



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00453**

(22) Data de depozit: **28/07/2022**

(41) Data publicării cererii:

30/01/2024 BOPI nr. **1/2024**

(71) Solicitant:

• **UNIVERSITATEA "BABEȘ BOLYAI" DIN CLUJ-NAPOCA, STR. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 1, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN CLUJ-NAPOCA, STR. EMIL ISAC NR. 13, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **UNIVERSITATEA TEHNICĂ DIN CLUJ-NAPOCA, STR. MEMORANDUMULUI NR. 28, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:

• **MOLDOVAN MARIOARA, STR. VIILE NADAȘEL NR. 52, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**

• **GASPARIK CRISTINA, STR. BUNĂ ZIUA NR. 37D, BLE5, SC.A1, AP.15, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **POPESCU VIOLETA, STR. OĂȘULUI NR. 340J, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **SAROȘI LIANA CODRUȚA, STR. GURGHIU NR. 4, AP. 25, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **PRODAN DOINA, STR. PROFESOR CIORTEA NR. 5, SC. 2, AP. 44, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **CUC STANCA, STR. URUȘAGULUI NR. 117 E, AP. 2, FLOREȘTI, CJ, RO;**
• **MOLDOVAN IONELA AMALIA, ALEEA SCĂRIȘOARA NR. 5, SC. 1, AP. 6, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **DUDEA DIANA, STR. LUNETEI NR. 23, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **AGAPESCU CAMELIA, STR. ION AGĂRBICEANU NR. 15, PARTER, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **GEL DESTINAT ALBIRII ȘI REGENERĂRII SMALȚULUI DENTAR PE BAZĂ DE ENZIME**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei compoziții de gel utilizată în stomatologie pentru tratamentul decolorărilor dentare localizate. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: preparare a unei faze organice prin amestecarea sub agitare, la temperatura de 50°C a 1,5% acetat de etil, extract de gutui, un amestec format în prealabil din enzime de bromelină și enzime de papaină, acid polilactic și hidroxiapatită, cu menținerea agitării încă 30 min, prepararea unei faze apoase sub agitare mecanică, prin adăugare a 1,5% acetat de etil în amestec de extract de gutui și apă, timp de 30 min, urmat de 5% surfactant, adăugarea fazei organice sub agitare, la faza apoasă, rezultând o soluție

coloidală care se diluează cu un volum triplu de apă distilată, se agită suspensia rezultată, se îndepărtează solvenții, rezultând o soluție care se îngheață și după eliminarea apei prin liofilizare rezultă un produs sub formă de nanocapsule cu enzime, care se adaugă în procent de 6...8% într-un amestec format din suc de gutui, hidroxiapatită, pulbere de zer liofilizat, uleiuri esențiale și polimeri biocompatibili pentru condiționare sub formă de gel cu enzime înglobate în nanocapsule care eliberează controlat enzimele pe smalțul dentar de tratat.

Revendicări: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. a 2022 00 453	78-07-2022
Data depozit	

DESCRIEREA INVENȚIEI

Obiectivul actualului brevet îl constituie elaborarea unei compoziții de gel cu enzime, destinată pentru tratamentul minim invaziv al decolorărilor dentare localizate, cu proprietăți corespunzătoare utilizării lor în stomatologie.

În ultima vreme a avut loc o dezvoltare semnificativă a produselor de albire a dinților „fără prescripție medicală” și fără implicarea specialiștilor. Colorarea dentară poate rezulta prin acumularea de molecule cu grupări cromofore/cromogene (în general, sisteme nesaturate conjugate sau chiar compuși aromatici) pe suprafața structurilor dentare. Aderarea cromoforilor se face prin mai multe tipuri de forțe, în general supramoleculare – în special van der Waals. Factori legați de obiceiurile alimentare, cum ar fi consumul excesiv de cafea sau ceai, fumat și expunerea la agenți chimici, sunt asociați cu colorarea dentară. Produsele de albire dentară se bazează tradițional pe apă oxigenată sau geluri de peroxid de carbamidă (peroxid de hidrogen și uree). Aceste produse pe bază de peroxid eliberează radicali liberi care atacă cromogenii, fiind capabili să degradeze molecule mai mari în molecule mai mici care pot fi ușor eliminate din țesuturile dentare, promovând astfel un anumit grad de albire a dinților.

