



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 00392**

(22) Data de depozit: **19/06/2017**

(41) Data publicării cererii:  
**28/12/2018** BOPI nr. **12/2018**

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

(72) Inventatori:  
• **PĂUN GABRIELA, STR.OCCIDENTULUI,  
NR.29, POPEȘTI- LEORDENI, IF, RO;**  
• **RADU GABRIEL LUCIAN,  
ALEEA ROTUNDĂ NR 4, BL. H6, SC. D,  
AP. 61, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **NEAGU ELENA, STR. PORȚILE DE FIER  
NR. 40A, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **MOROEANU VERONICA,  
STR. PLT. PETRE IONESCU NR. 51, BL. 7,  
SC. 5, AP. 285, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;**  
• **UNGUREANU OANA RODICA,  
ALEEA SECUIILOR, NR1, BL.2, SC.A, ET.7,  
AP.59, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **PARVULESCU VIORICA,  
STR. AMURGULUI 4G,  
POPEȘTI-LEORDENI, IF, RO;**  
• **NEGREȘ SIMONA, ȘOS.GIURGIULUI  
NR.121, BL.5, SC.2, AP.44, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **ZANFIRESCU ANCA, ALEEA CETĂȚUIA,  
NR.6, BL.M24, SC.7, AP.418, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **IONESCU ELENA,  
STR.ȘTEFAN CEL MARE NR.60,  
PIATRA NEAMȚ, NT, RO**

(54) **BIOVECTOR - COMPLEX DE MEMBRANE DUBLU STRAT  
ȘI PRINCIPII BIOACTIVE CU EFECT ANTIINFLAMATOR,  
ANTIMICROBIAN ȘI CICATRIZANT**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un biovector cu efect antiinflamator, antimicrobian și cicatrizant pentru aplicații topice, și la un procedeu de obținere a acestuia. Biovectorul, conform invenției, este un ansamblu de 2 straturi membranare: un strat membranar poros de chitosan și un strat membranar compozit din alginat de sodiu, eventual cu nano-oxid de silice și un fitocomplex constituit din extracte concentrate de *Symphytum officinale*, *Betonica officinalis*, *Salvia officinalis* și *Impatiens noli-tangere*, în raport volumetric de 1:2:2:2. Procedeu, conform invenției, constă în aceea că în prima etapă se prepară fitocomplexul concentrat, în a

doua etapă se realizează primul strat membranar de chitosan prin dizolvarea chitosanului în acid acetic, în care se adaugă glicerol, după care, în etapa a treia, se prepară al doilea strat membranar compozit prin dizolvarea alginatului de sodiu într-un amestec de apă distilată și fitocomplexul preparat în prima etapă, se adaugă nano-oxid de silice și glicerol, rezultând o soluție polimerică care se toarnă peste membrana de chitosan, și ansamblul se menține în etuvă la 40°C timp de 12...48 h.

Revendicări: 2



## **Biovector - complex de membrane dublu strat si principii bioactive cu efect antiinflamator, antimicrobian si cicatrizant**

Inventia se refera la un biovector biomimetic constand dintr-un complex de membrane dublu strat si un fitocomplex obtinut din extracte concentrate de *Symphytum officinale*, *Betonica officinalis*, *Salvia officinalis* si *Impatiens noli-tangere*, cu efect antiinflamator, antimicrobian si cicatrizant si la procedeul de obtinere al acestuia.

Procesul de vindecare a ranilor se caracterizeaza prin 3 faze: hemostaza, inflamatiya si proliferarea si implica o serie de interactiuni complexe intre diferite tipuri de celule, citokine mediatore si matricea extracelulara. Procesul de vindecare poate fi intarziat de infectia microbiana si de prezenta radicalilor liberi de oxigen.

Principiile active din plante din clasa polifenolilor (flavonoide, acizi fenolici si taninuri), alantoina si acid ascorbic sunt cunoscute pentru efectul lor antioxidant, antiinflamator [1-3] si proprietatile de vindecare a ranilor [4-6]. Cele patru specii de plante medicinale selectate pentru a intra in componenta biovectorului sunt cunoscute ca avand proprietati antioxidante, antiinflamatoare, cicatrizante si hemostatice [7-10].

