



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00785**

(22) Data de depozit: **03/11/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/01/2021** BOPI nr. **1/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2017 BOPI nr. **6/2017**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **OPRIȚA ELENA IULIA,
STR. VALEA IALOMIȚEI NR.6, BL.C 10,
ET.9, SC.C, AP.184, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **GASPAR PINTILIESCU ALEXANDRA,
ȘOS. COLENTINA NR. 55, BL. 83, SC. 1,
AP. 17, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **MOLDOVAN LUCIA,
BD.CONSTRUCTORILOR NR.24A, BL.19,
SC.A, ET.2, AP.13, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CRĂCIUNESCU OANA,
BD.NICOLAE GRIGORESCU NR.33, BL.A 1,
SC.3, AP.33, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **TATIA RODICA, STR.EROU ADRIAN
FULGA NR.3, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **TOMA AGNES ELENA,
STR. DRUMUL BACRIULUI NR. 40A, AP. 4,
SAT ROȘU, COMUNA CHIAJNA, IF, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**RO 122181 B1; US 2004/0185123 A1;
US 5578307 A**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PANSAMENT COMPOZIT
BIOCOMPATIBIL ȘI BIODEGRADABIL ȘI PANSAMENTUL
OBTINUT PRIN ACEST PROCEDEU**



RO 131950 B1

1 Invenția se referă la un pansament compozit pe bază de colagen și condroitin sulfat
îmbogățit cu polifenoli și polizaharide de origine vegetală, obținute din pelin, cu acțiune în tra-
3 tare și vindecarea unor afecțiuni cutanate (răni, arsuri ușoare) și la procedeul de obținere al
acestuia.

5 Se cunoaște că pansamentele pe bază de colagen (proteina cea mai răspândită în
țesutul conjunctiv, biocompatibilă, biodegradabilă și slab imunogenă) sunt utilizate pe scară
7 largă în procesul de vindecare a rănilor, stimulând creșterea și proliferarea celulară, angioge-
neza, formarea țesutului de granulație și a epitelului la locul lezat (**Parenteau-Bareil R.,
9 Gauvin R., Berthod F., Materials, 2010; 3:1863-1887**). Asocierea acestuia cu compuși
fenolici și flavonoide din extract de frunze de neem (*Azadirachta indica*) a asigurat proprietăți
11 antiinflamatorii, antifibrotice, analgezice, readucând organismul la funcționarea normală și
asigurând substratul pentru celulele implicate în procesul de vindecare a rănilor (**Viji
13 Chandran S., Trikkurmadom S.A., Rajalekshmi G., Sujatha S., Pandimadevi M. and
Pandimadevi M., Int J PharmBioSci, 2015; 6(3): 1365-1389**).

15 Condroitin sulfatul este un polizaharid întâlnit în matricea extracelulară a țesutului
dermic, cunoscut prin capacitatea sa de a stimula proliferarea și migrarea celulelor implicate
17 în sinteza noului țesut, în cazul leziunilor cutanate.

19 De asemenea, este cunoscut faptul că, în ultimii ani, s-au intensificat studiile de
explorare a plantelor medicinale în regenerarea pielii datorită stimulării regenerării țesutului
epitelial în timpul vindecării rănilor, activității lor antioxidante (**Oana Craciunescu, Daniel
21 Constantin, Alexandra Gaspar, Liana Toma, Elena Utoiu and Lucia Moldovan,
Chemistry Central Journal, 2012;6:97**), anti-inflamatorii (**Kira H.P., Son K.H., Chang H.
23 W., Kang S.S., Journal of Pharmacological Sciences, 2004;96(3): 229-245**), inhibării
enzimelor care împiedică procesul de vindecare a rănilor (colagenaze și mieloperoxidaze)
25 (**Francesco Antonio, Rocasalbas Guillem, Tourino Sonia, Mattu Clara, Gentile
Piergiorgio, Chiono Valeria, Ciardelli Gianluca, Dr. Tzanko Tzanov, Biotechnology
27 Journal, 2011 ;6(10): 1208-1218**) și proprietăților antimicrobiene (**Amal B., Veena B.,
Jayachandran V.P., Shilpa J, J Mater Sci:Mater Med, 2015; 26: 181**).

