (șoricei) a **toxicității acute**. După 14 zile de la administrarea unei singure doze de *ImunoBoost* (2000 mg/Kg corp) nu s-au observat semne fizice sau clinice referitoare la starea de sănătate a animalelor. Animalele au fost evaluate zilnic. Mai mult decât atât, după sacrificarea animalelor nu s-au observat leziuni patologice la nivelul organelor interne. De asemenea, toate animalele au supraviețuit și nu s-a observat o scădere în greutate. Nu s-au observat diferențe semnificative în creșterea organelor interne la animalele care au fost testate pentru doza acută.

În evaluarea efectului administrării unei doze de 200mg/Kg corp de *ImunoBoost* asupra numărului total de leucocite (WBC), limfocitelor (LY), neutrofilelor (NE) și monocitelor (MO) la șoarece, după 14 zile de la administrarea dozei de *ImunoBoost* se observă o creștere semnificativă a numărului de leucocite comparativ cu lotul control (Tabel 2). Creșterea numărului total de leucocite (WBC) poate indica un efect stimulator asupra celulelor stem hematopoietice.

Evaluarea efectului imunomodulator pe perioada a 21 de zile a demonstrat că la niciunul din grupurile la care s-a administrat *ImunoBoost* nu s-a observat o scădere semnificativă în greutate, ci doar mici variații ale greutății pe durata experimentului. Nu s-au observat diferențe semnificative în creșterea organelor interne la animalele care au primit *ImunoBoost* comparativ cu grupul control.

Tabel 2. Efectul administrării *ImunoBoost* în trei concentrații diferite asupra indexului de greutate a organelor (mg/g) la șoarece

Grup	Index timus	Index splina	Index ficat	Index rinichi stâng	Index rinichi drept
Control	1,0±0,6	3,0±0,4	44,0±2,5	4,7±0,5	5,4±1,0
Grup 1 (50 mg/Kg corp)	1,4±0,5	3,7±0,4	51,7±4,6	5,7±0,6	5,4±1,1

Grup 2 (100 mg/Kg corp)	1,2±0,3	2,7±0,4	45,9±3	5,4±0,6	5,1±0,8
Grup 3 (200 mg/Kg corp)	1,2±0,3	3,1±0,5	45,4±0,9	4,9±0,4	4,8±0,3

După 21 zile de administrarea a produsului *ImunoBoost* se observă o creștere a numărului de leucocite comparativ cu lotul control. Creșterea numărului total de leucocite (WBC) poate indica un *efect stimulator asupra celulelor stem hematopoietice*.

Evaluarea prin imunofenotiparea populațiilor și subpopulațiilor limfocitare în splina la șoarecii care au primit *ImunoBoost* nu a evidențiat modificări ale procentului de limfocite T (LyCD3+), limfocite T citotoxice/supresor (CD3+CD8+), limfocite T helper (CD3+CD4+), limfocite B (CD3-CD19+) și celule NK (CD3-NK1.1.+). De asemenea, nu exista diferențe față de grupul control în ceea ce privește raportul Th/Ts.

Tabel 3. Efectul administrării *ImunoBoost* în trei concentrații diferite asupra populațiilor și subpopulațiilor limfocitare la șoarece

Grup	LyCD3+	CD3+CD8+	CD3+CD4+	CD3-CD19+	CD3-NK1.1.+	Th/Ts
Control	50,4±4,6	41,6±1,5	52,8±1,5	32,6±3,7	3,2±0,3	1,3±0,1
Grup 1	51,3±4,6	41,7±2,6	52,5±2,8	35,5±4,2	3,2±0,6	1,3±0,2
Grup 2	51,3±6,7	40,8±1,4	53,4±1,8	31,3±7,2	3,1±0,3	1,3±0,2
Grup 3	50,4±1,9	41,9±0,5	52,1±0,5	31,9±5,7	3,3±0,5	1,2±0,02

Stimularea celulelor imune in cultură pentru 24 h atât cu LPS, cât și cu con A a dus la creșterea activării acestora. Celulele imune provenite de la animalele care au primit doze mai mari de *ImunoBoost* au prezentat o creștere semnificativă a expresiei moleculei CD69, marker de activare timpurie exprimat pe limfocite (Tabel. 4-5).

