



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00342**

(22) Data de depozit: **27.04.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29.03.2013** BOPI nr. 3/2013

(41) Data publicării cererii:
29.10.2010 BOPI nr. 10/2010

(73) Titular:

- INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU OPTOELECTRONICĂ - INOE 2000, STR.ATOMIȘTILOR NR.409, MĂGURELE, IF, RO;
- INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- CĂLIN MIHAELA ANTONINA, STR.DOBRINA NR.12, BL.49 D 1, SC.A, ET.9, AP.115, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- SAVASTRU ROXANA, STR.IANI BUZOIANI NR.3, BL.16, SC.A, AP.2, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- PARASCA SORIN VIOREL, CALEA ȘERBAN VODĂ NR.270, BL.14, SC.B, AP.60, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- ION RODICA MARIANA, STR.VOILA NR.3, BL.59, ET.1, SC.3, AP.36, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 2005/0107853 A1

(54) **AGENT FOTOSENSIBILIZATOR ȘI PROCEDU DE ACTIVARE A ACESTUIA PENTRU COMBATAREA CONTAMINĂRII BACTERIENE**



RO 125753 B1

1 Invenția se referă la un agent fotosensibilizator, la un procedeu de activare a
acestuia, pentru combaterea contaminării bacteriene a unor suprafețe din domeniul medical,
3 alimentar etc.

5 În momentul actual, bacteriile care contaminatează suprafețe, pielea animală sau
umană sau plăgi pot fi distruse prin metode fizice și chimice. Metodele fizice constau în
7 expunerea la radiații electromagnetice (radiații ultraviolete sau raze X). Efectele secundare
pe care acest tip de radiații le au asupra corpului animal sau uman constituie principalul
9 dezavantaj al acestor metode. Metodele chimice constau în aplicarea unor substanțe din
grupul dezinfectanților sau substanțelor antiseptice. Dezinfectanții se pot folosi doar pe
11 corpuri inerte, pentru că produc leziuni pe pielea animală sau umană. Substanțele
antiseptice, utilizate în soluții, creme, geluri au un efect de mai scurtă durată și sunt
demonstrate a interfera și încetini procesul de vindecare atunci când sunt folosite pe plăgi.

13 Bacteriile care prezintă rezistență la aceste metode de decontaminare pot fi inactivate
printr-o nouă metodă/procedeu bazată pe efect fotodinamic, recent abordată de comunitatea
15 științifică internațională.

17 Această metodă se bazează pe fotooxidarea materiei biologice, în care sunt implicați
trei constituenți esențiali: agent fotosensibilizator, radiație luminoasă și oxigenul.

19 Combinarea acestor două elemente complet netoxice, agentul fotosensibilizator și
lumina, în prezența oxigenului, conduce la distrugerea selectivă a celulelor țintă sau
microorganismelor.

21 Metoda a fost validată în cazul celulelor țintă canceroase și aprobată de către forurile
de specialitate, pentru tratarea: tumorilor obstructive de esofag și a cancerului endobronhic
23 (Statele Unite ale Americii), tumorilor de vezică urinară (Canada), tumorilor avansate de
esofag și plămâni (Franța și Olanda), cancerului precoce de plămâni (Germania), cancerului
25 precoce de esofag, plămâni, gastric și cervical (Japonia) etc.

27 În cazul celulelor țintă bacteriene, metoda prin inactivare fotodinamică a fost testată
și validată, pentru combaterea unor germeni bacterieni care contaminatează suprafețe, pielea
animală sau umană, și care prezintă rezistență la metodele curente de decontaminare, cum
29 sunt: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus piogenes*, *Colstridium perfingens*, *Escherichia coli*,
Micoplasma hominis, *Helicobacter pilori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria*
31 *monocytogenes*, *Yersinia pseudotuberculosis* etc.