Una dintre cele mai noi tendinte de cercetare este integrarea de extracte naturale bioactive in materiale pe baza de polimeri (vectori transportori) pentru dezvoltarea de noi tipuri de biovectori. Vectorii de transport sunt utilizati cu succes pentru a controla raportul de eliberare a substantelor active, pentru a obtine o actiune terapeutica retardat a substantei active si pentru a directiona compusii bioactivi la organul tinta. Printre biovectorii care au rol de plasturi cicatrizanti, membranele bi-strat, care constau dintr-un strat exterior dens si un sub-strat poros au o capacitate buna de a accelera procesul de vindecare si in acest scop au fost studiatii o serie de biopolimeri [11-14]. Dintre polimerii naturali, chitosanul si derivatii sai [15-17], precum si alginatii naturali [18,19] datorita faptului ca sunt netoxici, a proprietatilor antimicrobiene si a biocompatibilitatii sunt utilizati in regenerarea tisulara. Chitosanul, dar si alginatii sunt cunoscuti ca avand proprietati hemostatice si bacteriostatice, fapt ce ii recomanda pentru utilizare sub forma de pansamente/bureti/fibre/gel in tratarea ranilor. La nivel tisular chitosanul s-a dovedit a fi un promotor al regenerării dermice și un accelerator al cicatrizării, ceea ce stat la baza studiilor ce au folosit chitosanul de la simple pansamente la matrici tip piele artificială [20]. Unul din efectele chitosanului in procesul de vindecare a ranilor este formarea tesutului de granulatatie cu angiogeneza. De asemenea o serie de materiale anorganice, pe baza de silice mezo-si

*Quer*

nanoporoase (ex. SBA-15, MCM-41) au fost utilizate ca transportori pentru medicamente eliberate controlat [21, 22].

Se cunosc o serie de brevete de inventie care se refera la biomateriale pe baza de chitosan (RO 129428 A2; RO 127378 A0; US 4572906 ; US 4956350; US5395305; EP1401352 B1), brevetul U.S. Patent 4532134 se refera la efectul hemostatic si de regenerare tisulara al chitosanului, brevete referitoare la biomateriale pe baza de alginati (Patents US No.2512616; 3879168; 4948575; 5470576, precum si British Patents GB 2221620A), iar brevetul US Patent 5836970 se refera la un pansament format dintr-un amestec de chitosan si alginat.

Prezenta inventie se refera la un biovector reprezentat de un complex de membrane dublu strat si un fitocomplex continand principii active obtinut din extractele concentrate de *Symphytum officinale*, *Betonica officinalis*, *Salvia officinalis* si *Impatiens noli-tangere*, precum si la procedeul de obtinere al acestuia. Biovectorul se poate utiliza in aplicatii topice actionand ca hemostatic si de refacere a tesutului epitelial datorita celor doua straturi membranare din chitosan si respectiv alginat, precum si prin eliberarea principiilor active din fitocomplex actioneaza ca antiinflamator, antimicrobian si cicatrizant pentru prevenirea si tratarea ranilor infectate.

Procedeul de obtinere a biovectorului cu efect antiinflamator, antimicrobian si cicatrizant, conform inventiei, consta din doua etape:

- prima etapa consta din realizarea fitocomplexului concentrat continand 1.8 ..... 2.2 g/L polifenoli totali si 1.5 ..... 1.8 g/L flavone, preparat din extractele concentrate de *Symphytum officinale* (radacina), *Betonica officinalis* (parte aeriana), *Salvia officinalis* (parte aeriana) si *Impatiens noli-tangere* (parte aeriana) in raport volumetric de 1:2:2:2; extractele din cele patru specii vegetale au fost obtinute prin **extractie cu ultrasunete** sau **tehnici conventionale** (la reflux si la temperatura camerei) utilizand ca solvent etanol si au fost ulterior prelucrate succesiv prin microfiltrare si **concentrate prin nanofiltrare**. Fitocomplexul concentrat este caracterizat din punct de vedere al continutului in compusii biologic activi (polifenoli, flavone, antociani) calitativ prin HPLC si cantitativ prin metode spectrofotometrice si al efectului antimicrobian si antiinflamator.

