



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 00840**

(22) Data de depozit: **26/10/2018**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/08/2023** BOPI nr. **8/2023**

(41) Data publicării cererii:
30/04/2020 BOPI nr. **4/2020**

(73) Titular:

• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE TEXTILE
PIELĂRIE - SUCURSALA INSTITUTUL DE
CERCETARE PIELĂRIE ÎNCĂLȚĂMINTE,
STR.ION MINULESCU NR.93, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

• **MARIN MARIA MINODORA,
SAT PĂUȘEȘTI - OTĂSĂU,
COMUNA PĂUȘEȘTI, VL, RO;**
• **ALBU KAYA MĂDĂLINA GEORGIANA,
BD. TINERETULUI, NR.21, BL.Z6, SC.1,
ET.7, AP.48, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;**

• **MARIN ȘTEFANIA, BD. MATEI BASARAB
NR. 40, BL. 30, SC. B, AP. 21, ET. 5,
SLOBOZIA, IL, RO;**
• **DANIILA ELENA, SAT GHEBOAIA,
COMUNA FINTA, DB, RO;**
• **BUMBENECI GEORGETA, STR.LT.ILIE
CÂMPEANU NR.3, BL.15A, SC.2, AP.16,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ALDEA CORINA, STR. GENERAL ION
CULCER, NR.15, SECTOR 5, BUCUREȘTI,
B, RO;**
• **GHEORGHE COARA, STR. CAP. PETRE
MIȘCĂ, NR.4, BL.M16, SC.1, ET.8, AP.35,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ALBU LUMINIȚA FLORICA,
CALEA FERENTARI NR. 23, BL. 129B,
SC. 3, ET. 4, AP. 82, SECTOR 5, O.P.75,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
CN 103966294 (A); CN 105331662 (A)

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A EXTRACTELOR COLAGENICE
DIN CARTILAJ BOVIN PENTRU APLICAȚII MEDICALE**



RO 134024 B1

1 Invenția se referă la procedeul de obținere a extractelor colagenice din cartilaj bovin
2 pentru aplicații medicale.

3 Cartilajul este un țesut hialin ce prezintă o elasticitate ridicată, având o grosime de
4 aproximativ 2-4 mm. În comparație cu alte țesuturi, cartilajul nu prezintă vase de sânge, vase
5 limfatice și nervi. Acesta este alcătuit dintr-o matrice extracelulară densă (ECM) cu o distri-
6 buție redusă a intensității celulelor specializate numite condrocite. Condrocitele furnizează
7 5% sau mai puțin din volumul total al cartilajului, astfel, proprietățile funcționale ale
8 cartilajului, inclusiv rigiditatea, durabilitatea și distribuția încărcării mecanice, se bazează pe
9 matricea extracelulară. Matricea extracelulară conține colagen de tip II care reprezintă 90%
10 până la 95% din colagen și formează fibrile și fibrele legate între ele cu proteoglicani. Tipurile
11 de colagen I, IV, V, VI, IX și XI sunt de asemenea prezente, dar contribuie doar într-o propor-
12 ție minoră care ajută la formarea și stabilizarea rețelei de colagen tip II. Comportamentul
13 biomecanic al cartilajului articular este cel mai bine înțeles atunci când țesutul este privit ca
14 un mediu bifazic. Celulele articulare sunt formate din două faze: o fază fluidă și o fază solidă.
15 Apa este componenta principală a fazei lichide, contribuind cu până la 80% din greutatea
16 umedă a țesutului. Faza solidă este caracterizată de ECM, care este poroasă și permeabilă.
17 Relația dintre proteoglicanii agregați și fluidele interstițiale asigură rezistența la compresiune
18 a cartilajului prin forțe negative de repulsie electrostatică. Aplicarea inițială și rapidă a forțelor
19 de contact articulare în timpul încărcării articulației determină o creștere imediată a presiunii
20 fluidului interstițial. Această creștere locală a presiunii determină lichidul să curgă din ECM,
21 generând o mare rezistență la frecare pe matrice. Când încărcarea compresivă este eli-
22 minată, fluidul interstițial curge înapoi în țesut. Permeabilitatea scăzută a cartilajului articular
23 împiedică scurgerea rapidă a fluidului din matrice.

