



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 00618**

(22) Data de depozit: **29/08/2018**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2020 BOPI nr. **3/2020**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA TEHNICĂ " GHEORGHE
ASACHI " DIN IAȘI,**
STR. PROF.DR. DOC.DIMITRIE
MANGERON, NR.67, IAȘI, IS, RO

(72) Inventatori:
• **MAIER STELIAN SERGIU,**
STR.FĂNTĂNILOR NR.37, BL.B 2, ET.7,
AP.69, IAȘI, IS, RO;

• **MAIER VASILICA, STR.FĂNTĂNILOR
NR.37, BL.B 2, ET.7, AP.69, IAȘI, IS, RO;**
• **KAMERZAN CRINA MARIA,**
ALEEA SĂNDULEȘTI, NR.5, BL.E15, SC.1,
ET.10, AP.54, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• **TIHĂUAN BIANCA MARIA, STR. CODRII
NEAMȚULUI, NR.5-7, BL.A, AP.8,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA MATRICELOR
COLAGEN-POLIZAHARIDICE MICROPOROASE,
CU CONȚINUT DE VIOLACEINĂ, DESTINATE APLICAȚIILOR
BIOMEDICALE ȘI DERMATO-COSMETICE**

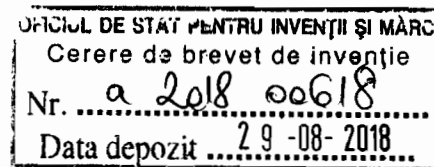
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor matrice colagen-polizaharidice microporoase, pentru aplicații biomedicale. Procedeu conform invenției constă în etapele de: preparare a soluțiilor concentrate ale precursorilor bio(macro)moleculari, prepararea formei de înglobare a violaceinei, prepararea și formularea compozițiilor fluide precursoare ale matricelor, generarea matricelor microporoase solide (atelo) cola-

gen-polizaharidice cu conținut de violaceină, condiționarea și post-procesarea fizico-chimică a acestora, asocierea matricelor post-procesate cu sisteme fizice cu rol de atașare la suprafața tegumentelor, ambalarea în pachete și sterilizarea pachetelor astfel ambalate.

Revendicări: 12





Procedeu pentru obținerea matricelor colagen-polizaharidice microporoase, cu conținut de violaceină, destinate aplicațiilor biomedicale și dermato-cosmetice

Invenția se referă la un procedeu pentru obținerea matricelor colagen-polizaharidice microporoase, cu conținut de violaceină, destinate aplicațiilor biomedicale și dermato-cosmetice, caracterizat prin aceea că furnizează substraturi solide poroase sterile, cu hidrofilie controlată, hipo-imunogene și hipo-alergenice, cu rol de pansament sau compresă de unică folosință. Funcționalitatea respectivelor matrice în aplicațiile biomedicale și dermato-cosmetice este asigurată de două dintre componentele lor, respectiv (atelo)colagenul cvasi-nativ hipo-imunogen și violaceina. În virtutea primeia dintre componentele citate, matricele asigură sorbția și stocarea fluidelor locale, dar și rolurile de „substrat de sacrificiu” în refacerea tisulară ghidată și de „țintă falsă” pentru matrix-metaloproteinazele produse în exces în răni. Cea de-a doua componentă funcțională, violaceina, conferă matricei rol antibacterian cu spectru îngust și induce un efect imunomodulator cu ecou în mecanismele inflamatorii locale. Funcție de natura și fracția polizaharidelor în compoziția și structurarea morfologică a matricelor, acestea din urmă pot dobândi funcționalitate bio-medicală suplimentară. **Matricele obținute conform procedurii brevetat, divers asociate cu sisteme fizice pentru fixarea lor la suprafața tegumentelor, sunt destinate** tratării efectelor stărilor patologice și incidentale localizate la nivelul pielii, sau cu ecou în fiziologia țesuturilor epitelial și conjunctiv al tegumentelor, precum și asistării refacerii post-traumatice a epidermei și dermei. Ele sunt utilizabile, ca atare sau după umidificare / îmbibare, în manevre și tratamente medicale (inducerea hemostazei, refacerea accelerată a rănilor superficiale ori supurante și a arsurilor, asistarea vindecării ulcerațiilor și escarelor, igiena plăgilor chirurgicale), precum și pentru tratamente dermato-cosmetice (refacerea epidermei agresate termic, radiativ, sau chimic, limitarea devierilor microbiotei pielii, asistarea vindecării rănilor cauzate de extragerea neglijentă a comedoanelor etc.).

Matricele microporoase (atelo)colagenice, precum și cele mixte, (atelo)colagen – polizaharidice, au caracteristici de biomaterial și, funcție de morfologia internă și reactivitatea lor fizico-chimică, pot fi utilizate drept substrat sau vector pentru specii de interes biochimic și/sau farmacologic, ori ca sediu bioinvadabil, cito-prietenos. În marea lor majoritate respectivele matrice sunt biodegradabile / bioresorbabile, ori cel puțin biointegrabile. Pentru a putea fi utilizate în aplicații biomedicale și dermato-cosmetice, toate componentele lor trebuie să fie lipsite de cito-toxicitate și de antigenicitate intrinsecă sau prin asociere ori degradare, fapt care impune restricții severe în selectarea formelor colagenice și a speciilor non-colagenice incluse.

Principalul motiv al utilizării (atelo)colagenului de tip fibrilar (I, II și III) drept componentă a matricelor cu aplicații biomedicale rezidă în prezența în macromoleculele sale a domeniilor de recunoaștere celulară (Davidenko N., Hamais S., Bax D.V., Malcor J.D., Schuster C.F., Gullberg D., Farndale R.W., Best S.M., Cameron R.E., *Selecting the correct cellular model for assessing of the biological response of collagen-based biomaterials*, Acta Biomaterialia, 65, **2018**, 88-101), fapt care îi asigură o compatibilitate necondiționată cu practic toate tipurile de celule aderente la substrat. Cerințele pentru ca această caracteristică să fie valorificată sunt expunerea sterică favorabilă a secvențelor de aminoacizi complementari integrinelor (GFOGER, GROGER, GLOGER etc.), precum și asigurarea unei „concentrații” minimale (relativ ridicată) a acestora pe suprafețele matricei care vin în contact cu celulele, inclusiv în pereții porilor săi.

Incidența clinică a reacțiilor adverse ale țesuturilor (aflate în stare fiziologică sau patologică) la contactul cu forme colagenice derivate de la tipul I, II și III este extrem de redusă (Lynn A.K., Yannas I.V., Bonfield W., *Antigenicity and Immunogenicity of Collagen*, Journal of Biomedical Materials Research, Part B - Applied Biomaterials, 71(2), **2004**, 343-54; Teixeira C., Ferraz R., Prudêncio C., Gomes P., *Collagen-like materials for tissue regeneration and repair*, în *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair*, Editori: Barbosa M., Martins M.C., Woodhead Publishing, Cambridge, U.K., **2017**, p. 283-307), iar prin modificarea lor fizico-chimică, intenționată sau incidentală, în cursul obținerii și post-procesării tehnologice, imunogenicitatea acestora se estompează mult (DeLustro F., Condell R.A., Nguyen M.A., McPherson J.M., *A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen*, Journal of Biomedical Materials Research, 20(1), **1986**, 109-120; Holmes R., Kirk S., Tronci G., Yang X., Wood D., *Influence of telopeptides on the structural and physical properties of polymeric and monomeric acid-soluble type I collagen*, Materials Science and Engineering C, 77, **2017**, 823-827).

De regulă, rolul polizaharidelor în matricele mixte este preponderent structural (de a asigura consolidarea morfologiei interne, microporoase), dar, funcție de tipul și caracteristicile lor, poate fi și unul funcțional, complementar (atelo)colagenului (de nuanțare a comportamentului fizico-chimic și reo-mecanic în mediu umed și/sau apos, ori chiar de inducere a unor efecte biochimice speciale, cum sunt reținerea și eliberarea unor ioni anorganici, ori a unor compuși organici mic-moleculari). Frecvent, mai ales în condițiile mediului fiziologic sau patologic tisular, nativ sau simulat, cele două specii biomacromoleculare ((atelo)colagenul și polizaharidele) devin coloidal incompatibile și co-precipită prin mecanisme ionice sau sterice, fapt care se soldează cu denaturarea parțială a scelorproteinei, ori cu mascarea parțială a domeniilor de recunoaștere celulară specifice acestora, deci cu reducerea șanselor de aderare a celulelor la pereții matricelor mixte. Din acest motiv, prepararea compozițiilor din care se obțin matricele mixte trebuie să prevadă rapoarte de amestecare care să se situeze în apropierea limitei stabilității de fază (Lefter C.M., Maier S.S., Maier V., Popa M., Desbrieres J., *Engineering preliminaries to obtain reproducible mixtures of atelocollagen and polysaccharides*, Materials Science and Engineering C, 33, **2013**, 2323-2331), pe care să nu o depășească flagrant. Selectarea tipurilor de polizaharide și a formelor lor de procesare anterioară contactării cu (atelo)colagenul fibrilar (prin hidroliză parțială, funcționalizare chimică, reticulare controlată, conjugare cu specii mic-moleculare) se realizează ținând cont de potențialul lor de angajare în interacții favorabile adeziunii și proliferării celulare (Diekjürgena D., Grainger D.W., *Polysaccharide matrices used in 3D in vitro cell culture systems*, Biomaterials, 141, **2017**, 96-115) la pereții matricelor.