29 Cercetări anterioare au indicat faptul că pelinul (*Artemisia absinthium*) conține diferite
clase de compuși chimici de tipul uleiurilor esențiale, polifenolilor, flavonoidelor, și lactonelor
31 terpenice (**Kamel Msaada, Nidhal Salem, Olfa Bachrouch, Slim Bouselmi, Sonia
Tammar, Abdullchaleg Alfaify, Khaldoun Al Sane, Wided Ben Ammar, Sana Azeiz, Adel
33 Haj Brahim, Majdi Hammami, Sawsen Selmi, Ferid Limam, and Brahim Marzouk,
Journal of Chemistry, 2015, Volume 2015, Article ID 804658, 12 pages**) responsabile de
35 proprietățile antiseptice, antiinflamatoare, diuretice, antibacteriene, carminative, antipiretice,
antiparazitare sau cicatrizante atribuite acestuia (**Scarlat Mihai Alin, Tohaneanu Monica,
37 Bazele fitoterapici, Ed. Word Galaxy, 2009, ISBN 979-973-86333-8-3**). De asemenea,
polizaharidele din compoziția speciilor *Artemisia* au prezentat proprietăți imunomodulatoare,
39 de inhibare a speciilor reactive de oxigen (**Xie G., Schepetkin LA., Siemsen D.W.,
Kirpotina L.N., Wiley J.A., Quinn M.T., Phytochemistry. 2008;69(6): 1359-71**),
41 antitumorale (**Koo, K., Kwak, .1., Lee, K., Zee, O., Woo, E., Park, H., et al. (1994). Arch
Pharma Res, 17(5), 371-374**), dar și capacitate de inducere a procesului de diferențiere a
43 celulelor dendritice derivate din măduva osoasă (**Lee, J.A., Sung, H.N., Jeon, C.H., Gill,
B.C., Oh, G.S., Youn, H.J. et al. (2008). Int Immunopharmacol, 8(4), 534-541**).

45 Se cunosc studii prin care se încearcă combinarea sub diferite forme (filme, pansa-
mente, bureți) a caracteristicilor colagenului cu proprietățile plantelor medicinale în vederea
47 stimulării regenerării tegumentului în cazul rănilor și arsurilor (**Muthukumar T., Sastry T.P.,**

RO 131950 B1

J Colloids and Surface B: Biointerfaces, 2013;113: 207-212; Viji Chandran S., Trikkurmadom S.A., Rajalekshmi G., Sujatha S., Pandimadevi M. and Pandimadevi M., Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 2015;32(2): 193-199). 1
3

De asemenea, brevetul US 5578307/26 Nov 1996 se referă la obținerea de pelete sau sfere conținând extracte de plante, în special Aloe vera și care cuprind o dispersie a extractului de plante într-o matrice compusă predominant dintr-un amestec de colagen, hidrolizat de colagen, gelatină, gelatină fracționată, derivat de gelatină, proteină vegetală, hidrolizat de proteină vegetală și amestecuri ale acestora. Ele sunt stabile la depozitare și caracteristicile lor farmacologice și cosmetice sunt, în esență, nemodificate comparativ cu extractul nativ. 5
7
9

Realizarea de biopreparate pentru vindecarea tegumentului lezat a fost raportată anterior, respectiv în brevetul RO 118929 B1/2004, care descrie un preparat format dintr-o emulsie conținând ulei de in, apă de var și extract alcoolic de muguri de plop și urzică mare precum și în brevetul RO 122181 B1/2009 unde se prezintă compoziția unui hidrogel natural, constituit prin combinarea componentelor: colagen tip I și II, elastina alpha și kappa, glicozaminoglicani, carbomer, extract alcoolic de *Equisetum arvense* și *Achillea millefolium*, nipagin, nipasol și apă distilată. 11
13
15
17

Sunt cunoscute biopreparate peliculogene pe bază de extracte de plante medicinale și colagen hidrolizat cu efect protector, regenerativ și cicatrizant și procedeul de obținere al acestora (Brevetul A/00876 din 07.09.2011). Invenția se referă la un unguent constituit din ceară de albine, cetaceum, vaselină, ulei de măsline, oxid de zinc, fitocomplex liofilizat constituit din coada calului, coada șoricelului, isop și echinaceea, colagen hidrolizat, vitamina E, sulfat de neomicină, extract de sâmburi de grapefruit, ulei de levănțică și apă purificată. 19
21
23

Problema pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui procedeu de obținerea a unui pansament compozit bicompatibil și biodegradabil care stimulează procesul de vindecare a rănilor. 25

