



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00767**

(22) Data de depozit: **09/12/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2023 BOPI nr. **6/2023**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CONSTANTINESCU-ARUXANDEI DIANA,
ȘOS.MIHAI BRAVU NR.297, BL.15A, SC.A,
AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **TRITEAN NAOMI,
STR. PERFECȚIONĂRII, NR.11, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DIMITRIU LUMINIȚA, ALEEA BARAJULUI
BICAZ, NR.9, BL.M31, SC.B, ET.2, AP.408,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DEȘLIU-AVRAM MĂLINA, STR. GÂRLENI
NR. 4, BL. C85, SC. A, ET. 6, AP. 40,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DIMA ȘTEFAN-OVIDIU, STR. ODOBEȘTI
NR. 5B-5C, BL. M7-M7B, SC. B, ET. 6,
AP. 72, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **TUDOR IOANA, ALEEA ILIOARA, NR.2,
BL.PM30A, SC.B, ET.3, AP.50, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **HOSU IOANA SILVIA, STR. SALCIILOR
NR. 4, ÎNTORSURA BUZĂULUI, CV, RO**

(54) **COMPOZIȚIE PENTRU COMBATAREA BIOFILMULUI
DISBIOTIC ȘI A INFLAMAȚIEI ASOCIATE ACESTUIA
ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A RESPECTIVEI COMPOZIȚII**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei compoziții pentru combaterea biofilmului disbiotic și a inflamației asociate. Procedeul, conform invenției, constă în etapele: extracție hidrolitică asistată de ultrasunete a materialului vegetal bogat în siliciu, pleavă de orez, adăugare de infuzie de ceai verde, zaharuri fermentescibile și polen colectat de albine, inoculare aseptice cu o colonie simbiotică de drojdii și bacterii cu incubare la temperatura camerei, timp de 8...10 zile, separare a materialului vegetal nereacționat, a grăuncioarelor de polen, respectiv, nanoparticule de silice, recu-

perare permeat bogat în polifenoli utilizat pentru producerea de chitosan grefat cu polifenoli și de nanoparticule amorfe de seleniu, separarea acestora cu adăugarea nanoparticulelor de silice și introducerea suspensiei de nanoparticule de silice-nanoparticule de seleniu-chitosan fungal grefat cu polifenoli în interiorul grăuncioarelor de polen și dispesarea acestora în hidrogel de nanoceluloză.

Revendicări: 3



COMPOZIȚIE PENTRU COMBATAREA BIOFILMULUI DISBIOTIC ȘI A INFLAMAȚIEI ASOCIATE ACESTUIA ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A RESPECTIVEI COMPOZIȚII

Prezenta invenție se referă la o compoziție pentru combaterea biofilmului disbiotic și a inflamației asociate acestui tip de biofilm disbiotic. Compoziția este pe bază de nanoparticule de siliciu și nanoparticule de seleniu încapsulate împreună în grăuncioare de polen, iar cererea de brevet se referă și la un procedeu de obținere a acestei compoziții pentru combaterea biofilmului disbiotic și a inflamației asociate.

Sunt cunoscute compoziții pe bază de nanoparticule de silice și/sau seleniu care au efecte de combatere a biofilmului disbiotic și/sau inflamației. Pe mucoasele din diferite organe umane expuse mediului extern, ca de ex. cavitatea orală, intestinul gros și subțire, cavitatea vaginală, se formează biofilme microbiene. Aceste biofilme microbiene sunt, în condiții normale, biofilme comensale / simbiotice, cu rol în menținerea stării de sănătate a organelor / țesuturilor pe care se formează, din cavitatea orală (Radaic & Kapila, 2021), din intestine (Deng et al., 2020) sau din cavitatea vaginală (Tomas et al., 2020). Inflamația favorizează formarea unor biofilme disbiotice, iar biofilmele disbiotice exacerbează inflamația, determinând o serie de boli cum sunt paradontoza (Van Dyke et al., 2020), vaginita bacteriană (Verstraelen & Swidsinski, 2019) sau sindromul de intestin iritabil, boala inflamatorie intestinală sau cancerul colorectal (Dixit et al., 2021).