Compozițiile (atelo)colagen – polizaharide aflate în fază lichidă coloidal omogenă sunt capabile ca, înainte de a genera matricele microporoase, să înglobeze diverse specii chimice, mic- sau macro-moleculare, individuale sau agregate, inerte sau active biochimic (Devi N., Sarmah M., Khatun B., Maji T.K., *Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates*, Advances in Colloid and Interface Science, 239, **2017**, 136-145). Pentru ca funcționalitatea acestora din urmă să se mențină și în compoziția / structura și aplicațiile matricelor generate ulterior, ele trebuie să fie înglobate pur fizic, fără a li se permite interacții fizico-chimice semnificativ intense cu cele două componente biomacromoleculare. În situația în care acest fapt nu este posibil, precum și atunci când speciile chimice adăugate sunt nemiscibile și tind să separe, acestea trebuie protejate prin includere în sisteme de vehiculare (lipozomi, niozomi, complecși de găzduire, micro-geluri). Mecanismul și forma de protejare se aleg funcție de tehnica prin care se vor genera matricele, pornind de la compozițiile fluide.

Din punct de vedere chimic, violaceina este un compus mic-molecular bis-indolic, hidrofob, cu caracteristici de nano-pigment. Ea este biosintetizată de câteva specii de bacterii Gram negativ (Choi S.Y., Yoon K-h, Lee J.I., Mitchell R.J, *Violacein: Properties and production of a versatile bacterial pigment*, BioMed Research International, **2015**, Article ID 465056, DOI 10.1155/2015/465056), poate fi biosintetizată și în sisteme acelulare (Hoshino T., Yamamoto M., *Conversion from tryptophan precursor into violacein pigments by a cell-free system from Chromobacterium violaceum*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 61(12), **1997**, 2134-2136) și poate fi sintetizată pe cale chimică (Ballantine J.A., Beer R.J., Crutchley D.J., Dodd G.M., Palmer D.R., *The chemistry of bacteria. Part VIII, The synthesis of violacein and related compounds*, Journal of the Chemical Society, **1960**, part II, 2292-2299; Wille G., Steglich W., *A short synthesis of the bacterial pigments violacein and deoxyviolacein*, Synthesis, 5, **2001**, Article ID 1437-210X,E;2001), însă cu randamente scăzute, care fac neinteresantă transpunerea la scară tehnologică. Coeficientul de partiție octanol : apă calculat pentru violaceină utilizând algoritmul *XLogP3-AA* are, la 25 °C, valoarea 1,9. Solubilitatea în soluții apoase fiind foarte scăzută, violaceina se separă prin precipitare, mai ales în prezența electroliților, pierzând abilitățile de agent antibacterian, imunomodulator antioxidant și fotoprotector pe care le prezintă atunci când este disponibilă ca moleculă independentă. Din acest motiv, pentru a putea fi inclusă în compoziții apoase destinate realizării de matrice cu caracteristici de biomaterial, violaceina trebuie fin dispersată sub formă de emulsie, sau trebuie adăugată sub formă încapsulată ori încărcată în complecși de incluziune.

Din literatura de specialitate și din cea de brevete, este cunoscut faptul că matricele microporoase solide ce includ (atelo)colagen și eventual polizaharide se obțin pornind de la compoziții fluide, formulate suplimentar sau nu, ce se supun uscării prin liofilizare sau prin extracție cu solvenți (Chvapil M., *Collagen sponge: Theory and practice of medical applications*, Journal of Biomedical Materials Research, 11(5), **1977**, 721-41; US Pat. No. 3157524 / **1964**; WO **2005/004928**; US Pat. No. 9439999 / **2016**; US Pat. No. 9655997 / **2017**; US Pat. No. 9757495 / **2017**). Compozițiile care includ și polizaharide se prepară, uzual, prin reticularea mediată de polizaharidul funcționalizat chimic, pentru a asigura matricei o morfologie internă stabilă și o porozitate adaptată aplicațiilor vizate (Luca A., Maier V., Maier S.S., Butnaru M., Danu M., Ibănescu C., Pinteală M., Popa M., *Biomacromolecular-based ionic-covalent hydrogels for cell encapsulation: The atelocollagen – Oxidized polysaccharides couples*, Carbohydrate Polymers, 169, **2017**, 366-375). În calitate de agent reticulant se pot utiliza, de

asemenea, compuși bifuncționali biocompatibili, capabili să lege prin punți covalente (atelo)colagenul și polizaharidele compoziției (Maier V., Lefter C.M., Maier S.S., Butnaru M., Danu M., Ibănescu C., Popa M., Desbrieres J., *Property peculiarities of the atelocollagen-hyaluronan conjugates crosslinked with a short chain di-oxirane compound*, Materials Science and Engineering C, 42, **2014**, 243-253; US Pat. No. 9872934 / **2018**). Frecvent, compozițiile se formulează prin adaos de antibiotice (US Pat. No. 3823212 / **1974**; RO 128972 / **2017**), specii de interes biochimic (US Pat. No. 9539363 / **2017**; US Pat. No. 9540610 / **2017**), sau fosfați de calciu (Kane R.-J., Weiss-Bilka H.E., Meagher M.J., Liu Y., Gargac J.A., Niebur G.L., Wagner D.R., Roeder R.K., *Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties*, Acta Biomaterialia, 17, **2015**, 16-25; Sun R.-X., Lv Y., Niu Y.-R., Zhao X.-H., Cao D.-S., Tang J., Sun X.-C., Chen C.-Z., *Physicochemical and biological properties of bovine-derived porous hydroxyapatite/collagen composite and its hydroxyapatite powders*, Ceramics International, 43(18), **2017**, 16792-16798; US Pat. No. 8435552 / **2013**), funcție de aplicația biomedicală vizată. **Dezavantajul** major al procedeelor deja cunoscute derivă din faptul că în compozițiile preparate pentru obținerea matricelor (atelo)colagenice unitare și respectiv mixte, (atelo)colagen-polizaharidice, eventual formulate, precum și în matricele finale obținute pornind de la acestea, se includ și se regăsesc specii chimice cu rol de reticulant. Fie prin ei înșiși ca entități chimice (reacționate sau rămase în produs ca impurități), fie prin intermediul compușilor lor de degradare (bio)chimică în produs (în cursul obținerii, stocării, sau utilizării produsului), agenții de reticulare sunt sau devin cito-toxici ori imunogenic activi, reducând semnificativ valoarea de întrebuințare terapeutică a matricei. În plus, derularea reacțiilor de reticulare în prezența adaosurilor de formulare (cu rol de antibiotic, antioxidant etc.) poate duce la inactivarea / mascarea compușilor activi, fapt care diminuează efectele curative scontate. Mai mult decât atât, atunci când adaosurile de formulare farmacologic active sunt hidrofobe, aplicând procedeele cunoscute, ele tind să separe ca fază, ceea ce fie le inactivează, fie le reduce semnificativ biodisponibilitatea și funcționalitatea. De aceea, spre exemplu, utilizând procedeele citate, violaceina nu poate fi inclusă ca nanopigment în astfel de matrice, atunci când acestea sunt destinate aplicațiilor bio-medicale și dermato-cosmetice, iar funcționalitatea violaceinei este îndeplinită doar dacă ea se regăsește ca moleculă distinctă / individuală și nu sub formă de precipitat sau de cristal, în produsul final.

Problema pe care o rezolvă invenția este legată de obținerea, în condiții de lucru la nivel (semi)industrial, a unor matrice (atelo)colagen-polizaharidice cu conținut

de violaceină, în care aceasta din urmă se regăsește dispersată la nivel molecular, vehiculată fiind fie prin intermediul unor micro-emulsii, fie sub forma compușilor de incluziune. Pentru a nu interfera cu violaceina, în recepturile compozițiilor fluide din care se obțin respectivele matrice nu se includ compuși cu rol de reticulare chimică. Prepararea compozițiilor și generarea matricelor microporoase solide se realizează exclusiv apelând la procese fizice, iar morfologia internă și caracteristicile lor fizico-chimice și reo-mecanice sunt reglate prin intermediul raportului de amestecare între cele două componente biomacromoleculare, care se aduc în condiții de co-precipitare prin interacții electrostatice, în regim controlat prin receptură și prin procedură.