În ciuda eficacității lor, produsele pe bază de peroxid pot provoca abraziuni grave la nivelul structurilor dentare – și sunt în general toxice/corozive pentru orice țesut. În acest context se încearcă dezvoltarea de produse de albire cu acțiune enzimatică, care, în unele cazuri, par a fi la fel de eficiente și pentru îndepărtarea unor pete extrinseci. Ingredientele active derivate din produse naturale s-au dovedit a avea potențiale efecte antibacteriene fără a provoca abraziuni, acestea putând fi o bună alternativă la cele bazate pe peroxizi. [1].

Münchow și coautorii [2] prezintă primele date din literatura de specialitate legate de obținerea și testarea unor geluri de albire a dinților pe bază de enzime proteolitice, deși paste de dinți cu enzime au fost studiate anterior.

Aceștia au folosit ca agenți de îngroșare, gumă xantan și polietilenglicol 400 alături de bicarbonat de sodiu, xilitol, polivinil pirolidonă, glicerină, fosfat de sodiu, în geluri pe bază de bromelaină și papaină. Aspectul unic al acestui gel constă în mecanismul biochimic care asigură nu numai tratamentul eficient al leziunilor dentare discromice, ci și protecția

totală a cavității bucale. Enzimele (papaina și bromelaina) care se urmăresc a fi utilizate ca ingrediente în aceste formulări includ pe cele capabile să descompună proteinele, asigurând astfel accesul eficient la coloranții depuși pe dinți. Folosite în preparatele noastre le va cuprinde pe cele capabile să degradeze compușii organici aromatici responsabili de colorarea dinților fără a fi nevoie să adăugăm peroxizi.

Enzimele proteolitice joacă un rol catalitic în hidroliza proteinelor care conțin legături amidice și uneori esterice. Exopeptidazele scindează legăturile peptidice în vecinătatea grupării amino primare $-NH_2$ sau a unei grupări carboxil terminale $-COOH$. Aminopeptidazele acționează asupra grupărilor terminale $-NH_2$ ale lanțului polipeptidic și eliberează un singur aminoacid, fie dipeptidă, fie tripeptidă. Carboxipeptidazele acționează la grupul terminal $-COOH$ al polipeptidei și eliberează un singur aminoacid sau dipeptidă. Endopeptidazele scindează legăturile peptidice interne ale moleculei proteice din substrat. Bromelaina este o cistein protează (EC 3.4.22.2) constând dintr-un amestec de enzime proteolitice care este derivată din tulpina plantei de ananas, *Ananas comosus*, în timp ce papaina, cunoscută și sub numele de papaya proteinaza I, este și o cistein protează (EC 3.4.22.2) enzimă prezentă în papaya (*Carica papaya*) și papaya de munte (*Vasconcellea cundinamarcensis*).

Bromelaina este un extract enzimatic cu activitate proteolitică, găsită în principal în planta de ananas (*Ananas comosus*) din genul *Bromeliaceae* [3]. Acest extract poate fi obținut atât din tulpină cât și din fructele plantei de ananas, și conține drept componentă principală un amestec de enzime sulfidril proteolitice glicozilate [4-6]. Bromelaina din tulpină posedă proprietăți și compoziție biochimică diferite în comparație cu bromelaina din fructe [7], aceasta din urmă conținând mai multe endopeptidaze tiolice și, de asemenea, compuși precum peroxidaze, fosfatază acidă, glicoproteine, glucide și Ca^{2+} complexat organic [8, 3]. Până în prezent, opt componente proteolitice active au fost izolate din bromelaină [9, 10] Proteinazele sunt considerate a fi fracția cea mai activă, care cuprind ~ 2% din totalul proteinelor; ocazional, termenul de bromelaină este folosit și pentru a descrie doar cele două proteaze dominante din acest extract [11]. Bromelaina își exercită activitatea într-un interval de pH de la 4,5 la 9,5 [12].