- a doua etapa consta din realizarea si asamblarea membranelor dublu strat: primul strat este reprezentat de o membrana poroase din chitosan, preparata prin dizolvarea chitosanului (2% w/v) intr-o solutie de acid acetic 1 ... 2% (v/v), in care se adauga glicerol (3 .... 4 % w/v) ; al doilea strat membranar este reprezentat de membrana compozita (rezervor de principii active) din alginat de sodiu cu sau fara nano-oxid de silice (KIT-6-NH<sub>2</sub>) si fitocomplexul concentrat preparat in etapa anterioara.

Prezenta inventie prezinta urmatoarele avantaje:

- biovectorii au in componenta lor exclusiv compusi netoxici, biodegradabili si biocompatibili;
- asocierea ansamblului dublu strat format din membrana de chitosan si cea compozita pe baza de alginat de sodiu si fitocomplex asigura o eficienta ridicata in tratarea ranilor datorita proprietatilor hemostatice, antiinflamatoare si antimicrobiene.

Se prezinta in continuare 2 exemple de realizare a inventiei.

### Exemplul 1

In prima etapa se realizeaza extracte hidroalcoolice prin amestecul a 160...200 g din fiecare planta fin maruntita, cu ajutorul unei mori de macinare, cu 2 L alcool etilic 50% pentru extractele de *Betonica officinalis* (parte aeriana), *Salvia officinalis* (parte aeriana) si *Impatiens noli-tangere* (parte aeriana) si respectiv 80% pentru extractul de *Symphytum officinale* (radacina), amestec supus **extractiei cu ultrasunete** sau prin **tehnici conventionale** (la reflux), la temperatura camerei. Solutiile extractive se filtreaza grosier, se microfiltreaza si sunt **concentrate prin nanofiltrare**, utilizand membrane de nanofiltrare NF90 cu cut-off ~200-400 Da. Fitocomplexul concentrat este preparat din extractele concentrate de *Betonica officinalis*, *Salvia officinalis*, *Impatiens noli-tangere* si *Symphytum officinale* in raport volumetric de 2:2:2:1.

Fitocomplexul concentrat prezinta urmatoarele caracteristici:

- continut total de polifenoli: 1.2 .... 2.5 g/L (exprimati in acid galic)
- continut de flavone : 1.2 .... 2.0 g/L (exprimate in quercetin)

In a doua etapa, se realizeaza primul strat membranar reprezentat de o membrana poroasa din chitosan, preparata prin dizolvarea a 15....20 g chitosan cu masa moleculara medie in 1 L solutie acid acetic de concentratie 1-2% (v/v), in care se adauga 30....40 mL glicerol, ca porogen si plastifiant. Solutia polimerica se toarna in placi Petri si se tine la freezer la -24°C timp de 1-2 h, apoi timp de 1 h la temperatura de 80°C si in final 12-24 h la temperatura de 40°C.

Se prepara al doilea strat membranar reprezentat de membrana compozita din alginat de sodiu cu nano-oxid de silice (KIT-6-NH<sub>2</sub>) si fitocomplex concentrat. Se dizolva 20....30 g alginat de sodiu intr-un amestec format din 0.5 L apa distilata si 0.5 L fitocomplex concentrat, se adauga 0.5...1 g nano-oxidul de silice (KIT-6-NH<sub>2</sub>) si 60....80g glicerol. Solutia polimerica obtinuta este turnata peste membrana de chitosan, iar evaporarea solventului pentru acest al doilea strat membranar se realizeaza prin introducerea ei in etuva la 40°C pentru cca. 12-48 h.

## Exemplul 2

Se prepara prin aceeași metoda fitocomplexul concentrat și membrana poroasă din chitosan.

Al doilea strat membranar se prepara prin dizolvarea a 20...30 g alginat de sodiu într-un amestec format din 0.5 L apă distilată și 0.5 L fitocomplex concentrat în care se adaugă 60...80g glicerol. Soluția polimerică obținută este turnată peste membrana de chitosan, iar evaporarea solventului pentru acest al doilea strat membranar se realizează prin introducerea ei în etuvă la 40°C pentru cca. 12-24 h.