Procedeul conform invenției permite obținerea a două tipuri de matrice cu conținut de violaceină, diferite prin caracteristicile lor, respectiv (i) unul *destinat utilizării în medii abundent umede*, spre exemplu pentru igiena și asistarea vindecării rănilor, arsurilor și ulcerățiilor și (ii) unul *destinat utilizării în condiții preponderent uscate*, spre exemplu pentru tratarea unor afecțiuni cutanate superficiale. În primul tip menționat, violaceina joacă rol de **imunomodulator activ pentru controlul inflamațiilor** (Verinaud L., Lopes S.C.P., Prado I.C.N., Zanucoli F., Alves da Costa T., Di Gangi R. și alții, *Violacein Treatment Modulates Acute and Chronic Inflammation through the Suppression of Cytokine Production and Induction of Regulatory T Cells*, PLoS ONE, 10(5), **2015**: e0125409, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125409>), iar în al doilea ea acționează drept **antibiotic, pentru reechilibrarea microbiotei pielii** (Dodou H.V., de Moraes Batista A.H., Sales G.W.P., de Medeiros S.C., Rodrigues M.L., Nogueira P.C.N., Silveira E.R., Nogueira N.A.P., *Violacein antimicrobial activity on Staphylococcus epidermidis and synergistic effect on commercially available antibiotics*, Journal of Applied Microbiology, 123(4), **2017**, 853-860), dar și ca **antioxidant implicat în blocarea peroxidării lipidelor în zonele în care epiderma a fost agresată fizic** (Konzen M., De Marco D., Cordova C.A.S., Vieira T.O., Antônioc R.V., Creczynski-Pasa T.B., *Antioxidant properties of violacein: Possible relation on its biological function*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 14, **2006**, 8307-8313). Pentru a-și îndeplini respectivele roluri, violaceina trebuie să poată difuza dinspre matricea solidă, către substratul aflat în stare fiziologică sau patologică, la solicitarea substratului și în cantități terapeutice active. Asigurarea difuziei se realizează, în cazul primului tip de produs, prin gelifierea / destructurarea / solubilizarea acestuia în zona tratată, iar pentru al doilea, prin contactarea intimă cu țesuturile subjacente, ce dețin propriile materii lipidice în care violaceina se poate solubiliza lent. De aceea, pentru obținerea tipurilor de produse menționate, violaceina se formulează în mod distinct, conform procedurii brevetat.

În principiu, procedeul pentru obținerea matricelor colagen-polizaharidice solide microporoase, cu conținut de violaceină, destinate aplicațiilor biomedicale și dermato-cosmetice, procedeu care face obiectul prezentei invenții, implică parcurgerea următoarelor etape, proiectate pentru a asigura reproductibilitatea compozițională a produselor finale, derulate toate în condiții de sterilitate și de curățenie conforme reglementărilor corespunzătoare aplicațiilor vizate pentru matricele în cauză:

- i. – prepararea soluțiilor concentrate ale precursorilor biomacromoleculari;
- ii. – prepararea formei de înglobare a violaceinei;
- iii. – prepararea și formularea compozițiilor fluide precursore ale matricelor;
- iv. – generarea matricelor microporoase solide, (atelo)colagen-polizaharidice, cu conținut de violaceină;
- v. – condiționarea fizico-chimică a matricelor microporoase solide;
- vi. – post-procesarea fizico-mecanică a matricelor microporoase solide;
- vii. – asocierea matricelor post-procesate cu sisteme fizice cu rol de atașare la suprafața tegumentelor;
- viii. – ambalarea și sterilizarea produselor finale.

În continuare se prezintă **principiile și detaliile semnificative ale modului de conducere la scară semiindustrială a etapelor mai sus enumerate**, respectiv pe un flux tehnologic prin a cărui parcurgere se asigură obținerea de produse finale destinate aplicațiilor bio-medicale și dermato-cosmetice utilizabile în medii umede și respectiv preponderent uscate.

(i) Conform prezentei invenții, compozițiile fluide (atelo)colagen – polizaharide se prepară prin co-precipitare asociativă prin mecanism mixt, electrostatic și conformațional (cauzat de „încălcirea” reciprocă a biomacromoleculilor prezente în mediul lichid), rezultată ca urmare a amestecării intime a unor soluții coloidale de (atelo)colagen și polizaharid, suficient de concentrate. Acest tip de co-precipitare se soldează cu separare de fază și sinereză, dar faza organică vâscoasă rezultată are compoziție omogenă (nu segregă suplimentar pe componente) și include cei doi parteneri în concentrațiile dictate prin receptura amestecului. Co-precipitarea se controlează prin modificarea pH-ului amestecului în raport cu plaja izoelectrică a speciei scleroproteice, ceea ce conduce la încărcarea electrostatică opusă a celor doi parteneri cu caracter de polielectroliti macromoleculari. Uzual, în soluții apoase, polizaharidele dobândesc încărcare negativă. De aceea, pentru a favoriza co-precipitarea, încărcarea (atelo)colagenului trebuie adusă în domeniul potențialelor zeta pozitive, lucrând la valori ale pH-ului mai coborâte decât pH-ul izoelectric. Rapoartele de amestecare se stabilesc

astfel încât limita stabilității coloidale a perechii celor două componente să fie atinsă și minimal depășită. Dacă respectiva limită este încălcată flagrant, se întrunesc condițiile separării segregative, iar amestecul devine neomogen. Pentru a conduce în siguranță co-precipitarea, se impune ca soluțiile celor doi parteneri amestecați să aibă concentrații suficient de ridicate, dar corelate între ele. Deoarece soluția coloidală de (atelo)colagen nu poate fi concentrată peste circa $6 \div 9$ g/L, din cauza creșterii excesive a vâscozității, soluția de polizaharid va fi preparată la aceeași concentrație, sau la una cu până la 30 % mai scăzută, atunci când masa moleculară a polizaharidului utilizat este mult mai mare decât masa moleculară a (atelo)colagenului unimer.

(ii) Conform prezentei invenții, violaceina se adaugă în compozițiile fluide (atelo)colagen – polizaharide după înglobarea într-un sistem de protejare și vehiculare, la nivel molecular, sistem care poate fi de tipul micro-emulsiilor, lipozomilor, niozomilor (generați utilizând poloxameri, sau cuplul Span / Tween), sau compușilor de incluziune. Natura și componentele sistemului de înglobare se aleg funcție de aplicația finală a matricelor (atelo)colagen-polizaharidice, recurgând la specii chimice biocompatibile și acceptate de farmacopee și de Directiva pentru Cosmetică a Uniunii Europene (ca selecție din lista INCI). În prezenta descriere se vor detalia recepturile și procedurile pentru obținerea sistemelor extreme din enumerarea de mai sus, respectiv micro-emulsiile și compușii de incluziune, ele reprezentând cazurile tipice pentru înglobarea violaceinei la nivel de „colecție de molecule” și respectiv de molecule individuale.

Înglobarea în micro-emulsii recurge la emulgatori cationici sau neionogeni, care să asigure preluarea și omogenizarea emulsiei în volumul compoziției (atelo)colagen – polizaharid, la valori apropiate de neutru ale pH-ului (între 5,8 și 7,8). Emulgatorii se aleg astfel încât, individual sau în amestec, să asigure valori ale HLB în plaja $6 \div 15$. Se preferă fosfolipidele și derivații acestora, esterii sorbitanului nativi și polietoxilați și/sau bloc-copolimerii etoxilici, ori glicozidele modificate chimic. Cantitatea de emulgatori se stabilește funcție de forma sub care se prezintă violaceina, respectiv ca soluție în solvent organic volatil, sau ca soluție în fază organică hidrofilă nevolatilă, situându-se între 0,01 și 0,15 % m/v în raport cu volumul final al micro-emulsiei (de tip „ulei în apă”). Se preferă prepararea unor volume minime de emulsie, care să poată fi omogenizate eficient în soluția coloidală a unuia dintre biomacromoleculele ce vor alcătui compoziția fluidă din care se obțin apoi matricele microporoase. În vederea emulsionării, violaceina se va aduce fie în soluția unui solvent lipsit de cito-toxicitate și non-precipitant față de (atelo)colagen (dimetil-sulfoxid, acetat de etil etc.), fie în fază organică hidrofilă (PEG 400, PEG 600, glicerină, poliglicerol de puritate farmaceutică etc).

Înglobarea violaceinei în compuși de incluziune asigură vectorizarea moleculelor sale individuale în medii polare, inclusiv apoase și aglomerate supramoleculare. Compusul „gazdă” apt a include violaceina este β -ciclodextrina, eventual funcționalizată chimic. Conform prezentei invenții, încărcarea β -ciclodextrinei cu violaceină se realizează pornind de la soluții ale acesteia din urmă în fază organică hidrofilă, asigurând un exces de compus „gazdă” și durate ale procesului suficient de lungi, impuse de cinetica lentă în mediul de reacție vâscos, tipic fazei organice în cauză.

