



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2019 00330**

(22) Data de depozit: **03/06/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/09/2020 BOPI nr. **9/2020**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
DIN BUCUREȘTI, BD.MĂRĂȘTI NR.59,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **VAMANU EMANUEL,
ALEEA VALEA CĂLUGĂREASCĂ NR.3,
BL.A 10, SC.D, ET.2, AP.53, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU IN VIVO DE DETERMINARE A EFECTULUI
PROTECTIV AL UNUI NUTRACEUTIC LA STRESUL
OXIDATIV**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de determinare in vivo a efectului protectiv a unui supliment funcțional sau medicament la stresul oxidativ. Metoda, conform invenției, constă în etapele de pregătire a tulpinii microbiene probiotice țintă - *S. cerevisiae*, obținerea biomasei viabile de drojdii, obținerea soluțiilor de generare a radicalilor liberi, efectuarea testului in vivo,

determinarea punctului critic reprezentând valoarea de echilibru a concentrației de radicali liberi peste care produsul testat nu are efect protectiv de păstrare a viabilității tulpinii testate.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



20
21

Procedeu *in vivo* de determinare a efectului protectiv al unui nutraceutic la stresul oxidativ

Cercetarea își propune stabilirea unei concentrații critice specifice fiecărui produs testat în prezența stresului oxidativ. Procedeu presupune utilizarea drojdiei probiotice *Saccharomyces boulardii* ca agent biologic *in vivo* de exprimare a rezistenței (sub forma unei concentrații critice) caracteristică produsului testat. Punctul (concentrația) critic reprezintă intersectarea liniei viabilității cu cea mortalității și exprimă o stare de echilibru sub care viabilitatea tulpinii testate este direct afectată de acțiunea oxidativă a peroxidului de hidrogen.

Generarea radicalilor liberi reprezintă un proces fiziologic normal, dar stresul oxidativ apare atunci când concentrația lor depășește posibilitățile fiziologice de neutralizare ale organismelor. Radicalii liberi acționează ca molecule semnalizatoare, îndeplinind o serie de funcții fiziologice esențiale. Creșterea proporției de radicali liberi generați acționează asupra membranelor celulare, prin inducerea peroxidării lipidelor, dar și asupra materialului genetic producând mutații [1].

Procedeu inovativ se referă la introducerea unui noi modalități practice de evaluare a potențialului antioxidant al unor produse biofarmaceutice. Este o modalitate utilă, ușor de aplicat la nivel de laborator, în faza de concepere și testare a unui produs. Astfel, domeniul de aplicare al invenției este cel biofarmaceutic, presupunând o evaluare *in vivo* a unui supliment funcțional sau medicament ce acționează profilactic împotriva acțiunii radicalilor liberi (boli degenerative).

Protocolul pornește de la metoda de testare a viabilității unor tulpini probiotice prezentate de Kos și colab., 2000 [2] și stabilirea ratei de supraviețuire la aplicarea unui stres oxidativ asupra unei tulpini de drojdie [3]. Stabilirea punctului critic, la aplicarea unui stres oxidativ, creează un model experimental de validare *in vivo*. Pentru obținerea acestui punct critic (concentrație) s-au utilizat cinci concentrații (0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.02 și 0.03%). Dacă testele de la care s-a pornit utilizau o singură concentrație (un dezavantaj), actualul protocol prezintă un comportament *in vivo* la aplicarea unor doze diferite ale stresului oxidativ.

Procedeu propus elimină utilizarea dozei unice și combină răspunsul microorganismului cu prezența unui protector (produs), ceea ce reprezintă o noutate. Aceasta rezolvă o problemă

Rector USAMVB,



Prof. Univ. Dr. Cimpeanu Sorin Mihai

Inventator,

Dr. Emanuel Vamanu

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <i>a 2019 00330</i>
Data depozit <i>03-06-2019</i>

tehnică limitativă a actualelor protocoale ce folosesc exclusiv doze unice de generare a stresului oxidativ. Procedul propus elimină o problemă majoră în caracterizarea biofarmaceutică, aceea a protecției antioxidante a unui produs în momentul utilizării *in vivo*. Astfel, se pot elimina o serie de etape de validare preclinică ale unui medicament, putând avea o imagine a eficacității și rolului unor produse noi cu rol profilactic. Utilizarea unui protocol bazat pe reacția unui organism eucariot (drojdie probiotică) determină aspectul protectiv al polifenolilor (cel mai frecvent nutraceutic) asupra toxicității induse prin aplicarea tratamentului cu peroxid de hidrogen. Chiar dacă procedul propus se bazează pe păstrarea viabilității, se poate determina și reacția altor mecanisme moleculare implicate în apărarea la prezența unor concentrații critice de radicali liberi. Astfel, acest procedu poate fi modelat, în funcție de scopul cercetărilor efectuate. De exemplu, procedul experimental bazat pe drojzii poate fi utilizat la testarea protecției oferite de polifenoli în neurodegenerescentă.

