



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2014 00979

(22) Data de depozit: 11/12/2014

(41) Data publicării cererii:
30/06/2016 BOPI nr. 6/2016

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU ȘTIINȚE
BIOLOGICE, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR. 296, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• TCACENCO LUMINIȚA, STR. EDUCAȚIEI
NR. 35, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• IORDĂCHEL CĂTĂLIN, STR. NOVACI
NR. 11, BL. P 33, SC. 2, AP. 48, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BERTEANU ELENA,
STR. DR. ALEXANDRU LOCUSTEANU
NR. 2, BL. 77A, ET. 3, AP. 15, BUCUREȘTI,
B, RO;

• PARASCHIV MARIA,
CALEA CĂLĂRAȘILOR NR. 325, BL. D1,
SC. 3, AP. 128, BRĂILA, BR, RO;
• DINU ECATERINA LILIANA,
STR. CARPENULUI NR. 4, BUCUREȘTI, B,
RO;
• ENACHE MIHAELA IONICA,
STR. PLT. NEDELCU ION NR. 3, SC. 1,
ET. 4, AP. 25, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• ZUAV ADINA-LIDIA, ALEEA MOINEȘTI
NR. 1, BL. 15, SC. 2, ET. 3, AP. 34,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• TUSA IRIS MARIA, STR. ELIE CAROFOLI
NR. 12, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• GEANTA MARIANA, STR. GHIRLANDEI
NR. 60, BL. 73, SC. 2, ET. 1, AP. 28,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) HIDROGEL PE BAZĂ DE BIOPOLIMERI CUPLAȚI CU
EXTRACTE DIN PLANTE CU EFECT ANTIINFLAMATOR

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un hidrogel pe bază de biopolimeri cuplați cu extracte de plante cu efect antiinflamator. Hidrogelul conform invenției este pe bază de chitosan, carbopol, trietanolamină, glicerină și extracte din următoarele plante: sulfină (*Melilotus officinalis*), mesteacăn

(*Betula verrucosa*), trei frați pătați (*Viola tricolor*), roiniță (*Melissa officinalis*) și crețșoară (*Alchemilla vulgaris*).

Revendicări: 2
Figuri: 3

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).



HIDROGEL PE BAZA DE BIOPOLIMERI CUPLATI CU EXTRACTE DIN PLANTE CU EFECT ANTIINFLAMATOR.

Tcacenco Luminita, Iordachel Catalin, Berteanu Elena, Paraschiv Maria, Dinu Ecaterina Liliana, Enache Mihaela-Ionica, Zuav Adina-Lidia, Tusa Iris Maria, Geanta Mariana.

Inventia se refera la un material biocompatibil, hidratant, pe baza de chitosan, biopolimer natural, compatibil si compusi biologic activi din extracte de plante cu efect antiinflamator: sulfina (*Melilotus officinalis*), mestecanul (*Betula verrucosa*), trei frati patati (*Viola tricolor*), roinita (*Mellissa officinalis*) si cretisoara (*Alchemilla vulgaris*).

Chitosanul utilizat in compozitia acestui hidrogel este un constituent natural, un biopolimer biodegradabil si biocompatibil, fiind un produs ieftin si accesibil.

Chitosanul este o polizaharida liniara derivata din chitina, este polimerul existent in exoscheletul artropodelor, cochiliile de crustacee sau cuticulele de insecte (Muzzarelli RAA. Chitin. New York: Pergamon; 1977).

Este un produs ce in ultimii ani a fost studiat extensiv, datorita biocompatibilitatii sale unice, biodegradabilitatii, stabilitatii in mediul natural, precum si proprietatilor antifungice si anti-bacteriene (Muzzarelli RAA. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. Carbohydr. Polym. 2009; 77:1-9; Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. Int J Food Microbiol. 2010; 144:51-63).

Fiind un bun bioadeziv poate fi usor cuplat cu suprafete incarcate negativ. Prelucrat adecvat, favorizeaza transportul medicamentelor de-a lungul suprafetelor epiteliale. Chitosanul inhiba formarea celulelor in cancerul mamar, este non-toxic si are proprietati active in profilarea genetica (HemCon Medical Technologies Inc, <http://hemcon.com/2004>; Mani Prabakaran, Chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery, Journal of Biomaterials Applications, 2008, vol. 23,5-36; Scheila Honey and col. The effect of chitosan molecular weight on the properties of alginate chitosan microparticules containing - <http://www.tipr.org>.)