Indiferent de forma de înglobare a violaceinei, sistemul coloidal obținut se amestecă și se omogenizează, de preferat, în soluția coloidală concentrată a polizaharidului, deoarece aceasta este puțin sensibilă la prezența compușilor străini, mai ales a micro-emulsiilor. Pentru ca micro-emulsiile (dar și lipozomii și niozomii eventual preparați) să nu se destrucureze, omogenizarea se conduce la cea mai scăzută temperatură care permite încă amestecarea, fără pierderea fluidității sistemului coloidal. Respectiva valoare a temperaturii depinde semnificativ de natura polizaharidului utilizat și în mai mică măsură de concentrația acestuia.

(iii) Compozițiile fluide din care urmează a se obține matricele microporoase solide se prepară amestecând soluția coloidală de (atelo)colagen cu cea de polizaharid formulată (prin adăugarea formei de vehiculare a violaceinei). Deși amestecarea și omogenizarea celor două soluții apoase concentrate ale precursorilor este dificilă, nu se lucrează cu soluții diluate deoarece acestea permit co-precipitarea prematură a celor două specii biomacromoleculare și o sinereză masivă. Pentru ca omogenizarea să fie eficientă, aceasta se realizează în două etape: mai întâi prin malaxare lentă și apoi prin vortexare, în condiții de termostatare la temperaturi de 12 ± 25 °C. Ambele etape se subîmpart în „epoci” care alternează amestecarea și maturarea statică de scurtă durată, pentru a permite îndepărtarea progresivă a apei ce se separă prin sinereză. La finalul omogenizării, compozițiile fluide pot fi formulate suplimentar, prin adăugarea de specii de interes biochimic și farmacologic, funcție de aplicația finală vizată. Compozițiile astfel rezultate se supun unei maturări finale sub vid moderat, în condiții de termostatare la 25 ± 40 °C, cu dublul scop de dezaerare și definitivare a sinerezei (îndepărtând apa pe măsură ce aceasta este eliminată, prin scurgere și sorbție).

(iv) Generarea matricelor microporoase solide se realizează supunând liofilizării compozițiile fluide anterior preparate, turnate în casete din oțel inoxidabil (aliajul 316L). Pentru a obține matrice cu caracteristici reproductibile, liofilizarea se conduce conform unui program de subrăcire, congelare, sublimare sub vid și uscare secundară adaptat compozițiilor procesate. În principiu, subrăcirea se realizează în congelator separat, la

temperaturi ușor negative, atinse și menținute în compoziție fără a permite inițierea semnificativă a cristalizării apei. Tăvile cu compoziția subrăcită se introduc rapid în liofilizatorul subrăcit în prealabil la temperaturi cu $2 \div 10$ °C mai coborâte decât cele atinse în compoziție. După o scurtă etapă de menținere sub vid moderat (pentru eliminarea condensului), se inițiază congelarea compoziției la valoarea minimă a temperaturii permisă de utilaj, atinsă cu cea mai abruptă pantă posibilă. Uscarea primară se conduce sub vid înaintat, iar uscarea secundară sub vid moderat și temperaturi crescânde, care (doar) la final pot atinge $40 \div 48$ °C.

(v) Condiționarea fizico-chimică a matricelor poroase rezultate după liofilizare are drept scop modificarea în limite sensibile a caracteristicilor de biomaterial ale produsului și se poate realiza prin menținere în atmosferă cu umiditate, compoziție și temperatură controlată și/sau prin reticulare dehidrotermică, funcție de forma de înglobare a violaceinei. Dacă aceasta a fost înglobată în niozomi sau în β -ciclodextrină, reticularea dehidrotermică este permisă, cu condiția conducerii operației sub vid moderat, menținut dinamic (în flux minimal de aer steril). Urmare reticulării dehidrotermice, capacitatea de gonflare / gelifiere / solubilizare a matricei scade, iar rigiditatea sa mecanică crește.

(vi) Post-procesarea fizico-mecanică a matricelor poroase este opțională și vizează formarea sa spațială și ajustarea dimensiunilor sale funcție de gama de utilizare a produsului finit. Se realizează prin aplatizare și decupare, eventual prin stivuirea straturilor aplatizate cu alte matrice sau (bio)materiale plane, cu grosimi reduse.

(vii) Asocierea matricelor divers post-procesate cu sisteme fizice care au rol de atașare sau fixare la sau pe suprafața tegumentelor (eventual în zone afectate de răni, ulcerații etc.) este și ea opțională și dependentă de aplicația vizată. Se realizează prin montarea matricelor / ansamblurilor pe suprafața acoperită cu adezivi a unor folii sau filme polimerice, ori a unor materiale textile. Suporturile adezive se decupează după contururi adecvate aplicației, fie înaintea montării, fie după ce montarea s-a efectuat.

(viii) Ambalarea în condiții de curățenie de nivel ISO 6 și sterilizarea produselor finale sunt obligatorii. Sterilizarea se realizează prin expunere la radiație gamma, la dozele minim necesare, pentru a evita degradarea formelor de înglobare a violaceinei.

Procedeul pentru obținerea matricelor collagen-polizaharidice microporoase, cu conținut de violaceină, destinate aplicațiilor biomedicale și dermato-cosmetice, conform prezentei invenții, prezintă următoarele avantaje:

- asigură menținerea violaceinei în stare individualizată la nivel molecular, înglobată fiind în sisteme de vehiculare de tipul micro-emulsiilor, lipozomilor, niozomilor, sau compușilor de incluziune, ce se regăsesc în matrice, la final;

- asigură generarea și stabilitatea morfologiei interne microporoase a matricelor pornind doar de la (atelo)colagen și polizaharide, fără a utiliza agenți de reticulare ca molecule de sine stătătoare, bi- sau multi-funcționale, ori ca tronsoane moleculare funcționalizate, aparținând unuia dintre cei doi parteneri biomacromoleculari;
- asigură matricelor obținute următoarele caracteristici fizico-chimice, înainte de aplatizare (această operație modificându-le semnificativ, definitiv și variabil):
 - densitatea aparentă: $0,06 \pm 0,02 \text{ g/cm}^3$;
 - densitatea reală (picnometrică; 2-propanol 99,8 %): $0,32 \pm 0,05 \text{ g/cm}^3$;
 - porozitatea: $84 \pm 2 \%$;
- asigură matricelor obținute următoarele caracteristici compoziționale:
 - substanță uscată: $85 \pm 2 \%$, în atmosferă cu umiditatea relativă de $50 \pm 4 \%$, la temperatura de $23 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$;
 - conținut de violaceină: $0,30 \pm 0,05 \%$, raportat la substanța uscată;
 - pentru matricele obținute din amestecuri cu raportul masic 1,5 : 1 între (atelo)colagen și polizaharid:
 - conținut total de colagen (prin conținutul de hidroxiprolină):
 $64 \pm 3,3 \%$;
 - conținut de colagen nativ (prin metoda cu Sirius Red F3B):
 $56 \pm 1,2 \%$, respectiv $87,5 \pm 4,5 \%$ din conținutul total de colagen;
 - conținutul de materii grase (prin metoda Weibull-Stoldt): sub 0,6 %, pentru matricele în care violaceina este înglobată în β -ciclodextrină.
- asigură potențiale de eliberare a violaceinei, la $37 \text{ }^\circ\text{C}$, (în procente masice) de:
 - peste 70 % în medii umede, în cazul colapsării / solubilizării matricelor încărcate cu compuși de incluziune, după 30 minute de la contactare (determinare prin îmbibare cu soluție Ringer, static și centrifugare);
 - peste 55 % în contact cu medii parțial hidrofobe, în cazul matricelor încărcate cu micro-emulsii, după 90 minute de la contactare (determinare prin îmbibare cu 1-butanol (HLB 7), static și centrifugare);
- permite formularea compoziției, funcție de natura aplicațiilor vizate, din sfera bio-medicală și a dermato-cosmeticii;
- asigură menținerea caracteristicilor produsului final pentru durate de stocare de $18 \div 24$ luni, la temperatura ambiantă ($10 \div 28 \text{ }^\circ\text{C}$), în ambalaje închise ermetic și supuse sterilizării cu radiație gamma.