În domeniul dentar, pastele de dinți pe bază de enzime proteolitice și-au dovedit eficacitatea prin îndepărtarea petelor dentare, față de un control, fără să determine creșterea

rugozității smalțului dentar (13, 1). De asemenea, având în vedere efectele dăunătoare pe care le produc agenții de albire peroxidici asupra structurii dentare, s-au studiat și alternative fără peroxizi. Dintre acestea, principalele candidate au fost enzimele de tip cisteină-protează, cum ar fi papaina și bromelaina, descrise ca agenți activi cu potențial de albire [1-2,14-15]. Aspectul și culoarea dinților sunt preocupări pentru un număr tot mai mare de persoane care caută tratament dentar alternativ celui chimic. În ultima vreme a avut loc o creștere importantă a numărului de produse de albire a dinților „fără prescripție medicală” și fără implicarea specialiștilor. S-a demonstrat că pastele de dinți conținând extracte de papaină și bromelaină, perturbă, sau elimină porțiunea de proteine din stratul de peliculă care se formează pe suprafața dinților eliminând astfel pigmenții care sunt legați de aceste proteine. Aceste studii in vitro ajută la evaluarea eficacității pastelor de dinți, la îndepărtarea petelor înainte de a planifica ședințe clinice costisitoare și consumatoare de timp.

Într-un alt studiu s-au formulat geluri care conțin enzime proteolitice care conțin (bromelină sau papaină) de origine vegetală și s-a investigat efectul lor de îndepărtare a petelor atunci când este aplicat pe smalț bovin, colorat în soluție de cafea timp de o săptămână și măsurată cu un spectrofotometru digital (Easyshade, Vita Zahnfabrik) pentru evaluarea culorii. A fost măsurată culoarea în comparație cu efectul unui gel de albire cu 20% peroxid de carbamidă. Materialele au fost aplicate o dată la săptămână, de trei ori pe zi, timp de 4 săptămâni. Gelurile pe bază de bromelaină și papaină au fost eficiente în decolorarea smalțului dentar colorat, chiar dacă eficacitatea lor a fost mai mică decât cea a unui produs comercial pe baza de peroxid de carbamidă [2].

Problema tematică, pe care o rezolvă invenția, se referă la obținerea unor formule de geluri de albire cu proprietăți superioare, pe de o parte prin folosirea unor geluri naturale pe bază de enzime, iar pe de altă parte prin elaborarea unei compoziții optime de geluri în care enzimele sunt înglobate în nanocapsule pentru asigurarea eliberării controlate a acestora. Cu toate acestea, gelurile propuse care conțin enzime de origine vegetală pot deține potențial clinic semnificativ pentru prepararea de produse lipsite de peroxid de hidrogen / carbamidă.

Procedul de obținerea a nanocapsulelor constă în obținerea a două faze nemiscibile (faza organică și faza apoasă), apoi acestea se amestecă obținându-se o suspensie coloidală.

iar în final după eliminarea solventului și a apei prin liofilizare, se obține produsul final sub forma nanocapsulelor cu enzime.

Faza organică s-a obținut amestecând la temperatura de 50°C și 500-800 rpm, acetat de etil 1,5 % în apă și extract de gutui. După 20 minute s-a adăugat în vasul de reacție, un amestec format în prealabil, din *enzime de bromelaină și enzime din papaină*, acid polilactic (PLLA) și hidroxiapatită (HA). S-a menținut agitatea încă 30 minute.

Faza apoasă s-a obținut prin agitarea mecanică la 800 rpm, adăugând acetat de etil 1,5% în amestec de extract de gutui și apă timp de 30 minute, după care s-a adăugat soluție de 5% Pluronic™ F-68 ca și surfactant. Etapa următoare este cea în care faza organică este adăugată foarte încet și sub agitare fazei apoase, obținându-se o suspensie coloidală care se diluează cu un volum triplu de apă distilată. Suspensia obținută se agită timp de 10 minute la 12000 rpm, după care se trece la eliminarea solventului cu ajutorul evaporatorului rotativ (rotavaporului). Soluția obținută se îngheață, după care se elimină apa prin liofilizare.