Compusii biologic activi de origine vegetala de tipul polifenolilor si polizaharidelor continuti in plante prezinta proprietati antiinflamatoare, care au la baza

capacitatea de a inhiba activitatea radicalilor liberi implicati in procesele de imbatranire, inflamare si in procesele degenerative si imunologice precum cancerul, boli tot mai frecvente datorita poluarii crescute din mediu la toate nivelurile, poluare ce conduce la stressul oxidativ ce determina astfel moartea celulara si degradarea matricei extracelulare.

Datele de literatura privind plantele enumerate mai sus indica faptul ca *sulfina* contine derivati flavonoidici cu proprietati diuretice si antiinflamatorii, taninuri cu efect cicatrizant, melilotol (ulei volatil cu proprietati antiseptice), cumarine si substante amare. Planta prezinta efect antiinflamator, antispastic, anesteziec, sedativ, astringent si cicatrizant. Administrata extern sulfina este benefica in leziuni ale pielii (rani, ulceratii, furuncule), ale mucoaselor (afte, gingivite), faringite, amigdalite, nevralgii, inflamatii oculare (conjunctivite). Referitor la *mesteacan*, frunzele acestuia contin: flavone cu actiune diuretica si antiinflamatoare, saponozide cu actiune diuretica, taninuri cu efect cicatrizant, ulei volatil cu proprietati antiseptice, resine cu efect diuretic, antiseptic si de eliminare a acidului uric, glucide, vitamina C si saruri minerale. Atat frunzele cat si scoarta contin acizi fenolici, tanini, vitamina C si metil salicilat. Mesteacaul este mentionat ca fiind un foarte bun antiinflamator (folosit in special in afectiuni reumatismale), printre componentele active ale mesteacaului amintim glicozidele salicilice care in organism se transforma in acid salicilic (aspirina naturala). Extern se foloseste in tratarea plagilor (se pot face spalaturi sau cataplasme cu macerat).

Trei frati patati contine: flavonoide, uleiuri volatile, violina, antocianozide, vitamina A si C, betacaroten, mucilagii cu actiune emolienta, zaharuri, rasini, saponine, compusi salicilici, taninuri si rutina (cu rol in stabilizarea membranelor capilare). Are actiune antiinflamatoare si sudorifica datorita compusilor salicilici (salicilat de metil). In uz extern, ajuta la vindecarea plagilor, furunculozelor, aftelor, stomatitelor, leucoreei, rinoreei, flebitelor etc. *Cretisoara*, contine: tanin (6-8%), flavonozide, acid salicilic, saponine, acid stearic, acid palmitic, acid elagic, acid luteic, fitosteroli si saruri minerale. Extern, planta se foloseste in urmatoarele afectiuni: acnee, hemoroizi, stomatite (inflamatii ale gingiilor insotite uneori de sangerari), precum si in tratarea ranilor si plagilor, sub forma de macerat sau cataplasme din frunze proaspete zdrobite. Are actiune antiinflamatorie datorita continutului de flavonozide si acid salicilic, este cicatrizanta si hemostatica, efect datorat continutului ridicat de tanin.



O alta planta selectionata este *roinita*-frunzele acestei plante contin: ulei volatil, vitamina C (pana la 15% din substanta uscata), acid ursolic, acid cafeic, acid oleanoic, citrol, tanin, saponine, substante amare si saruri minerale. Roinita are o actiune antiinflamatoare articulara (reumatism), antialgica (incetinind sau chiar oprind procesele degenerative), antimicrobiana, sedativa, laxativa, carminativa si antispastica. Extern planta este folosita pentru ulceratii acute si cronice, prurit, herpes, contuzii, eczeme (<http://www.mirabilys-magazin.ro>; <http://www.csid.ro/plante-medicinale-fitoterapice-si-gemoterapice>).

Cercetarile din ultimii ani efectuate in domeniul biomaterialelor au condus la rezultate spectaculoase in ceea ce priveste cresterea calitatii vietii populatiei.

