



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

- (21) Nr. cerere: **a 2017 00392**
- (22) Data de depozit: **19/06/2017**
- (45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/03/2023** BOPI nr. **3/2023**

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

(73) Titular:  
• **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 NEAMȚI, NT, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**CN 10159738 A**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI BIOVECTOR  
CU ACȚIUNE ANTIINFLAMATOARE, ANTIMICROBIANĂ  
ȘI CICATRIZANTĂ**



# RO 132969 B1

1           Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biovector cu acțiune antiinflamatoare, antimicrobiană și cicatrizantă. Biovectorul biomimetic constă dintr-un complex de  
3           membrane dublu strat și un fitocomplex obținut din extracte concentrate de *Symphytum officinale*,  
5           *Betonica officinalis*, *Salvia officinalis* și *Impatiens noli-tangere*, cu efect antiinflamator, antimicrobian și cicatrizant.

7           Procesul de vindecare a rănilor se caracterizează prin 3 faze: hemostaza, inflamația și proliferarea și implică o serie de interacțiuni complexe între diferite tipuri de celule, citokine  
9           mediatoare și matricea extracelulară. Procesul de vindecare poate fi întârziat de infecția microbiană și de prezența radicalilor liberi de oxigen.

11          Principiile active din plante din clasa polifenolilor (flavonoide, acizi fenolici și taninuri),  
13          alantoina și acid ascorbic sunt cunoscute pentru efectul lor antioxidant, antiinflamator [1-3] și proprietățile de vindecare a rănilor [4-6]. Cele patru specii de plante medicinale selectate  
15          pentru a intra în componența biovectorului sunt cunoscute ca având proprietăți antioxidante, antiinflamatoare, cicatrizante și hemostatice [7-10].

17          Una dintre cele mai noi tendințe de cercetare este integrarea de extracte naturale bioactive în materiale pe bază de polimeri (vectori transportori) pentru dezvoltarea de noi  
19          tipuri de biovectori. Vectorii de transport sunt utilizați cu succes pentru a controla raportul de eliberare a substanțelor active, pentru a obține o acțiune terapeutică retardat a substanței  
21          active și pentru a direcționa compușii bioactivi la organul țintă. Printre biovectorii care au rol de plasturi cicatrizanți, membranele bi-strat, care constau dintr-un strat exterior dens și un  
23          sub-strat poros au o capacitate bună de a accelera procesul de vindecare și în acest scop au fost studiați o serie de biopolimeri [11-14]. Dintre polimerii naturali, chitosanul și derivații  
25          săi [15-17], precum și algiinații naturali [18,19] datorită faptului că sunt netoxici, a proprietăților antimicrobiene și a biocompatibilității sunt utilizați în regenerarea tisulară.  
27          Chitosanul, dar și algiinații sunt cunoscuți ca având proprietăți hemostatice și bacteriostatice, fapt ce îi recomandă pentru utilizare sub formă de pansamente/bureți/fibre/gel în tratarea  
29          rănilor. La nivel tisular chitosanul s-a dovedit a fi un promotor al regenerării dermice și un accelerator al cicatrizării, ceea ce a stat la baza studiilor ce au folosit chitosanul de la simple  
31          pansamente la matrici tip piele artificială [20]. Unul din efectele chitosanului în procesul de vindecare a rănilor este formarea țesutului de granulație cu angiogeneza. De asemenea o  
33          serie de materiale anorganice, pe bază de silice mezo- și nanoporoase (exemplu: SBA-15, MCM-41) au fost utilizate ca transportori pentru medicamente eliberate controlat [21, 22].

35          Se cunosc o serie de brevete de invenție care se referă la biomateriale pe bază de chitosan (**RO 129428 A2**; **RO 127378 AO**; **US 4572906**; **US 4956350**; **US 5395305**;  
37          **EP 1401352 B1**), brevetul **US 4532134** se referă la efectul hemostatic și de regenerare tisulară al chitosanului, brevete referitoare la biomateriale pe bază de algiinați (Patents  
39          **US 2512616**; **3879168**; **4948575**; **5470576**, precum și British Patents **GB 2221620 A**), iar brevetul **US 5836970** se referă la un pansament format dintr-un amestec de chitosan și  
41          alginat.

