



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00641

(22) Data de depozit: 17/10/2022

(41) Data publicării cererii:
30/04/2024 BOPI nr. 4/2024

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE, BUCUREȘTI,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• GAVRIL GEORGIANA- LUMINIȚA,
STR.ALEXANDRU CUTIERU, NR.25A, BL.2,
SC.2, AP.110, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;

• BERTEANU ELENA,
STR. DR. ALEXANDRU LOCUSTEANU
NR. 2, BL. 77A, ET. 3, AP. 15, BUCUREȘTI,
B, RO;
• PĂUN MIHAELA, ALEEA
COMPOZITORILOR, NR.13, BL.OD5, SC.7,
AP.248, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• GHEORGHE ANA-MARIA, STR. LUICA
NR. 31, BL. M4BIS, SC. A, ET. 10, AP. 63,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO

(54) HIDROGEL CU ACȚIUNE HEMOSTATICĂ UTILIZABIL
ÎN CAZUL PLĂGILOR HEMORAGICE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un hidrogel cu acțiune hemostatică utilizat în tratamentul plăgilor hemoragice externe pentru oprirea hemoragiei și asigurarea unei regenerări și videcări rapide a țesutului afectat. Hidrogelul conform invenției este constituit din compuși biologic activi conținuți în extractul fitoterapeutic de *Equisetum arvense* (coada calului) încorporați într-o bază de gel preparată din 1,5...2,5% procente masice de gelatină. Procedeele de obținere conform invenției constă în obținerea extractului de *Equisetum arvense* din 10 g material vegetal și 200 ml apă distilată, prin extracție solid - lichid (tehnica Soxhlet) timp de 9 ore, utilizând un raport de extracție de 10 : 200 m/v, extract care se încorporează direct în baza de gel, nefiind necesară

decantarea și/sau filtrarea extractului, după care se prepară suspensia coloidală de gelatină prin dizolvarea a 2,5 g gelatină la 100 ml apă distilată prin agitare la temperatura de 60°C pe un agitator magnetic la 1300 rot/min., obținându-se astfel un gel omogen, consistent, translucid, cu un pH de 6, care se păstrează în repaus pentru hidratare la o temperatură de 4°C timp de 24 h, iar după 24 h extractul fitoterapeutic se încorporează în masa de gel într-un raport de greutate gel: extract de 8 : 1, prin adăugarea extractului în masa de gel în fir subțire, sub agitare continuă.

Revendicări: 1
Figuri: 2



DESCRIEREA INVENȚIEI

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	ca 2022 00641
Data depozit	17-10-2022

**HIDROGEL CU ACȚIUNE HEMOSTATICĂ UTILIZABIL ÎN CAZUL
PLĂGILOR HEMORAGICE**

Invenția se referă la un bioprodus hemostatic de uz topic condiționat sub formă de hidrogel pe bază de gelatină în combinație cu extract de *Equisetum arvense* L. (coada calului). Hidrogelul poate fi utilizat în domeniul medical în tratamentul plăgilor hemoragice externe pentru oprirea hemoragiei și asigurarea unei regenerări rapide și unei vindecări eficiente a țesutului afectat minimizând formarea cicatricilor.

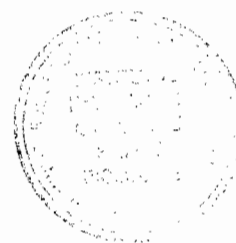
De-a lungul timpului, au fost folosite diverse metode pentru controlul hemoragiei și vindecarea rănilor, precum utilizarea cărnii crude de către egiptenii antici sau utilizarea plasmei uscate în timpul primului război mondial (Stemberger *et al.*, 1998, Bergel S., 1909). Metodele au evoluat iar ulterior au fost dezvoltate tehnici mecanice (presiune directă, suturi, legarea cu cleme, capse, tamponane textile, tifon, bureți), termice (electrocauterizare, bisturii hemostatic, laser) sau chimice.

Agenții hemostatici existenți sunt clasificați în agenți hemostatici pasivi, care opresc sângerarea acționând mecanic pe baza proprietăților specifice ale suprafeței materialului (cum ar fi hemocompatibilitatea și capacitatea de a preveni infecțiile) și agenți hemostatici activi, care intervin în procesul de coagulare a sângelui și induc hemostaza prin inițierea și augmentarea cascadei de coagulare.

În prezent, principalele materiale cu acțiune hemostatică utilizate sunt bandajele, materialele hemostatice derivate din sânge și materialele hemostatice sub formă de geluri sau bureți (Qin *et al.*, 2021).