Fitocomplexul concentrat a fost analizat chimic, determinându-se cantitativ compuși polifenolici totali și flavonoide prin spectrofotometrie, precum și prin cromatografie lichidă HPLC.

De asemenea, fitocomplexul concentrat a fost caracterizat din punct de vedere al **activității antioxidante** prin metoda inhibiției DPPH și ABTS, **antimicrobiană** prin metoda difuzimetrică pe următoarele tulpini bacteriene patogene: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (gram pozitive), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25992 (gram negativ) și **anti-inflamatoare in vitro** prin inhibiția enzimelor ciclooxigenază (COX-1) și lipooxigenază (LOX). Rezultatele obținute au arătat o puternică activitate antioxidantă (88.1% inhibiție DPPH și 97.6% inhibiție ABTS), o activitate antimicrobiană mai ridicată asupra bacteriilor *S. Aureus* și *S. Epidermidis* și anti-inflamatoare (44.6% inhibiție LOX și 65.8% inhibiție COX-1).

Biovectorii realizați conform prezentei invenții (din exemplele 1 și 2) au fost testați *in vivo* din punct de vedere al toxicității și al efectelor farmacologice. Studiile de toxicitate în doză unică, pe rozătoare mici, au urmărit toxicitatea locală constatându-se că aceștia au fost bine tolerați de animalele de laborator testate. Efectul cicatrizant și anti-inflamator a fost demonstrat pe șobolani albi Wistar, masculi, proveniți din biobază U.M.F. „Carol Davila” București. De asemenea, a fost studiată eliberarea în timp a compușilor polifenolici din biovectorii realizați conform prezentei invenții.

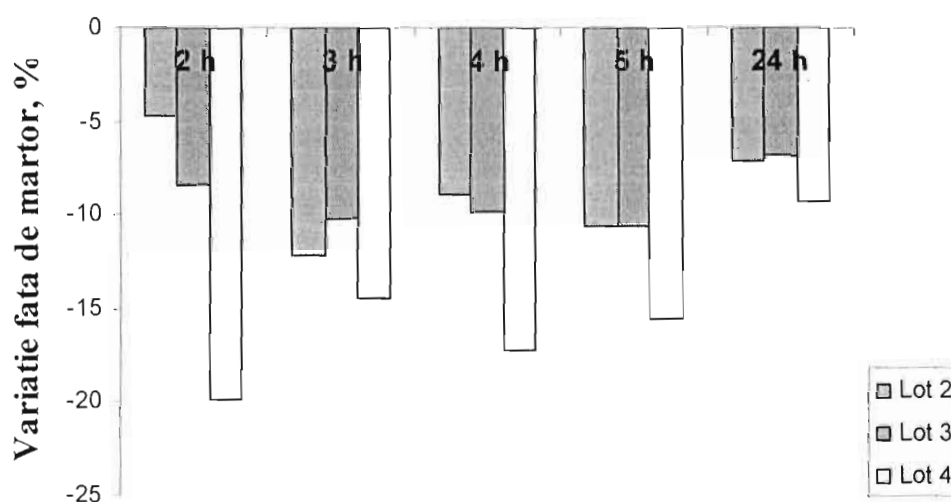
Toate rezultatele privind activitatea biologică a biovectorilor care fac obiectul prezentei invenții sunt prezentate în tabelele 1 și 2 și figurile 1-3.