24 Cartilajul articular este vâscoelastic și prezintă un comportament dependent de timp
25 atunci când este supus unei sarcini sau unei deformări constante. Două tipuri de mecanisme
26 sunt responsabile de vâscoelasticitatea cartilajului articular: mecanismul dependent de flux
27 și cel independent de flux. Mecanismul dependent de flux depinde de fluidul interstițial și de
28 frecțiunea asociată cu acest flux. Frânarea rezultată din fluidul interstițial este cunoscută drept
29 comportament vâscoelastic bifazic. Componenta independentă de flux a vâscoelasticității
30 este determinată în mod specific de mișcarea macromoleculară. Ca urmare, presiunea
31 fluidului asigură o componentă semnificativă a suportului încărcăturii totale, reducând astfel
32 tensiunea care acționează asupra matricei solide.

33 Cartilajul prezintă, de asemenea, un răspuns stres-relaxare. Atunci când se aplică
34 o presiune constantă asupra țesutului, deformarea acestuia crește odată cu timpul și se va
35 deforma până când va atinge o valoare de echilibru. În mod similar, atunci când cartilajul
36 este deformat și menținut la o presiune constantă, stresul va crește până la un vârf, care va
37 fi urmat de un ritm lent stres-relaxare până la atingerea unei valori de echilibru. Deoarece
38 cartilajul articular tinde să rămână cu o tensiune crescută, acesta nu poate fi descris de
39 modulul lui Young. Întinderea fibrelor de colagen distribuite aleatoriu asigură cartilajului
40 răspunsul la tensiunea de forfecare. Proprietățile rezistenței la tracțiune derivă din aranja-
41 mentul molecular precis al fibrelor de colagen. Stabilizarea și rezistența maximă la tracțiune
42 a fibrei de colagen sunt considerate a rezulta din legăturile încrucișate intra- și intermole-
43 culare.

44 Din cauza potențialului limitat de regenerare, repararea cartilajului articular se prezintă
45 ca una dintre cele mai dificile sarcini, iar o modalitate de a rezolva această problemă este
46 reprezentată de biomateriale. Aceste biomateriale trebuie să prezinte anumite caracteristici
47 speciale precum biocompatibilitate și bioresorbabilitate, trebuie să susțină creșterea celulară,
48 proliferarea și diferențierea, să asigure proprietăți mecanice ideale și să asigure transportul