Dintre aceste materiale amintim agenții hemostatici pe bază de bumbac, celuloză oxidată, celuloză regenerată oxidată, colagen, gelatină, alginat, chitosan, polilizină, poliarginină, poli oxid de propilenă (PPO), fibrină, fibrinogen și trombină (Sultan *et al.*, 2022, Yu and Zhong, 2022).

Pe piață există mai multe produse hemostatice disponibile comercial, dintre care amintim: Evicel și Crosseal (hemostatice pe bază de fibrină produse de Omrix), Surgicel Original (hemostatic pe bază de celuloză oxidată produs de Johnson and Johnson), Celox (hemostatic pe bază de chitosan produs de MedTradeProducts Ltd) sau QuikClot (hemostatic pe bază de zeolit produs de Z-Medica).



Fiecare dintre produsele existente pe piață sau care sunt în curs de testare, diferă în ceea ce privește mecanismul de acțiune, costul de producție sau modalitatea de aplicare și, din păcate, fiecare dintre aceste produse prezintă și anumite dezavantaje. Astfel, în prezent, se desfășoară intense cercetări în domeniul agenților hemostatici cu scopul de a elimina diversele complicații asociate utilizării acestora, cum ar fi apariția reacțiilor alergice sau exotermice, inflamația, hemoliza, tromboembolismul sau riscul contactării cu boli transmisibile prin sânge precum encefalita spongiformă bovină sau infecțiile virale.

Problema propusă spre rezolvare de prezenta cerere de brevet de invenție constă în tratarea plăgilor hemoragice externe prin oprirea hemoragiei și asigurarea unei regenerări rapide și eficiente a țesutului afectat.

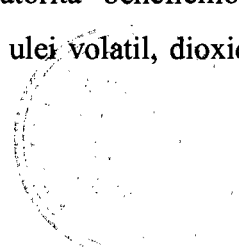
Nevoia unor produse cu activitate hemostatică (procoagulantă) apare din necesitatea de a trata într-o manieră eficientă și cu minimizarea efectelor adverse leziunile însoțite de hemoragii. La ora actuală, se acordă un interes deosebit în dezvoltarea de produse hemostatice eficiente deoarece hemoragia este prima cauza de deces precoce în chirurgie și provoacă peste 30% din decesele traumatice ce survin pe câmpurile de luptă, în spitale sau în situații de urgență, jumătate dintre acestea având loc înainte ca pacienții să poată ajunge la spital (Yu and Zhong, 2021).

Soluția oferită de prezenta cerere de brevet constă în asocierea într-o compoziție farmaceutică condiționată sub forma unui hidrogel a unui biopolimer natural (gelatina) cu compuși biologic activi cu activitate hemostatică din extract de *Equisetum arvense* (coada calului). Hidrogelul obținut poate fi folosit în tratamentul plăgilor cu sângerare datorită proprietăților sale de absorbție a fluidelor și a efectului hemostatic sinergic exercitat de gelatină și de compușii biologic activi din extractul fitoterapeutic.

Gelatina este un biopolimer natural, obținut prin hidroliza parțială a colagenului, prezintă o conformație parțial cristalină, formată dintr-un șir de aminoacizi (glicina, prolina, alanina, valina, hidroxiprolina) ce are avantajul unui cost mai redus și care, în același timp, conține încă fragmente de legare pentru atașarea celulelor. Gelatina este, nontoxică, non-carcinogenică, biocompatibilă și biodegradabilă (Skopinska-Wisniewska *et.al.*, 2021).

Gelatina păstrează proprietățile hemostatice ale colagenului și poate absorbi de până la 40 de ori greutatea sa în sânge. Gelatina produce hemostaza nu numai prin activarea și agregarea plachetelor dar și prin blocarea răni, deoarece are capacitatea de a se umfla *in vivo* până la 200% atunci când intră în contact cu sângele (Ghimire *et. al.*, 2021).

Extractul de *Equisetum arvense* este folosit în fitoterapie datorită beneficiilor compușilor săi bioactivi, precum: flavonoide, saponine, alcaloizi, steroli, ulei volatil, dioxid



de siliciu, săruri de potasiu, substanțe minerale, etc. Astfel că, este utilizat cu succes în diferite afecțiuni datorită proprietăților sale hemostatice (Gilca *et al.*, 2018; Cordova *et al.*, 2017; Nayal *et al.*, 2015; Gallo *et al.*, 2011), antiinflamatorii (Roumili *et al.*, 2022; López Villarreal *et al.*, 2020), antioxidante (Dormousoglou *et al.*, 2022; Roumili *et al.*, 2022), antimicrobiene (López Villarreal *et al.*, 2022; Amirinia *et al.*, 2021), cicatrizante și remineralizante (Carneiro *et al.*, 2013, 2019), diuretic (Mo *et al.*, 2022) etc.