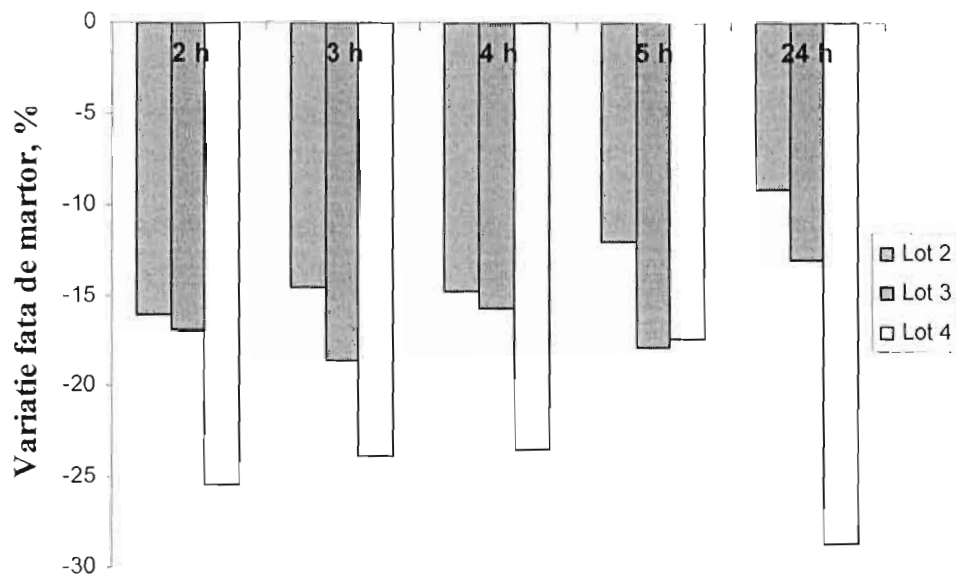
**Tabelul 1** Activitatea antimicrobiana si antioxidanta a fitocomplexului concentrat

Activitate antimicrobiana, diametrul zonei de inhibitie (mm)	Tulpini patogene	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	15
		<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	12
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	3
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25992	12
Activitate antioxidanta, %		Inhibitie DPPH	88.1
		Inhibitie ABTS	97.6

**Testarea *in vivo* a actiunii cicatrizante (modelul arsurii)****Tabelul 2** Evolutia ariei leziunii termice

	Aria leziunii, medie			
	Ziua 1	Ziua 2	Ziua 4	Ziua 7
Lot 1 (martor, fara tratament)	304,01	278,43	256,22	237,62
Lot 2 (control)	325,86	261,24	214,02	197,77
Lot 3 (biovector exemplul 1)	303,27	225,21	196,97	175,69
Lot 4 (biovector exemplul 2)	298,08	219,26	163,62	144,94

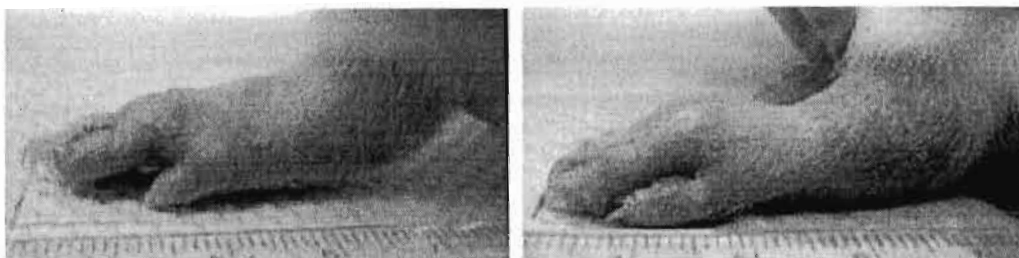
**Testarea *in vivo* a actiunii antiinflamatoare****Fig. 1** Determinărilor plethysmometrice pentru animalele tratate cu biovectorii din prezenta inventie în cazul inflamatiei induse cu dextran; Lotul 2 = control (diclofenac)



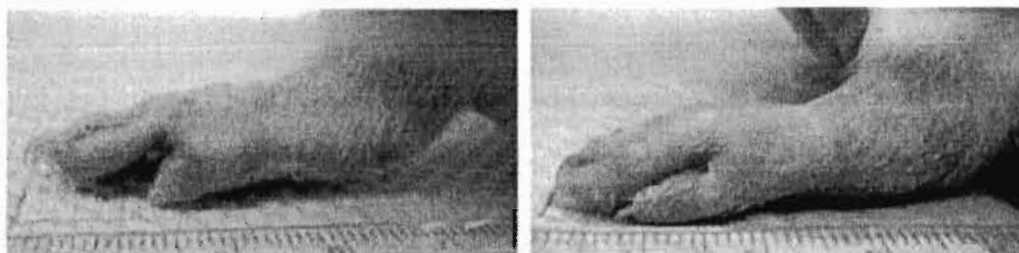
**Fig. 2** Determinărilor pletismometrice pentru animalele tratate cu biovectorii din prezenta invenție în cazul inflamației induse cu caolin; Lotul 2 = control (diclofenac)

Aspectul membrilor inferioare ale sobolanilor testati pentru ambele modele de inducere a inflamației, la 24 de ore după inducerea inflamației este prezentată în figura 5.