RO 134024 B1

nutrienților și deșeurilor celulare. În ultimii ani, cercetătorii au testat atât biomateriale naturale	1
cât și sintetice cu scopul de a crea un mediu propice care să furnizeze semnalele biologice	
necesare să orienteze comportamentul celular către repararea cartilajului și către suport	3
celular. Aceste biomateriale pot fi împărțite în două clase: materiale naturale și materiale	
sintetice. Materialele naturale precum colagenul, chitosanul, alginatul, fibrina, celuloza etc.	5
prezintă proprietăți mecanice slabe, iar proprietățile lor fizice pot să varieze, în funcție de	
sursă. Materialele sintetice precum acidul poli (lactic-glicolic) (PLGA), acidul polilactic (PLA),	7
policaprolactona (PLC) etc. prezintă avantajul că dețin proprietăți mecanice consistente,	
controlabile și precise precum rigiditate, porozitate sau elasticitate dar au dezavantajul că	9
unele dintre acestea pot induce citotoxicitate.	
Colagenul reprezintă componenta principală a matricei extracelulare. Colagenul este	11
o proteină naturală cu o structură triplu-helicoidală și prezintă o compatibilitate excelentă a	
țesuturilor, biodegradabilitate lentă, iar produsele sale de degradare sunt absorbite cu	13
ușurință de organism fără inflamație.	
Astfel extractele colagenice din cartilaj bovin reprezintă un candidat ideal pentru	15
aplicațiile medicale ce implică regenerarea cartilajului afectat.	
CN 106916870 (A) descrie o metodă de obținere a colagenului tip II din cartilaj bovin	17
prin hidroliză enzimatică. Metoda cuprinde următoarele etape: degresare, dezinfectare,	
omogenizare, hidroliză enzimatică, filtrare și uscare. În etapa de hidroliză enzimatică, pH-ul	19
suspensiei obținute în etapa de omogenizare este ajustat la 2,5-8,5, se adaugă o enzimă	
reprezentând 0,001-2% din greutatea cartilajelor; hidroliza enzimatică se realizează la	21
25-50°C timp de 12-48 h.	
O altă metodă de obținere a colagenului tip II prin hidroliză enzimatică este descrisă	23
în documentul de brevet US 5840848 (A) , prin tratarea țesuturilor din stern de pui care conțin	
colagen tip II mai întâi cu pepsină și apoi cu tripsină. Enzimele au fost îndepărtate prin	25
spălare și/sau dializă sau diafiltrare.	
CN 101301490 (A) descrie o metodă de obținere a colagenului tip II cu aplicații	27
medicale din cartilaj articular prin tratamente acide, folosind soluții de acid clorhidric și acid	
acetic, apoi pepsină adăugată de două ori sub agitare, supernatantul a fost îndepărtat prin	29
centrifugare, iar inactivarea pepsinei s-a realizat cu ajutorul unei soluții de EDTA.	
CN 102146428 (A) prezintă o metodă pentru extracție a colagenului de tip II din	31
cartilajul animal, supus metodelor de enzimoliză, ultrafiltrare și uscare prin pulverizare, în	
CN 103352063 (A) este descrisă o metodă de extracție a colagenului din țesut cartilaginos	33
articular prin tratamente acide, alcaline, enzimatică și centrifugare. O altă metodă de obținere	
a colagenului din surse de cartilaj animal este prezentată în CN 105331662 (A) , unde sunt	35
utilizate hidrolize acide, bazice, enzimatică și tratamente cu ultrasunete. Metoda de prepara-	
rare cuprinde următoarele etape: luarea cartilajelor de animale proaspete și trasabile ca	37
materii prime; efectuarea unui tratament de purificare pe cartilajele animale prin procedee	
de congelare repetată, de degresare cu ultrasunete, de înmuiere bazică - acidă;	39
desfășurarea proceselor de îndepărtare a zaharurilor, tratare cu enzime compuse, purificare	
centrifugală pe mai multe perioade, dializă cu membrană și uscare, obținându-se astfel	41
colagen spongios nedenaturat tip II.	
Documentele de brevet descrise mai sus prezintă metode de extracție a colagenului	43
din țesuturi cartilaginoase utilizând atât enzime, cât și acizi și baze, combinând aceste trei	
metode, dar au dezavantajul de a obține un produs greu de purificat, etapă esențială în	45
aplicațiile medicale. De asemenea, un alt dezavantaj îl reprezintă și timpul îndelungat de	
obținere al acestora.	47

RO 134024 B1

1 Problema tehnică, pe care o rezolvă invenția, constă în procedeul de obținere a
2 extractelor de colagen din cartilaj bovin pentru aplicații medicale având ca scop îmbunătățirea
3 calității vieții persoanelor cu probleme articulare.

4 Procedeul de obținere a extractelor colagenice din cartilaj bovin, conform invenției,
5 constă în aceea că, materia primă a fost spălată cu o soluție de detergent bio 0,1...1%, timp
6 de 1...2 h, ulterior cu apă timp de 2...3 h, iar apoi a fost supusă unui tratament alcalin NaOH
7 1...5 M, raportat la flotă pentru îndepărtarea țesuturilor necolagenate (grăsimi), timp de
8 5...8 h la temperatura camerei (20...25°C).

9 După tratamentul alcalin a fost efectuată spălarea timp de 6 h sub jet de apă
10 continuu, ulterior fiind supuse unor operații mecanice specifice, pastrându-se doar țesutul
11 cartilaginos. Pentru gonflare, cartilajul bovin a fost supus unor tratamente acide succesive
12 (pH 3, la temperatura camerei 20...25°C), utilizând pe rând: acid clorhidric 1...10%, raportat
13 la flotă, acid lactic 1...10%, raportat la flotă și acid citric 1...10%, timp de 8...24 h fiecare
14 tratament acid. Fiecare tratament acid a fost urmat de câte o spălare, timp de 1...2 h. După
15 gonflare au fost realizate prelucrări mecanice ale cartilajului bovin în vederea obținerii
16 extractelor colagenice. În final au fost efectuate filtrarea și omogenizarea, obținându-se
17 extracte colagenice cu un conținut de substanță uscată de 1,3...2,6%, cenușă nedetectabilă
18 și pH 2...4.