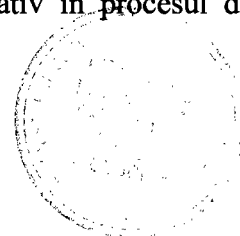
Prin asocierea gelatinei cu extractul vegetal de coada calului s-a urmărit obținerea unui efect complex, deoarece gelatina nu determina doar o stimulare a procesului natural de cicatrizare și regenerare tisulară ci potențează și efectele individuale ale extractului vegetal, facilitându-i penetrarea la nivelul pielii și mucoaselor. Datorită utilizării gelatinei, coagularea este inițiată prin activarea contactului particulele gelatinoase condiționate sub forma de hidrogel, restricționează fluxul de sânge și formează o matrice stabilă în jurul căreia se formează cheagul. Pentru bioprodusul care face obiectul prezentei cereri de brevet s-a ales extractul de *E. arvense* datorită efectului său rapid și eficient de a opri hemoragiile și totodată de a ajuta organismul să se refacă în urma unei sângerări abundente, ceea ce îl recomandă a fi un foarte bun hemostatic.

Această combinație de substanțe naturale active, în care extractul de *E. arvense* furnizează compuși bioactivi pentru inducerea coagulării și refacerea pielii iar gelatina furnizează toate componentele proteice de bază hidrosolubile ce intervin direct atât în reconstrucția țesutului cutanat cât și în inducerea coagulării sângelui conduce la obținerea unui bioprodus capabil să oprească sângerarea, să reducă inflamația și să asigure refacerea țesutului afectat cu minimizarea cicatricilor.

În cazul hidrogelului obținut, pentru prima dată în lume (bibliografia științifică și bazele de date privind brevetele și cererile de brevet nu conțin nicio menționare în acest sens) se utilizează gelatina în combinație cu extractul fitoterapeutic de coada calului.

Datorită componentelor utilizate în prepararea gelului, se elimină dezavantajele caracteristice altor produse existente pe piață cum ar fi reacțiile alergice mediate de IgE sau riscul de transmitere a bolilor virale de tipul hepatitei A, B, C sau HIV (de tip 1 sau 2). Totodată se elimină reacția exotermă ce apare în cazul utilizării zeoliților prevenind astfel arsurile cauzate de aceștia.

Hidrogelul asigură un control rapid și eficient al hemoragiilor, având capacitatea de a face contact efectiv cu suprafața de sângerare datorită compoziției suportului și asigură adsorbția pe suprafața sa a produșilor de degradare locali cu rol negativ în procesul de regenerare.



Hidrogelul obținut este sigur și ușor de manevrat și, în plus, este în măsură să ofere un sistem biodegradabil care poate fi degradat și absorbit de la sine. Condiționarea bioprodusului sub forma unui hidrogel, elimină dezavantajele perturbării cheagului care apar odată cu eliminarea produselor de tipul bandajelor sau a bureților deoarece nu mai este necesară îndepărtarea de la locul leziunii și asigură furnizarea susținută a unei cantități eficiente de agent hemostatic direct la locul leziunii. Totodată se elimină și riscul dispersiei agentului de coagulare ce apare la utilizarea produselor sub formă de pulbere.

Structura sa asigură absorbția sângelui și a secrețiilor leziunii, promovarea agregării plachetare, regenerarea țesutului lipsă, timpul de vindecare devine mai scurt și cicatricile sunt minime.

În figura nr.1 este prezentată morfologia hidrogelului de gelatină îmbogățit cu compuși biologic activi cu activitate hemostatică din extract de *Equisetum arvense* (coada calului).

În figura nr. 2 (a și b) este prezentată analiza prin microscopie electronică de scanare a aderării hematiilor și plachetelor din sânge proaspăt după 30 de minute de contact cu hidrogelul la temperatura de 37°C. Din imagine se poate observa aderarea plachetelor sangvine și a eritrocitelor pe suprafața hidrogelului. În figura nr.2 (c) este prezentată imaginea obținută prin microscopie electronică care atestă formarea cheagului de sânge după 30 minute de la contactul cu hidrogelul la temperatura de 37 ° C.

Hidrogelul obținut conform invenției, este caracterizat prin aceea că este constituit din compuși biologic activi conținuți în extractul fitoterapeutic de *Equisetum arvense* (coada calului) încorporați într-o bază de gel preparată din 1,5-2,5g % gelatină.