Seleniu, atât sub formă ionică, mai ales selenit și selenat, cât și sub formă de nanoparticule de seleniu zerovalent, s-a dovedit a avea un efect de tratare a biofilmelor disbiotice (Lin et al., 2021). Brevetul US 11076599 B2 exploatează această caracteristică a seleniului și revendică o acoperire anti-biofilm disbiotic, care include nanoparticule de seleniu (ca și nanoparticule de alt calcogenid, telurii, și nanoparticule mixte de seleniu și telurii), cărora li se formează o coroană de chitosan. Dezavantajul acestei soluții tehnice este că acționează doar preventiv, nu și curativ.

Speciile de siliciu solubile au efecte anti-inflamatorii și de reparare celulară (Lee et al., 2019) și au un potențial ridicat de limitare a inflamației care facilitează formarea biofilmelor disbiotice. Întrucât speciile solubile de siliciu policondensează spontan la concentrații de peste 1,7 mM, au fost propuse o serie de nanostructuri silicoase ca sursă de specii solubile de siliciu. Una dintre sursele de siliciu solubil sunt nanoparticulele de silice (Quignard et al., 2017). Brevetul EP3105281 (B1) descrie o compoziție pe bază de polimeri de acid silicic și nanosilicați ca sursă de specii solubile de silicon destinate susținerii proceselor anti-inflamatorii și de reparare celulară.

Dezavantajul acestor soluții este dat de faptul că nanostructurile silicioase au un efect pro-inflamator marcant, chiar și atunci când sunt amorfe (Sharma & Jha, 2020).

Nanoparticulele produse prin (bio)sinteză în medii biologice au avantajul de a-și forma o coroană cu stabilitate mai ridicată încă din faza de (bio)sinteză. Această coroană formată încă din faza de (bio)sinteză amplifică proprietățile nanoparticulelor. De exemplu, particulele de nanoseleniu biosintetizate de bacteriile gram-negative *Stenotrophomonas maltophilia* [Sm-SeNPs⁽⁻⁾] și de bacteriile gram-pozitive *Bacillus mycoides* [Bm-SeNPs⁽⁺⁾] au efecte anti-microbiene superioare celor sintetizate chimic (Cremonini et al., 2016). Un avantaj suplimentar al procedeelor de (bio)sinteză în medii biologice a nanoparticulelor este că acestea sunt procedee "verzi", care nu implică temperaturi ridicate sau pH extrem.

În cazul suspensiilor de nanoparticule de seleniu asociate cu cele de siliciu, stabilitatea este însă afectată de caracterul diferit al celor două tipuri de nanoparticule, puternic hidrofob al celor de nano-seleniu zerovalent și puternic hidrofil al celor de silice (hidratată). Utilizarea surfactanților determină schimbarea compoziției biocoroanei (Müller et al., 2018), deci compatibilizarea celor două tipuri de nanoparticule, hidrofobe și hidrofile, ar trebui să se realizeze prin utilizarea unui component care să fie compatibil cu biocoroana celor două tipuri de nanoparticule.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o compoziție pe bază de nanoparticule de silice și nanoparticule de seleniu, încapsulate împreună, din care să se elibereze treptat specii solubile bioactive de siliciu și seleniu, care să acționeze curativ împotriva biofilmelor disbiotice, limitând atât inflamația, cât și proliferarea microorganismelor disbiotice.

Compoziția conform invenției este alcătuită din 0,52 grame nanoparticule de seleniu și 1,34 grame de nanoparticule de silice, stabilizate împreună cu 2,5 grame de chitosan fungal grefat cu polifenoli, încapsulate în 50 grame grăuncioare de polen, golite de conținut, care sunt dispersate în 950 ml de hidrogel de nanoceluloză bacteriană 0,4%.

Nanoparticulele de seleniu sunt obținute prin reducerea selenitului de sodiu de către polifenolii eliberați din grăuncioare de polen, din ceai verde și din pleavă de orez.

Nanoparticulele de silice sunt obținute prin eliberare din structurile biogene de tip opal sub acțiunea combinată a enzimelor hidrolitice și a unui consorțiu de bacterii și drojdii SCOBY și recuperare prin ultrafiltrare din mediul de fermentare.

Chitosanul grefat cu polifenoli este chitosan fungal cu masa moleculară cuprinsă între 240 și 260 kDa și cu un grad de deacetilare de 85-88%, pe care s-au grefat polifenolii eliberați din grăuncioare de polen, din ceai verde și din pleavă de orez.

Grăuncioarele de polen sunt golite de conținut în urma fermentării lor împreună cu un consorțiu de bacterii și drojdii – SCOBY și sunt recuperate prin filtrare din mediul de fermentare.

