



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00696

(22) Data de depozit: 19/09/2018

(41) Data publicării cererii:
30/08/2019 BOPI nr. 8/2019

(71) Solicitant:
• ANTIBIOTICE S.A., STR.VALEA LUPULUI
NR.1, IAȘI, IS, RO;
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "GRIGORE T. POPA" DIN IAȘI,
STR.UNIVERSITĂȚII NR.16, IAȘI, IS, RO

(72) Inventatori:
• ANDRIEȘ CLAUDIA,
STR.EMILIA DUMITRESCU NR.355,
SAT VĂDENI, BR, RO;
• PROFIRE LENUȚA, STR. EMIL HONORIU
NR. 12, IAȘI, IS, RO;
• MOISUC LĂCRĂMIOARA ȘTEFANIA,
STR.SF.PETRU MOVILĂ NR.1, BL.L12,
SC.B, ET.2, AP.9, IAȘI, IS, RO;
• IACOB ANDREEA TEODORA,
STR.ȘOSEAUA PĂCURARI NR.46, BL.553,
SC.A, ET.6, AP.23, IAȘI, IS, RO;

• NICOARĂ MIHAELA,
ALEEA MIHAIL SADOVEANU NR.32B, AP.2,
IAȘI, IS, RO;
• CONFEDERAT LUMINIȚA GEORGETA,
STR.VICTORIEI NR.17, BL.E13, SC.B,
AP.12, SUCEAVA, SV, RO;
• POTORAC LILIANA,
SAT LUNCA GETĂȚUII NR.150,
COMUNA CIUREA, IS, RO;
• AVRAM IUSTINA MIHAELA,
SAT BOIȘTEA, COMUNA PETRICANI, NT,
RO;
• RUSU ANCA DANIELA, ȘOS.NICOLINA
NR.56, BL.977B, AP.2, IAȘI, IS, RO;
• CĂRUNTU IRINA DRAGA,
BD.ȘTEFAN CEL MARE ȘI SFÂNT NR.4,
SC.A, ET.6, AP.28, IAȘI, IS, RO;
• TELIȘCĂ AMALIA DIANA, STR.GĂRII
NR.17, BL.L9, ET.7, AP.4, IAȘI, IS, RO;
• GIUSCA SIMONA ELIZA, STR.BUCIUM
NR.31, BL.B2-3, SC.A, AP.4, IAȘI, IS, RO

(54) PRODUS TOPIC CONȚINÂND PRINCIPII ACTIVE NATURALE,
FOLOSIT ÎN TRATAMENTUL PLĂGILOR CRONICE,
ȘI PROCEDEUL INDUSTRIAL DE OBTINERE A ACESTUIA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un produs topic, utilizat în tratamentul plăgilor cronice, și la un procedeu de obținere a acestuia. Produsul conform invenției este un hidrogel constituit din 0,1...5% hialuronat de sodiu, respectiv, L-arginină, chitosan, 0,5...10% bentonită, 5...50% glicerol, 0,02...6% acid lactic, până la 5% un formator de gel, preferabil hidroxietilceluloză, 20...85% apă purificată, până la 5% betulină, respectiv, 15% purtător acceptabil farmaceutic, preferabil propilenglicol. Procedeu conform invenției constă în prepararea gelului de chitosan

prin hidratare la 45°C și solubilizare prin acidulare cu acid lactic, suspendarea hialuronatului de sodiu în glicerol, suspendarea bentonitei, amestecarea componentelor și adăugarea ingredientelor active, cu omogenizare la temperatura camerei, rezultând un hidrogel având activitate antioxidantă și antimicrobiană pe o gamă largă de microorganisme specifice.

Revendicări: 8
Figuri: 7



h0

**Produs topic conținând principii active naturale folosit în tratamentul plăgilor cronice și
procedul industrial de obținere a acestuia**

Inventatori: Claudia Andrieș, Lenuța Profire, Lăcrămioara Ștefania Moisuc, Andreea Teodora Iacob, Mihaela Nicoară, Irina Draga Căruntu, Liliana Potorac, Luminița Georgeta Confederat, Anca Daniela Rusu, Iustina Mihaela Avram, Amalia Diana Telișcă, Simona Eliza Giusca