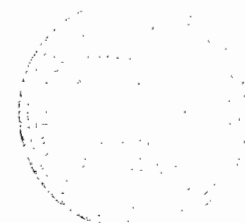
Pentru obținerea extractului s-a folosit metoda de extracție Soxhlet (Marsoul *et al.*, 2020), utilizându-se 10g material vegetal uscat de *Equisetum arvense* iar ca solvent 200mL apă distilată (Millipore). Materialul vegetal a fost fixat într-un cartuș de hârtie de filtru și introdus în extractor, temperatura de extracție 100°C, timpul de extracție 9 ore. Pentru ca randamentul de extracție să fie cât mai bun, s-au realizat 3 cicluri de extracție.

Baza de gel s-a preparat prin dizolvarea a 1,5g - 2,5g pulbere gelatină în 100 ml apă distilată prin agitare magnetică la 1300 rpm la temperatura de 60° C iar amestecul s-a lăsat în repaus la 4°C timp de 24h. Ulterior, extractul fitoterapeutic s-a încorporat în baza de gel prin metoda includerii.



EXEMPLU

1. Pentru obținerea extractului de *E. arvense* s-au folosit 10 g material vegetal și 200mL apă distilată, prin extracție solid-lichid (tehnică Soxhlet), timp de 9 ore, utilizând un raport de extracție 10:200 m/v. Extractul obținut a fost încorporat direct în baza de gel (nefiind necesară decantarea și/sau filtrarea extractului).
2. Se prepară suspensia coloidală de gelatină prin dizolvarea a 2,5 g gelatină la 100 ml apă distilată prin agitare la temperatura de 60° C pe un agitator magnetic la 1300 rpm. Se obține astfel un gel omogen, consistent, translucid, cu un pH în jur de 6, care se păstrează în repaus pentru hidratare la 4°C timp de 24h.
3. După 24h se încorporează în masa de gel extractul fitoterapeutic în raport de greutate între gel și extract de 8:1 prin adăugarea extractului în fir subțire, sub agitare continuă, în masa de gel.



Handwritten signature in black ink.