43          Prezenta invenție se referă la un biovector reprezentat de un complex de membrane dublu strat și un fitocomplex conținând principii active obținut din extractele concentrate de  
45          *Symphytum officinale*, *Betonica officinalis*, *Salvia officinalis* și *Impatiens noli-tangere*, precum și la procedeul de obținere al acestuia. Biovectorul se poate utiliza în aplicații topice  
47          acționând ca hemostatic și de refacere a țesutului epitelial datorită celor două straturi membranare din chitosan și respectiv alginat, precum și prin eliberarea principiilor active din  
49          fitocomplex acționează ca antiinflamator, antimicrobian și cicatrizant pentru prevenirea și tratarea rănilor infectate.

# RO 132969 B1

Procedeul de obținere a biovectorului cu efect antiinflamator, antimicrobian și cicatrizant, conform invenției, constă din două etape:	1
- prima etapă constă din realizarea fitocomplexului concentrat conținând 1,8...2,2 g/L polifenoli totali și 1,5...1,8 g/L flavone, preparat din extractele concentrate de <i>Symphytum officinale</i> (rădăcina), <i>Betonica officinalis</i> (parte aeriană), <i>Salvia officinalis</i> (parte aeriană) și <i>Impatiens noli-tangere</i> (parte aeriană) în raport volumetric de 1:2:2:2; extractele din cele patru specii vegetale au fost obținute prin extracție cu ultrasunete sau tehnici convenționale (la reflux și la temperatura camerei) utilizând ca solvent etanol și au fost ulterior prelucrate succesiv prin microfiltrare și concentrate prin nanofiltrare. Fitocomplexul concentrat este caracterizat din punct de vedere al conținutului în compuși biologic activi (polifenoli, flavone, antociani) calitativ prin HPLC și cantitativ prin metode spectrofotometrice și al efectului antimicrobian și antiinflamator;	3 5 7 9 11
- a doua etapă constă din realizarea și asamblarea membranelor dublu strat: primul strat este reprezentat de o membrană poroasă din chitosan, preparată prin dizolvarea chitosanului (2% g/v) într-o soluție de acid acetic 1...2% (v/v), în care se adaugă glicerol (3...4% g/v); al doilea strat membranar este reprezentat de membrana compozită (rezervor de principii active) din alginat de sodiu cu sau fără nano-oxid de silice (KIT-6-NH <sub>2</sub> ) cu rol în imobilizarea compușilor bioactivi din fitocomplex și fitocomplexul concentrat preparat în etapa anterioară.	13 15 17 19
Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje:	
- biovectorii au în componența lor exclusiv compuși netoxici, biodegradabili și biocompatibili;	21
- asocierea ansamblului dublu strat format din membrana de chitosan și cea compozită pe bază de alginat de sodiu și fitocomplex asigură o eficiență ridicată în tratarea rănilor datorită proprietăților hemostatice, antiinflamatoare și antimicrobiene.	23 25
Se prezintă în continuare 2 exemple de realizare a invenției.	
<b>Exemplul 1</b>	27
În prima etapă se realizează extracte hidroalcoolice prin amestecul a 160...200 g din fiecare plantă fin mărunțită, cu ajutorul unei mori de măcinare, cu 2 L alcool etilic 50% pentru extractele de <i>Betonica officinalis</i> (parte aeriană), <i>Salvia officinalis</i> (parte aeriană) și <i>Impatiens noli-tangere</i> (parte aeriană) și respectiv 80% pentru extractul de <i>Symphytum officinale</i> (rădăcina), amestec supus extracției cu ultrasunete sau prin tehnici convenționale (la reflux), la temperatura camerei. Soluțiile extractive se filtrează grosier, se microfiltrează și sunt concentrate prin nanofiltrare, utilizând membrane de nanofiltrare NF90 cu cut-off-200-400 Da. Fitocomplexul concentrat este preparat din extractele concentrate de <i>Betonica officinalis</i> , <i>Salvia officinalis</i> , <i>Impatiens noli-tangere</i> și <i>Symphytum officinale</i> în raport volumetric de 2:2:2:1.	29 31 33 35 37
Fitocomplexul concentrat prezintă următoarele caracteristici:	
- conținut total de polifenoli: 1,2...2,5 g/L (exprimați în acid galic);	39
- conținut de flavone: 1,2...2,0 g/L (exprimate în quercetin).	
În a doua etapă, se realizează primul strat membranar reprezentat de o membrană poroasă din chitosan, preparată prin dizolvarea a 15...20 g chitosan cu masa moleculară medie în 1 L soluție acid acetic de concentrație 1-2% (v/v), în care se adaugă 30...40 mL glicerol, ca porogen și plastifiant. Soluția polimerică se toarnă în plăci Petri și se ține la freezer la -24°C timp de 1-2 h, apoi timp de 1 h la temperatura de 80°C și în final 12-24 h la temperatura de 40°C. Se preparară al doilea strat membranar reprezentat de membrana compozită din alginat de sodiu cu nano-oxid de silice (KIT-6-NH <sub>2</sub> ) și fitocomplex concentrat. Se dizolvă 20...30 g alginat de sodiu într-un amestec format din 0,5 L apă distilată și 0,5 L	41 43 45 47