Procedeul conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că constă în realizarea unei membrane sau folii spongioase prin amestecarea a 70...90 părți compoziție constituită din 60...80% soluție vâscoasă de colagen tip I cu concentrația de 0,5...1% și 20...40% soluție apoasă de condroitin sulfat cu concentrația de 15...25 mg/ml și soluție apoasă de condroitin sulfat cu 10...30 părți compoziție formată din extract hidroalcoolic de pelin (*Artemisia absinthium*) cu conținut de 5...60 mg/ml polifenoli și 1...10 mg/ml polizaharide, cele două compoziții se amestecă cu agitare puternică timp de 20...60 min la temperatura camerei, amestecul obținut se reticulează cu 5...10 părți soluție de riboflavină cu concentrația de 0,01...0,05% și se condiționează fie prin uscare la 35°C folosind uscătoare cu ventilație pentru a obține membrane omogene, fie se liofilizează prin înghețare la -40°C și uscare la 25...35°C pentru a obține folii spongioase, după care variantele de pansament rezultate se taie la dimensiunile dorite, se ambalează și se sterilizează timp de 8...16 ore prin expunere la radiații UV sau radiații gama. 27
29
31
33
35
37
39

Pansament obținut prin procedeul definit mai sus este constituit din 40...70% gel de colagen tip I cu greutatea moleculară medie 300...350 kDa, 10...30% condroitin sulfat cu greutatea moleculară medie 10...30 kDa, 10...25% extract hidroalcoolic de pelin (*Artemisia absinthium*) conținând 5...60 mg/ml polifenoli, 1...10 mg/ml polizaharide și 0,05...1% riboflavină. 41
43

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje: 45

- suporturile obținute prezintă o eficiență mare în tratarea și vindecarea leziunilor tegumentare (arsuri, răni), conținând în compoziția lor colagen și condroitin sulfat cu efect trofic și epitelizant; 47

RO 131950 B1

1 - timpul de vindecare a tegumentului lezat este semnificativ redus datorită principiilor
active care mimează caracteristicile matricei extracelulare naturale ale țesutului dermic;
3 - produsul prezintă proprietăți antimicrobiene, antiseptice, cicatrizante și antiinflama-
toare, datorită extractului de pelin;
5 - suporturile sunt bidegradabile, biocompatibile, rezistente mecanic și stabile în timp;
- modul de obținere este fezabil și nu necesită echipamente cu grad ridicat de
7 complexitate.

În continuare sunt prezentate 2 exemple de realizare a invenției:

9 **Exemplul 1**

Etapa I

11 Colagenul tip I a fost extras din tendon bovin prin metoda enzimatică, utilizând
pepsina, dizolvată în prealabil într-o soluție de acid acetic 0,5 M, extracția se desfășoară timp
13 de 48 h, la temperatura de 4°C, apoi se realizează o purificare prin precipitare cu NaCl crista-
lizată și în final se dializează față de apa distilată, pentru îndepărtarea urmelor de sare.

15 Părțile aeriene (tulpini, frunze și flori) ale plantei medicinale *Artemisia absinthium*
(pelin) au fost uscate la temperatura camerei timp de 4-5 zile și mărunțite mecanic. Extractul
17 vegetal s-a obținut prin extracție hidroalcoolică în etanol/apă (70/30, v/v) într-un raport
material/solvent de 1:10 (w/v), cu agitare continuă, timp de 8 h. Extractul a fost separat de
19 materialul rezidual prin decantare și filtrare după care s-a concentrat și uscat prin liofilizare.

Etapa II

21 Într-un vas de inox prevăzut cu agitator, se introduc 600 ml soluție de colagen tip I,
cu greutatea moleculară medie de 300 kDa și substanță uscată 0,5% peste care se adaugă
23 sub agitare continuă 200 ml soluție de condroitin sulfat de greutate moleculară medie 20 kDa
și concentrația de 20 mg/ml, preparată în prealabil la temperatura camerei.

25 Separat într-un alt vas de laborator se prepară soluția de extract de pelin prin
dizolvarea a 0,6 g extract liofilizat în 200 ml apă distilată, la temperatura camerei cu agitare
27 intensă, obținând o soluție omogenă ce conține aproximativ 30 mg/ml polifenoli și 5 mg/ml
polizaharide. Soluția astfel obținută se adaugă peste compoziția de colagen și condroitin
29 sulfat, cu agitare continuă, până la omogenizarea completă.

Se obține un hidrogel omogen, transparent care se amestecă sub agitare continuă
31 cu 50 ml soluție riboflavină de concentrație 0,05%, folosită ca agent de rețiculare în vederea
creșterii rezistenței mecanice a compoziției obținute.

33 Gelul compozit astfel obținut se toarnă în tăvițe de inox sau de sticlă și se usucă sub
formă de membrane folosind un uscator cu ventilație, la temperaturi care să nu depășească
35 35°C. După uscare membranele se taie la dimensiunile dorite, se ambalează în pungi de
polietilenă și se sterilizează prin expunere la radiații UV, într-o incintă de sterilizare, timp
37 de 8 h.

