



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00552

(22) Data de depozit: 09/09/2022

(41) Data publicării cererii:
29/03/2024 BOPI nr. 3/2024

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
FIZICA MATERIALELOR-INCDFM
BUCUREȘTI, STR.ATOMIȘTILOR NR.405A,
MĂGURELE, IF, RO;
• INTELECTRO IAȘI S.R.L.,
STR.IANCU BACALU, NR.5, IAȘI, IS, RO

(72) Inventatori:
• BAIBARAC MIHAELA, ALEEA BARAJUL
DUNĂRII, NR.1, BL.M35, SC.5, ET.10,
AP.217, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• BURLANESCU TEODORA, STR.
FARULUI, NR.28, SECTOR 4, BUCUREȘTI,
B, RO;
• TRANDABĂȚ ALEXANDRU FLORENTIN,
BD. INDEPENDENȚEI, NR.11, BL.D1, SC.B,
ET.6, AP.16, IAȘI, IS, RO

(54) METODĂ DE EVALUARE A FOTODEGRADĂRII PROTEINELOR

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de evaluare a fotodegradării proteinelor prin fotoluminescență, albumina fiind una dintre proteinele cele mai importante care se află în sânge. Metoda conform invenției permite determinarea gradului de degradare al proteinei, funcție de timpul de expunere la lumina UV prin fotoluminescență, gradul de fotodegradare fiind calculat folosind valorile experimentale ale intensităților spectrelor de foto-

luminescență (PL) în starea inițială, adică înainte de expunerea la lumină UV și respectiv finală, adică după expunerea la lumina UV pentru o anumită perioadă de timp.

Revendicări: 1
Figuri: 2



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2022 ee 552
Data depozit 09-09-2022

RO 138059 A2

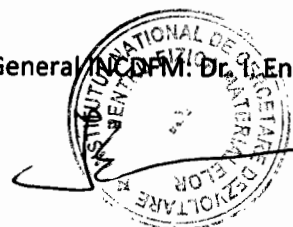
6

METODA DE EVALUARE A FOTODEGRADĂRII PROTEINELOR

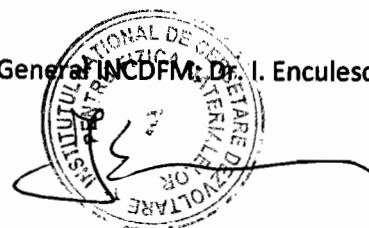
Invenția se referă la metoda de evaluare a fotodegradării proteinelor prin fotoluminescență.

Albumina este una dintre proteinele cele mai importante care se afla in sange. Principala functie fiziologica la care aceasta contribuie este presiunea osmotica a sangelui. Rolul cel mai important al albuminelor consta in legarea, transportul și livrarea unei varietăți de substanțe endogene și exogene. Legarea de albumina serică de aceste substanțe poate afecta proprietățile in vivo, ca de exemplu absorbția, metabolismul, stabilitate și toxicitate acestor substanțe [R.E. Olson, D.D.Chris, Annu. Rep. Med. Chem. 31 (1996) 327–337; S. Neelam, M.Gokara, B.Sudhamalla, D.G.Amooru, R.Subramanyam, J. Phys. Chem. B. 114 (2010) 3005]. Cconformația albuminei serice se modifica la leagă de aceste substanțe, iar schimbarea a fost raportata să afecteze structura secundară și terțiară a albuminelor [A.V.Solomonov, E.V.Rumyantsev, S.P.Ivanov, B.A.Kochergin, E.V.Antina, Protein J. 32 (2013) 343; A.R.Timerbaev, C.G.Hartinger, S.S.Aleksenko, Chem.Rev. 106 (2006) 2224]. Principalele metode folosite pentru caracterizarea albuminei au fost spectroscopie de infrarosu [Z. Guleken, B. Unubol, R. bilici, D. Sanbal, S. Toraman, O. Gunduz, S.E. Kuruca, J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 190, 113553, 2020], spectroscopie de fotoelectroni de raze X [L. Zhou, K. Wang, Z. Wu, H. Dong, H. Sun, X. Cheng, H. I. Zhang, H. Zhou, C. Jia, Q. Jin, H. Mao, J.L. Coll, J. Zhao, Langmuir 32, 12623-12631, 2016], fotoluminescenta [K.C. Tseng, L.K. Chu, J. Appl. Phys. 125, 084701, 2019], spectroscopie Raman exaltata prin plasmoni de suprafata [GP Szekeres, M Montes-Bayon, J Bettmer, J Kneipp, Analytical Chem. 92, 8553-8560, 2020], etc. In scopul de a intelege mai bine originea fotoluminescentei albuminei serice (bovine serum albumine-BSA) trebuie precizat ca aceasta contine doi triptofani și douăzeci de tirozine, avand fluorescența situata in domeniul spectral 300-450 nm, originea acesteia fiind atribuita triptofanului la excitația ultravioletă [K. A. Majorek, P. J. Porebski, A. Dayal, M. D. Zimmerman, K. Jablonska, A. J. Stewart, M. Chruszcz, and W. Minor, Mol. Immunol. 52, 174 (2012); I. Dragan and C. D. Geddes, J. Appl. Phys. 108, 094701 (2010)]. Importanta intelegerii modificarilor induse BSA functie de temperatura, conditii de conservare si manipulare joaca un rol deosebit de important.