Tabel 4. Efectul administrării *ImunoBoost* în trei concentrații diferite asupra expresiei moleculei CD69 pe suprafața limfocitelor la șoarece – stimulare cu LPS

Grup	LyCD3+CD69+		CD8+CD69+		CD3-CD19+CD69+		CD3-NK1.1.CD69+	
	medie±DS	*p	medie±DS	*p	medie±DS	*p	medie±DS	*p

Control	11,6±4,1		9,2±2,1		40,3±2,5		18±1,2	
Grup 1	12,2±2,5	0,8557	8±1,9	0,5048	35,9±6,3	0,3231	16,7±4,1	0,6296
Grup 2	28,9±5,2	0,0108	27±3,9	0,0021	48,8±4,3	0,0416	33,1±3,9	0,0031
Grup 3	29±4,5	0,0077	26,6±3,3	0,0015	44,9±4,9	0,224	31,3±4	0,0051

Tabel 4. Efectul administrării *ImunoBoost* în trei concentrații diferite asupra expresiei moleculei CD69 pe suprafața limfocitelor la șoarece – stimulare cu con A

Grup	LyCD3+CD69+		CD8+CD69+		CD3-CD19+CD69+		CD3-NK1.1.CD69+	
	medie±DS	*p	medie±DS	*p	medie±DS	*p	medie±DS	*p
Control	48,7±8,4		58,7±9,9		45,1±0,5		27±1,4	
Grup 1	50,5±3,2	0,7398	53,2±3,5	0,4197	47,3±5,7	0,5395	22,8±2,9	0,0895
Grup 2	67,6±10,1	0,066	70±0,7	0,1202	66,6±2,5	0,0001	38,2±9,8	0,1223
Grup 3	72,1±2,3	0,0094	74±1,1	0,0567	76,7±0,7	3,80E-07	29,36±4	0,383

Capacitatea de proliferare a limfocitelor B și T a fost evaluată prin modularea cu mitogeni, LPS și con A. În cazul cultivării splenocitelor în prezența LPS, creșterea semnificativă a capacității de proliferare se observă doar în cazul dozei mari de *ImunoBoost* comparativ cu grupul control (Tabel 10). La celelalte două grupuri capacitatea de proliferare a splenocitelor este similară cu cea a grupului control.

Tabel 6. Efectul administrării *ImunoBoost* în trei concentrații diferite asupra proliferării limfocitelor la șoarece – stimulare cu LPS

Grup	Cultură 48 h			Cultură 72 h		
	OD	*p	Index proliferare	OD	*p	Index proliferare
Control	0,12±0,016			0,113±0,004		

Grup 1	0,112±0,011	0,5109	0,93	0,108±0,003	0,1688	0,96
Grup 2	0,113±0,016	0,5826	0,94	0,110±0,004	0,3083	0,97
Grup 3	0,167±0,037	0,1112	1,39	0,155±0,023	0,037	1,36

Tabel 7. Efectul administrării *ImunoBoost* în trei concentrații diferite asupra proliferației limfocitelor la șoarece – stimulare cu con A

Grup	Cultură 48 h			Cultură 72 h		
	OD	*p	Index proliferare	OD	*p	Index proliferare
Control	0,153±0,016			0,139±0,01		
Grup 1	0,179±0,012	0,0842	1,17	0,225±0,066	0,0913	1,62
Grup 2	0,242±0,036	0,0178	1,58	0,209±0,044	0,0552	1,5
Grup 3	0,283±0,017	0,0006	1,85	0,269±0,049	0,0102	1,94

Stimularea proliferației limfocitelor prin modularea cu con A, a arătat că splenocitele izolate de la animalele care au primit *ImunoModulator* în doza de 200 mg/kg corp au proliferat aproape de 2 mai mult decât cele provenite de la lotul control (Tabel 7). Prin acest studiu fiind demonstrat faptul că produsul *ImunoModulator* poate **crește numărul de limfocite**, promovează **activarea și proliferarea limfocitelor**, având efectul imunomodulator dorit.