19 Aplicarea invenției conduce la următoarele avantaje:

20 - procedeul conform invenției permite obținerea de extracte colagenice din țesuturi
21 cartilaginoase doar prin hidroliză acidă și alcalină, fără a utiliza enzime care sunt greu de
22 inactivat;

23 - procedeul conform invenției este simplu, aplicabil la temperatura camerei: 20...25°C,
24 cu consum redus de energie și cu aparatură simplă, permițând obținerea de extracte cu
25 puritate ridicată, specifică materialelor pentru aplicații medicale.

26 Procedeul de obținere, conform invenției, constă în supunerea cartilajului bovin unui
27 tratament alcalin cu NaOH 1...5 M și tratamente acide succesive, utilizând pe rând: acid
28 clorhidric 1...10%, raportat la flotă, acid lactic 1...10%, raportat la flotă și acid citric 1-10%.

29 În final au fost efectuate prelucrări mecanice ale cartilajului bovin, urmate de filtrare,
30 omogenizare și purificare obținându-se extracte colagenice sub formă de gel. Extractele de
31 colagen sub formă de gel, obținute conform procedurii enunțat au un conținut de substanță
32 uscată de 1,3...2,6%.. Cenușa și grăsimea trebuie să fie nedetectabile la analiza calitativă
33 și cantitativă, iar pH-ul este acid, 2...4.

34 Se prezintă în continuare câteva exemple de realizare a invenției:

35 Exemplul 1

36 Materia primă - cartilajul bovin, a fost spălată cu o soluție de detergent bio 0,1%, timp
37 de 1...2 h, ulterior cu apă timp de 2...3 h, iar apoi a fost supusă unui tratament alcalin NaOH
38 1 M, raportat la flotă pentru îndepărtarea țesuturilor necolagenice (grăsimi), timp de 5...8 h
39 la temperatura camerei (20...25°C). După tratamentul alcalin a fost efectuată spălarea timp
40 de 6 h sub jet de apă continuu, ulterior fiind supuse unor operații mecanice specifice,
41 pastrându-se doar țesutul cartilaginos. Pentru gonflare, cartilajul bovin a fost supus unor
42 tratamente acide succesive (pH 3, la temperatura camerei: 20...25°C), utilizând pe rând: acid
43 clorhidric 8%, raportat la flotă, acid lactic 10%, raportat la flotă și acid citric 10%, timp de
44 8...24 h fiecare tratament acid. Fiecare tratament acid a fost urmat de câte o spălare, timp
45 de 1...2 h. După gonflare au fost realizate prelucrări mecanice ale cartilajului bovin în
46 vederea obținerii extractelor colagenice. În final au fost efectuate filtrarea și omogenizarea,
47 obținându-se extracte colagenice sub formă de gel.

RO 134024 B1

Exemplul 2	1
Procedeul de obținere a fost similar cu cel descris în exemplul 1, exceptând procentul de acid citric care a fost de 8%, raportat la flotă.	3
Exemplul 3	5
Procedeul de obținere a fost similar cu cel descris în exemplul 2, exceptând procentul de de acid lactic care a fost de 8%, raportat la flotă.	7
Exemplul 4	9
Procedeul de obținere a fost similar cu cel descris în exemplul 1, exceptând tratamentul alcalin care a fost efectuat cu NaOH 5 M, raportat la flotă.	9

1

Revendicări

3

1. Procedeu de obținere a extractelor colagenice din cartilaj bovin pentru aplicații medicale, **caracterizat prin aceea că**, are următoarele etape: tratarea materiei prime - cartilajul bovin cu un tratament alcalin NaOH 1...5 M, raportat la flotă pentru îndepărtarea țesuturilor necolagenate grăsimi, timp de 5...8 h la temperatura camerei de 20...25°C și apoi tratamente acide succesive, cu utilizarea pe rând de acid clorhidric 1...10%, raportat la flotă, acid lactic 1...10%, raportat la flotă și acid citric 1...10%, prelucrări mecanice, urmate de filtrare, omogenizare și purificare.

9

11

2. Procedeu de obținere definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, extractele de colagen sunt sub formă de gel, de puritate ridicată, au un conținut de substanță uscată de 1,3...2,6%, cenușa și grăsimea din acestea trebuie să fie nedetectabile la analiza calitativă și cantitativă, iar pH-ul este acid, 2...4.

13



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 330/2023