Descrierea invenției

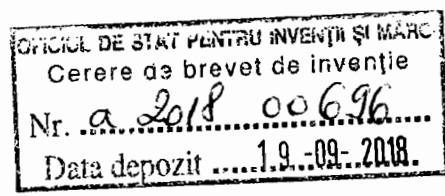
Prezenta invenție se referă la realizarea unui hidrogel destinat tratamentului plăgilor, arsurilor și escarelor. În stadiul tehnicii se regăsește lucrarea de doctorat "Sinteza și evaluarea biologică a unor noi derivați de α -aminoacizi", susținută în cadrul Universității de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” Iași, Facultatea de Farmacie, la data de 18.09.2015. Lucrarea de doctorat abordează înglobarea unor noi derivați de L-arginină cu structură de tiazolidin-4-onă în matrici polimerice pe bază de chitosan și chitosan-acid hialuronic (sub forma de „sponge” și film). Tehnica de lucru prezentată în această lucrare, atât pentru „sponge” cât și pentru film, presupune etape dificil de transpus la scară industrială, ce sunt consumatoare de timp și energie și care necesită echipamente speciale.

Compozițiile prezentate în lucrarea de doctorat nu sunt înregistrate ca medicament și nu se aplică terapeutic din cauza dificultăților legate de procesul tehnologic, greu de aplicat la nivel industrial, ce implică timpi prelungiți de procesare, precum și din cauza etapelor tehnologice multiple, cu implicații majore în rentabilitate.

Un alt aspect al invenției se referă la compoziția farmaceutică a produsului, ce constituie o asociere originală a unor ingrediente naturale (chitosan, acid hialuronic, bentonită, L-arginină și betulină provenită din extract standardizat de *Betula alba*), cu acțiune multiplă în tratamentul plăgilor cronice.

Descrierea detaliată a invenției

Compoziția conform invenției este constituită din 0,1...5% hialuronat de sodiu, 0,1...5% L-arginină, 0,5...10% bentonită, 0,1...5% chitosan, 5...50% glicerol, 0,02...6% acid lactic, fără sau cu adaos de formator de gel 0,1...5%, preferabil hidroxietilceluloză (HEC), 20...85% apă purificată, fără sau cu adaos de 0,1...5% betulină, fără sau cu adaos de 5...15% vehicul acceptabil farmaceutic, preferabil propilenglicol.



Ingredientele active naturale utilizate în produsul topic ce face obiectul invenției sunt cunoscute pentru importante efecte biologice. Apreciem că în combinația și în proporțiile declarate, principiile active utilizate conduc la obținerea unui produs cu acțiune multiplă și îmbunătățită în tratamentul plăgilor cronice, și extrem de important din punct de vedere economic, tehnologia de obținere poate fi transpusă la scară industrială.

Clorhidratul de L-arginină este un amino-acid semiesențial care joacă un rol important în fiziologia celulară. Este bine cunoscut faptul că, L-arginina intensifică sinteza colagenului la nivelul plăgii și conferă elasticitate țesutului afectat. De asemenea, L-arginina este cunoscută pentru abilitatea de a stimula circulația sanguină la nivelul plăgilor, cu rol în reducerea riscului de suprainfectare a acestora. Arginina are efect pozitiv asupra nivelului factorului de creștere insulin-like (IGF-1), hormon polipeptidic, având structură similară insulinei și proinsulinei din organism, care stimulează vindecarea plăgilor cronice, inclusiv a celor de tip picior diabetic [1, 2].

Datorită acestor funcții multiple, L-arginina este un element esențial în procesul de vindecare a plăgilor și numeroase studii au indicat că administrarea L-argininei poate grăbi procesul de vindecare [3, 4].

Acidul hialuronic (HA) este un glicozaminoglican nesulfonat, component principal al matricii extracelulare, prezent în diferite țesuturi, cum ar fi: piele, articulații sinoviale, țesuturi peridontale [5]. Acidul hialuronic cu masă moleculară mare are rol în activarea și modularea răspunsului antiinflamator [6] și în regenerarea tisulară. Totodată acest glicozaminoglican joacă un rol important pe parcursul fiecărei etape de vindecare a răni, inclusiv în etapele de inflamație, granulare și reepitelizare [7, 8].

