



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00998

(22) Data de depozit: 29/11/2018

(41) Data publicării cererii:  
30/01/2020 BOPI nr. 1/2020

(71) Solicitant:  
• LABORATOARELE MEDICA SRL,  
STR. FRASINULUI NR. 11, OTOPENI, IF,  
RO

(72) Inventatori:  
• OPRÎȚA ELENA IULIA,  
STR. VALEA IALOMIȚEI NR.6, BL.C 10,  
ET.9, SC.C, AP.184, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• OANCEA ANCA OLGUȚA, STR. PAȘCANI  
NR. 5, BL. D7, SC. E, AP. 45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;

• CRĂCIUNESCU OANA,  
BD.NICOLAE GRIGORESCU NR.33, BL.A 1,  
SC.3, AP.33, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• UȚOIU ELENA, STR. TEIUL DOAMNEI,  
NR.6, BL.22, SC.A, ET.2, AP.8, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• MORARU ANGELA, STR. PETRICANI  
NR. 1R, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;  
• MORARU IONUȚ, STR. PETRICANI  
NR. 1R, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(54) COMPOZIȚIE BIOACTIVĂ PENTRU VINDECAREA RĂNILOR  
SUPERFICIALE

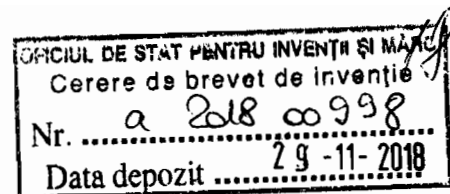
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei compoziții bioactive pentru tratarea rănilor superficiale. Procedeu, conform invenției, constă în aceea că 80...95% amestec format din 96...99 părți în greutate nanoceluloză bacteriană de concentrație 0,4...0,6%, 0,15...1,5 părți în greutate hidrolizat de collagen având o greutate medie de 5000...12000 Da și 1...3 părți în greutate sorbitol sau extract de sămburi de grapefruit, se agit la temperatura camerei, timp de 30...60 min, după care se adaugă 5...20% soluție de silice biogenă

având un conținut de siliciu de 2, 3...7, 5 mg/l, rezultată din fermentația unui amestec de infuzie de ceai negru, zaharoză, consorțiu simbiotic de bacterii și drojdii, și pleavă de orez și/sau pulbere de coada calului, rezultând o soluție vâscoasă având un conținut de substanță uscată de 5...15%, fiind condiționată sub formă de gel resorbabil în timp la locul aplicării.

Revendicări: 1





## DESCRIEREA INVENTIEI

### Compozitie bioactiva pentru vindecarea ranilor superficiale

Elena Iulia Oprita, Anca Olguta Oancea, Oana Craciunescu, Elena Utoiu, Angela Moraru,  
Ionut Moraru

Prezenta propunere de brevet se refera la o compozitie bioactiva pe baza de compusi naturali, precum nanoceluloza bacteriana, hidrolizat de colagen si silice biogena, destinata vindecarii ranilor superficiale ale pielii.

In ultimii ani exista un interes crescut pentru dezvoltarea unor pansamente performante cu utilizari in procesul de vindecare a ranilor care sa indeplineasca cerinte de elasticitate, umiditate si mentinere a pH-ului in mediul plagii si sa prezinte capacitatea de prevenire a contaminarii bacteriene si de realizare a unei vindecari nedureroasa a ranilor (*Hakkarainen et al., Journal of Controlled Release, 2016;244:292-301*).

Este cunoscuta utilizarea nanocelulozei bacteriene ca suport in ingineria tisulara, in special ca pansament in vindecarea ranilor datorita proprietatilor sale si anume: caracteristici mecanice unice similare cu ale tesuturilor moi, puritate mare a fibrelor, morfologie unica a retelei de nanofibrile. De asemenea, se cunoaste ca fibrele de nanoceluloza bacteriana mimeaza proprietatile matricei extracelulare, sunt biocompatibile, nealergenice si prezinta capacitate de eliberare controlata a unor substante biologice active. Studiile anterioare au aratat ca nanoceluloza bacteriana este superioara pansamentelor conventionale in procesul de vindecare a ranilor in termeni de retentie a exudatului, durere redusa, timpi mai mici de vindecare, infectie si cicatrizare reduse si consultare mai usoara a ranilor (*Petersen N si Gatenholm P, Appl Microbiol, 2011;91:1277-1286; Fu et al., Materials Science and Engineering C 33, 2013:2995-3000; Dumanli AG, Curr Med Chem. 2017;24(5):512-528*).