În cele ce urmează, se prezintă exemple de conducere a etapelor și operațiilor de obținere și post-procesare a matricelor colagen-polizaharidice microporoase cu conținut de violaceină, conform invenției. Descrierile de mai jos au titlu exemplificativ din următoarele puncte de vedere:

- tipul, originea și forma de prezentare a (atelo)colagenului utilizat drept precursor;
- tipul, originea și forma de prezentare a polizaharidelor utilizate drept precursor;
- tipul, compoziția și modul de preparare a formelor de înglobare a violaceinei;
- natura și concentrațiile compușilor (bio)chimici mic-moleculari, oligomeri sau macromoleculari utilizați în oricare dintre operațiile procesului;
- rapoartele de amestecare și diluare utilizate în oricare dintre operațiile de obținere, formulare și post-procesare a matricelor (atelo)colagen-polizaharidice;
- parametrii fizico-chimici de lucru și compozițiile chimice implicate în oricare dintre etapele procesului;
- natura, numărul și succesiunea operațiilor unitare din cadrul etapelor generice ale procesului;
- echipamentele, instalațiile și dispozitivele utilizate pentru obținerea, formularea și post-procesarea matricelor, în oricare dintre etapele procesului;
- natura și concentrațiile speciilor chimice adjuvante și a materialelor implicate în formularea compozițiilor precursoare, precum și în condiționarea matricelor;
- natura și concentrațiile speciilor chimice de interes cosmetic utilizate în formularea compozițiilor și pentru condiționarea matricelor post-procesate;
- tipul, natura și dimensiunile sistemelor fizice destinate fixării matricelor postprocesate pe suprafața tegumentelor;
- modul de asociere a matricelor obținute conform invenției, cu sistemele fizice destinate fixării lor pe suprafața tegumentelor;
- denumirile atribuite etapelor, operațiilor și proceselor descrise în invenție.

Acolo unde nu se specifică în mod expres, operațiile se efectuează la temperatura ambientală, care nu va depăși însă plaja 15 ± 28 °C. Apa utilizată pentru prepararea soluțiilor și a compozițiilor apoase de tratare este dublu distilată sau deionizată până la conductivități de cel mult $1 \mu\text{S}$ (ISO 3696:1987), sterilă și liberă de pirogeni (conform Farmacopeei Europene, sortimentul „Apă pentru preparate injectabile”). Toate soluțiile și toți reactivii lichizi se supun sterilizării prin filtrare, cu excepția celor care se pot steriliza în autoclavă și a celor potențial ne-infectabili.

Exemplul 1 – Prepararea soluțiilor concentrate ale precursorilor

Soluțiile celor doi precursori biomacromoleculari se prepară și se aduc la vâscozități cât mai apropiate și la concentrații (exprimate în procente substanță uscată) corelate cu diferența între masele lor moleculare (masa moleculară a atelocolagenului cavsi-nativ, M_w , este de $273 \pm 0,8$ kDa). Drept (exo)polizaharide, se preferă utilizarea gellanului cu grad de acilare ridicat (M_w 5000 ÷ 7000 kDa), pullulanului (M_w 600 ÷ 800 kDa), sau dextranului de biosinteză (*Leuconostoc mesenteroides*, M_w 1500 ÷ 1800 kDa), dar se pot utiliza și alginatul (M_w 120 ÷ 150 kDa), xantanul (M_w 6000 ÷ 8000 kDa), sau levanul (M_w 2000 ÷ 4500 kDa). Soluțiile de (exo)polizaharide se formulează în mod individualizat, cel puțin prin adăugarea unui agent de ampastare (de regulă glicerina, care joacă și rolurile de mediator de amestecare cu (atelo)colagenul și de regulator al rigidității matricei finale) și a unui agent fluidifiant (cu acțiune chelatantă, împotriva gelifierii mediate de ionii de Ca^{2+} și Mg^{2+}).

Exemplul 1.1. – Concentrarea soluției de atelocolagen hipoimunogen

Drept precursor scleroproteic se utilizează soluțiile coloidale de atelocolagen biologic-activ, de înaltă puritate, de tip I, obținute conform brevetului RO 126403 / 2015, exemplul 3.2, condiționate în vederea utilizării în ingineria tisulară. Din formula agenților de condiționare se exceptează modulatorii metabolismului celular. După verificarea conținutului total de colagen și a conținutului de colagen nativ, soluția se termostatează la 5 ± 1 °C, iar apoi se concentrează până la 6 ÷ 9 g/L colagen total, prin ultrafiltrare prin membrane ceramice cu limita de trecere de 50 kDa (tip SterliTech, cu strat activ de ZrO_2), sub o presiune de 1,8 ÷ 2,6 bari. La final, soluția concentrată se maturează static, timp de 12 ÷ 18 ore, la 5 ± 1 °C, sub vid moderat (10 ÷ 25 mbar), în incintă umidificată, sterilă.

Exemplul 1.2. – Prepararea soluției coloidale concentrate de gellan

Soluția coloidală de gellan cu concentrația de 4 ÷ 7 g/L se prepară ampastând mai întâi pulberea de polizaharid cu o soluție de 0,8 ÷ 2,4 % glicerină anhidră, la rece. După completa umectare, peste pastă se adaugă o soluție fierbinte ($85 \div 90$ °C) de 0,05 ÷ 0,2 % citrat trisodic în tampon citrat 0,1 M, cu pH 5,0, sub agitare eficientă. Gelul rezultat se aduce și se menține la $90 \div 95$ °C, timp de 20 ÷ 60 minute, sub agitare eficientă, în vas închis, pentru completa lichefiere. La final, se adaugă apă distilată fierbinte, în volumul necesar pentru a corecta concentrația soluției de gelan la valoarea impusă prin receptură. Soluția se răcește progresiv, sub continuă agitare, până la $25 \div 30$ °C, valoare la care se poate utiliza pentru amestecarea cu soluția de atelocolagen.

Exemplul 2 – Prepararea formei de înglobare a violaceinei

Se pornește de la soluții de violaceină în solvenți organici biocompatibili (hidrofili: alcool etilic, alcool izopropilic, alcool butilic, tetrahidrofuran, dimetilsulfoxid etc., sau hidrofobi: 1-octanol, cloroform, acetat de etil), sau în fază organică hidrofilă (PEG 400 sau 600, ori glicerină), funcție de tehnica de înglobare. Pentru aplicații ale matricelor finale în medii umede / apoase, înglobarea se realizează în β -ciclodextrină, sau în derivați ai acesteia modificați chimic. Pentru matricele utilizabile în condiții preponderent uscate, înglobarea se realizează în (micro)emulsii.

Exemplul 2.1 – Înglobarea violaceinei în compuși de incluziune

Solubilitatea în apă a β -ciclodextrinei este relativ mică, de circa 1,8 % m/v, la 25 °C. Pentru a-i spori solubilitatea, în soluțiile apoase se adaugă adjuvanți (uree, săruri metalice etc.) sau cosolvenți (alcooli metilic, etilic, sau izopropilic, dimetil-sulfoxid, tetrahidrofuran, acetonitril etc.). Atunci când randamentele de înglobare sunt critice, indiferent de natura fazei în care se află violaceina, se preferă utilizarea β -ciclodextrinei funcționalizată (de exemplu sulfo-butyl-eter derivatul acesteia, Captisol®; CyDex Inc.).

A. Înglobarea violaceinei în β -ciclodextrină nemodificată chimic

β -ciclodextrina se dizolvă în soluțiile apoase ale cosolvenților, la 40 °C, astfel: 2 g în 100 mL soluție de 30 % alcool etilic, sau 12 g în 100 mL soluție 25 % 2-propanol, sau 12 g în 100 mL soluție 60 % DMSO. Amestecul ternar β -ciclodextrină : apă : cosolvent se adaugă, sub agitare eficientă, peste soluția de violaceină în fază organică (PEG 400 sau glicerină) anterior încălzită la 40 ÷ 70 °C, astfel încât să se asigure o concentrație molară a β -ciclodextrinei egală sau dublă în raport cu concentrația molară a violaceinei în faza organică. Lichidul rezultat se menține sub agitare, la reflux, timp de 72 ÷ 90 ore, la temperatura de 40 ÷ 70 °C, funcție de natura cosolventului organic. La final, lichidul se răcește brusc la 4 ÷ 10 °C și se maturează static, 12 ore, la 2 ÷ 5 °C. În continuare, lichidul încă rece se centrifughează la 1200 ÷ 3600 g, timp de 10 ÷ 30 minute, reținând supernatantul. Acesta din urmă se supune eliminării cosolventului și concentrării prin evaporare sub vid, în echipament rotativ, sub o presiune de 72 mbar, la 40 ÷ 42 °C, până la reducerea semnificativă a conținutului de apă.

A. Înglobarea violaceinei în β -ciclodextrină funcționalizată chimic

O soluție de 3 ÷ 8 % Captisol® în apă distilată se încălzește la 30 ÷ 50 °C, iar apoi, sub agitare eficientă, în ea se adaugă soluția de violaceină în fază organică (PEG 400 sau glicerină) anterior încălzită la aceeași temperatură, astfel încât să se asigure o

concentrație molară a Captisol-ului egală sau dublă în raport cu concentrația molară a violaceinei în faza organică. Amestecul se menține sub agitare, în vas închis, timp de $12 \div 36$ ore, la temperatura de $25 \div 30$ °C. La final, lichidul se răcește brusc la $4 \div 10$ °C și se maturează static, 12 ore, la $2 \div 5$ °C. În continuare, lichidul încă rece se centrifughează la $1200 \div 3600$ g, timp de $10 \div 30$ minute, reținând supernatantul. Acesta din urmă se supune concentrării prin evaporare sub vid, în echipament rotativ, sub o presiune de 72 mbar, la $40 \div 42$ °C, până la eliminarea sau reducerea semnificativă a conținutului de apă.