# RO 132969 B1

1 fitocomplex concentrat, se adaugă 0,5...1 g nano-oxidul de silice (KIT-6-NH<sub>2</sub>) și 60...80 g  
2 glicerol. Soluția polimerică obținută este turnată peste membrana de chitosan, iar evaporarea  
3 solventului pentru acest al doilea strat membranar se realizează prin introducerea ei în etuvă  
la 40°C pentru circa 12-48 h.

## 5 Exemplul 2

6 Se prepară prin aceeași metodă fitocomplexul concentrat și membrana poroasă din  
7 chitosan. Al doilea strat membranar se prepară prin dizolvarea a 20...30 g alginat de sodiu  
8 într-un amestec format din 0,5 L apă distilată și 0,5 L fitocomplex concentrat în care se  
9 adaugă 60...80 g glicerol. Soluția polimerică obținută este turnată peste membrana de  
chitosan, iar evaporarea solventului pentru acest al doilea strat membranar se realizează prin  
11 introducerea ei în etuvă la 40°C pentru circa 12-24 h.

12 Fitocomplexul concentrat a fost analizat chimic, determinându-se cantitativ compușii  
13 polifenolici totali și flavonoide prin spectrofotometrie, precum și prin cromatografie lichidă  
HPLC. De asemenea, fitocomplexul concentrat a fost caracterizat din punct de vedere al  
15 activității antioxidante prin metoda inhibiției DPPH și ABTS, antimicrobiană prin metoda  
difuzimetrică pe următoarele tulpini bacteriene patogene: *Staphylococcus aureus* ATCC  
17 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (gram pozitive), *Pseudomonas aeruginosa*  
ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25992 (gram negative) și antiinflamatoare *in vitro* prin  
19 inhibiția enzimelor ciclooxigenaza (COX-1) și lipooxigenaza (LOX). Rezultatele obținute au  
arătat o puternică activitate antioxidantă (88,1% inhibiție DPPH și 97,6% inhibiție ABTS), o  
21 activitate antimicrobiană mai ridicată asupra bacteriilor *S. Aureus* și *S. Epidermidis* și  
antiinflamatoare (44,6% inhibiție LOX și 65,8% inhibiție COX-1).

22 Biovectorii realizați conform prezentei invenții (din exemplele 1 și 2) au fost testați *in*  
23 *vivo* din punct de vedere al toxicității și al efectelor farmacologice. Studiile de toxicitate în  
24 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  
27 demonstrat pe șobolani albi Wistar, masculi, proveniți din biobaza U.M.F. „Carol Davila”  
București. De asemenea, a fost studiată eliberarea în timp a compușilor polifenolici din  
29 biovectorii realizați conform prezentei invenții.