In Romania ca si in multe tari europene au fost dezvoltate o serie de biomateriale destinate refacerii tisulare dupa accidente cu afectarea tesutului dermic, conditionate atat sub forma de membrane cat si sub forma de creme si geluri. Piata romaneasca abunda de astfel de produse dintre care amintim: Cicatrizin- unguent cu tataneasa, sunatoare, musetel, galbenele; unguent natural de muguri de plop; unguent cu extract de flori de nalba. Prezenta inventie isi propune realizarea unui biomaterial avand in compozitia sa componente cunoscute cu efect antiinflamator, regenerativ, emolient, pe baza de chitosan si extracte de plante mai putin investigate, cu continut bogat in aminoacizi, polifenoli si fitosteroli.

Produsul, conform inventiei este un material biocompatibil, higroscopic, emolient, sub forma de gel, constituit din chitosan cu concentratie de 50 mg/mL; carbopol in concentratie de 10...20 mg/mL, trietanloamina 8 mg/mL, glicerina 2,64 mg/mL si extractele de plante reunite in proportie de 8,33% in raport la cantitatea finala a gelului.

Procedeul de obtinere al produsului, conform inventiei consta in amestecarea gelului de chitosan dupa prealabila dizolvare a acestuia in tampon acid acetic (2M)-acetat de sodiu (1M) in raport 1:1; pH=4,5 la 40-45°C, cu solutia de carbopol in concentratie de 10 mg/mL in diferite rapoarte molare, extractele de plante reunite si concentrate de sulfina (*Melilotus officinalis*), mesteacan (*Betula verrucosa*), trei frati patati (*Viola tricolor*), roinita (*Mellissa officinalis*) si cretisoara (*Alchemilla vulgaris*), cu un continut total de aminoacizi (exprimat in acid glutamic) de 0,05- 0,07% , polifenoli si fitosteroli



evidentiați cromatografic, soluția de etanolamina și glicerina. Se agită amestecul la 350 rpm, cu agitator tip Polytron pentru o omogenizare cât mai perfectă a gelului.

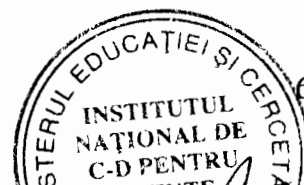
Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje:

- Substanța de bază, gelul de chitosan este cunoscut ca fiind un produs cu puternice proprietăți terapeutice antiinflamatoare și regeneratoare. Înglobarea principiilor active continute și identificate în extractele plantelor studiate permite potentarea acestor proprietăți și o bună penetrare a acestora la locul aplicării.
- De asemenea substanța de bază, gelul de chitosan cât și concentratele din plantele adăugate sunt biocompatibile, neproducând vreă reacție alergică la contactul cu pielea.
- Produsul este stabil în timp, proprietățile organoleptice și de aderență nu se modifică în timp.
- Procedul de obținere este simplu, fezabil, utilizează materii prime ieftine, accesibile și nu necesită aparatură și instalații complexe.

Mod de lucru: Inițial s-a preparat suspensia coloidală a biopolimerului, gelul de chitosan 1% g/v, în soluție acetică (acid acetic 2M-acetat de sodiu 1M 1:1), prin dizolvare pe baie de apă la temperatura de 45°C și un pH final de 5,4. Separat s-a preparat gelul de carbopol în concentrație 1% g/v.

Extractele de plante s-au obținut din plantele uscate, procurate prin rețeaua PLAFAR peste care s-a adăugat apă distilată în raport 1:13 g/v și lasate la extracție timp de 10 zile, la temperatura ambiantă și cu agitare ocazională. Extractele limpezi obținute prin filtrare sub vid prin filtru de hartie s-au concentrat la 1/10 din volumul inițial, cu aparat Rotavapor BUCHI și sub această formă au fost utilizate la prepararea gelurilor.

Extractele apoase obținute au prezentat următoarele proprietăți organoleptice pe baza testelor efectuate conform prevederilor Farmacopeei Române, Ediția a-IX-a, Capitolul 2.