33 Metoda constă în aplicarea, pe suprafața contaminată, a unor agenți
fotosensibilizatori, pe bază de: porfirine (Caminos D. A. et al, 2007; Banfi S. E et al. 2006),
fenotiazine (Tegos G. P et al, 2006), ftalocianine (Minnock A. et al., 2000), Roz Bengal
35 (Schafer M. et al., 2000; Paulino T. P. et al., 2006), dorine (Faten G. et al., 2004; Embleton
M. et al., 2005), albastru de toluidină (Komerik N. et al., 2000; Matevski D. et al., 2005),
37 albastru de metilen (Chan Y. et al., 2003; Nagasawa M. et al., 2005) etc., preparați sub formă
de soluții sau unguent și apoi expunerea suprafeței la radiații optice emise de surse de
39 lumină incoerentă (lămpi, LED-uri) pentru activarea acestora.

41 Aplicarea acestei metode pentru decontaminarea unor suprafețe prezintă însă unele
dezavantaje: utilizarea agenților fotosensibilizatori preparați sub formă de soluție sau
43 unguent limitează adâncimea de penetrare a acestora, iar utilizarea surselor de lumină
incoerente (care prezintă un spectru de emisie larg care nu corespunde cu maximul de
45 absorbție al agentului fotosensibilizator) pentru activarea agentului fotosensibilizator conduc
la o eficiență scăzută a metodei.

47 Problema pe care își propune să o rezolve invenția este de a realiza un agent
fotosensibilizator cu eficiență ridicată în combaterea contaminării bacteriene a unor suprafețe
(mobilier, instrumentar, vase de laborator etc. și piele intactă sau plăgi) și un procedeu de
49 activare a acestuia.

RO 125753 B1

Invenția rezolvă problema tehnică și elimină dezavantajele soluțiilor cunoscute, printr-un agent fotosensibilizator sub formă de gel, constituit din: 0,02...0,03% albastru de metilen, 0,5...1,0% colagen, 15...18% 1,3-propilenglicol, 4...5% NaOH, restul 75...80% apă bidistilată. 1
3

Procedeul de activare, conform invenției, constă în aplicarea unui strat subțire de agent fotosensibilizator pe suprafața contaminată, menținerea suprafeței la întuneric timp de 30...60 min și expunerea suprafeței astfel tratată, de la o distanță de 5...10 cm, la radiații laser de mică putere, 3...15 mW, cu lungimi de undă de 635 nm, timp de 5...30 min; operațiile menționate pot fi eventual repetate până la obținerea unui nivel de contaminare dorit. 5
7
9

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- agentul fotosensibilizator este netoxic, nepoluant; 11
- agentul fotosensibilizator este ușor de preparat și nu este costisitor;
- agentul fotosensibilizator preparat sub formă de gel penetrează mai ușor în țesut; 13
- agentul fotosensibilizator poate fi activat cu radiație optică din domeniul vizibil, care nu este nocivă; 15

- agentul fotosensibilizator nu interferează cu procesele de vindecare;
- utilizarea agentului fotosensibilizator activat prin expunere la lumină nu produce leziuni cutanate sau alte efecte adverse; 17

- agentul fotosensibilizator este nedureros la aplicare în medicina umană și veterinară; 19

- se obține un nivel de decontaminare a suprafețelor necesar (impus de standardele în vigoare) prin reaplicarea procedurii; 21

- se mărește eficiența metodei prin utilizarea radiațiilor laser cu lungimi de undă corespunzătoare absorbției maxime a agentului fotosensibilizator; 23

- se distruge speciile de bacterii rezistente la alte tratamente (antibiotice, antiseptice), situație des întâlnită *in vivo*. 25

Se dau, în continuare, 2 exemple de realizare a invenției, care au rolul de a ilustra invenția și nu de a o limita. 27

Exemplul 1. a. Obținerea agentului fotosensibilizator pe bază de albastru de metilen 29

Albastru de metilen a fost dizolvat în apă bidistilată, realizându-se o soluție stock de concentrație $1,6 \times 10^{-3}$ M. La 25 ml de soluție de albastru de metilen ($1,6 \times 10^{-3}$ M), s-a adăugat o soluție de colagen în apă (5 mg/ml), după care s-au adăugat în picătură 20 ml soluție în NaOH (picurare la 37°C, timp de 30 min) până la valoarea pH-ului fiziologic (7,4). La acest amestec, s-au adăugat 15 ml de propilenglicol, utilizat ca și solvent polar și ca intensificator de penetrare dermică. Se obțin 100 g de gel. 31
33
35

b. Activarea agentului fotosensibilizator pe bază de albastru de metilen

Se aplică un strat subțire de agent fotosensibilizator pe suprafața țintă (plaga contaminată cu bacterii din speciile *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa*) și se lasă la întuneric timp de 30 min. Se expune apoi suprafața contaminată, timp de 10 min, la radiații laser de mică putere, 15 mW, cu lungimi de undă de 635 nm. Distanța de iradiere este de aproximativ 5 cm (fig. 1). Procedeul se repetă după 24 h, pentru obținerea nivelului de contaminare dorit. 37
39
41