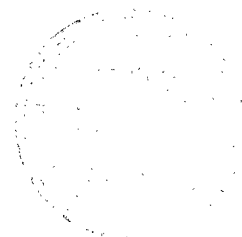
BIBLIOGRAFIE

1. Amirinia, F., & Pourhajibagher, M. (2021). *In vitro* antimicrobial and cytotoxicity activities of some medicinal plant extracts against oral microbial pathogens. *Folia Medica*, 63, 932.
2. Bergel S. (1909). Über die Wirkung des Fibrins. *Dtsch Med Wschr* 35:663–665.
3. Carneiro, D. M., Jardim, T. V., Araújo, Y. C. L., Arantes, A. C., de Sousa, A. C., Barroso, W. K. S., ... & Jardim, P. C. B. V. (2019). *Equisetum arvense*: new evidences support medical use in daily clinic. *Pharmacognosy Reviews*, 13(26), 51.
4. Carneiro, D. M., Tresvenzol, L. M. F., Jardim, P. C. B. V., & Cunha, L. C. D. (2013). *Equisetum arvense*: scientific evidences for clinical use.
5. Cordova, E., Morganti, L., & Rodriguez, C. (2017). Possible drug–herb interaction between herbal supplement containing horsetail (*Equisetum arvense*) and antiretroviral drugs: report of 2 cases. *Journal of the International Association of Providers of AIDS Care (JIAPAC)*, 16(1), 11–13.
6. Dormousoglou, M., Efthimiou, I., Antonopoulou, M., Fetzer, D. L., Hamerski, F., Corazza, M. L., ... & Vlastos, D. (2022). Investigation of the Genotoxic, Antigenotoxic and Antioxidant Profile of Different Extracts from *Equisetum arvense* L. *Antioxidants*, 11(7), 1393.
7. Gallo, F. R., Multari, G., Federici, E., Palazzino, G., Giambenedetti, M., Petitto, V., ... & Nicoletti, M. (2011). Chemical fingerprinting of *Equisetum arvense* L. using HPTLC densitometry and HPLC. *Natural Product Research*, 25(13), 1261–1270.
8. Gilca, M., Tiplica, G. S., & Salavastru, C. M. (2018). Traditional and ethnobotanical dermatology practices in Romania and other Eastern European countries. *Clinics in dermatology*, 36(3), 338–352.
9. López Villarreal, S. M., Elizondo Luévano, J. H., Pérez Hernández, R. A., Sánchez García, E., Verde Star, M. J., Castro Ríos, R., ... & Chávez Montes, A. (2022). Preliminary Study of the Antimicrobial, Anticoagulant, Antioxidant, Cytotoxic, and Anti-Inflammatory Activity of Five Selected Plants with Therapeutic Application in Dentistry. *International journal of environmental research and public health*, 19(13), 7927.
10. Marsoul, A., Ijjaali, M., Elhajjaji, F., Taleb, M., Salim, R., & Boukir, A. (2020). Phytochemical screening, total phenolic and flavonoid methanolic extract of pomegranate bark (*Punica granatum* L): Evaluation of the inhibitory effect in acidic medium 1 M HCl. *Materials Today: Proceedings*, 27, 3193–3198.
11. Mo, B., Sendker, J., Herrmann, F., Nowak, S., & Hensel, A. (2022). Aqueous extract from *Equisetum arvense* stimulates the secretion of Tamm-Horsfall protein in human urine after oral intake. *Phytomedicine*, 104, 154302.
12. Nayal, R., Abajy, M. Y., & Takla, S. (2015). Investigating In Vitro the Hemostatic Effect of Some Medicinal Plants. *Research Journal of Aleppo University*, 100p.
13. Roumili, I., Cheniti, W., Baghiani, A., Charef, N., & Arrar, L. (2022). HPLC Analysis, Acute toxicity and Assessment of Antioxidant and Anti-inflammatory Capacity of different Extracts of *Equisetum arvense*. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 12(3), 318–326.
14. Stemberger, A., Altmeyen, J., Bader, F., Calatzis, A. (1998). Characterization of Biomaterials for Tissue Repair. In: Stark, G.B., Horch, R., TÁczos, E. (eds) *Biological Matrices and Tissue Reconstruction*, Springer, Berlin, Heidelberg.
15. Sultan T., Hong H., Lee O.J., Ajiteru O., Lee Y.J., Lee J. S., Lee H., Kim S. H. and Park C. H. (2022). Silk Fibroin-Based Biomaterials for Hemostatic Applications, *Biomolecules*, 12, 660.
16. Skopinska-Wisniewska J., Tuszyńska M., Olewnik-Kruszkowska E. (2021). Comparative Study of Gelatin Hydrogels Modified by Various Cross-Linking Agents, *Materials*, 14, 396.
17. Xiaolei Q., Felix J.M., Mingzi M., Ruyi H., Mengdi M., Xueying H., Yu C. and Yang Y. (2021). In situ photo-crosslinking hydrogel with rapid healing, antibacterial, and hemostatic activities, *e-Polymers*, 21 (1), 606–615.
18. Yu P., and Zhong W. (2021). Hemostatic materials in wound care, *Burns & Trauma*, 9: tkab019.



REVENDICĂRI

Hidrogel cu activitate hemostatică și de stimulare a procesului de refacere tisulară pe baza de gelatină cu o concentrație de 1,5 - 2,5% și extract apos de *Equisetum arvense*.



DESENE



Figura 1. Morfologia hidrogelului de gelatină îmbogățit cu compuși biologic activi din extract de *Equisetum arvense*

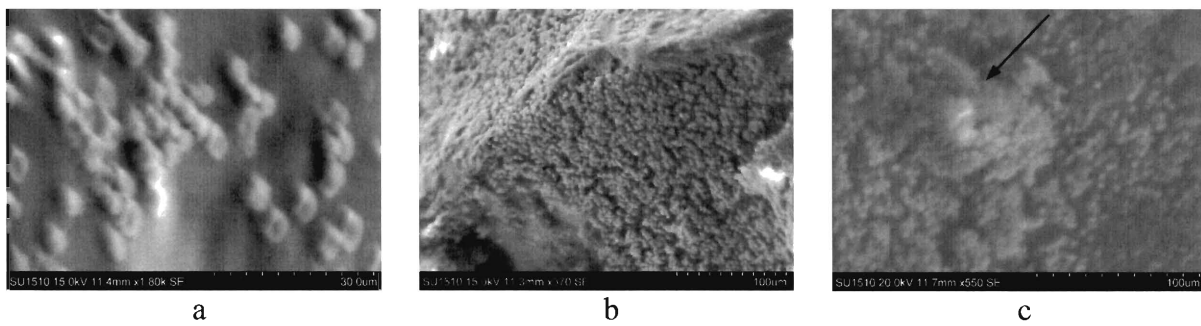


Figura 2. Analiza prin microscopie electronică de scanare a aderenței hematiilor și plachetelor din sânge proaspăt (a și b) și formarea cheagului de sânge (c) după 30 de minute de contact cu hidrogelul la temperatura de 37°C.