Exemplul 2.2 – Înglobarea violaceinei în (micro)emulsii tip ulei în apă

În vederea înglobării violaceinei ($\log P = 1,9$) în emulsii apoase se pornește de la soluția acesteia într-un solvent organic volatil, biocompatibil sau cel puțin biotolerabil, de preferință 1-octanol ($\log P = 2,339$; HLB = 5,1), 1-butanol ($\log P = 0,779$; HLB = 7,0), 2-propanol ($\log P = 0,389$; HLB = 7,48), etanol ($\log P = -0,31$; HLB = 7,9). Emulsionarea se realizează cu un amestec de emulgatori al cărui HLB care o valoare cel puțin egală cu valoarea HLB a solventului în care a fost adusă violaceina. Deoarece HLB este o mărime liniar aditivă, există o largă plajă de amestecuri de emulgatori capabile să emulsioneze stabil soluțiile de violaceină în solvenți organici. Concentrația solventului organic în interiorul picăturilor de emulsie (C_o) în raport cu cea în faza dispersantă a emulsiei (C_w), respectiv apetența pentru emulsionare, se calculează pornind de la relația $HLB - 7 = 0,36 \cdot \ln(C_w / C_o)$. Aplicând-o, rezultă că stabilitatea emulsiilor scade în seria 1-octanol > 1-butanol; în cazul 2-propanolului se pot obține doar emulsii grosiere, pentru a căror stabilizare este nevoie de amestecuri de emulgatori cu HLB mult mai mare decât 7,48 (de preferință dublu), iar în cazul alcoolului etilic, acesta se va solubiliza imediat în faza apoasă, transferând în întregime violaceinei apetența de emulsionare. De aceea, atunci când se pornește de la soluții de violaceină în alcool etilic, emulsia non-apoasă se formează adăugând surfactanții direct în aceasta, urmând ca faza apoasă să fie furnizată de soluția coloidală concentrată de polizaharid, care va prelua practic în întregime, dar lent, alcoolul din picăturile de emulsie non-apoasă.

Prezentul exemplu descrie emulsionarea unei soluții de violaceină în 1-butanol, deoarece acest solvent se plasează la limita apetenței de a forma micro-emulsii. S-a ales 1-butanolul și din considerente aplicative, acesta fiind non-comedogenic.

Într-o soluție de $0,6 \div 1,8$ g/L glucoză în apă distilată, încălzită la $40 \div 65$ °C, se adaugă $0,3 \div 0,5$ g/L amestec de emulgatori cu HLB 9,6 (spre exemplu cantități egale de Span 80 și Tween 80), sub agitare lentă, evitând spumarea. În paralel, într-o soluție de $0,6 \div 0,8$ g/L violaceină în 1-butanol, încălzită la $50 \div 70$ °C, se adaugă $0,3 \div 0,8$ g/L

amestec de emulgatori cu HLB 5,9 (spre exemplu 85 părți Span 80 și 15 părți Tween 80), sub agitare lentă. Ambele soluții se maturează apoi, la temperatura de preparare, timp de 30 ÷ 180 minute. Peste soluția de violaceină în 1-butanol astfel aditivată se adaugă, în fir subțire, sub agitare eficientă, un volum egal de soluție apoasă cu amestec de emulgatori. Vasul de amestecare se închide apoi ermetic, iar lichidul se supune agitării energice, la 360 ÷ 1000 rotații/minut, timp de 10 ÷ 40 minute, funcție de geometria vasului. La final, lichidul se răcește la temperatura ambiantă, iar apoi se supune vortexării la 8000 ÷ 12000 rotații/minut, timp de 10 ÷ 30 minute. După spargerea spumei formate, lichidul se preia într-un evaporator rotativ și se supune concentrării, la presiunea de 72 mbar, și temperatura de 40 ÷ 45 °C. În etapa de vortexare, emulsia se poate formula suplimentar, prin adăugare de odorant (spre exemplu 0,01 ÷ 0,05 g/L cinamat de butil) și de antioxidant (spre exemplu 0,03 ÷ 0,09 g/L vitamina A propionat), iar în etapa de concentrare i se poate adăuga un stabilizator (spre exemplu 0,1 ÷ 0,3 g/L oleat de trietanolamină ($\log P = 4,374$, HLB = 12), dizolvat în etanol, sau 0,08 ÷ 0,12 g/L Tween 60 ($\log P = 2,48$, HLB = 14,9)). Emulsia finală se poate stoca, la temperatura ambiantă, cel mult 12 ore. Pentru durate mai lungi de stocare, vortexarea se repetă periodic.

Exemplul 3 – Prepararea și formularea compozițiilor precursoare

Cele două soluții coloidale ale precursorilor se amestecă în proporții dependente de masa moleculară a polizaharidului utilizat. În cazul gellanului, spre exemplu, raportul de amestecare (calculat considerând conținutul de substanță uscată al precursorilor) este de 3 : 1 în favoarea atelocolagenului. Atunci când vâscozitatea uneia dintre soluțiile precursorilor este excesivă, aceasta se diluează, iar raportul de amestecare se recalculază, astfel încât amestecarea să devină posibilă.

Soluția coloidală de polizaharid se introduce într-un malaxor orbital prevăzut cu manta pentru termostatare și se aduce la 20 °C. Sub malaxare lentă dar eficientă, peste ea se adaugă, în fir subțire soluția sau emulsia care conține violaceina. În continuare, se adaugă soluția de (atelo)colagen, în trei rate egale, în fir subțire, sub malaxare, intercalând timpi de maturare statică de 10 ÷ 30 minute, pentru a permite separarea și scurgerea soluției apoase rezultate ca urmare a sinerezei. La final, masa fluidă rezultată se supune maturării statice, la 6 ÷ 10 °C, timp de 12 ore, scurgând eventuala soluție formată prin sinereză. Masa fluidă se supune apoi vortexării (sau unei agitări energice), în trei etape intercalate cu timpi de odihnă de 10 ÷ 30 minute pentru fiecare 3 ÷ 5 minute de vortexare efectuată la 8000 ÷ 12000 rotații/minut. Pe durata acestor operații

se verifică temperatura masei fluide și se peintâmpină depășirea valorii de 40 °C. În cursul ultimei epoci de vortexare, care nu mai este urmată de scurgerea soluției separate prin sinereză, în compoziția fluidă se pot doza adjuvanți hidrofilii, cum ar fi 0,03 ÷ 0,12 g/kg pantotenat de calciu (vitamina B5, ca promotor de (re-)epitelializare și antioxidant), și/sau 0,03 ÷ 0,06 g/kg acid nicotinic (vitamina PP, cu rol de vasodilatator local). La final, masa fluidă se supune dezaerării și maturării statice, în incintă sterilă umidificată, la temperatura ambiantă, timp de 12 ore, sub vid moderat (10 ÷ 25 mbar). Eventualul lichid separat prin sinereză nu se îndepărtează, ci se reînglobează prin malaxare.

Exemplul 4 – Generarea matricelor solide poroase, prin liofilizare

Masa fluidă precursoare se toarnă în casete din oțel inoxidabil (aliaj 316L) cu înălțimea de 15 mm și arii adaptate aplicațiilor vizate, anterior curățate, sanitizate și clătite cu apă deionizată sterilă. Înălțimea de turnare nu va depăși 12 mm. În momentul turnării casetele vor fi umede. În continuare, compoziția repartizată în casete se supune subrăcirii, la temperaturi care evită cristalizarea fazei apoase, în plaja +2 ÷ -8 °C, timp de 3 ÷ 8 ore, într-un congelator separat. În paralel, incinta liofilizatorului se aduce la o temperatură cu 5 ÷ 15 °C sub cea la care s-a răcit compoziția fluidă. După încărcarea rapidă a casetelor în liofilizator, incinta acestuia se aduce la 30 ÷ 50 mbar și se inițiază etapa de congelare, coborând temperatura până la -40 ÷ -60 °C, cu o pantă de 1 ÷ 3 °C/minut. După atingerea temperaturii prescrise, congelarea se continuă pentru încă 6 ÷ 10 ore, timp în care presiunea se scade progresiv, în trei etape, până la 5 ÷ 10 mbar. În continuare, se inițiază etapa de sublimare controlată a cristalelor de apă înghețată, coborând presiunea în liofilizator până la 0,10 ÷ 0,15 mbar și menținând-o, în condiții izoterme, timp de 2 ÷ 6 ore. Apoi, în condiții izobare, temperatura în interiorul solidului poros în formare se crește cu o pantă de 1 °C/oră, până la temperatura ambiantă. Etapa uscării secundare a matricei poroase se conduce izobar, ridicând temperatura în incinta liofilizatorului până la +40 °C, cu o pantă de 1,5 ÷ 3,0 °C/oră. După încheierea ultimei etape a liofilizării, incinta utilajului se inundă treptat cu azot gazos uscat, în condiții izoterme, până la o ușoară suprapresiune față de presiunea atmosferică.