Soluția tehnică propusă prin acest procedu presupune activități uzuale de laborator și permite o cultivare în condiții de laborator. Nu implică materii prime dăunătoare pentru mediu și crește gradul de valorificare a unor molecule valoroase, provenite din surse naturale. De asemenea, poate fi adaptat la diferite tulpini probiotice (specii diferite de bacterii și/sau drojzii), în scopul determinării unui tipar microbial al răspunsului biologic exercitat *in vivo*. Acest aspect constituie un avantaj prin creșterea gradului de valorificare *in vivo* a unor molecule bioactive.

Etapele realizării procedului *in vivo* au următoarea succesiune, ce a plecat de la datele publicate de Andrade și colab., 2011. Calcularea raportului de viabilitate (punctul critic) s-a realizat pe baza cercetărilor lui Kos și colab., 2012, și a brevetului 127731/2018:

1. **Pregătirea tulpinii microbiene probiotice țintă – *S. cerevisiae*.** Tulpina este păstrată în glicerol 20% la -80°C . În condiții sterile, se realizează un inocul 1, pe mediu YPG lichid, pentru revitalizarea culturii de drojzii. Într-un vas Erlenmeyer (100 mL), se prepară 70 mL YPG. Se sterilizează la 115°C , timp de 20 de minute, în autoclav. După răcire, se inoculează (în raport de 1%, v/v) cu inocul 1 și se introduce într-un agitator cu răcire. Se păstrează 24 – 48 de ore, la 30°C , 150 rpm, pentru obținerea inoculului 2. Acesta va fi utilizat la obținerea biomasei necesare testelor *in vivo*.



Rector USAMVB,

Prof. Univ. Dr. Cimpeanu Sorin Mihai

Inventator,
Conf. dr. Emanuel Vamanu

2. **Obținerea biomasei viabile de drojdii.** Biomasa se realizează în flacoane Erlenmeyer, 500 mL, cu 300 mL mediu YPG steril. Se inoculează cu 1% inocul 2 și se dezvoltă în condiții similare. La final, biomasa se separă prin centrifugare (4.000 rpm, 10 minute). Se spală de două ori cu NaCl 0.9% steril. La final, biomasa se reia în NaCl 0.9% steril, astfel încât densitatea optică la 600 nm să fie cuprinsă între 0.9 – 1.0.
3. **Obținerea soluțiilor de generare a radicalilor liberi.** Se realizează cinci concentrații de peroxid de hidrogen - 0.001, 0.005, 0.01, 0.2, 0.3%. Se pornește de la o soluție stoc de 3% H₂O₂. Soluția se diluează cu apă distilată sterilă.
4. **Efectuarea testului *in vivo*.** Amestecul de reacție se realizează într-un tub Eppendorf steril, volum 2 mL. Se adaugă: 0.4 mL cultură de *S. cerevisiae*, 0.4 mL extract și 0.8 mL H₂O₂, diferite concentrații. Amestecul se păstrează la temperatura camerei, cu agitare intermitentă, timp de o oră. La final, se realizează diluții succesive și se determină viabilitatea prin însămânțare pe mediu YPG agarizat, într-o placă Petri.
5. **Determinarea punctului critic.** Se calculează parametrii necesari pentru stabilirea punctului critic, care este definit ca fiind concentrația (exprimată ca și concentrație %) la care are loc intersecția curbei viabilității cu cea a mortalității. Punctul critic, reprezintă astfel valoarea de echilibru a concentrației de radicali liberi peste care produsul testat nu va putea exercita un efect protectiv de păstrare a viabilității unei tulpini testate.

V_t – viabilitatea totală - număr de celule în absența sursei de radicali liberi;

V_{p1...n} – viabilitatea parțială la concentrația 1...n - număr de celule la diferite concentrații de H₂O₂.

Se calculează după formula: $V_{1...n} = \frac{V_p}{V_t} \times 100$;

M_{1...n} – mortalitatea (%) la diferite concentrații de H₂O₂. Se calculează după formula: $M_{1...n} = 100 - V_{1...n}$;

P_c – punctul critic – reprezintă intersecția dintre linia viabilității cu cea a mortalității. Cu cât este mai redusă valoarea (%), cu atât potențialul antioxidant al unui produs (extract de exemplu) este mai ridicat.