Rezultatele obținute pe un lot de 20 animale de laborator ce prezentau plăgi contaminate cu bacterii din speciile *Staphylococcus aureus* au evidențiat faptul că numărul de colonii formatoare de unități (CFU) a scăzut, în medie, după aplicarea agentului fotosensibilizator (gel) și activarea acestuia de la 8,70 log CFU/ml la 6,95 log CFU/ml (fig. 2). După 24 h, nivelul de contaminare al plăgii a fost de 5,45 log CFU/ml, iar după repetarea procedurii, s-a atins nivelul de 3,37 log CFU/ml. După 48 h, numărul de colonii formatoare de unități prezent la nivelul plăgii a scăzut la 3,12 log CFU/ml (datorită sistemului de autoapărare al organismului), nivel considerat acceptabil. 43
45
47
49

RO 125753 B1

1 Aplicarea agentului fotosensibilizator și activarea acestuia prin expunere la radiație
2 optică coerentă pe un lot de 25 de animale de laborator cu plăgi contaminate cu
3 *Pseudomonas aeruginosa* a condus la reducerea numărului de colonii formatoare de unități
4 de la 8,91 log CFU/ml la 7,24 log CFU/ml (fig. 3). După 24 h, s-a repetat procedeul și s-a
5 ajuns la un nivel de contaminare de 6,77 log CFU/ml, iar după 48 h, s-au înregistrat numai
6 4,17 log CFU/ml.

7 În ambele cazuri, s-a obținut un nivel de contaminare de sub 10^5 germeni/gram țesut,
8 nivel care scoate contaminarea din domeniul infecției. În aceste două cazuri, germeii țintă
9 au fost microbi cu rezistență la antibiotice, deosebit de greu de combătut prin mijloace
10 convenționale.

11 **Exemplul 2.** Agentul fotosensibilizator obținut ca în exemplul 1 s-a utilizat în cazul
12 unui pacient voluntar cu arsură de gradul II pe fața anterioară a antebrațului.

13 Pentru activarea agentului fotosensibilizator, se aplică un strat subțire de agent
14 fotosensibilizator, pe o zonă cu diametrul de circa 5 cm (fig. 4) și se lasă la întuneric timp de
15 60 min. Se expune apoi suprafața contaminată, timp de 20 min, la radiații laser de mică
16 putere, 15 mW, cu lungimi de undă de 635 nm. Distanța de iradiere este de aproximativ 5
17 cm (fig. 5). După 24 h, se repetă procedeul și după 48 h se evaluează nivelul de
18 contaminare.

19 Evaluarea clinică a zonei luate în studiu a arătat următoarele:

20 - inițial, înainte de aplicarea protocolului de studiu, plagă cu aspect roz-roșiatic, cu
21 minimum exsudat seros, fără semne inflamatorii perilezionale;

22 - după aplicarea substanței fotosensibilizante și imediat după iradierea laser, nu s-au
23 observat modificări semnificative ale aspectului plăgii (cu excepția modificării de colorație
24 datorată fotosensibilizatorului);

25 - la 24, respectiv 48 h după iradiere, a fost remarcată diminuarea până la dispariție
26 a exsudatului seros, plaga de culoare roz, curată, fără urme de sângerare spontană,
27 sensibilă spontan și la manipulare, aptă pentru epitelizare spontană (fig. 6).

28 Colorația temporară a plăgii în albastru (datorată agentului fotosensibilizator) a
29 dispărut aproape complet la 48 h, permițând o evaluare clinică fără dificultăți a evoluției.

30 Evoluția clinică nu a fost influențată în mod negativ de aplicarea metodei, aceasta
31 putând înlocui cu succes mijloacele clasice (creme antibacteriene).