Exemplul 5 – Condiționarea fizico-chimică a matricelor solide poroase

Casetele cu matricea solidă poroasă se scot din liofilizator și se supun maturării într-o cameră climatizată, menținându-se timp de 12 ore, la temperatura de 25 ± 1 °C și umiditatea relativă a aerului de 55 ± 3 %, sub un flux de aer recirculat de 5 ÷ 8 m³/h

pentru fiecare metru cub al volumului incintei, funcție de gradul de încărcare și de modul de amplasare al casetelor pe rafturi. La finalul maturării, înainte de preluarea casetelor din incintă, aceasta se ventilează timp de 20 ÷ 40 minute, cu un flux de aer steril de 15 ÷ 30 m³/h pentru fiecare metru cub al volumului incintei, în vederea eliminării volatilelor.

În cazul matricelor în care violaceina a fost înglobată altfel decât sub forma emulsiilor, precum și al celor în care nu s-au adăugat adjuvanți hidrofilii, solidul poros condiționat se poate supune reticulării dehidrotermice. În acest scop, casetele cu matricea solidă poroasă se introduc într-un uscător sub vid, în care presiunea este adusă la 30 ÷ 50 mbar, inițial la temperatura ambiantă. Apoi, în condiții izobare, temperatura se ridică în trei etape: mai întâi la 40 ÷ 45 °C, pentru 3 ore, apoi la 75 ÷ 90 °C, pentru alte 3 ore, iar în final la 110 ÷ 150 °C timp de 18 ore, funcție de natura și stabilitatea termică a compușilor de înglobare a violaceinei. În continuare, temperatura în uscător se coboară la 60 ÷ 80 °C, cu o pantă de 8 ÷ 10 °C/oră, prin trecerea la vid moderat (10 ÷ 25 mbar) menținut dinamic prin aflux de aer steril. La final, incinta uscătorului se aduce lent la presiunea atmosferică și la temperatura ambiantă. Casetele se preiau din uscător după 2 ÷ 5 ore de la echilibrarea parametrilor în incintă, în raport cu cele ambientale. Manevrele se efectuează sub baldachin cu circulație verticală a aerului steril.

Exemplul 6 – Post-procesarea fizico-mecanică a matricelor solide poroase

Funcție de aplicația vizată, matricele solide poroase se compactează diferențiat, prin aplatizare. Când se aplică matricelor individuale, operația se efectuează prin presare la rece între două folii din Mylar[®] tip A (polietilen tereftalat extrudat) transparent, cu grosimea de 500 micrometri. Se recurge la o presă hidraulică dotată cu plăci din oțel inoxidabil, a cărei închidere se limitează la 0,8 ÷ 2,2 mm, pentru un timp de menținere de 5 ÷ 15 secunde. Aplatizarea se poate aplica și unei stive alcătuită din matricea produsă conform descrierilor de mai sus și mai multe substraturi poroase, identice sau diferite, din atelocolagen, polizaharide, sau polimeri de (semi)sinteză. Stiva se include între folii din Mylar[®] tip A, iar închiderea preseii și durata de menținere se reglează corespunzător grosimii stivei și caracteristicilor materialelor care o alcătuiesc. Una sau ambele folii din Mylar[®] se pot înlocui cu un alt material (poliuretan, hârtie parafinată, hârtie plasticată, polimeri metalizați, material polimeric sau textil cu peliculă adezivă etc.). După aplatizare, structura compactată se menține flancată între folii, timp de 60 ÷ 90 minute, pentru stabilizarea grosimii finale. În continuare, structura compactată, încă flancată de folii, se decupează după diverse contururi, prin ștanțare în presă hidraulică,

sau sub un valț profilat. Decuparea se poate face pe întreaga grosime a ansamblului matrice – folii, sau menținând una dintre folii intactă, ori doar perforând-o.

Exemplul 7 – Asocierea matricelor compactate cu sisteme fizice cu rol de atașare la suprafața tegumentelor

Opțional, funcție de aplicația vizată, matricele sau stivele post-procesate fizico-mecanic se detașează de cel puțin una dintre foliile de flancare din Mylar[®], se pulverizează superficial cu o compoziție de îmbibare (ce conține unul sau mai mulți dintre următorii adjuvanți: 1-butanol, soluție 8 ÷ 12 % lactat de butil în 2-propanol, 0,2 ÷ 0,6 mg/mL pantotenat de calciu, 0,1 ÷ 0,5 mg/mL acid nicotinic etc.), se zvântă în flux de aer steril și se montează pe suprafața unor materiale polimerice sau textile acoperite cu peliculă adezivă. După aplicarea unui strat de protecție definitiv sau temporar, structura rezultată se decupează după contururi adecvate. Toate operațiile se efectuează sub baldachin cu circulație verticală a aerului steril.

Exemplul 8 – Ambalarea și sterilizarea produselor finale

Piese obținute conform descrierii din exemplul 7 se sortează dimensional și calitativ, se selectează numeric și se poziționează, iar apoi se includ în pachete sau în cutii etanșe și se ambalează corespunzător aplicației vizate. Pachetele ambalate se supun sterilizării cu radiație gamma, la doze administrate / absorbite minim necesare asigurării sterilității, dar și corelat cu degradabilitatea componentelor matricelor (inclusiv a adjuvanților).

REVENDICĂRI

1. Procedeu pentru obținerea matricelor colagen-polizaharidice microporoase, cu conținut de violaceină, destinate aplicațiilor biomedicale și dermato-cosmetice, care constă în parcurgerea succesivă a următoarelor opt etape, derulate în condiții tehnologice și de curățenie și sterilitate adecvate fabricării dispozitivelor medicale:

- prepararea soluțiilor concentrate ale precursorilor biomacromoleculari;
- prepararea formei de înglobare a violaceinei;
- prepararea și formularea compozițiilor fluide precursoare ale matricelor;
- generarea matricelor microporoase solide, atelocolagen-polizaharidice cu conținut de violaceină, prin liofilizare;
- condiționarea fizico-chimică a matricelor microporoase solide;
- post-procesarea fizico-mecanică a matricelor microporoase solide;
- asocierea matricelor post-procesate cu sisteme fizice cu rol de atașare la suprafața tegumentelor;
- ambalarea și sterilizarea produselor finale,

caracterizat prin aceea că :

- permite obținerea a două clase de produse finale, respectiv utilizabile (i) în medii umede, sau (ii) în condiții preponderent uscate, ambele apte să elibereze violaceina la nivel molecular, opțional alături de adjuvanți cu rol farmacologic;
- permite punerea în valoare a efectelor violaceinei (i) de imunomodulator activ pentru controlul inflamațiilor locale, (ii) de antibiotic cu spectru îngust destinat reechilibrării locale a microbiotei pielii și (iii) de antioxidant implicat în blocarea peroxidării lipidelor în zonele în care epiderma a fost agresată fizic, radiativ sau chimic, efecte combinate cu cele jucate de atelocolagenul cvasi nativ, respectiv de agent hemostatic și activ în refacerea țesuturilor conjunctive, toate utile în asistarea vindecării rănilor, ulcerațiilor, arsurilor, inflamațiilor și agresiunilor de orice tip intervenite la nivelul tegumentelor;
- evită utilizarea agenților de reticulare chimică, înlocuind efectul lor de stabilizare fizico-chimică și morfologică a matricelor microporoase solide prin coprecipitarea asociativă prin mecanism mixt, electrostatic și conformațional, a celor doi precursori biomacromoleculari, atelocolagenul și polizaharidul (acesta ales dintre gellan, pullulan, dextranul de biosinteză, alginat, xantan, sau levan);

- asigură matricelor obținute, înainte de condiționarea lor fizico-chimică și de post-procesarea lor, următoarele caracteristici fizico-chimice: densitate aparentă: $0,06 \pm 0,02 \text{ g/cm}^3$, densitate picnometrică: $0,32 \pm 0,05 \text{ g/cm}^3$ și porozitate: $84 \pm 2 \%$;
- asigură matricelor obținute următoarele caracteristici compoziționale: substanță uscată: $85 \pm 2 \%$, conținut de violaceină: $0,30 \pm 0,05 \%$ raportat la substanța uscată, conținut total de colagen: $64 \pm 3 \%$ (funcție de polizaharidul partener), conținut de colagen nativ: $87,5 \pm 4,5 \%$ din conținutul total de colagen;
- permite formularea nuanțată a compoziției matricelor, în etapele de preparare a precursorilor, de condiționare fizico-chimică și de asociere cu sisteme fizice cu rol de atașare la suprafața tegumentelor, formulare dependentă de aplicațiile vizate, de factură biomedicală sau dermato-cosmetică.

