



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00893**

(22) Data de depozit: **26/11/2015**

(41) Data publicării cererii:  
**30/05/2017** BOPI nr. **5/2017**

(71) Solicitant:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE  
CHIMICO-FARMACEUTICĂ - ICCF,  
CALEA VITAN NR.112, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **CASARICA ANGELA,  
STR. POPA STOICA FARCAS NR. 19,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **LUPESCU IRINA, STR.PREVEDERII  
NR.15 A, BL.C 1, SC.A, ET.2, AP.9,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **MOSCOVICI MISU, STR. JEAN STERIADI  
NR. 7, BL. I 22, SC. B, ET. 2, AP. 16,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **STANESCU PAUL-OCTAVIAN,  
STR. VATRA DORNEI NR. 9, BL. E4, SC. 2,  
ET. 2, AP. 30, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,  
RO;**  
• **ZAHARIA CĂTĂLIN, STR. CERNIȘOARA  
NR. 43, BL. O12, SC. B, ET. 1, AP. 62,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **IONESCU ANA DESPINA,  
STR.ALUNIȘULUI NR.4, BL.11 A, SC.3,  
AP.99, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU BIOTEHNOLOGIC DE OBȚINERE A UNOR NOI  
COMPOZITE BIOACTIVE, PE BAZĂ DE CELULOZĂ  
BACTERIANĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor compozite bioactive, utilizate în tratamentul afecțiunilor cutanate. Procedeu conform invenției constă în aceea că mere depreciate, congelate la temperatura de -17...-19°C, sunt supuse extracției cu soluție coloidală de argint 25 ppm, la temperatura camerei, timp de 4 h, extractul se separă prin filtrare, după care se adaugă 1% quercetină, respectiv, propolis, amestecul este adus

la pH de 4,8, prin adaos de NaOH, și este inoculat cu 10% inocul de cultură sterilă *Acetobacter xylinum*, timp de 14 zile, cu recoltarea și purificarea compozitului rezultat.

Revendicări: 1  
Figuri: 2



## Procedeu biotehologic de obtinere a unor noi compozite bioactive pe baza de celuloză bacteriană

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a unor compozite pe baza de bioceluloza (BC)/quercitina si BC/propolis in solutie de argint coloidal ionic in concentratie de 25 ppm, pentru aplicatii antimicrobiene superioare.

Microorganismul producator este *Acetobacter xilinum* DSMZ 2004 (ICCF 398).

Încorporarea antimicrobiana a diferitelor ingrediente valoroase, cum ar quercitina, propolisul, argintul coloidal ionic, sau a altor substante biologic active în celuloza bacteriană are o largă aplicabilitate în domeniul farmaceutic, medical, chimic, cosmetic, produse alimentare si in alte domenii.

Quercitina este un bioflavonoid cu rol puternic antioxidant, favorizand blocarea radicalilor liberi, puternic antiinflamator, impiedicand eliberarea elementelor inflamatorii si alergene, avand si efect antibacterian (inhibitor de crestere microbiana) cu stimularea regenerarii tesuturilor.

Propolisul (cleiul de albine) este un material rasinos si balsamic obținut din asocierea albinelor cu diferite surse vegetale, producând o acțiune antimicrobiană și de vindecare. În plus pentru a regenera pielea, noile compozite BC/quercitina, BC/propolis in solutie de argint coloidal, pot ucide bacteriile (pot impiedica dezvoltarea microorganismelor patogene) care vin împreună cu leziunile, avand proprietati cicatrizante si antiseptice.

Argintul coloidal ionic este un amestec omogen de ioni de argint ce au sarcina pozitiva cu particule nanometrice de argint in apa distilata si structurata, fiind eficient in controlul unui spectru larg de microorganisme, inclusiv patogeni multi rezistenti.

Membrana de celuloza antimicrobiana ce contine quercitina/nanoparticule de argint coloidal si respectiv propolis/nanoparticule de argint coloidal, va fi folosita ca un agent antimicrobian si dezinfectant pentru ranile cronice.

Celuloza bacteriană (BC) este unul din materialele eco-friendly, si este sintetizata de către bacteria acetica *Acetobacter xilinum*. Structură fibroasă de BC constă dintr-o retea tridimensională de microfibrile, reticulata, care ii confera o suprafata mare de transfer si o porozitate mare, ce ii permite inglobarea unor substante active sau efectuarea de diverse reactii in mediul apos care este prezent in structura sa tridimensională.