Chitosanul, este un polizaharid liniar, un component natural, netoxic, biocompatibil, derivat din chitină care prezintă o serie de avantaje atunci când este utilizat în tratamentul rănilor și arsurilor. Eficiența derivaților de chitină în tratarea rănilor este cunoscută încă din anii '70 [9]. Unul dintre avantajele utilizării chitosanului este faptul că la aplicare pe plagă, fiind un polimer cationic, reacționează cu proteinele anionice (inclusiv keratina din piele), formând o peliculă biocompatibilă și permeabilă, ce permite oxigenarea țesuturilor afectate. Adițional, acest biopolimer are abilitatea de a absorbi apa și de a se degrada natural sub acțiunea enzimelor, fapt pentru care nu este necesară îndepărtarea lui de pe răni. Un alt avantaj al utilizării chitosanului constă în capacitatea sa de a vindeca răni fără formare de cicatrice. De asemenea, chitosanul prezintă acțiune antibacteriană și antifungică [10] și efect hemostatic [11-14]. Proprietățile analgezice ale chitosanului se datorează

stimulării imunocitelor, leucocitelor, macrofagelor și fibroblaștilor, prin blocarea terminațiilor nervoase cu reducerea durerii [15, 16].

Bentonita este o argilă naturală cu structura cristalină utilizată în produse farmaceutice ca agent de suspendare, de stabilizare, prezentând totodată și o mare capacitate de absorbție a apei. În cazul aplicării bentonitei pe țesuturile lezate, fluidele extravazate din leziuni vor fi absorbite și astfel va fi favorizat procesul de reepitelizare. Prin conținutul ridicat de minerale bentonita este un agent natural de detoxifiere, absorbând toxinele și eliberând nutrienți la nivelul pielii, stimulând circulația sângelui și eliminând celulele moarte ale pielii. În literatura de specialitate se regăsesc date cu privire la proprietățile antimicrobiene ale bentonitei [17] și despre rolul acesteia în vindecarea rănilor [18].

Betulina este un amestec de triterpene provenite din extract natural de coajă de mesteacăn (*Betula alba*). Datele din literatura de specialitate confirmă faptul că betulina este un compus activ natural cu proprietăți antiinflamatoare, antibacteriene și de regenerare tisulară, antivirale (fiind activă pe Herpes Simplex Type I) și anticancerigene. Aceste proprietăți susțin utilizarea betulinei în produse farmaceutice topice destinate tratamentului plăgilor cronice, având rol în stimularea procesului de cicatrizare [19, 20].

Acidul lactic este un acid organic slab, netoxic, cu rol în stimularea reepitelizării găsiindu-se în organism în cantități apreciabile. Este utilizat ca agent acidifiant și intervine în procesul de reepitelizare prin stimularea sintezei de colagen, a ceramidelor și a factorului de creștere epidermal [21-23].

Glicerolul este o substanță ce se găsește în mod natural în plante și animale, este conservant antimicrobian, non-toxic, fiind folosit în produsele farmaceutice/cosmetice, cu rol de emolient, umectant și plasticizant.

De asemenea, glicerolul este utilizat în prezenta invenție datorită interacțiunilor sale cu două componente prezente în compoziție:

- interacțiunea glicerol– bentonită: bentonita, înainte de a fi introdusă în compoziție, necesită o activare prin realizarea unei suspensii stabile de bentonită în glicerol, în raportul din formulă pentru a asigura stabilitatea amestecului. În cazul în care această activare nu este realizată sau este realizată în parametri improprii, se poate observa un impact negativ asupra stabilității produsului finit.
- interacțiunea glicerol – chitosan: datorită structurii sale poliolice, glicerolul posedă capacitatea de a interacționa cu polizaharidele (chitosan) prin intermediul legăturilor de hidrogen [24, 25].

În acest mod sunt îmbunătățite proprietăți precum: flexibilitatea, ductilitatea și mobilitatea lanțurilor polimerice. Efectul plastifiant al glicerolului duce la modificarea temperaturii de tranziție sticloasă (T_g), crescând mobilitatea sistemului. Prin natura sa hidrofilă, glicerolul poate încorpora apă în rețeaua gelului. În cazul produsului din prezenta invenție, chitosanul se structurează parțial în prezența acidului lactic prin intermediul speciei anionice lactat. Peste această reticulare parțială se suprapune structura generată de bentonită, iar mobilitatea structurii rezultate este influențată în același timp de prezența glicerolului.

Hidroxietilceluloza (HEC) este un polimer non-ionic, derivat de celuloză, utilizat ca agent de gelifiere și îngroșare în industria farmaceutică și cosmetică.

Vindecarea rănilor este un proces complex, cu rolul de a restabili bariera protectoare a pielii și de a reduce riscul apariției infecțiilor sau a complicațiilor datorate acestora. Procesul de vindecare a rănilor presupune cinci faze, și anume:

- hemostază;
- inflamație;
- migrație și proliferare celulară;
- sinteza proteinelor și contracția rănilor;
- reepitelizare.