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de preparare a soluțiilor concentrate ale precursorilor, soluția de $4 \div 7 \text{ g/L}$ polizaharid în apă se prepară utilizând $0,8 \div 2,4 \%$ glicerină, care joacă triplul rol de agent de ampastare, mediator de amestecare cu atelocolagenul și regulator al rigidității matricei solide, alături de $0,05 \div 2 \%$ citrat trisodic în tampon citrat $0,1 \text{ M}$ cu pH $5,0$, cu rol de fluidifiant chelator al ionilor de Ca^{2+} și Mg^{2+} , uzual prezenți în formele comerciale ale polizaharidelor, ioni care predispun la gelifiere soluțiile concentrate ale polizaharidelor.

3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de preparare a formei de înglobare a violaceinei, moleculele acesteia se găzduiesc în sisteme cu eliberare controlată, funcție de aplicația vizată a matricelor solide, respectiv se prepară sub forma compușilor de incluziune, atunci când produsul final este destinat utilizării în medii umede, sau se încapsulează în (micro)emulsii, atunci când produsul final se utilizează prin contactare fermă cu substraturi preponderent uscate, dar oleofile.

4. Procedeu conform revendicărilor 1 și 3, **caracterizat prin aceea că** pentru prepararea compușilor de incluziune ai violaceinei, în calitate de compus gazdă se utilizează β -ciclodextrina nativă sau cea funcționalizată chimic, funcție de natura soluției în care violaceina se regăsește, respectiv un solvent organic hidrofob, sau o fază organică hidrofilă.

5. Procedeu conform revendicărilor 1, 3 și 4, **caracterizat prin aceea că** pentru prepararea compușilor de incluziune a violaceinei în β -ciclodextrină nativă, aceasta din urmă se dizolvă în soluția apoasă a unui co-solvent (alcool etilic, alcool izopropilic, sau dimetilsulfoxid), iar amestecul ternar β -ciclodextrină : apă : co-solvent se aduce în contact cu soluția în care se regăsește violaceina astfel încât să se asigure rapoarte

molare de 1 : 1 sau 1 : 2 între violaceină și β -ciclodextrină, iar după agitatea amestecului sub reflux, la $40 \div 70$ °C, timp de $72 \div 90$ ore, acesta se răcește brusc, se maturează static la $2 \div 5$ °C, se centrifugează, supernatantul supunându-se apoi eliminării cosolventului și concentrării prin evaporare sub vid, la 72 mbar și $40 \div 42$ °C, în evaporator rotativ.

6. Procedeu conform revendicărilor 1, 3 și 4, **caracterizat prin aceea că** pentru prepararea compușilor de incluziune a violaceinei în β -ciclodextrină funcționalizată chimic, aceasta din urmă se aduce în soluție apoasă cu concentrația de $3 \div 8$ %, aceasta se încălzește la $30 \div 50$ °C și se aduce în contact cu soluția de violaceină în fază organică hidrofilă, asigurând rapoarte molare de 1 : 1 sau 1 : 2 între violaceină și β -ciclodextrina funcționalizată, apoi amestecul se agită eficient, $12 \div 36$ ore, la $25 \div 30$ °C, iar în continuare se răcește brusc, se maturează static la $2 \div 5$ °C, se centrifugează, supernatantul supunându-se apoi concentrării prin evaporare sub vid, la 72 mbar și $40 \div 42$ °C, în evaporator rotativ.

7. Procedeu conform revendicărilor 1 și 3, **caracterizat prin aceea că** pentru încapsularea violaceinei în (micro)emulsii, se prepară mai întâi o soluție de $0,6 \div 1,8$ g/L glucoză și $0,3 \div 0,5$ g/L amestec de emulgatori cu HLB circa 9,6 în apă distilată, iar în paralel o soluție de $0,6 \div 0,8$ g/L violaceină în alcool n-butilic și $0,3 \div 0,8$ g/L amestec de emulgatori cu HLB circa 5,9, soluții care se maturează la cald, apoi se amestecă și se emulsionează reciproc în două etape, sub agitare energetică și respectiv prin vortexare, emulsia rezultată supunându-se concentrării sub vid, la 72 mbar și $40 \div 45$ °C și opțional formulării prin adăugarea unui stabilizator ($0,1 \div 0,3$ g/L oleat de trietanolamină, sau $0,08 \div 0,12$ g/L Tween 60), a unui antioxidant ($0,03 \div 0,09$ g/L vitamina A propionat) și a unui odorant ($0,01 \div 0,05$ g/L cinamat de butil).

8. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de preparare și formulare a compozițiilor fluide precursorare ale matricelor, soluția coloidală de polizaharid se malaxează eficient cu forma lichidă de înglobare a violaceinei, apoi cu soluția coloidală de atelocolagen în proporții adaptate concentrației și masei moleculare a polizaharidului, într-un regim care să permită separarea și scurgerea soluției apoase separată prin sinereză, masa fluidă rezultată se maturează static la rece, iar apoi se supune vortexării în etape intercalate cu timpi de ședere statică, pentru eliminarea lichidului rezultat prin sinereză, evitând încălzirea la peste 40 °C; în cursul ultimei etape de vortexare, în masa fluidă se dozează, opțional, un compus cu efect vasodilatator local ($0,03 \div 0,06$ g/kg acid nicotinic) și un promotor al (re-)epitelializării ($0,03 \div 0,12$ g/kg pantotenat de calciu); la final masa fluidă se maturează static, sub vid moderat.

9. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de generare a matricelor microporoase solide, masa fluidă precursoră se distribuie în casete din oțel ioxidabil, se subrăcește la $+2 \div -8$ °C timp de $3 \div 8$ ore, evitând congelarea, apoi se congelează în liofilizator până la $-40 \div -60$ °C sub depresiune ($30 \div 50$ mbar), cu o pantă de $1 \div 3$ °C/minut, după care se supune uscării primare în regim izoterm, la $0,1 \div 0,16$ mbar timp de $2 \div 6$ ore, continuată cu uscarea secundară în regim izobar și la temperaturi crescătoare cu o pantă de $1,5 \div 3,0$ °C/oră, până la $+40$ °C, operația de uscare prin liofilizare încheindu-se prin inundarea cu azot gazos uscat a incintei utilajului, înainte de extragerea matricelor solide microporoase astfel obținute.

10. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de condiționare fizico-chimică a matricelor solide microporoase, acestea se supun maturării timp de 12 ore, în incintă climatizată, la temperatura de 25 ± 1 °C și umiditate relativă a aerului de 55 ± 3 %, sub un flux de aer steril recirculat de $5 \div 8$ m³/oră pentru fiecare metru cub al volumului incintei, iar apoi doar matricele ce nu includ materii grase și adjuvanți cu efect farmacologic se supun reticulării dehidrotermice, în uscător sub vid, la $30 \div 50$ mbar și temperaturi crescătoare în trepte, astfel: 3 ore la $40 \div 45$ °C, 3 ore la $75 \div 90$ °C și 18 ore la $110 \div 150$ °C, funcție de natura și stabilitatea termică a compușilor de înglobare a violaceinei; în continuare, temperatura uscătorului se aduce la $60 \div 80$ °C cu o pantă de $8 \div 10$ °C/oră, în paralel cu scăderea presiunii la $10 \div 25$ mbar, iar la final matricele condiționate fizico-chimic se maturează în uscător, la presiunea atmosferică, alte $2 \div 5$ ore, până la atingerea temperaturii ambientale.

11. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de post-procesare fizico-mecanică, matricele condiționate se supun opțional compactării prin aplatizare la rece, flancate fiind de folii din Mylar[®] tip A transparente, cu grosimea de 500 microni, utilizând o presă hidraulică a cărei închidere se limitează la $0,8 \div 2,2$ mm, pentru timpi de menținere de $5 \div 15$ secunde; la finalul operației de aplatizare, matricele solide încă flancate de foliile din Mylar[®] se maturează timp de $60 \div 90$ minute, pentru relaxarea tensiunilor interne și atingerea grosimii finale.

12. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de asociere a matricelor, alpatizate și decupate, cu sistemele fizice destinate atașării lor la suprafața tegumentelor, acestea se îmbibă superficial, opțional, prin pulverizare fină cu o soluție de $8 \div 12$ % lactat de butil în alcool n-butilic sau în alcool izopropilic, pentru a le favoriza contactul intim cu porțiunile de tegument pe care urmează a se aplica.