32 Invenția, constând în gelul de agent fotosensibilizator și metoda sa de activare în
33 vederea controlului contaminării bacteriene, a fost aplicată, ca experiment, în laborator (pe
34 culturi de celule în cazul a doi germeni rezistenți la multiple antibiotice), pe suprafața plăgilor
35 la animale de laborator sau în condiții clinice pe arsuri de mică suprafață. Studiul clinic a fost
36 conceput ca un studiu preliminar de testare a eficienței, fără a pune în pericol evoluția
37 generală a pacientului și a demonstrat aplicabilitatea invenției în controlul contaminării
38 bacteriene a unor suprafețe.

39 Invenția se situează la o arie de interferență a mai multor științe (chimie, fizică,
40 biologie și medicină), care generează posibilități largi de aplicație. Anumite suprafețe inerte
41 de diferite dimensiuni pot fi decontaminate și chiar sterilizate. De asemenea, invenția își
42 poate găsi utilitatea și în tratamentul diverselor tipuri de patologii cutanate, cum ar fi: infecțiile
43 de suprafață, ulcerele cronice sau plăgile deschise post-traumatice sau postoperatorii.

44 În concluzie, invenția oferă un agent fotosensibilizator netoxic, nepoluant și care
45 prezintă eficiență ridicată în combaterea contaminării bacteriene de suprafață. Rezistența
46 bacteriană este eliminată prin utilizarea efectului fotodinamic, aplicabil oricărei bacterii.
47 Înglobarea agentului fotosensibilizator într-un gel asigură o penetrabilitate mai bună pentru
48 domeniile vizate și o acțiune eficientă împotriva microbilor.

RO 125753 B1

Revendicări

1. Agent fotosensibilizator, **caracterizat prin aceea că** este constituit din 0,02...0,03% albastru de metilen, 0,5...1,0% colagen, 15...18% 1,3-propilenglicol, 4...5% NaOH, restul de 75...80% fiind apă bidistilată, părțile fiind exprimate în procente masice, este preparat sub formă de gel. 1
2. Procedeu de combatere a contaminării bacteriene, pe baza agentului fotosensibilizator, definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** acesta constă în aplicarea unui strat subțire de agent fotosensibilizator pe suprafața contaminată, menținerea suprafeței la întuneric timp de 30...60 min și expunerea suprafeței astfel tratată, de la o distanță de 5...10 cm, la radiații laser de mică putere, 3...15 mW, cu lungimi de undă de 635 nm, timp de 5...30 min, operațiile menționate fiind eventual repetate până la obținerea nivelului de contaminare dorit. 3
7
9
11
13
3. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** se aplică pentru combaterea contaminării bacteriene cu bacterii gram pozitive și gram negative. 15
4. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** bacteriile sunt selectate dintre *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa*. 17



Fig. 1

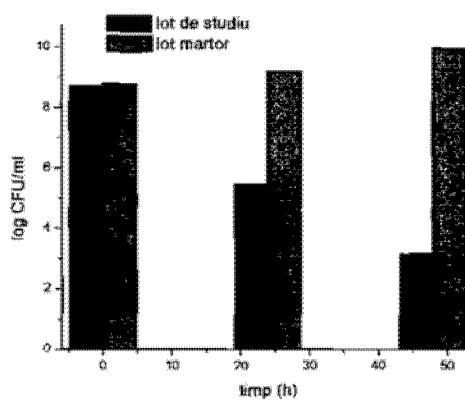


Fig. 2

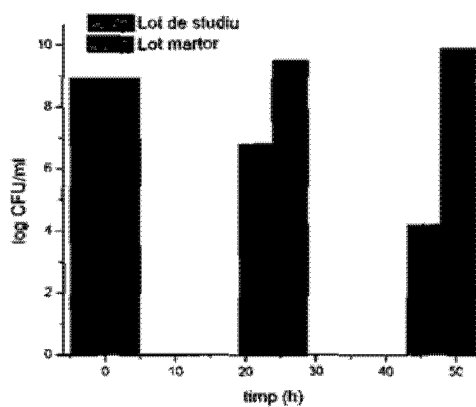


Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6