Cu toate acestea, doar trei dintre ele (faza inflamatorie, de granulare și cea de reepitelizare) se evidențiază ca faze distincte în procesul de vindecare.

Pe piața farmaceutică, există în acest moment, un număr considerabil de produse destinate tratării plăgilor, produse care asigură hidratarea și regenerarea țesutului afectat, asigurând totodată protecție împotriva infecțiilor. Un loc important în categoria produselor topice îl ocupă hidrogelurile. Acestea au la bază rețele tridimensionale de polimeri hidrofilii reticulați chimic, în a căror matrice sunt înglobate substanțele active cu rol bine definit în procesul de vindecare a rănilor [26, 27].

În timp ce polimerii folosiți în produsele farmaceutice de acest tip pot fi de origine naturală sau sintetică, formula inovatoare prezentată în acest brevet are la bază polimeri de origine naturală, ceea ce îi conferă un plus de biocompatibilitate.

Chitosanul în combinație cu diferiți polimeri (de exemplu: alginat și colagen) a fost folosit pentru încapsularea diferitelor substanțe medicamentoase (de exemplu: acid ascorbic, nistatină, norfloxacină, etc.), ca sisteme de eliberare controlată în ingineria tisulară [28, 29]. În literatura de

specialitate există studii despre hidrogeluri compozite chitosan-acid hialuronic, folosite ca sisteme cu eliberare controlată [6, 26]. Datele din literatura de specialitate prezintă diferite tipuri de hidrogeluri ce au la baza combinații de chitosan și acid hialuronic, dar nu sunt date cu privire la combinația chitosan-acid hialuronic-bentonită-L arginină-betulină, ceea ce face ca formula de gel propusă în prezenta invenție să reprezinte un element de noutate.

Un plus pe care îl aduce această invenție constă în avantajul procesului tehnologic aplicat în raport cu fazele tehnologice complexe necesare obținerii „sponge”-ilor pe bază de chitosan-acid hialuronic prezentați în teza de doctorat “Sinteza și evaluarea biologică a unor noi derivați de α -aminoacizi”, susținută în cadrul Universității de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa”, Iași, Facultatea de Farmacie.

Etapele de obținere a „sponge”-ilor sunt următoarele:

1. Prepararea gelului de chitosan prin hidratarea și solubilizarea acestuia în acid acetic, soluție 1%, la temperatura camerei, prin agitare timp de 6 ore și neutralizarea cu hidroxid de sodiu, soluție 1M;
2. Prepararea hidrogelului de acid hialuronic prin dizolvarea acestuia într-un volum minim de apă purificată, prin agitare timp de 12 ore la temperatura camerei;
3. Reunirea gelurilor obținute în etapa 1 și respectiv 2, în raport 2:1, și omogenizarea acestora timp de 12 ore;
4. Adăugarea derivaților de L-arginină cu structură de tiazolidin-4-onă, în concentrație de 1% în amestecul omogen din etapa 3 și omogenizare timp de 24-48 ore la temperatura camerei;
5. Obținerea „sponge”-ilor prin liofilizarea gelului obținut timp de 72 ore.
6. Reticularea „sponge”-ilor prin tratare cu soluție de tripolifosfat pentasodic.

Se observă că procesul prezentat mai sus nu este rentabil de a fi aplicat la scară industrială, etapele propuse necesitând timp îndelungat (în jur de o săptămână), ceea ce ar determina costuri ridicate de producție. În plus, durata extinsă a procesului de fabricație ridică probleme din punct de vedere al stabilității chimice a ingredientelor active.

În prezenta invenție, se propune un proces simplificat, aplicabil la nivel industrial, cu etape considerabil reduse din punct de vedere al timpilor de fabricație (maxim 3 ore) și o stabilitate fizico-chimică crescută a produsului obținut, demonstrată experimental.

În invenție sunt descrise, prin exemple, formulele și metodele experimentale utilizate în caracterizarea acestora, însoțite de figuri.