Hidrogelul de nanoceluloza bacteriană este obținut din membranele formate de un consorțiu de bacterii și drojdii – SCOBY, prin fibrilare repetată pe moară coloidală și pe microfluidizator.

Procedeul conform invenției constă în următoarele etape:

- ✓ Extracția hidrolitică asistată de ultrasunete a materialului vegetal bogat în siliciu, pleavă de orez, prin tratare timp de 12 ore a 100 grame pleavă cu 1000 ml apă, conținând un complex de hidrolaze microbiene, 75 unități beta-glucanazice, 320 unități endo-chitinazice și 100 unități beta-glucozidazice, la pH 5, temperatura de 50°C, cu ultrasonicare intermitentă, 5 min la fiecare 30 min, la 20 kHz și cu o putere de 400 W, urmată de inactivarea finală a enzimelor și sterilizare prin autoclavare la 121°C timp de 20 min;
- ✓ Adăugarea peste materialul vegetal hidrolizat a 1500 ml infuzie de ceai verde, obținută prin extragere timp de 10 min a 50 g de frunze de ceai în 1000 ml de apă fierbinte, de 90-95°C, în raport de 1 parte material vegetal inițial la 5 părți infuzie de ceai verde;
- ✓ Adăugarea unei soluții de 25-30% zaharuri fermentescibile, peste materialul vegetal cu infuzie de ceai verde, până la atingerea unei concentrații finale de 5-7% zaharuri reducătoare fermentescibile;
- ✓ Adăugarea a 50 grame polen colectat de albine la fiecare 1000 ml de amestec material vegetal bogat în siliciu, infuzie de ceai verde, zaharuri fermentescibile;
- ✓ Inocularea aseptică cu o colonie simbiotică de drojdii și bacterii, SCOBY, și incubarea la temperatura camerei, în condiții de microaerofilie, timp de 8-10 zile;
- ✓ Recuperarea membranelor de celuloză și fibrilare repetată prin măcinare umedă de 25 ori la moară coloidală, la 16 bari presiune și microfluidizare repetată de 10 ori, la 2000 bari printr-o cameră diamantată în formă de Z;
- ✓ Separarea prin sitare a materialul vegetal pleavă de orez nereacționat și separarea prin filtrare pe filtru micrometric a grăuncioarelor de polen golite de conținut în timpul procesului de fermentare împreună cu un consorțiu de drojdii și bacterii – SCOBY;

- ✓ Separarea prin ultrafiltrare pe membrană cu pragul de excludere de 250 kDa a nanoparticule de silice, folosind un debit de 25 ml/min;
- ✓ Recuperarea permeatului bogat în polifenoli și utilizare pentru producerea de chitosan grefat cu polifenoli, prin introducerea unei soluții 1% de chitosan fungal activat prin adăugarea lentă a 0,6 ml de apă oxigenată și 0,4 grame de acid ascorbic la fiecare 100 ml soluție de chitosan, în raport de 1,5 ml soluție chitosan activat la 20 ml permeat.
- ✓ Utilizarea suspensiei rezultate pentru producerea de nanoparticule amorfe de seleniu, prin adăugarea de 5 ml selenit de sodiu soluție 1% la 100 ml suspensie, pentru a asigura reducerea bioasistată de către polifenoli și acidul ascorbic.
- ✓ Separarea nanoparticulelor de seleniu și a chitosanului grefat prin ultrafiltrare tangențială pe membrană de 100 kDa;
- ✓ Adăugarea nanoparticulelor de silice peste retentatul care conține nanoparticule de seleniu, dispersarea lor prin omogenizare pentru a facilita stabilizarea de către chitosanul grefat cu polifenoli și introducerea suspensiei nanoparticule de silice – nanoparticule de seleniu – chitosan grefat cu polifenoli în interiorul grăuncioarelor de polen prin filtrare sub vid, la 150-200 mbari;
- ✓ Dispersarea grăuncioarelor de polen în hidrogelul de nanoceluloză prin ultrasonicare în flux, la 20 kHz și cu o putere de 400 W.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Fragilizează structurile parietale din pleava de orez supusă procesării și eliberează nanoparticule de biosiliciu din respectivele structuri, sub acțiunea combinată a enzimelor hidrolitice și a acizilor organici produși de microorganisme SCOBY
- Combină sinergic polifenoli obținuți din pleavă de orez, ceai verde și polen colectat de albine într-o compoziție complexă care este grefată pe chitosan și reduce selenitul la nanoparticule de seleniu
- Compatibilizează nanoparticulele hidrofile de siliciu și pe cele hidrofobe de seleniu prin utilizarea chitosanului a cărei amfifilicitate a fost amplificată prin grefare cu polifenoli
- Realizează o structură din care speciile solubile de seleniu și siliciu solubile se eliberează treptat și care previne contactul direct al nanoparticulelor cu celulele.