Pentru aromă și proprietăți antibacteriene se vor utiliza uleiuri esențiale incluzând, dar nu se limitează la: cimbru, geranium, oregano, lemongrass, eucalipt, mentă, scorțișoară, lămâie, tămâie, portocale, mușetel, cuișoare și altele, singure sau în amestec de 2-5 uleiuri esențiale.

Se prezintă în continuare 6 exemple nelimitative de realizare a gelurilor de albire.

Exemplul 1. Se realizează un *gel de albire* cu următoarea compoziție: 3 % lubrizol, 8 % PEG 400, 35 % suc de gutui; 2% hidroxiapatită; 2 % pulbere de zer liofilizat, 6 % nanocapsule cu bromelaină, 0,05 % uleiuri esențiale, 2 % 2-hidroxietyl salicilat; restul până la 100 % apă distilată. Pentru obținerea gelului se cântărește într-o capsulă cantitatea de lubrizol specificată se adaugă sucul de gutui, se omogenizează se adaugă PEG 400, se omogenizează la temperatura camerei, se adaugă pulberea de zer liofilizat, nanocapsulele de bromelaină, 2-hidroxietyl salicilatul, amestecul de uleiuri esențiale și se completează cu apă.

Exemplul 2. Se realizează un *gel de albire* cu următoarea compoziție: 6 % lubrizol, 17 % PEG 400, 57 % suc de gutui; 3 % hidroxiapatită; 4 % pulbere de zer liofilizat, 8 % nanocapsule cu papaină, 0,1 % uleiuri esențiale, 2 % 2-hidroxietil salicilat; restul până la 100 % apă distilată. În continuare se procedează după modul de lucru descris în *exemplul 1*.

Exemplul 3. Se realizează un *gel de albire* cu următoarea compoziție: 5 % lubrizol, 15 % PEG 400, 50 % suc de gutui; 2,5 % hidroxiapatită; 3 % pulbere de zer liofilizat, 4 % nanocapsule cu bromelaina, 4 % nanocapsule de 0,1 % uleiuri esențiale, 2 % 2-hidroxietil salicilat; restul până la 100 % apă distilată. În continuare se procedează după modul de lucru descris în *exemplul 1*.

Exemplul 4. Se realizează un *gel de albire* cu următoarea compoziție: 5 % lubrizol, 15 % PEG 400, 50 % suc de gutui; 2,5 % hidroxiapatită; 3 % pulbere de izolat proteic de zer, 4 % nanocapsule cu papaină, 4 % nanocapsule de bromelaină, 0,1 % uleiuri esențiale, 2 % 2-hidroxietil salicilat; restul până la 100 % apă distilată. În continuare se procedează după modul de lucru descris în *exemplul 1*.

Exemplul 5. Se realizează un *gel de albire* cu următoarea compoziție: 5 % lubrizol, 15 % PEG 400, 50 % suc de gutui; 2,5 % hidroxiapatită; 3 % pulbere de izolat proteic de zer, 4 % nanocapsule cu bromelaina, 0,1 % uleiuri esențiale, 2 % 2-hidroxietil salicilat restul până la 100 % apă distilată. În continuare se procedează după modul de lucru descris în *exemplul 1*.

Exemplul 6. Se realizează un *gel de albire* cu următoarea compoziție: 5 % lubrizol, 10 % PEG 400, 50 % suc de gutui; 2 % hidroxiapatită; 3 % pulbere de izolat proteic de zer, 4 % nanocapsule cu bromelaina, 4 % nanocapsule cu papaină, 0,1 % uleiuri esențiale, 2 % 2-hidroxietil salicilat restul până la 100 % apă distilată. În continuare se procedează după modul de lucru descris în *exemplul 1*.