Dezavantajul metodelor de analiză, cum ar fi spectroscopia de fotoelectroni de raze X, spectroscopia FTIR si spectroscopia Raman este ca ele nu pot oferi informații in timp real despre fotodegradarea BSA.



Conform invenției, fotoluminescența poate fi o metoda care sa permita monitorizarea fotodegradării BSA in prezenta luminii UV. În continuare se prezintă un exemplu de realizare a invenției. În vederea ilustrării fotodegradării BSA, va fi prezentata dependenta intensitatii spectrelor de fotoluminescența cu timpul de expunere la lumina UV. In vederea ilustrării procesului de fotodegradare prin fotoluminescența a fost utilizat un spectrofotometrul Fluorolog 3.2.2.1 în geometria „right angle”. Expunerea la lumina UV a fost efectuată utilizând o lampa cu Xe având puterea de 450W. Înregistrarea succesivă a spectrelor de fotoluminescență (PL) ale BSA a fost efectuată la lungimea de undă de excitare de 275 nm și timpul total de expunere la lumina UV a fost de 217 min.. Figura 1 ilustreaza spectrele de PL ale BSA, care prezinta o banda de emisie cu maximul la 350 nm, avand intensitatea egala cu 1.79×10^5 counts/sec, inainte de expunerea la lumina UV. O scadere graduala a intensitatii spectrelor de PL ale BSA, mai importanta, este remarcata in primele 102 min, cand intensitatea benzii de PL devine egala cu 8.88×10^4 counts/sec. In intervalul de timp 102 min. – 217 min., se observa ca pe masura ce timpul de expunere la lumina UV creste, intensitatea spectrelor de PL variaza de la 8.88×10^4 counts/sec la $\sim 7.32 \times 10^4$ counts/sec. Figura 2 ilustreaza ca in intervalul 0-102 min. are loc o scdere a intensitatii spectrelor de PL ale BSA de tip exponential in timp ce in intervalul 102-217 min, scaderea intensitatii spectrelor de PL ale BSA este una de tip liniar. Gradul de degradare al BSA poate fi calculat utilizând următoarea formulă: $D(\%) = [(I_0 - I_f)/I_0] \times 100$ (1), unde I_0 și I_f corespund intensității spectrului de PL al probei înainte de expunere la lumina UV și respectiv intensității spectrului de PL al probei după expunerea la lumina UV când nu mai apar variații de intensitate. Conform formulei (1), gradul de degradare al BSA prin expunere la lumina UV este in primele 102 min. este de ~ 50.4 %. In intervalul 102-217 min, gradul de degradare al BSA prin expunere la lumina UV este in primele 102 min. este de $\sim 17.6\%$. Folosind aceste dependente, in cazul a doua esantioane de BSA stocate la lumina UV timp de 65 min. si respectiv 152 min., spectrele de PL au evidentiat intensitati de cca. 1.027×10^5 counts/sec si respectiv de 8.167×10^4 counts/sec. Aceste valori sunt apropiate de cele prezentate in Figura 2, variatiile fiind de 0.68% si respectiv 1.43%. Metoda de evaluare a fotodegradării BSA conform invenției prezintă următoarele avantaje: i) trasarea curbei de calibrarea folosind spectrofotometrele de fluorescența nu necesita o sursa de lumina UV suplimentara; si ii) metoda permite evaluarea gradului de fotodegradare al BSA, putand fi adaptata si in cazul altor proteine.