Problema pe care o rezolvă invenția este legată de stimularea naturală a sistemului imunitar, intensificarea răspunsul imun în cazul infecțiilor, la acțiunea radicalilor liberi, a toxinelor și a stresului, menținerea stării de homeostazie și accelerarea procesului de vindecare și recuperarea în cazul răcelilor, gripelor și infecțiilor tractului respirator, efectul imunomodulator fiind demonstrat *in vitro* unde a fost observată creșterea numărul de limfocite, promovarea activarea și proliferarea limfocitelor.

Surse bibliografice citate în descrierea invenției

- Agyei, Dominic, and Michael K. Danquah. 2012. "Rethinking Food-Derived Bioactive Peptides for Antimicrobial and Immunomodulatory Activities." *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.010>.
- Cornara, Laura, Marco Biagi, Jianbo Xiao, and Bruno Burlando. 2017. "Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products." *Frontiers in Pharmacology* 8 (JUN): 412. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00412>.
- Cova, José Angel. 2013. "Immunological Properties of Bee Products." In *Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees*, 9781461449:513–23. Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_38.
- El-Loly, M.M. 2007. "Bovine Milk Immunoglobulins in Relation to Human Health." *International Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3923/ijds.2007.183.195>.
- Godhia, Meena, and Neesah Patel. 2013. "Colostrum - Its Composition, Benefits As A Nutraceutical: A Review." *Current Research in Nutrition and Food Science Journal* 1 (1): 37–47. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.1.1.04>.
- Hartmann, Rainer, and Hans Meisel. 2007. "Food-Derived Peptides with Biological Activity: From Research to Food Applications." *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.013>.
- He, F, E Tuomola, H Arvilommi, and S Salminen. 2001. "Modulation of Human Humoral Immune Response through Orally Administered Bovine Colostrum." *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 31: 93–96. [https://doi.org/S0928-8244\(01\)00247-4](https://doi.org/S0928-8244(01)00247-4) [pii].
- K. Wolska, A. Gorska, K. Antosik, and K. Ługowska. 2019. "Immunomodulatory Effects of Propolis and Its Components on Basic Immune Cell Functions." *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 81 (4): 575–88. www.ijpsonline.com.
- Mine, Yoshinori. 2007. *Egg Bioscience and Biotechnology*. Edited by Yoshinori Mine. *Egg Bioscience and Biotechnology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley and Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470181249>.
- Pasupuleti, Visweswara Rao, Lakshmi Sammugam, Nagesvari Ramesh, and Siew Hua Gan. 2017. "Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits." <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>.

Playford, Raymond J, Christopher E Macdonald, and Wendy S Johnson. 2000. "Colostrum and Milk-Derived Peptide Growth Factors for the Treatment of Gastrointestinal Disorders." *The American Journal of Clinical Nutrition* 72 (1): 5–14. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.1.5>.

Wichers, Harry. 2009. "Immunomodulation by Food: Promising Concept for Mitigating Allergic Disease?" *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2838-1>.


Handwritten notes:
Lara
PS
My
Duy
Nastasic
Lela
Duy
Lara

REVENDICĂRI

1. Formula produsului **ImunoBoost** - supliment alimentar cu proprietăți imunomodulatoare, produs inovativ ce presupune utilizarea unor combinații optimizate între principii active de origine vegetală cu acțiune antioxidantă și de origine animală cu acțiune imunomodulatoare, formulate sub forma unui supliment alimentar tip pulbere buvabilă.

Produsul **ImunoBoost** – supliment alimentar cu principii active imunomodulatoare, propus spre brevetare, are următoarea compoziție:

Ingrediente/ doză: colagen bovin hidrolizat – 16,2 g; pulbere din gălbenuș de ou și zer de colostrum liofilizat - 10,2 g; extract total liofilizat din părți aeriene de Echinacea (Echinacea purpurea), cu 4 % echinacozide – 1 g; pulbere din extract din fructe de Afin (Vaccinium myrtillus), cu 40 % proantocianidine – 1 g; lăptișor de matcă – 0,2 g; agenți antiaglomeranti (stearat de magneziu/ E470b, dioxid de siliciu coloidal/ E551); îndulcitor (glicozide derivate din steviol/ E960); potențiator de aromă (aromă de portocale); conservant (sorbit de potasiu/ E202).


Nastasia Belc
18