În continuare se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără a limita domeniul ei de aplicare.

Exemplu 1. O cantitate de 100 grame de pleavă de cântărită se trece într-un balon cu trei găuri de 2 litri, prevăzut cu agitare mecanică, sistem de termostatare și

un sistem de recirculare cu o celulă de flux FC100L1-1S (Hielscher Ultrasonics, Teltow, Germania), împreună cu 1000 ml soluție de enzime hidrolitice cu pH-ul ajustat la 5. Soluția de enzime hidrolitice este un amestec de enzime care conține endo- și exo (1,3)-beta-D-glucanaze, endo-chitinază și beta-glucozidază, în raport de 75 unități beta-glucanazice, 320 unități endo-chitinază și 100 unități beta-glucozidazice, la 100 g de pleavă. Un exemplu de amestec de enzime comerciale care se poate folosi este Vinotaste Pro (Novozyme, Bagsværd, Danemarca), care este un amestec complex de enzime litice, produs de tulpini selectate de *Trichoderma harzianum* și *Aspergillus niger*, și care are o activitate exo- β -(1,3)-glucanazică (EC3.2.1.56) și endo- β -(1,3)-glucanazică (EC 3.2.1.6) de 75 unități glucanazice (BGUX) per gram și de 320 unități endo-chitinazice per gram. O unitate glucanazică BGUX este definită ca fiind cantitatea de enzimă necesară pentru a produce 1 μ mol de glucoză pe minut dintr-o soluție care conține 2,5 g/l laminarină, la pH 5,5 și la temperatura de 45°C. O unitate endo-chitinazică este definită ca fiind cantitatea de enzimă necesară pentru eliberarea a 1 μ mol de p-nitrofenol pe minut din p-nitrofenil- β -tri-acetil-chito-trioza (2,5 mM) în tampon MES (100 mM), pH 6,2 la 40°C. Un alt preparat enzimatic, de beta-glucozidază (EC 3.2.1.21) din drojdii de vinificație, care se folosește este Zymovarietal Aroma (Sodinal, București, România). Acest preparat are o activitate de 100 unități beta-glucozidazice per gram de preparat. O unitate endo-chitinazică este definită ca fiind cantitatea de enzimă necesară pentru eliberarea a 1 μ mol de p-nitrofenol pe minut din p-nitrofenil- β -D-glucopiranozid (pNPG) (5 mM) în tampon 100 mM acetat de sodiu, pH 4,5 la 23°C. Se poate folosi orice fel de amestec similar de preparate enzimatice, cu aceleași caracteristici, un astfel de cocktail enzimatic acționând asupra pereților celulari vegetali.

Se procedează timp de 12 ore la extracția hidrolitică asistată de ultrasunete a materialului biologic, pleavă de orez, la pH 5, temperatura de 50°C, cu ultrasonicare intermitentă, 5 min la fiecare 30 min, la 20 kHz și cu o putere de 400 W, urmată de inactivarea finală a enzimelor și sterilizarea amestecului material vegetal bogat în siliciu prin autoclavare la 121°C timp de 20 min .

Pleava de orez și soluția în care a fost extrasă se trece cantitativ într-un vas de sticlă termorezistent Simax® de 5 litri (Kavalier, Sazava, Cehia), prevăzut cu sistem de termostatare. Se adaugă 1500 ml de infuzie de ceai verde fierbinte, obținută prin extragerea timp de 10 min a 75 g de frunze de ceai în 1500 ml de apă fierbinte, de 90-95°C. Se lasă să se răcească și se determină substanța uscată refractometric (de ex. prin utilizarea unui refractometru digital de laborator RX- 5000, Atago, Yushima, Japonia). Peste cele 2500 g de amestec infuzie de ceai verde / suspensie de pleavă se