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

## 33 Activitatea antimicrobiană și antioxidantă a fitocomplexului concentrat

Tabelul 1

35 Activitate antimicrobiană, diametrul zonei de inhibiție (mm)	37 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
41 Activitate antioxidantă, %		Inhibiție DPPH	88,1
		Inhibiție ABTS	97,6

## 43 Testarea *in vivo* a acțiunii cicatrizante (modelul arsurii)

# RO 132969 B1

## Evoluția ariei leziunii termice

Tabelul 2

	Aria leziunii, medie			
	Ziua 1	Ziua 2	Ziua 4	Ziua 7
Lot 1 (martor, fără 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	144,9

### Testarea in vivo a acțiunii antiinflamatoare

Aspectul membrelor inferioare ale șobolanilor testați pentru ambele modele de inducere a inflamației, la 24 h după inducerea inflamației este prezentată în fig. 3.

Biovectorii obținuți conform exemplelor 1 și 2 ale prezentei invenții prezintă o acțiune antiinflamatorie intensă, în ambele modele utilizate. Mai mult, efectul antiinflamator este semnificativ superior celui al diclofenacului și persistă mai mult de 24 h, după cum demonstrează rezultatele obținute în cazul modelului de inflamație indusă cu caolin.

### Bibliografie

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., Lopez-Posadas R., Suárez M.D., Zarzuelo A., Martinez-Augustin O., Sánchez de Medina, F. (2011). *Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation*. Crit. Rev. FoodSci. 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. Dzialo 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/ijms 17020160.
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, în press). *Pharmacological properties of salvia officinalis and its components*. J. Tradit. Complement. Med. doi:10.1016/j.jtcrne.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.

# RO 132969 B1

- 1           10. Dawid-Pac R. (2013). *Medicinal plants used in treatment of inflammatory skin*  
diseases. *Postepy Dermatol. Alergol.* 30(3), 170-177.
- 3           11. Hinrichs L.J., Lommen E.J., Wildevuur C.R.H., Feijen J. (1992). *Fibration and*  
characterization of an asymmetric polyurethane membrane for use as a wound dressing. *J.*  
5 *Appl. Biomater.* 3, 287-303.
- 7           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.
- 9           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  
11 assembled chitosan and alginate multilayer films. *J. Controlled Release* 106, 319-328.
- 13          14. Hoffman S. (2002). *Hydrogels for biomedical applications.* *Adv. Drug Deliv. Rev.*  
54(1), 3-12.
- 15          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.*  
17 *Wound Repair Regen.* 9(6), 513-521.
- 19          16. Ueno H., Mori T., Fujinaga T. (2001). *Topical formulations and wound healing*  
applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev.* 52, 105-115.
- 21          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*  
23 *keratinocytes in vitro.* *Biomaterials* 22, 2959-2966.
- 25          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.
- 27          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.*  
29 *Biol. Macromol.* 52(1), 221-230.
- 31          20. Esmaili F., Heuking S., Junginger H.E., Borchard G. J. (2010). *Progress in*  
*chitosan-based vaccine delivery systems.* *Drug Del Sci. Tech.* 20, 53-61.
- 33          21. Andersson J., Rosenholm J., Areva S., Linden 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.