Au fost descrise o serie de materiale compozite pe baza de nanoceluloza in combinatie cu colagen, chitosan (*Zhang et al., Front Microbiol, 2016;7:260*), hexapolimetilen biguanida (*Napavichayanun et al., Arch Dermatol Res, 2016;308:123-132*) sau nanoparticule de argint (*Wen et al., Progress in Natural Science: Materials International, 2015;25:197-203*), destinate vindecarii ranilor. Astfel, se cunosc combinatii ale fibrelor de nanoceluloza cu cele de colagen, care sunt similare ca marime, ambele avand diametrul de aproximativ 100 nm. S-a demonstrat ca aceste compozite nanoceluloza-colagen, destinate vindecarii ranilor superficiale, prezinta flexibilitate si rezistenta mecanica superioare, deoarece nanoceluloza formeaza o armatura rezistenta si elastica pentru matricile colagenice si are rol si de sustinere a proliferarii si aderarii

celulare precum și în menținerea fenotipului celular normal (Moniri et al., *Nanomaterials*, 2017;7:257; Rodriques Fontes de Sousa Moraes et al., *Mat. Res.*, 2016;19(1); Li et al., *J Biomed Mater Res Part A*, 2014;102A:1131–1139).

Studii recente s-au axat pe evidențierea eficienței compusilor de tip silice biogenă în aplicații medicale. Materialele care conțin acești compusi conditionate sub forma de unguente, geluri sau pansamente, acționează ca bariere, care mențin rana hidratată, o protejează împotriva infecțiilor și favorizează o cicatrizare mai eficientă și mai rapidă (Lin et al., *Biomed. Mater.*, 2012;045017, *US 2017/0368154 A1*). Acidul silicic din compoziția biosilicei, cunoscut în medicina ca siliciu solubil, eliberat treptat din compus este cunoscut prin efectele sale asupra sănătății pielii (Macdonald et al., *Bone*, 2011;50:681-687), acționând asupra celulelor epidermice bazale și fibroblastelor dermale și reglând expresia factorului de creștere fibroblastic ( $\beta$ -FGF) (Quignard et al., *Colloids and Biosurfaces B: Biointerfaces*, 2017;155:530-537). De asemenea, se știe că siliciul solubil din sol se concentrează în plante sub forma de nanoparticule de silice. Conținutul ridicat de biosilice în diferite materiale naturale, cum este pleava de orez sau părțile aeriene de coada calului (*Equisetum arvense*), face ca astfel de materiale naturale să reprezinte o sursă ieftină pentru obținerea de nanoparticule de silice biogenă și pentru realizarea de compozite pe baza de nanoparticule de silice, cu valoare adăugată, pentru aplicațiile medicale (Batteggazzo et al., *RSC Adv*, 2014;4:54703; Sola-Rabada et al., *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2016;21(1):101–112).

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în realizarea unei noi compoziții sinergice bioactive, în care sunt incluse numai componente naturale (nanoceluloza bacteriană, hidrolizat de colagen și silice biogenă) eficiente în stimularea procesului de vindecare a pielii lezate.

Compoziția, conform invenției, constă în aceea că este constituită din 80...95% amestec format din 96...99 părți în greutate nanoceluloza bacteriană de concentrație 0,4...0,6% și 0,5...1,5 părți în greutate hidrolizat de colagen, de greutate moleculară medie 5000...12000 Da și 1...3 părți în greutate sorbitol sau extract de samburi de grapefruit, amestec obținut prin agitare la temperatura camerei, timp de 30...60 minute și având un pH al soluției de 7...8, la care se adaugă apoi 5...20 % soluție de silice biogenă cu un conținut în siliciu de 2,3...7,5 mg/L, obținută în urma fermentației unui amestec format din 300...500 părți în greutate infuzie de ceai negru 0,5%, 25...50 părți în greutate zaharoza, 100...500 părți în greutate consorțiu simbiotic de bacterii și drojii (SCOBY) și 4...20 părți în greutate pleava de orez și/sau pulbere de coada calului, fermentația s-a realizat la temperatura de 28<sup>0</sup> C, timp de 10...18 zile, iar soluția s-a filtrat

si s-a concentrat cu ajutorul unui rotavapor la temperatura de 40<sup>0</sup> C, pana la un volum final de 100 parti in greutate. Compozitia finala se prezinta sub forma de solutie vascoasa, cu substanta uscata de 5...15%, care poate fi conditionata sub forma de gel si ca solutie pentru pulverizare tip spray.

Prezenta inventie prezinta urmatoarele avantaje:

- compozitia este un gel care se prezinta sub forma de film/pellicula dupa aplicare, resorbabil in timp la locul aplicarii, iar componentele bioactive rezultate stimuleaza proliferarea celulelor pielii,
- compusii naturali utilizati (nanoceluloza bacteriana, hidrolizat de colagen si biosilice) in compozitia bioactiva actioneaza sinergic in procesul de vindecare a ranilor,
- bioprodusul realizat actioneaza ca o bariera impotriva infectiilor si mentine hidratarea normala a tesutului lezat,
- gelurile sunt biodegradabile, biocompatibile, stabile in timp si alcatuite din compusi naturali netoxici;
- produsul obtinut este superior pansamentelor clasice datorita compozitiei sale unice, fiind format din componente care faciliteaza o reepitelizare rapida, fara infectii si efecte secundare,
- procedeul de obtinere este fezabil si nu necesita echipamente cu grad ridicat de complexitate.

