



MD 83 Z 2009.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **83** ⁽¹³⁾ **Z**
(51) Int. Cl.: **A61K 36/28** (2006.01)
A01H 4/00 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)
A01N 27/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

(21) Nr. depozit: s 2009 0035 (22) Data depozit: 2009.03.26	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2009.09.30, BOPI nr. 9/2009
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: CALALB Tatiana, MD; JACOTĂ Anatol, MD; BUJOREANU Nicolae, MD; CHIRILOVA Eleonora, MD; BEJAN Nina, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Biomasă de fructe de *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, obținută *in vitro*, pentru utilizare în calitate de produs cu proprietăți antimicrobiene**

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la o sursă de materie primă vegetală cu proprietăți antimicrobiene, care poate fi utilizată în medicină.

Esența invenției constă în aceea că biomasa de fructe de *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, obținută *in vitro*, se propune pentru utilizare în calitate de produs cu proprietăți antimicrobiene.

2
5 Rezultatul invenției constă în aceea că biomasa de fructe de aronia posedă un spectru bacteriostatic și bactericid mai larg față de fructele de aronia.
Revendicări: 1

10

MD 83 Z 2009.09.30

Descriere:

Invenția se referă la o sursă de materie primă vegetală cu proprietăți antimicrobiene, care poate fi utilizată în medicină.

În ultimul timp tot mai frecvent se întâlnesc tulpini ale microorganismelor cu rezistență sporită la acțiunea antibioticelor. Elaborarea noilor remedii antimicrobiene de origine vegetală, bogate în conținut fenolic, cunoscute ca substanțe naturale cu diferite efecte terapeutice, inclusiv antibacteriene și bacteriostatice, reprezintă una din direcțiile prioritare în cercetare. În acest context, un interes deosebit reprezintă fructele de *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, extractul cărora se caracterizează prin diferite clase de compuși fenolici și manifestă sensibilitate față de microorganismele *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* [1], dar nu și față de alte microorganisme virulente. Fructele de aronie manifestă o acțiune antimicrobiană la un spectru redus de microorganisme, iar obținerea fructelor *in vivo* este dependentă de condițiile pedo-climaterice, cataclismele naturale, rotația sezonieră, consecințele crizei ecologice – acestea reprezentând dezavantaje esențiale.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în extinderea asortimentului de materie primă cu proprietăți antimicrobiene, obținută în condiții *in vitro*.

Esența invenției constă în aceea că biomasa de fructe de *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, obținută *in vitro*, se propune pentru utilizare în calitate de produs cu proprietăți antimicrobiene.

Rezultatul invenției constă în aceea că biomasa de fructe de aronia posedă un spectru bacteriostatic și bactericid mai larg față de fructele de aronia.

Exemplu de realizare a invenției

Biomasa de fructe de *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot a fost obținută din explante *in vitro*, prelevate de la fructele de aronie, ulterior sterilizate cu agent chimic Diacid timp de 7 min și spălate de 3 ori cu apă bidistilată sterilă. Explantele au fost inoculate pe mediu nutritiv Murashige-Skoog suplimentat cu reglatori de creștere: acid naftilacetic 3,0...3,5 mg/L; kinetina 0,5 mg/L; zaharoză 60 g/L, având pH 5,7; cultivată la temperatura de 18...22°C, cu fotoperioada zi-noapte respectiv de 16 și 8 ore și în condiții aseptice.

Pentru determinarea activității antimicrobiene au fost pregătite extractele etanolice din fructele de aronie și biomasa de fructe obținute *in vitro* de *A. melanocarpa*. Probele de analizat (fructe de aronie și respectiv biomasa de fructe *in vitro*) în cantitate de 20 mg, mărunțite în mojar și 80 mg de alcool etilic de 20% (raportul 1:5) au fost lăsate pentru extracție timp de 10 zile, la temperatura de 4°C, la întuneric. Extractele etanolice de 20% din fructe și din biomasa de fructe obținute *in vitro* au servit pentru studiul activității antimicrobiene.

Acțiunea antimicrobiană a conținutului fenolic din extractele etanolice de 20% ale biomasei de fructe obținute *in vitro* și a fructelor de aronie a fost determinată prin activitatea bacteriostatică (concentrația minimă de inhibiție – CMI), stabilită în cazul lipsei creșterii microorganismelor în mediul nutritiv lichid și cea bactericidă (concentrația minimă bactericidă – CMB) în baza lipsei creșterii microorganismelor după însămânțarea repetată pe geloză peptonată cu termostatarea ulterioară timp de 24 ore. În calitate de culturi de referință au servit: *Staphylococcus aureus* (tulpina 209-P), *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* (tulpina ATCC 25822), *Pseudomonas aeruginosa* (tulpina ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (tulpina MX 19222).

O parte din culturile de referință *S. aureus* (tulpina 209-P), *E. faecalis*, *E. coli* (tulpina ATCC 25822), *P. aeruginosa* (tulpina ATCC 27853), *P. vulgaris* (tulpina MX 19222), crescute pe geloză timp de 18 ore, spălate cu soluție izotonică de clorură de sodiu a fost însămânțată în doză de 500 mii de corpi microbieni la 1 ml de mediu nutritiv (după standardul optic de turbiditate) cu adaos de extract etanolic de 20% din biomasa de fructe de *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, obținută *in vitro*.

Altă parte din aceleași culturi de referință a fost însămânțată în doză de 500 mii de corpi microbieni la 1 ml de mediu nutritiv (după standardul optic de turbiditate) cu adaos de extract etanolic de 20% din biomasa de fructe de *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot. În calitate de test-control au servit mediile nutritive cu aceleași tulpini de bacterii de referință fără conținutul extractelor analizate.