Rector USAMVB,

Prof. Univ. Dr. Emanuel Vamanu Sorin Mihai

Inventator,

dr. Emanuel Vamanu

Experiment 1.

S-a utilizat un extract hidroalcoolic din ceai verde – măcinat fin (1% în etanol 50%), recunoscut pentru un nivel ridicat de protecție antioxidantă. Extractul are un nivel total de fenoli egal cu 162 $\mu\text{g/mL}$ echivalent acid galic și 4.75 $\mu\text{g/mL}$ echivalent quercitină, pentru cantitatea totală de flavonoide. Extractul testat are o activitate de inhibare a radicalului DPPH de aproximativ 81.53%. Punctul critic fiind calculat la o concentrație medie de 0.013% H_2O_2 .

Experiment 2.

S-a utilizat un extract hidroalcoolic din ceai verde – măcinat grosier (1% în etanol 50%), recunoscut pentru un nivel ridicat de protecție antioxidantă. Extractul are un nivel mediu de fenoli egal cu 100 $\mu\text{g/mL}$ echivalent acid galic și 4.6 $\mu\text{g/mL}$ echivalent quercitină, pentru cantitatea totală de flavonoide. Extractul testat are o activitate de inhibare a radicalului DPPH de aproximativ 87.3%. Punctul critic fiind calculat la o concentrație medie de 0.02% H_2O_2 .

Un astfel de procedeu nu este influențat de concentrația de solvent, etanolul 50%. Poate exista o influență a compoziției în compuși bioactivi ai substratului. Celulele eucariote sunt mai puțin sensibile, la aceste extracte. Pot exista rezultate alterate, în cazul utilizării bacteriilor, unde trebuie luat în considerare efectul asupra viabilității. Acest aspect poate fi considerat a fi un punct slab al metodei.

Procedeul propus spre brevetare are următoarele avantaje:

- Utilizează tulpini probiotice lipsite de patogenitate;
- Caracterizare *in vivo* în laborator a unui produs, fără a implica animale de laborator sau subiecți umani;
- Folosește celule eucariote, dar se poate adresa și unor tulpini procariote (de exemplu, bacterii lactice) pentru dezvoltarea de produse probiotice inovative;
- Inițierea unor studii interdisciplinare și multidisciplinare ce vizează microbiota umană în combaterea stresului oxidativ.



Rector USAMVB,

Prof. univ. dr. Cimpeanu Sorin Mihai

Inventator,

Conf. dr. Emanuel Vamanu

Revendicare:

Procedeu de testare *in vivo*, bazat pe determinarea viabilității asupra drojdiei *S. cerevisiae*, și care caracterizează capacitatea de protecție la acțiunea radicalilor liberi generați prin acțiunea peroxidului de hidrogen.

Procedeu, conform revendicării 1, se caracterizează prin pregătirea biomasei de *S. cerevisiae*. Aceasta este obținută în condiții sterile și păstrată în NaCl 0.9%. Se realizează cinci concentrații de peroxid de hidrogen - 0.001, 0.005, 0.01, 0.2, 0.3%. Se pornește de la o soluție stoc de 3% H₂O₂, iar diluțiile se realizează cu apă distilată sterilă. Amestecul de reacție se realizează într-un tub Eppendorf steril, volum 2 mL și se adaugă: 0.4 mL cultură de *S. cerevisiae*, 0.4 mL extract și 0.8 mL H₂O₂, diferite concentrații. Din amestecul păstrat la temperatura camerei, cu agitare intermitentă, timp de o oră se realizează diluții succesive și se determină viabilitatea prin însămânțare pe mediu agarizat. Revendicarea 2 constă în determinarea punctului critic, prin calcularea parametrilor necesari: V_t – viabilitatea totală - număr de celule în absența sursei de radicali liberi; V_{p1...n} – viabilitatea parțială la concentrația 1...n - număr de celule la diferite concentrații de H₂O₂. Se calculează după formula: $V_{1...n} = \frac{V_p}{V_t} \times 100$; M_{1...n} – mortalitatea (%) la diferite concentrații de H₂O₂. Se calculează după formula: $M_{1...n} = 100 - V_{1...n}$.



Rector USAMVB,

Prof. Univ. Dr. Cimpeanu Sorin Mihai


Inventator,
Conf. dr. Emanuel Vamanu