Prezenta propunere de inventie se ilustreaza prin urmatoarele exemple:

#### Exemplul I

##### Etapa I. Obtinerea gelului de nanoceluloza- colagen

Intr-un vas de inox prevazut cu agitator s-au adaugat 900 ml solutie de nanoceluloza bacteriana de concentratie 0,4%, 7 g hidrolizat de colagen de greutate moleculara medie 7000 Da si 10g sorbitol. Amestecarea ingredientelor s-a realizat prin agitare continuua, timp de 60 minute la temperatura camerei. S-a obtinut o solutie vascoasa sub forma de gel cu pH-ul 7,4.

##### Etapa II. Obtinerea solutiei de silice biogena

Separat, intr-un alt vas de inox prevazut cu agitare, s-au adaugat 500 ml infuzie racita de ceai negru 0,5% si 30 g zaharoza, s-a agitat amestecul pana la dizolvarea completa a zaharozei. S-au adaugat apoi 500 mL consortiu simbiotic de bacterii si drojdii (SCOBY) si 10 g pulbere uscata de coada calului. Dupa agitarea intensa a ingredientelor, amestecul obtinut s-a scos din vas si s-a introdus intr-o incinta termostata, unde s-a realizat fermentatia, la temperatura de

28<sup>0</sup> C, timp de 18 zile. Solutia fermentata s-a racit, s-a filtrat si apoi s-a concentrat la temperatura de 40<sup>0</sup> C cu ajutorul unui rotavapor, pana ce volumul a ajuns la 100 mL.

### Etapa III. Obtinerea compozitiei finale

Solutia II (100 ml) s-a adugat peste solutia I (900 ml), s-au amestecat prin agitare si in final s-a obtinut un amestec vascoas sub forma de gel, cu substanta uscata de 5,7%, care se poate conditiona ca atare in cutii de plastic sau ca solutie pentru pulverizare de tip spray.

### Exemplul 2

Solutia de nanoceluloza- collagen s-a preparat in aceleasi cantitati si conditii ca in exemplul I, etapa I. Solutia de silice biogena (etapa II), s-a preparat numai prin amestecarea a 500 ml consortiu simbiotic de bacterii si drojdii (SCOBY) cu 5 g pleava de orz. Fermentatia s-a realizat la temperatura de 28<sup>0</sup> C, timp de 10 zile, iar concentrarea solutiei s-a efectuat in conditii similare cu cele prezentate la exemplul I. Compozitia obtinuta prin amestecarea solutiei I (850 mL) cu solutia II (150 mL), are aspect de gel.

Compozitiile bioactive obtinute, conform exemplilor de mai sus, au fost testate din punct de vedere al efectului lor citotoxic asupra celule fibroblastice (linie celulara stabilizata NCTC), folosind modele experimentale *in vitro*. In acest context, s-au investigat viabilitatea (testul MTT), aderarea si morfologia (coloratie Giemsa) fibroblastelor in prezenta compozitiei bioactive realizata conform inventiei. Rezultatele obtinute au demonstrat ca toate compozitiile bioactive realizate conform exemplilor de mai sus sunt necitotoxice, favorizand viabilitatea, proliferarea si aderarea celulelor. De asemenea, morfologia celulelor pastreaza caracteristicile normale fenotipului celulelor NCTC.

Efectul compozitiei bioactive in vindecare ranilor pielii a fost investigat pe un model experimental realizat pe un monostrat de celule fibroblaste pe care s-a aplicat o „zgarietura”. La intervale regulate de timp s-au achizitionat imagini pentru evidentierea migrarii celulelor pana la atingerea confluenta acestora la locul lezat. Rezultatele au aratat ca rata de migrarea a celulelor in prezenta compozitiei bioactive a fost mai mare comparativ cu martorul de cultura netratat. Refacerea completa a monostratului celular s-a realizat dupa 72h de incubare.

### Revendicare

Compozitia, conform inventiei, consta in aceea ca este constituita din 80...95% amestec format din 96...99 parti in greutate nanoceluloza bacteriana de concentratie 0,4...0,6%, 0,5...1,5 parti in greutate hidrolizat de colagen, de greutate moleculara medie 5000...12000 Da si 1...3 parti in greutate sorbitol sau extract samburi de grapefruit, amestec obtinut prin agitare la temperatura camerei, timp de 30...60 minute, avand un pH al solutiei de 7...8, la care se adauga apoi 5...20 % solutie de silice biogena cu un continut in siliciu de 2,3...7,5 mg/L, obtinuta in urma fermentatiei unui amestec format din 300...500 parti in greutate infuzie de ceai negru 0,5%, 25...50 parti in greutate zaharoza, 100...500 parti in greutate consortiu simbiotic de bacterii si drojdii (SCOBY) si 4...20 parti in greutate pleava de orz si/sau pulbere de coada calului, fermentatia s-a realizat la temperatura de 28<sup>0</sup> C, timp de 10...18 zile iar solutia s-a filtrat si s-a concentrat cu ajutorul unui rotavapor la temperatura de 40<sup>0</sup> C, pana la un volum final de 100 parti in greutate. Compozitia finala se prezinta sub forma de solutie vascoasa, cu substanta uscata de 5...15%, care poate fi conditionat sub forma de gel si ca solutie pentru pulverizare tip spray.