Toate experiențele au fost efectuate în trei repetări paralele.

S-a studiat conținutul fenolic al principalelor grupe de compuși fenolici, care și determină activitatea antimicrobiană, iar rezultatele sunt prezentate în tab. 1.

MD 83 Z 2009.09.30

4

Tabelul 1

Conținutul compușilor fenolici în fructe și biomaselor de fructe
obținute *in vitro* și de la fructele de aronie *in vivo*

Lotul analizat	Conținutul totalului polifenolic (mg/kg ⁻¹)	Flavonoide (g % în rutozidă)	Antociani (mg/100g fructe)	Compuși fenilpropanici de tip C ₆ -C ₃ (mg/ml)
Fructele de aronie	58 370	0,478	821	0,178
Biomasa de fructe de <i>Aronia melanocarpa</i> (Michx.) Elliot obținută <i>in vitro</i>	65 570	0,483	680	0,375

5

În urma studierii activității antimicrobiene a extractelor etanolice de 20% a loturilor analizate s-a determinat că biomaselor de fructe obținute *in vitro* de aronie posedă acțiune bacteriostatică și bactericidă față de microorganismele *S. aureus* (tulpina 209-P), *E. faecalis*, *E. coli* (tulpina ATCC 25822), *P. aeruginosa* (tulpina ATCC 27853), *P. vulgaris* (tulpina MX 19222), pe când fructele de aronie doar față de *S. aureus* (tulpina 209-P), *E. faecalis*, *E. coli* (tulpina ATCC 25822). Intensitatea activității antimicrobiene a extractelor analizate corelează cu conținutul fenolic (tabelul 1).

10

Biomasa de fructe obținute *in vitro* se caracterizează printr-un conținut mai mare de polifenoli, flavonoide și compuși fenilpropanici decât fructele de aronie și posedă o activitate antimicrobiană mai mare cu un spectru mai larg bacteriostatic și bactericid (tab. 2).

15

Tabelul 2

Activitatea bacteriostatică și bactericidă a extractelor etanolice din
biomaselor de fructe obținute *in vitro* și fructele de aronie obținute *in vivo*

Extract alcoolic de 20% analizat	Culturile de referință									
	<i>S. aureus</i> (t. 209-P)		<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i> (t. ATCC 25822)		<i>P. aeruginosa</i> (t. ATCC 27853)		<i>P. vulgaris</i> (t. MX 19222)	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Fructe de aronie obținute <i>in vivo</i>	1:2	1:2	1:2	1:1	1:2	1:1	-	-	-	-
Biomasa de fructe obținute <i>in vitro</i>	1:4	1:4	1:2	1:2	1:2	1:2	14	1:4	1:2	1:2
Alcool etilic de 20%, control	1:1	1:1	1:1	1:1	1:2	1:1	1:4	1:1	1:1	1:1

20

Legendă: CMI - concentrația minimă de inhibiție; CMB - concentrația minimă bactericidă.

MD 83 Z 2009.09.30

5

(57) Revendicări:

Biomasă de fructe de *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, obținută *in vitro*, pentru utilizare în calitate de produs cu proprietăți antimicrobiene.

5

(56) Referințe bibliografice:

1. Valcheva-Kuzmanova S., Russev V., Bojkova K., Belcheva A. Study of natural *Aronia Melanocarpa* fruit juice for antibacterial and antiviral activity. Scr. Sci. Med. 2003, vol. 35, p. 21-23

Șef Secție:

COLESNIC Inesa

Examinator:

GORDIENCO Maria

Redactor:

CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

pentru cerere de brevet de invenție de scurtă durată conform art.52(2) a Legii nr. 50/2008

(21) Nr. depozit: s 2009 0035	(85) Data fazei naționale PCT:	
(22) Data depozit: 2009.03.26	(86) Cerere internațională PCT:	
Prioritatea invocată: (31) nr.: 32) data: 33) țara: (51) IPC: Int. Cl.: A61K 36/28 (2006.01) A01H 4/00 (2006.01) C12N 5/04 (2006.01) A01N 27/00 (2006.01) Alți indici de clasificare: Titlul: Utilizarea biomasei de fructe de Aronia melanocarpa (Michx.) Elliot, obținută in vitro, in calitate de produs cu acțiune antimicrobiene (71) Solicitantul: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD		
I. Condiția de unitate a invenției ☒ X satisface ☐ nu satisface. Notă:		
II. Minimul de documente consultate: MD, EA		
III. Domeniul de documentare: a) Indicii IPC (ultima redacție): A01H 4/00; C12N 5/04; C07H 63/36; A61K 36/28 b) Termeni caracteristici, cuvinte-cheie, sinonime: - biomasa de fructe; obținere <i>in vitro</i> ; activitatea antimicrobiană; - fruit biomass; obtaining <i>in vitro</i> ; antimicrobial characteristics		
IV. Documente considerate a fi relevante		
Categoria	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Relevant față de revendicarea nr.
A	MD 3763 B1 2009.03.31	1
A	a 2009 0042 hot. nr. 6024 din 2009.05.13	1
A	Valcheva-Kuzmanova S., Russev V., Bojkova K., Belcheva A. Study of natural Aronia Melanocarpa fruit juice for antibacterial and antiviral activity. Scr. Sci. Med. 2003, vol. 35, p. 21-23	1
A	(Hot.6024 din 2009.05.13) MD 46Y 2009.07.31	1
Categorii de documente citate		
A - document care definește stadiul anterior în general		O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere etc.
X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă		P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria care fundamentează invenția
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după această dată		D - Document menționat în descrierea cererii de brevet
Data finalizării documentării		2009.07.14
Examinatorul		GORDIENCO Maria