39 **Exemplul 2**

Se utilizează colagenul tip I și extractul vegetal obținute ca în exemplul 1, etapa I.
Procedul de obținere al compoziției finale este similar cu cel descris la exemplul 1, cu
41 deosebirea că amestecul de colagen și condroitin sulfat (compoziția I) se prepară din 800 ml
soluție de colagen tip I de concentrație 0,7% și 300 ml soluție de condroitin sulfat cu greu-
43 tatea moleculară medie de 12 kDa și concentrația de 25 mg/ml. Peste această compoziție
se adaugă 300 ml soluție de extract de pelin, cu aceleași caracteristici și condiții de lucru ca
45 în exemplul 1 și apoi se toarnă sub agitare continuă soluția de riboflavină, preparată ca mai
sus. Se obține un amestec sub formă de gel, se condiționează sub formă de folii spongioase
47 prin liofilizare care constă în înghețare la -40°C și uscare la +30°C, timp de 48 h. Materialul
poros, obținut după liofilizare, se taie la dimensiunile dorite, se ambalează în pungi de
49 polietilenă și se sterilizează prin expunere la radiații gamma.

RO 131950 B1

Extractul vegetal obținut din pelin, conform exemplului 1, a fost analizat biochimic demonstrându-se prezența unor cantități semnificative de acizi polifenolici, flavonoide și polizaharide. Experimentele <i>in vitro</i> au demonstrat că extractul vegetal bogat în compuși biologic activi prezintă activități antioxidante, antiinflamatoare (reduce sinteza de interleukine pro-inflamatoare IL-6, IL-1beta și TNF-alfa) și antimicrobiene precum și un grad ridicat de biocompatibilitate dovedit pe culturi de celule fibroblaste. Noile variante de materiale compozite, condiționate ca membrane sau folii spongioase, au fost testate din punct de vedere al efectului lor asupra vindecării rănilor tegumentului folosind modele experimentale <i>in vitro</i> , respectiv teste pe culturi de celule fibroblaste dermale și linii celulare de keratinocite umane (HaKaT). S-au investigat: viabilitatea celulară, proliferarea și morfologia acestora în prezența membranelor/foliilor spongioase de biopreparat conform invenției, comparativ cu substraturi ce conțin numai collagen, condiționate în același mod. Rezultatele obținute au demonstrat că produsul realizat a prezentat proprietăți considerabil îmbunătățite, comparativ cu martorul de collagen, favorizând proliferarea și infiltrarea celulelor în suport, precum și stimularea metabolismului fibroblastelor și keratinocitelor și al sintezei de componente ale noii matrici extracelulare (collagen, glicozaminoglicani), caracteristici importante în funcționarea unui produs destinat vindecării rănilor pielii.	1 3 5 7 9 11 13 15 17
Extractul de pelin adăugat în compoziția biomaterialului compozit a îmbunătățit rezistența acestuia față de infecțiile bacteriene.	19

RO 131950 B1

Revendicări

1

3

5

7

9

11

13

15

1. Procedeu de obținere a unui pansament compozit bicompatibil și biodegradabil, **caracterizat prin aceea că**, constă în realizarea unei membrane sau folii spongioase prin amestecarea a 70...90 părți compoziție constituită din 60...80% soluție vâscoasă de colagen tip I cu concentrația de 0,5...1% și 20...40% soluție apoasă de condroitin sulfat cu concentrația de 15...25 mg/ml și soluție apoasă de condroitin sulfat cu 10...30 părți compoziție formată din extract hidroalcoolic de pelin (*Artemisia absinthium*) cu conținut de 5...60 mg/ml polifenoli și 1...10 mg/ml polizaharide, cele două compoziții se amestecă cu agitare puternică timp de 20...60 min la temperatura camerei, amestecul obținut se reticulează cu 5...10 părți soluție de riboflavină cu concentrația de 0,01...0,05% și se condiționează fie prin uscarea la 35°C folosind uscătoare cu ventilație pentru a obține membrane omogene, fie se liofilizează prin înghețare la -40°C și uscarea la 25...35°C pentru a obține folii spongioase, după care variantele de pansament rezultate se taie la dimensiunile dorite, se ambalează și se sterilizează timp de 8...16 h prin expunere la radiații UV sau radiații gama.

17

19

2. Pansament obținut prin procedeul definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, este constituit din 40...70% gel de colagen tip I cu greutatea moleculară medie 300...350 kDa, 10...30% condroitin sulfat cu greutatea moleculară medie 10...30 kDa, 10...25% extract hidroalcoolic de pelin (*Artemisia absinthium*) conținând 5...60 mg/ml polifenoli, 1...10 mg/ml polizaharide și 0,05...1% riboflavină.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 20/2021