4

METODA DE EVALUARE A FOTODEGRADARII PROTEINELOR**RE V E N D I C A R E**

1. Invenția se referă la metoda de evaluarea fotodegradării proteinelor, aceasta fiind caracterizată prin aceea că permite determinarea gradului de degradare al proteinei, funcție de timpul de expunere la lumina UV, prin fotoluminescența, gradul de fotodegradare fiind calculat folosind valorile experimentale ale intensităților spectrelor de fotoluminescența (PL) în starea inițială, adică înainte de expunerea la lumina UV și respectiv finală, adică după expunerea la lumina UV pentru o anumită perioadă de timp.



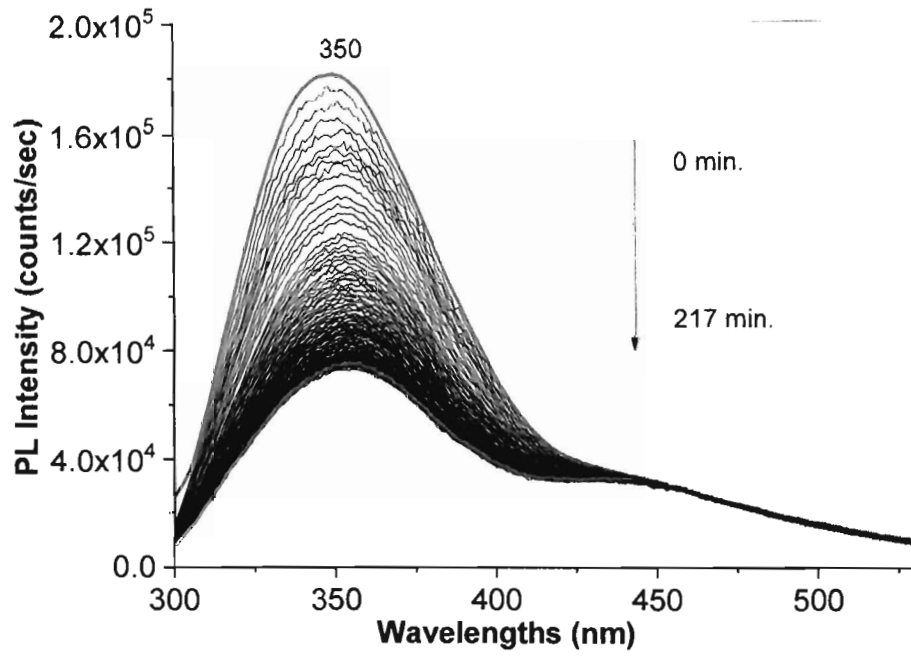
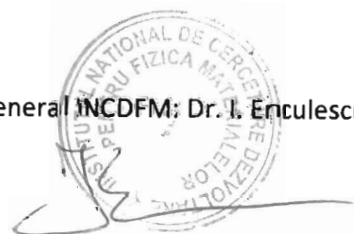


Figura 1. Evolutia intensitatii spectrelor de fotoluminescenta ale BSA functie de timpul de expunere la lumina UV.