adaugă cca 500 ml soluție de 30% zaharoză, cu atingerea unei concentrații finale de 5% zaharuri fermentescibile. În final se aduc în amestec și 150 grame polen colectat de albine. Se răcește amestecul și se inoculează aseptice cu o colonie simbiotică de drojdii și bacterii, SCOBY, și se incubă la temperatura camerei, în condiții de microaerofilie, timp de 10 zile. Consorțiile SCOBY sunt formate din două tipuri de bacterii producătoare de acizi organici (bacterii acetice și bacterii lactice) și din drojdii osmofile (Villarreal-Soto et al., 2018). Bacteriile acetice sunt cele care produc pelicula de celuloză bacteriană (Tran et al., 2020). Această peliculă de nanoceluloză este edificată pe un suport inițial, constituit de o rețea pseudo-hifală a drojdiilor osmofile (Tran et al., 2021). Drojdiile sunt înglobate în pelicula de celuloză, care devine astfel mai expandată (Tran et al., 2021). Consorțiul care se folosește este cel descris în lucrările grupului nostru, (Dima et al., 2017; Uțoiu et al., 2018), fiind un consorțiu care este de proveniență locală, din sudul României - și care este asemănător cu SCOBY descris pentru Serbia (Malbașa et al., 2006).

După terminarea perioadei de cultivare se recuperează biopelicula de SCOBY formată la suprafața mediului de cultură. Membranele de celuloză se fibrilează prin măcinare umedă repetată de 25 de ori la o moară coloidală (Labor-Pilot 2000/4, Ika, Staufen, Germania), la 16 bari presiune și microfluidizare repetată de 10 ori, într-un microfluidizator (M110P Microfluidizer®, Microfluidics, Westwood, MA, SUA), la 2000 bari printr-o cameră diamantată în formă de Z.

Se procedează apoi la separarea prin sitare a materialul vegetal pleavă de orez nereacționat și separarea prin filtrare a grăuncioarelor de polen golite de conținut în timpul procesului de fermentare împreună cu un consorțiu de drojdii și bacterii – SCOBY. Se utilizează o pâlnie de filtrare sub vid și o hârtie de filtru de dimensiuni micrometrice – polenul având diametrul minim de 20 μ M. Din filtrat se separă prin ultrafiltrare pe membrană cu pragul de excludere de 250 kDa nanoparticule de silice. Se folosește un sistem Minimate™ Tangential Flow Filtration Capsules (Pall Corporation, Port Washington, NY, SUA), cu membrană cu limita de excludere de 250 kDa, alimentat de o pompă peristaltică MasterFlex® L/S (Cole Parmer / Antylia Scientific, Vernon Hills, IL, SUA), cu un debit de 25 ml/min.

Permeatul bogat în polifenoli se recuperează și se utilizează pentru producerea de chitosan grefat cu polifenoli, prin introducerea a 300 ml soluție 1% chitosan fungal activat în prealabil cu 1,8 ml de apă oxigenată și 1,2 grame de acid ascorbic. Activarea prealabilă a chitosanului se face prin dizolvarea sa, 1g în 100 ml de acid acetic 1%, și adăugarea lentă a 0,6 ml de apă oxigenată și 0,4 grame de acid ascorbic la fiecare 100

ml soluție de chitosan. Se menține sub agitare continuă la 100 rpm timp de 30 de minute. Cei 2300 ml de permeat și soluție de chitosan rezultat se aduc într-un vas de reacție de 3 litri și se menține la temperatura camerei timp de 90 minute, sub agitare constantă de 100 rpm, pentru perfectarea reacției de grefare polifenoli pe chitosan. În suspensia rezultată este introdus încet, picătură cu picătură, 115 ml de soluție de selenit de sodiu 1% și se agită timp de 20 min pentru finalizarea reacției de formare nanoparticule amorse de seleniu prin reducere bioasistată de către polifenoli și acidul ascorbic. Se observă formarea nanoparticulelor de seleniu zerovalent prin apariția culorii cărămizii specifice seleniului zerovalent. Se separă nanoparticulele de seleniu și chitosan grefat prin ultrafiltrare tangențială pe membrană de 100 kDa. Se folosește un sistem Minimate™ Tangential Flow Filtration Capsules (Pall Corporation, Port Washington), cu membrană cu limita de excludere de 100 kDa, alimentat de o pompă peristaltică MasterFlex® L/S (Cole Parmer / Antylia Scientific, Vernon Hills), cu un debit de 25 ml/min.