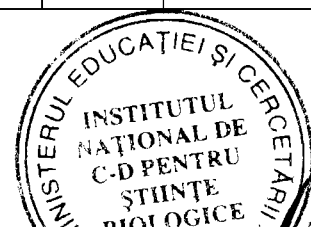
Proprietatile organoleptice ale extractelor plantelor studiate.

Nr. crt.	Proba	Aspect	Culoare	Miros	Gust
1.	Sulfina	Usor opalescent	Galbui-verzui pal	Caracteristic (specific plantei).	Placut aromat, dulceag, tenta analgezica.
2.	Mesteacan	Putin opalescent	Galben-portocaliu	Caracteristic (specific plantei).	Aromat, dulceag, placut papilelor gustative.
3.	Cretisoara	Limpede	Maro-galbui	Caracteristic (parfumat placut).	Putin amarui, o tenta salcie.
4.	Roinita	Limpede	Galben-verde	Caracteristic (placut aromat).	Putin lesios, aromat, tenta analgezica.
5.	Trei frati patati	Usor opalescent	Maro-brun	Caracteristic (specific plantei, dar se percepe si un alt miros.	Placut.

Aminoacizii identificati prin metoda cromatografiei in strat subtire in extractele din plantele folosite sunt prezentati in tabelul urmatoare:

Aminoacizi identificati in extractele apoase studiate.

Nr. crt	Aminoacizi (AA)	Rf AA	Extract apos Sulfina	Extract apos Mesteacan	Extract apos Trei frati patati	Extract apos Roinita	Extract apos Cretisoara
1.	L-hidroxi prolina	0,32	+		+	+	
2.	L- arginina	0,17		+	+	+	+
3.	L- histidina	0,17	+	+	+	+	+
4.	L- alanina	0,49			+	+	+
5.	Valina	0,60	+		+	+	+
6.	L- prolina	0,32	+		+	+	
7.	Acid glutamic	0,42	+	urme	+	+	urme
8.	Triptofan	0,71	+		+		
9.	L-lisina	0,14	+		+		
10.	L-asparagina	0,31					
11.	L-serina	0,36		+		+	
12.	Acid aspartic	0,35		+		+	+
13.	L-fenilalanina	0,68					



ES

14.	L-tirozina	0,68	+		+		
15.	L-leucina	0,70					
16.	L-metionina	0,56			+		+
17.	L-glicina	0,34		+			+

Continutul de aminoacizi exprimat ca acid glutamic a extractelor de plante s-a determinat prin metoda spectrofotometrica si este prezentat in tabelul ce urmeaza:

Continutul de aminoacizi (AA) exprimat in acid L-glutamic din extracte apoase:

Nr. crt.	Denumire proba	Densitatea optica (λ 530 nm)	Continut AA (g%)
1.	Sulfina	0,107	0,0176
2.	Roinita	0,049	0,0080
3.	Mesteacan	0,068	0,0112
4.	Trei frati patati	0,136	0,0224
5.	Cretisoara	0,068	0,0112
6.	Etalon acid L-glutamic	0,121	-

Gelul s-a preparat in 3 variante de lucru:

Varianta 1.

Nr. crt.	Compozitie	Catitate (mL)	Rol in formulare
1.	Extract sulfina (tinctura)	0,5	agent terapeutic
2.	Extract mesteacan (tinctura)	0,5	agent terapeutic
3.	Extract cretisoara (tinctura)	0,5	agent terapeutic
4.	Extract trei frati patati (tinctura)	0,5	agent terapeutic
5.	Extract roinita (tinctura)	0,5	agent terapeutic
6.	Chitosan gel	5,0	agent antimicrobian, cicatrizant, antitumoral
7.	Carbopol 940 gel	10,0	agent de crestere a vascozitatii
8.	Glicerina 99%	0,8	agent de mentinere a umiditatii
9.	Trietanolamina 97%	0,25	neutralizant
10.	Apa distilata	pana la 30	vehicul

Varianta 2.

S-au folosit aceleasi ingrediente, aceleasi cantitati ca la exemplul 1, cu deosebirea ca raportul molar chitosan:carbopol a fost 1:3.

Varianta 3.