Director General  
Dr. ing. Misu MOSCOVICI



BC are o varietate de aplicatii în domenii biomedicale, inclusiv utilizarea ca biomaterial pentru piele artificială, vase de sange artificiale, grefe vasculare, suport pentru ingineria tisulară, **si ca pansament**. BC este un excelent material pentru pansament, deoarece oferă un mediu umed care permite vindecarea rapidă a ranilor cronice, dar cu toate acestea, nu are proprietati antimicrobiene pentru a preveni infectiile [1,2,3,4]. Prin urmare, sinteza unor noi compozite BC/produse naturale a fost efectuată pentru a elimina aceste limitari si pentru a fi eficiente in tratarea infectiilor cronice (de profunzime). Materialele compozite BC ar trebui sa fie utilizate în mod eficient ca si componente structurale de înaltă performanță pentru diverse aplicatii [5,6]. Astfel, bioceluloza poate fi folosită la obținerea de materiale compozite cu scopul de a asigura hidrofilicitatea și biodegradabilitatea materialului.

Compozitele biocelulozei se pot obtine fie prin modificarea mediului de cultura (in-situ), fie prin modificare ex-situ, folosindu-se de la simpla amestecare a componentilor, pana la reactii chimice mai complicate care sa permita inglobarea altor substante in matricea de celuloza.

O abordare diferită pentru a îmbunătăți biocompatibilitatea BC constă în prepararea compozitelor BC cu diferite biomateriale. Astfel, din datele de literatura, dintre polimeri au fost testati biopolimeri de tipul: chitosan, gelatina, colagen avandu-se în vedere aplicatiile medicale ale compozitelor obtinute. Unele dintre compozitele astfel obtinute au prezentat proprietati superioare celulozei bacteriene, altele nu, evident si in functie de aplicatiile avute în vedere pentru respectivele materiale.

Compozite BC-chitosan au fost obtinute pentru a îmbunătăți unele dintre proprietățile structurale ale BC native. Kim si colab. [7] au obtinut compozite BC-chitosan prin cufundarea peliculelor BC umede într-o solutie de chitosan, urmată de un proces de liofilizare. Analiza morfologică efectuată sugerează că moleculele de chitosan pot pătrunde în BC formând un schelet cu o structura tridimensională multistrat. Biocompatibilitatea acestor compozite BC-chitosan a fost evaluată prin studii de proliferare celulară, unde acestea au fost atinse. In general, materialele compozite-BC chitosan au aratat o biocompatibilitate mult mai buna fata de BC pură.

Wang si colab. [8] au raportat sinteza unui compozit celuloză/gelatină prin reticulare cu procianidinen (antioxidanti, oligomeri polifenolici, substanțe ce ajută la scăderea colesterolului). Rezultatele au arătat că proliferarea, infiltrarea si aderența fibroblastelor sunt îmbunătățite fata de BC nativa. Într-adevăr, gelatina, o polipeptidă derivată dintr-o matrice extracelulară, si o formă denaturată a colagenului, prezintă mai multe proprietăți, cum ar fi bună biocompatibilitate, imunogenitate scăzută, adezivitatea, promovarea si cresterea celulara precum si costuri reduse. Prin urmare, acesta poate fi folosit ca un material alternativ la colagen în ingineria tisulară.

Director General

Dr. ing. Misu MÔSCU



Colagenul a fost de asemenea utilizat pentru a îmbunătăți biocompatibilitatea BC. Colagenul a fost utilizat în aplicații biomedicale datorită biodegradabilității, antigenicității scăzute și proprietăților de legare a celulelor [9]. În contrast, colagenul are proprietăți mecanice scăzute, posibil inter-infectare și pret ridicat, limitând astfel utilizarea sa în domeniile biomedicale [10]. Cai și colab. [11] au obținut compozite BC-colagen prin cufundarea unei membrane de BC în soluție de colagen. Celulele fibroblaste incubate s-au comportat bine în ceea ce privește aderența celulară și proliferarea. Compozitele BC-colagen preparate au arătat o citocompatibilitate mult mai bună decât BC pură (nativă).

Alte biomateriale utilizate pentru a îmbunătăți biocompatibilitatea BC includ amidonul [12, 13], hidroxiapatita [14-20], poli (alcool vinilic) [21-23], poli (metacrilat de metil) [24] și poliacrilamidă [25].