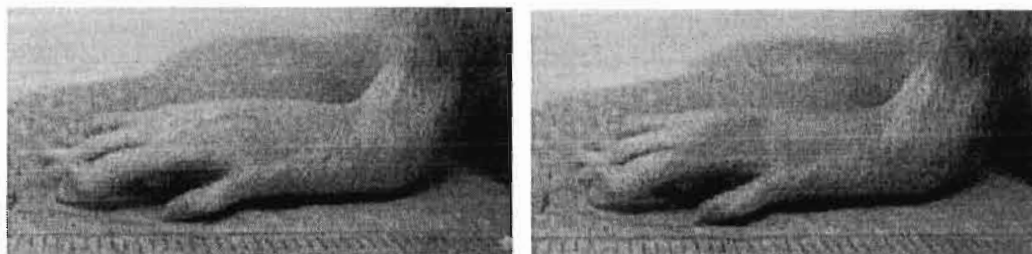
**Martor**



**Lot 3**  
(Biovector  
exemplul 1)



**Lot 4**  
(Biovector  
exemplul 2)



**Fig. 3**

*ues*



Biovectorii obtinuti conform exemplor 1 si 2 ale prezentei inventii prezintă o actiune antiinflamatorie intensă, în ambele modele utilizate. Mai mult, efectul antiinflamator este semnificativ superior celui al diclofenacului si persistă mai mult de 24 de ore, după cum demonstrează rezultatele obtinute în cazul modelului de inflamatie indusă cu caolin.

## Referinte

1. Esposito, D., Chen, A., Grace, M. H., Komarnytsky, S., Lila, M. A. (2014). Inhibitory effects of wild blueberry anthocyanins and other flavonoids on biomarkers of acute and chronic inflammation in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 62(29), 7022-7028.
2. González, R., Ballester, I., López-Posadas, R., Suárez, M.D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., Sánchez de Medina, F. (2011). Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51(4), 331-362.
3. Sarkar, S., Mazumder, S., Saha, S. J., Bandyopadhyay, U. (2016). Management of inflammation by natural polyphenols: A comprehensive mechanistic update. *Curr. Med. Chem.* 23(16), 1657-1695.
4. Działo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J., Kulma, A. (2016). The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 17(2) doi:10.3390/ijms17020160
5. Kundu, A., Ghosh, A., Singh, N. K., Singh, G. K., Seth, A., . . . , Laloo, D. (2016). Wound healing activity of the ethanol root extract and polyphenolic rich fraction from *potentilla fulgens*. *Pharm. Biol.* 54(11), 2383-2393.
6. Ponnusamy, Y., Chear, N. J., Ramanathan, S., Lai, C. -. (2015). Polyphenols rich fraction of *dicranopteris linearis* promotes fibroblast cell migration and proliferation in vitro. *J. Ethnopharm.* 168, 305-314.
7. Staiger, C. (2013). Comfrey root: From tradition to modern clinical trials. *Wien Med Wochenschr.* 163(3-4), 58-64.
8. Ghorbani, A., Esmaeilzadeh, M. (2017, in press). Pharmacological properties of *salvia officinalis* and its components. *J. Tradit. Complement. Med.* doi:10.1016/j.jtcme.2016.12.014
9. Albano, S.M., Miguel, M.G. (2011) Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Ind. Crop. Prod.* 33, 338-343
10. Dawid-Pač, R. (2013). Medicinal plants used in treatment of inflammatory skin diseases. *Postepy Dermatol. Alergol.* 30(3), 170-177.
11. Hinrichs, L.J., Lommen, E.J., Wildevuur, C.R.H., Feijen, J. (1992). Fabrication and characterization of an asymmetric polyurethane membrane for use as a wound dressing. *J. Appl. Biomater.* 3, 287-303.
12. Mi, F.L., Shyu, S.S., Wu, Y.B. et al. (2001). Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials* 22, 165-173.
13. Ye, S.Q., Wang, C.H.Y., Liu, X.X., Tong, Z.H. (2005). Deposition temperature effect on release rate of indomethacin microcrystals from microcapsules of layer-by-layer assembled chitosan and alginate multilayer films. *J. Controlled Release* 106, 319-328.