Referințe

1. Gonçalves Schwarzbold C, Cuevas-Suárez CE, Rocha Pacheco R, Silva Ribeiro J, Villarreal Carreño NL, Guerra Lund R, Evandro P, In vitro efficacy of commercial and experimental proteolytic enzyme-based whitening dentifrices on enamel whitening and superficial roughness *J Esthet Restor Dent* 2020; <https://doi.org/10.1111/jerd.12690>
2. Münchow, E. A., Hamann, H. J., Carvajal, M. T., Pinal, R. & Bottino, M. C. Stain removal effect of novel papain- and bromelain-containing gels applied to enamel. *Clin. Oral Investig.* 2016; **20**, 2315–2320.
3. Smith-Marshall J. Golden KD. Characterization of Bromelain from *Morindacitrifolia* (Noni). *J Sci Res.* 2012; 4(2): 445-456.
4. Tochi BN, Wang Z, Xu SY, Zhang W. Therapeutic Application of Pineapple Protease (Bromelain): A Review. *Pakistan J Nutrition.* 2008; 7 (4): 513-520.
5. Gautam SS, Mishra SK, Dash V, Goyal AK, Rath G. Comparative study of extraction, purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant. *Thai J Pharm.* 2010; 34(1): 67-76.
6. Hossain MM Lee SI, Kim IH. Effects of bromelain supplementation on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, faecal microbial shedding, faecal score and fecal noxious gas emission in weanling pigs. *Veterinarni Medicina.* 2015; 60(10): 544-552.
7. Pavan R, Jain S, Shradha, Kumar A. Properties and Therapeutic Application of Bromelain: A Review. *Biotechnol Res Int.* 2012; 2012(1): 1-6.
8. Maurer HR. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell Mol Life Sci.* 2001; 58(9): 1234-1245.
8. Larocca M, Rossano R, Santamaria M, Riccio P. Analysis of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] fruit proteinases by 2-D zymography and direct identification of the major zymographic spots by mass spectrometry. *Food Chem.* 2010; 123(1): 1334-1342
9. Ota S, Moore S, Stein WH. Preparation and chemical properties of purified stem and fruit bromelains. *Biochemistry* 1964; 3: 180-185.
10. Murachi T, Yasui M, Yasuda Y: Purification and physical characterization of stem bromelain. *Biochemistry* 1964; 3: 48-55.
11. Hale LP, Greer PK, Trinh CT, James CL. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 783-793.
12. P Kalyana, A Shashidhar, B Meghashyam, K R Sreevidya, S Sweta. Stain removal efficacy of a novel dentifrice containing papain and Bromelain extracts--an in vitro study. *Int J Dent Hyg.* 2011; 9(3): 229-33. DOI: 10.1111/j.1601-5037.2010.00473x
13. Chakravarthy, P. K., Acharya, S. Efficacy of extrinsic stain removal by novel dentifrice containing papain and bromelain extracts. *J. Young Pharm.* 2012; 4, 245–249.
14. Soares PAG, Vaz AFM, Correia MTS, Pessoa A Maria G, Cunha C. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. *Sep Purif Technol.* 2012; 98(2138): 389-395.
15. Babu BR, Rastogi NK, Raghavarao KSMS. Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. *Chem Eng Process.* 2008; 47(1): 83-89.
16. Ketnawa S, Sai-Ut S, Theppakorn T, Chaiwut P, Rawdkuen S. Partitioning of bromelain from pineapple peel (*Nang Laecultv.*) by aqueous two-phase system. *As J Food Ag-Ind.* 2009; 2(4): 457-468.
17. Rojek M. Enzyme Nutrition Therapy Beyond a Raw Food Diet, vol. 11. Australia: Nexus Magazine; 2004.

REVENDICĂRI

1. Compoziție destinată albirii dinților utilizată în estetica dentară, sub forma de gel, se aplică pe suprafața dinților cu sau fără gutieră. Această compoziție este pe bază de polimeri biocompatibili, sucuri și nanocapsule cu enzime, pulberi de hidroxiapatită HA, și zer liofilizat/izolat proteic de zer, ce permite gelului să îndepărteze petele și culoarea galbenă dinților.

2. Compoziția materialului de albire, conform actualului brevet, este formată din amestec de suc de gutui, zer liofilizat/ izolat proteic de zer și nanoumpluturi. Polimeriul biocompatibil este polietilen glicol – PEG 400 8-17 %, lubrizol 3-6 %, sucuri naturale de gutui, 35-57 %, izolat proteic de zer 5-10 % pulberi de hidroxiapatită HA 5-15% nanocapsule cu enzime (bromelaină, papaină) 6-8 % și apă.