Deoarece majoritatea polimerilor sintetici sunt nedegradabili, problemele de mediu generate de acestea sunt, de asemenea, în același timp în creștere. În scopul de a rezolva aceste probleme, tendința se îndreaptă acum spre dezvoltarea compozitelor ecologice, folosind materiale naturale. Mergând după aceste principii, am urmărit obținerea unor noi biomateriale compozite eco-friendly pe baza de celuloză bacteriană și produse naturale valoroase precum quercitina, propolisul, în soluție de argint coloidal, cu aplicații biomedicale corespunzătoare. În acest sens, posibilitatea obținerii de noi biomateriale compozite, cu proprietăți îmbunătățite, se va dovedi ca o soluție interesantă pentru realizarea compozitelor BC verzi, care satisfac nevoia de a explora cost minim, materiale biodegradabile și regenerabile. Astfel, invenția de față realizează obținerea de membrane compozite BC/produse naturale cu aplicații antimicrobiene superioare, printr-o metodă simplă, rapidă și cost scăzut.

Majoritatea încercărilor de modificare a mediului de cultură pentru producerea compozitelor BC s-au efectuat utilizând biomateriale solubile în apă. S-a pornit de la ideea că matricea de bioceluloză poate îngloba în ea diverse materiale, dacă acestea sunt prezente în mediul de reacție. Astfel, s-a optat pentru modificarea mediului de biosinteză (reacție in situ) cu adăugarea individuală de quercitina, propolis în soluție de argint coloidal.

Procesul de obținere al membranelor de bioceluloză, este, în cea mai mare parte, cunoscut tehnologic, așa cum noi arătam aici prin referința bibliografică [Brevet nr. 126940/30.09.2013] [26], care este incorporată prezentei invenții, prin referire, în totalitate.

Director General

Dr. ing. Misu MOSCOVICI



Membranele compozite BC/quercitina si BC/propolis in solutie coloidala de argint, conform invenției se obțin prin biosinteza cu tulpina *A. xilinum* DSMZ 2004 (ICCF 398). Astfel, merele depreciate proaspete sau congelate, se extrag in solutie coloidala de argint la temperatura camerei, in concentratie de 25 ppm, extractul se separa prin filtrare pe hartie de filtru calitativa, dupa care se adauga quercitina 1 % in prima varianta si propolis 1% in a doua varianta, iar membranele compozite obtinute au fost supuse purificarii pentru indepartarea celulelor microbine aderente si testarii analitice si farmacologice.

Astfel, mediile de cultura, cu volum util de 100 ml, preparate în baloane Erlenmeyer de 500 mL cu extract din mere depreciate in solutie coloidala de argint (25 ppm) si ingredientele naturale valoroase precum quercitina si propolisul, au fost sterilizate prin autoclavare la 121°C, 30 min si inoculate cu 10% mediu inocul Icell *A. xilinum* DSMZ-2004.

Incubarea s-a făcut în condiții statice, la 30°C, durata de incubare fiind de 14 zile cu recoltarea și purificarea membranelor compozite de celuloză.

Membranele compozite BC/quercitina si BC/propolis in solutie coloidala de argint obținute au fost purificate prin tratarea cu soluție de NaOH 1N (4%), la 30°C timp de 2 zile pentru a liza celulele microbiene din pelicula, tratate cu azidă de sodiu ( $\text{NaN}_3$ ) 0.02% pentru a reduce contaminarea microbiană si neutralizate cu acid acetic 1%, spalate cu apă distilată si pastrate la 4°C.

Avantajele invenției constau în principal în aceea că se obțin doua materiale compozite BC, de origine microbiana, de uz terapeutic, foarte active în afecțiunile cronice, greu tratabile, cu o compatibilitate mare cu componentele membranei celulare, a tegumentului in general, care poate conduce, în consecință, la îmbunătățirea stării de sănătate și creșterea calității vieții precum și la dezvoltarea economică a industriei farmaceutice.

BC accelerează procesul de vindecare a pielii față de pansamentele conventionale, cum ar fi tifonul umed si unguentele. Studiile au aratat ca acoperiri bazate pe BC reduce durerea ranii, accelereaza reepitelizarea si reduce ratele de infectare a plagii si cicatrizeaza [27, 28, 29].

Director General

Dr. ing. Misu MOSCOVICI



Se prezintă în continuare două exemple de realizare a invenției:

Exemplul 1.