# RO 132969 B1

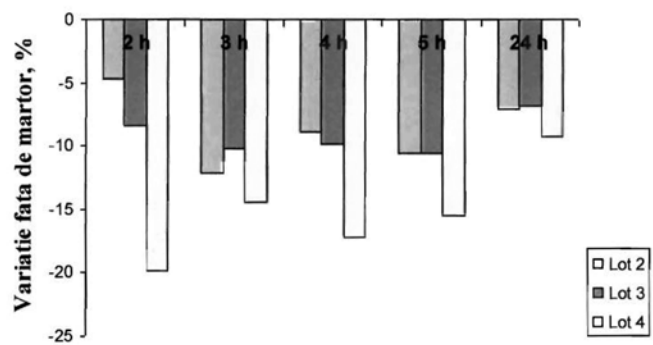
## Revendicări

1. Procedeu de obținere a unui biovector cu acțiune antiinflamatoare, antimicrobiană și cicatrizantă, **caracterizat prin aceea că**, se assemblează două straturi membranare, primul este membrana poroasă din chitosan cu adaos de glicerol obținută prin dizolvarea chitosanului 1-3% (g/v) într-o soluție de acid acetic de concentrație 1-2% (v/v) și 2-6% (g/v) glicerol, care se toarnă în plăci Petri și se ține la congelator la -24°C timp de 1-2 h, apoi timp de 1 h la temperatura de 80°C și în final 12-24 h la temperatura de 40...50°C, și cel de-al doilea strat membranar reprezentat de o membrană compozită din alginat de sodiu, glicerol, fitocomplex concentrat, cu sau fără adaos de nano-oxid de silice (KIT-6-NH<sub>2</sub>), preparată prin dizolvarea alginatului de sodiu în concentrație de 2-4% (g/v) într-un amestec de apă distilată 70...40 părți (g/v) și fitocomplex concentrat 30...60 părți (g/v), glicerol 4-10% (g/v), cu sau fără adaos de nano-oxid de silice (KIT-6-NH<sub>2</sub>) 0,5-2% (g/v) cu rol în imobilizarea compușilor bioactivi, turnată peste membrana de chitosan, iar evaporarea solventului pentru acest al doilea strat membranar se realizează în etuvă la 40...50°C pentru 12-48 h.
2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, fitocomplexul concentrat cu acțiune antioxidantă și antiinflamatoare este constituit dintr-o combinație de extracte hidroalcoolice concentrate de *Betonica officinalis*, *Salvia officinalis*, *Impatiens noli-tangere* și *Symphytum officinale* în raport volumetric de 2:2:2:1, având un conținut total de polifenoli de 1,2-2,5 g/L (exprimați în acid galic) și conținut de flavone de 1,2-2,0 g/L (exprimate în quercetină).

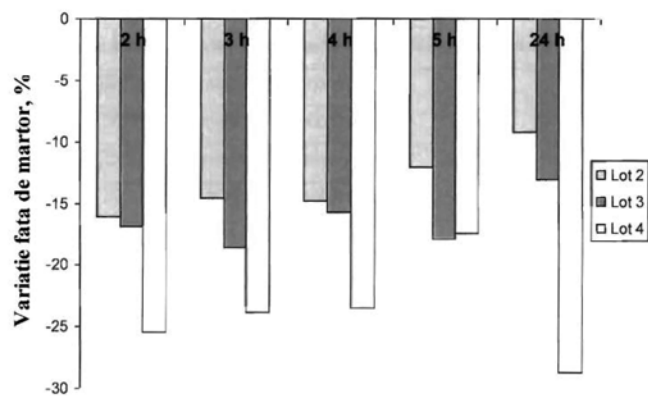
(51) Int.Cl.

**A61K 9/66** (2006.01);

**A61P 29/02** (2006.01)



**Fig. 1**



**Fig. 2**



(51) Int.Cl.

A61K 9/66<sup>(2006.01)</sup>,

A61P 29/02<sup>(2006.01)</sup>

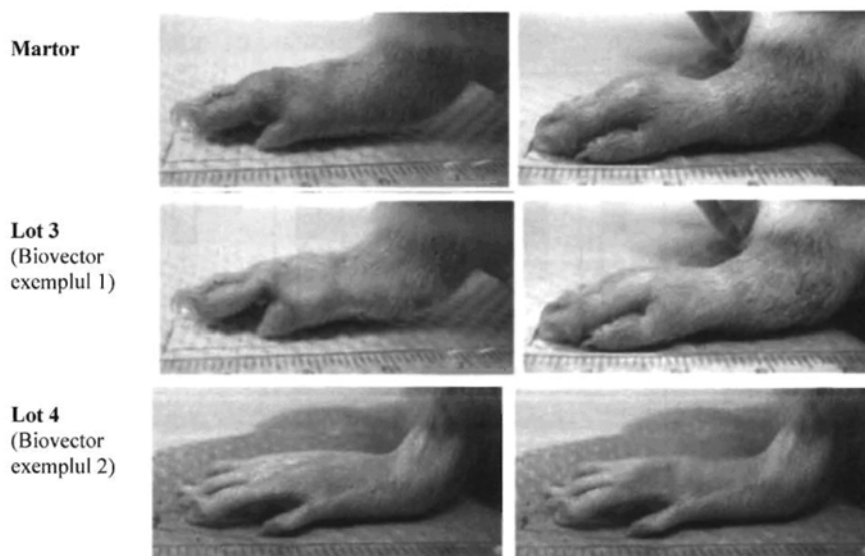


Fig. 3



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 110/2023