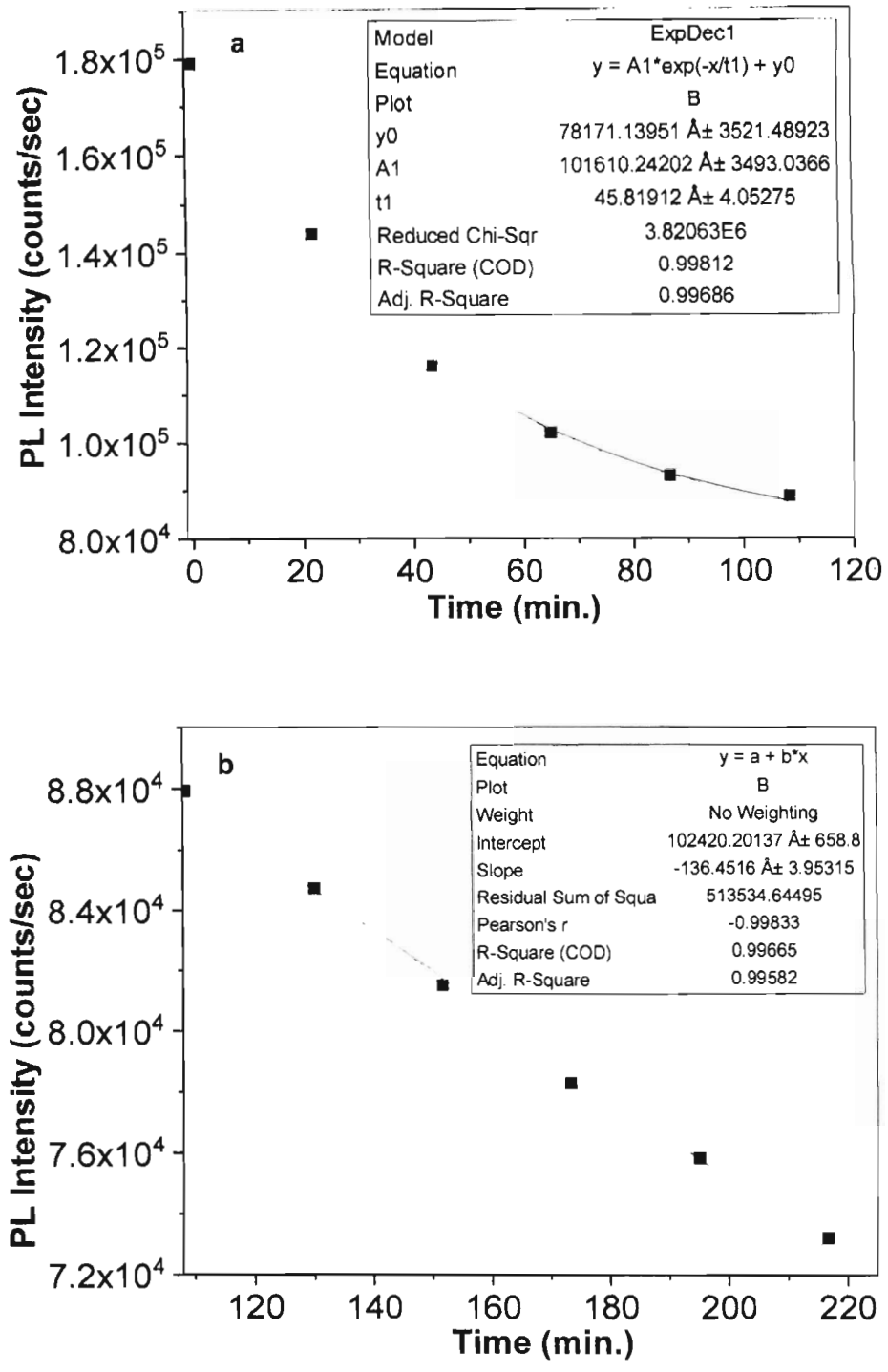


Figura 2. Dependenta intensitatii spectrelor de PL ale BSA cu timpul de expunere la lumina UV