S-au folosit aceleasi ingrediente, aceleasi cantitati ca la exemplul 1, cu deosebirea ca raportul molar chitosan:carbopol a fost 1:4.

Caracteristicile organoleptice ale celor 3 variante de unguente sunt prezentate in tabelul urmator:

Caracteristicile organoleptice ale unguentelor.

Nr. varianta	Aspect	Consistenta	Miros	Culoare	pH
1.	translucid	vascoasa	caracteristic	galben-usor maroniu	5.5-5.7
2.	translucid	vascoasa	caracteristic	usor albicios-maroniu	5.5
3.	translucid sticlos	vascoasa	caracteristic	galbem-usor maroniu	5.7-6

Controlul capacitatii de intindere, al plasticitatii s-a efectuat cu metoda extensiometrica Ojeda-Arbussa, atat inainte, cat si dupa incorporarea substantelor active din extractele concentrate de plante, rezultatele fiind prezentate in figurile 1, 2, 3.

Evaluarea rezultatelor obtinute demonstreaza buna capacitate de intindere a hidrogelurilor, care este influentata de prezenta extractelor vegetale si a concentratiei de carbopol.



Revendicare:

1. Formula de gel antiinflamator pe baza de chitosan, carbopol, trietanolamina, glicerina si extracte apoase din urmatoarele plante: sulfina (*Melilotus officinalis*), mestecan (*Betula verrucosa*), trei frati patati (*Viola tricolor*), roinita (*Mellissa officinalis*) si cretisoara (*Alchemilla vulgaris*).



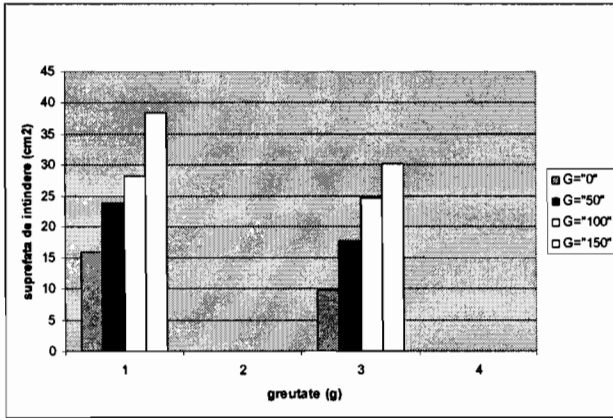


Fig. 1 Capacitatea de intindere (Varianta 1).

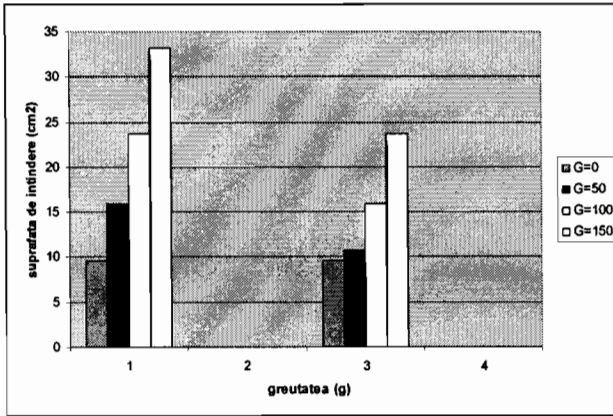


Fig.2 Capacitatea de intindere (Varianta 2).

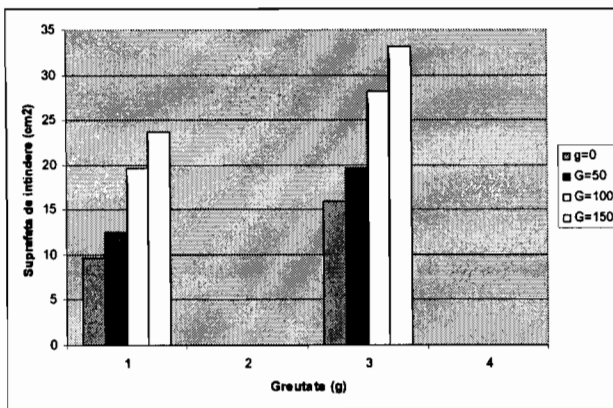


Fig.3. Capacitatea de intindere (Varianta 3).