14. Hoffman, S. (2002). Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54(1), 3-12.
15. Ishihara, M., Ono, K., Sato, M., Nakanishi, K., Saito, Y., Yura, H., ..., Kurita, A. (2001). Acceleration of wound contraction and healing with a photocrosslinkable chitosan hydrogel. *Wound Repair Regen.* 9(6), 513 -521.
16. Ueno, H, Mori, T, Fujinaga, T. (2001). Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev.* 52, 105–115 .
17. Howling, G.I., Dettmar, P.W., Goddard, P.A., Hampson, F.C., Dornish, M., Wood, E.J. (2001). The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials* 22, 2959-2966
18. Liakos, I., Rizzello, L., Scurr, D. J., Pompa, P. P., Bayer, I. S., Athanassiou, A. (2014). All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties. *Int. J. Pharm.* 463(2), 137-145.
19. Pereira, R., Carvalho, A., Vaz, D. C., Gil, M. H., Mendes, A., Bártolo, P. (2013). Development of novel alginate based hydrogel films for wound healing applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 52(1), 221-230.
20. Esmaeili, F., Heuking, S., Junginger, H.E., Borchard, G. J. (2010). Progress in chitosan-based vaccine delivery systems. *Drug Del Sci. Tech.* 20, 53–61.
21. Andersson, J., Rosenholm, J., Areva, S., Lindén, M. (2004). Influences of material characteristics on ibuprofen drug loading and release profiles from ordered micro- and mesoporous silica matrices. *Chem. Mater.* 16, 4160-4167.
22. Yu, H., Zhai, Q-Z. (2009). Mesoporous SBA-15 molecular sieve as a carrier for controlled release of nimodipine. *Micropor. Mesopor. Mat.* 123 (1-3), 298-305.

## REVENDICĂRI

1. Procedul de obtinere a biovectorilor cu actiune antiinflamatoare descris in inventie caracterizat prin asamblarea a doua straturi membranare, primul fiind membrana poroasa din chitosan cu adaos de glicerol obtinuta prin dizolvarea chitosanului 1-3 % (w/v) intr-o solutie de acid acetic de concentratie 1-2% (v/v) si 2-6% (w/v) glicerol, care se toarna in placi Petri si se tine la freezer la -24°C timp de 1-2 h, apoi timp de 1 h la temperatura de 80°C si in final 12-24 h la temperatura de 40 .... 50°C, si cel de-al doilea strat membranar reprezentat de o membrana compozita din alginat de sodiu, glicerol, fitocomplex concentrat, cu sau fara adaos de nano-oxid de silice (KIT-6-NH<sub>2</sub>), preparata prin dizolvarea alginatului de sodiu in concentratie de 2-4% (w/v) intr-un amestec de apa distilata 70 ... 40 parti si fitocomplex concentrat 30 .... 60 parti, glicerol 4-10% (w/v), cu sau fara adaos de nano-oxid de silice (KIT-6-NH<sub>2</sub>) 0.5 - 2% (w/v), turnata peste membrana de chitosan, iar evaporarea solventului pentru acest al doilea strat membranar se realizeaza in etuva la 40 .... 50°C pentru cca. 12-48 h.

2. Fitocomplex concentrat cu actiune antioxidanta si antiinflamatoare obtinut prin nanofiltrare din combinatia de extracte hidroalcoolice de *Betonica officinalis*, *Salvia officinalis*, *Impatiens noli-tangere* si *Symphytum officinale* in raport volumetric de 2:2:2:1, avand un continut total de polifenoli de 1.2 – 2.5 g/L (exprimati in acid galic) si continut de flavone de 1.2 – 2.0 g/L (exprimate in quercetin).