În cei 250 ml retentat, care conțin nanoparticule de seleniu și chitosan grefat cu polifenoli, se introduce suspensia de nanoparticule de silice. Se agită viguros timp de 5 min cu un omogenizator de laborator (T 18 digital Ultra-Turrax®, Staufen). Nanoparticulele de silice și de seleniu, dispersate prin omogenizare și stabilizate de chitosanul grefat cu polifenoli se introduc în interiorul grăuncioarelor de polen prin filtrare sub vid. Se amestecă suspensia de nanoparticule cu grăuncioarele de polen și se omogenizează cu un omogenizator de laborator (T 18 digital Ultra-Turrax®, Staufen, Germania) timp de 5 min. Suspensia rezultată se filtrează pe un filtru micrometric depus pe o pâlnie de filtrare la vid, care este operată la 150-200 mbari. Fixarea nanoparticulelor în interiorul grăuncioarelor de polen se observă prin dispariția culorii cărămizii din retentat și se verifică prin examinarea filtratului concentrat la microscopia electronică.

Grăunciorii de polen în care sunt incluse nanoparticule de seleniu și silice stabilizate de chitosan grefat se recuperează de pe hârtia de filtru și se dispersează în hidrogelul de nanoceluloză prin ultrasonicare la 20 kHz și cu o putere de 400 W, în proporție de 5 grame grăuncioare la 95 grame hidrogel nanoceluloză.

Revendicari

1 Compoziție pentru combaterea biofilmului disbiotic și a inflamației asociate acestuia caracterizată prin aceea că este alcătuită din 0,52 grame nanoparticule de seleniu și 1,34 g de nanoparticule de silice, stabilizate împreună cu 2,5 g de chitosan fungal cu masa moleculară între 240 și 260 kDa și cu un grad de deacetilare de 85...88% pe care s-au grefat polifenoli, încapsulate în 50 g grăuncioare de polen, golite de conținut prin fermentare lor împreună cu un consorțiu de bacterii și drojii –SCOBY.

2 Compoziție, conf orm revendicării 1, caracterizată prin aceea că nanoparticule de seleniu sunt obținute prin reducerea selenitului de sodiu din ceai verde și din pleavă de orez, iar nanoparticulele de silice sunt obținute prin eliberarea din structurile biogene de tip opal.

3 Procedeu de obținere a compoziție pentru combaterea biofilmului disbiotic și a inflamației asociate acestuia, conform revendicării 1, caracterizat prin etapele: extractia hidrolitică asistată de ultrasunte a materialului vegetal bogat în siliciu, pleavă de orez, adăugarea peste materialul vegetal hidrolizat a 1500 ml infuzie de ceai verde, a unei soluții de 25-30% zaharuri fermentescibile, până la atingerea unei concentrații finale de 5-7 % zaharuri reducătoare fermentescibile; adăugarea a 50 g polen colectat de albine la fiecare 1000 ml de amestec material vegetal, infuzie de ceai verde, zaharuri fermentescibile; inocularea aseptică cu o colonie simbiotică de drojdii și bacterii, SCOBY, și incubarea la temperatura camerei, în condiții de microaerofilie, timp de 8 -10 zile; recuperarea membranelor de celuloză și fibrilare repetată; separarea prin sitare a materialului vegetal pleavă de orez nereacționat și separarea prin filtrare a grăuncioarelor de polen golite de conținut în timpul procesului de fermentare împreună cu un consorțiu de drojdii și bacterii –SCOBY; separarea prin ultrafiltrare pe membrană; recuperarea permeatului bogat în polifenoli și utilizarea pentru producerea de chitosan grefat cu polifenoli, utilizarea suspensiei pentru producerea de nanoparticule amorfe de seleniu, prin adăugarea de 5 ml selenit de sodiu soluție 1% la 100 ml suspensie; separarea nanoparticulelor de seleniu și a chitosanului grefat prin ultrafiltrare tangențială pe membrană de 100 kDa; adăugarea nanoparticulelor de silice peste retentatul care conține nanoparticule de seleniu, dispersarea lor prin omogenizare și introducerea suspensiei de nanoparticule de silice, nanoparticule de seleniu – chitosan grefat cu polifenoli în interiorul grăuncioarelor de polen prin filtrare la vid, la 150-200 mbar; dispersarea grăuncioarelor de polen în hidrogelul de nanoceluloză prin ultrasonicare în flux la 20 kHz și cu o putere de 400 W.