Acest exemplu descrie soluția tehnologică de obținere a compozitelor BC/quercitina în soluție coloidală de argint, pornind de la medii sterile ce sunt inoculate cu *Acetobacter xilinum*. Pentru aceasta se utilizează o cantitate de 50 g mere depreciate, congelate la -17...-19°C, ce se supune extracției prin agitare cu 1 L soluție coloidală de argint 25 ppm, la temperatura camerei, timp de 4 h. După extracție, se separă faza solidă prin filtrare sub vid, pe palmie Buchner, pe hartie de filtru calitativă. A rezultat 1000 mL filtrat (extract) cu o concentrație echivalentă gram glucoză de 7.5%. În extractul de mere se mai adaugă: glicerină 2.0 %, sulfat amoniu 0.2 %, acid citric 0.5 %, sulfat de magneziu 0.05 %, yeast extract 0.05 % și quercitina 1 %.

Intrucât pH-ul inițial al mediului de cultură nu este constant, deoarece el depinde atât de pH-ul apei utilizate la preparare, de soluția coloidală de argint cât și de componentele adăugate în mediu, se procedează la aducerea sa la valoarea de 4.8 prin adaos de NaOH.

Odată mediul preparat și sterilizat, se realizează inocularea acestuia cu o cultură sterilă de *Acetobacter xilinum* 10% inocul.

Bioprocesul s-a realizat în condiții statice, la 30°C, durata de incubare fiind de 14 zile cu recoltarea și purificarea membranelor compozite de BC/quercitina (figura 1).

Compozitul BC/quercitina în soluție coloidală de argint, a fost tratat cu soluție de NaOH 1N, în vederea îndepărtării bacteriilor acumulate în acesta. Se obține astfel o membrană compozit BC clară, cu tente ușoare de galbui strălucitor, cu o grosime medie de 0.4 - 0.6 mm, care se tratează cu azidă de sodiu ( $\text{NaN}_3$ ) 0.02% pentru a reduce contaminarea microbiană și apoi se neutralizează cu acid acetic 1%, după care se spală și se pastrează în vase Petri sub apă distilată, la 4°C în vederea procesării sale ulterioare.

Exemplul 2.

Se procedează ca în exemplul 1, cu diferența că ingredientul valoros adăugat în mediul de cultură pentru formarea compozitului BC, este propolisul în soluție coloidală de argint. Se obțin astfel membrane compozit din bioceluloză cu propolis în soluție de argint (figura 2), care se prelucrează în continuare ca în exemplul 1. Acestea pot fi utilizate pentru tratarea ranilor cronice, tesuturilor arse sau deteriorate de insuficiența venoasă.

Director General

Dr. ing. Misu MOSCOVICI



Tabel 1. Activitatea antimicrobiana a compozitelor BC asupra  
*S. epidermidis*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*

14

Proba	Microorganism-test	Zona de inhibitie (mm)	Inmultire microbiana (zona de contact)
BC	<i>S. epidermidis</i> ATCC 1228	2.5	Niciuna
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	2	Niciuna
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	3	Niciuna
BC/Propolis 1%/ Argint coloidal 25 ppm	<i>S. epidermidis</i> ATCC 1228	3	Niciuna
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	4.5	Niciuna
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	4.5	Niciuna
BC/Quercitina 1%/ Argint coloidal 25 ppm	<i>S. epidermidis</i> ATCC 1228	4	Niciuna
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	6	Niciuna
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	4	Niciuna

Compozitele bioactive BC/quercitin/argint coloidal si BC/propolis/argint coloidal noi obtinute au prezentat activitate antimicrobiana clara (evidenta) fata de *S. epidermidis* ATCC 1228, *S. aureus* ATCC 6538 si *P. aeruginosa* ATCC 9027. Asadar, rezultatele din tabel arata ca cele doua compozite noi obtinute au prezentat efect antibacterian considerabil (efecte antimicrobiene excelente) asupra tuturor celor trei microorganism-test, sustinut de quercitina, propolis si ionii de argint.

Compozitele obtinute pot fi considerate un nou tip de pansament antimicrobian asociat cu proprietati de vindecare noi. Pansamentul este compus din bioceluloză impregnat cu nanoparticule de argint îmbogătite cu quercitina sau cu propolis.

Director General  
Dr. ing. Misu MOSCOVICI



Procedeu biotehnologic de obtinere a unor noi compozite bioactive  
pe baza de celuloză bacteriană

49

**REVENDICARE**

Membrane compozite BC/quercitina/argint coloidal si BC/propolis/argint coloidal, inovative si bioactive, foarte eficiente in tratamentul diferitelor afectiuni ale pielii (răni, arsuri, infecții provocate de diferite bacterii), **caracterizate prin aceea** ca se obtin prin biosinteza cu tulpina *A. xilinum* DSMZ 2004 (ICCF 398), din resurse vegetale autohtone regenerabile și ecologice - fructe depreciate, care se extrag in solutie coloidala de argint de 25 ppm, cu adaus individual de quercitina 1% si propolis 1%. Astfel, doua tipuri de membrane compozite BC eco-friendly, impregnate cu produse naturale (quercitina si propolis) si ioni de argint, nou identificate, au fost obtinute si pot fi folosite ca pansamente in afectiuni cronice, greu tratabile.

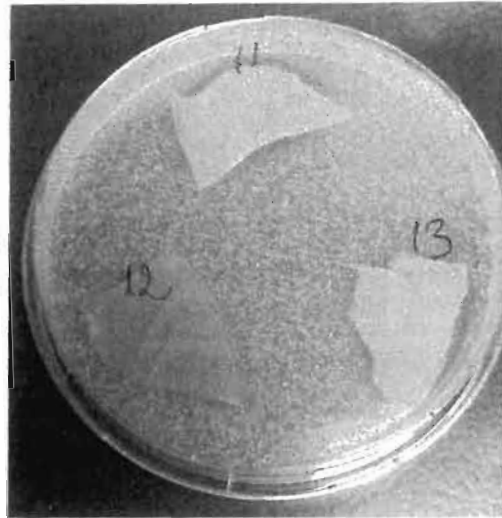
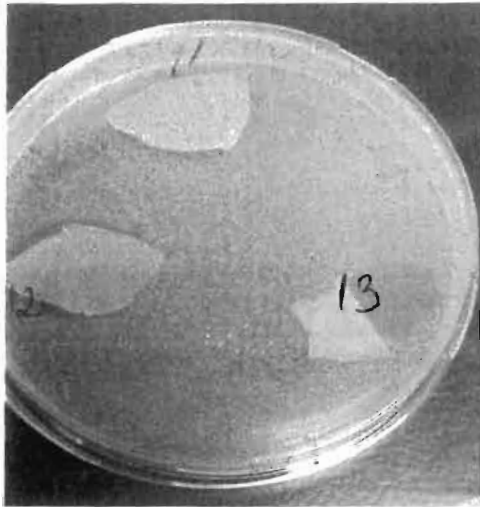
Director General

Dr. ing. Misu MOSCOVICI





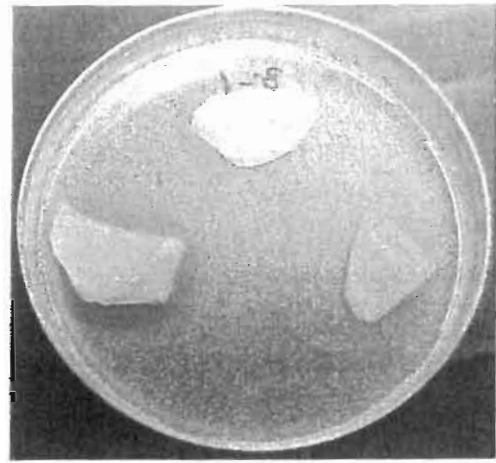
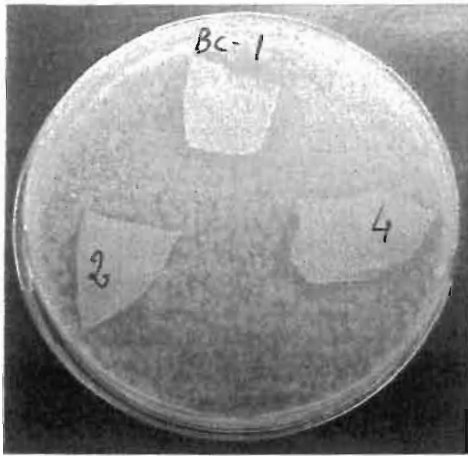
54



**Figura 1.** Activitate antibacteriana a membranelor compozite de BC/quercitina formate în cultură statică, după purificare

Director General  
Dr. ing. Mișu MOSCOVICI





50

**Figura 2.** Activitate antibacteriana a membranelor compozite de BC/propolis formate în cultură statică, după purificare.

Director General  
Dr. ing. Misu MOSCOVICI