Exemplu 1:

Compoziție	% (m/m)
Chitosan	3
Acid lactic	1.5
Hialuronat de sodiu (HA)	0.3
Glicerol	5
Bentonită	3
L-Arginină HCl	1
Apă purificată	86.2
Total	100

Mod de preparare I:

Compoziția farmaceutică pentru administrare topică, obținută prin procesul inovativ, implică următoarele etape de preparare:

I.1. Prepararea gelului de chitosan prin hidratarea și solubilizarea acestuia în cantitatea corespunzătoare de acid lactic, soluție 3%, la 45°C, prin agitare timp de 30 minute, cu ajutorul unui agitator magnetic cu încălzire;

I.2. Titurarea bentonitei în prezența unei cantități minime de glicerol până la obținerea unei paste omogene;

I.3. Amestecul omogen de bentonită cu glicerol se aduce peste hidrogelul de chitosan preparat în etapa I.1;

I.4. Adăugarea cantității de L-arginină HCl corespunzătoare peste amestecul omogen chitosan-bentonită și agitare timp de o oră la temperatura camerei, până la obținerea unui amestec omogen;

I.5. Prepararea gelului de acid hialuronic prin dizolvarea acestuia într-o cantitate minimă de apă purificată, prin agitare timp de 4-5 ore la temperatura camerei;

I.6. Reunirea amestecului omogen obținut în etapa I.4 cu hidrogelul obținut în etapa I.5 în raport de 7:3 (m/m);

I.7. Omogenizare 4 ore, până la obținerea unui produs omogen.

Comparativ cu procesul prezentat în stadiul tehnic al cunoașterii pentru „sponge”, timpul necesar preparării produsului este redus de la o săptămână la aproximativ 10 ore.

Exemplul 2

Deoarece prin procesul descris mai sus s-a obținut o formulă cu o stabilitate chimică și structurală redusă (vezi datele experimentale), iar durata de realizare a etapelor implică un timp mai îndelungat (aproximativ 10 ore), s-a optimizat procesul tehnologic prin reducerea semnificativă a timpilor de proces (aproximativ 3 ore), urmărind în același timp și îmbunătățirea stabilității produsului.

Compoziție	% (m/m)
Chitosan	2
Acid lactic	1.5
Hialuronat de sodiu (HA)	0.5
Glicerol	40
Bentonită	5
L-Arginina HCl	1
Apă purificată	50
Total	100

Mod de preparare II:

Compoziția farmaceutică pentru administrare topică, obținută prin procesul inovativ, implică următoarele etape de preparare:

II.1. Hidratare chitosan într-o cantitate minimă de apă purificată, la 45°C, prin agitare timp de 30 minute, cu ajutorul unui agitator magnetic cu încălzire;

II.2. Solubilizarea chitosanului prin acidifierea suspensiei obținută la II.1 cu acid lactic și omogenizare 30 minute până la obținerea gelului;

II.3. Obținerea suspensiei de HA în cantitatea minimă de glicerol prin omogenizare 10 minute;

II.4. Suspendarea bentonitei peste cantitatea rămasă de glicerol prin agitare 10 minute;

II.5. Reunirea suspensiilor obținute în etapele II.3 și II.4, prin transferul suspensiei de bentonită în suspensia de HA și aducerea acestora peste gelul de chitosan (II.2) prin agitare 20-30 minute, până la obținerea unui amestec omogen;

II.6. Solubilizarea argininei în cantitatea rămasă de apă purificată și adăugarea acesteia în masa de hidrogel obținută la II.5;

II.7. Omogenizare 20-30 minute, până la obținerea unui produs omogen.

Procesul modificat prezintă avantajul reducerii timpului de înglobare a HA în formulă, prin înlocuirea gelului de HA (etapa I.5) cu o suspensie de HA în glicerol (etapa II.3). Noul proces

necesită în etapa de omogenizare finală (II.7) doar 30 minute, comparativ cu 4 ore necesare procesului descris anterior (I.7).

Exemplul 3

La formula din exemplul 2, a fost adăugat un nou principiu activ, betulina, provenită din extract natural de *Betula alba*, datorită activității sale antiinflamatorii și analgezice, activitate demonstrată științific [30].

Compoziție	% (m/m)
Chitosan	2
Acid lactic	1.5
Hialuronat de sodiu (HA)	0.5
Glicerol	35
Bentonită	5
L-Arginină HCl	1
Apă purificată	49
Propilenglicol	5
Betulină	1
Total	100

Mod de preparare:

Modul de preparare al formulei din exemplu 3, obținută prin procesul inovativ, respectă etapele prezentate la exemplul 2 (II.1 – II.6), cu diferența introducerii unei etape suplimentare, ce constă în suspendarea betulinei în propilenglicol prin omogenizare timp de 10 minute, la temperatura camerei și introducerea suspensiei în sistem. După această etapă suplimentară, procesul continuă cu etapa de omogenizare finală (II.7).

Alegearea suspendării betulinei în propilenglicol se datorează caracterului hidrofob al acesteia, ceea ce o face practic insolubilă în apă.

Introducerea acestui principiu activ extinde proprietățile terapeutice ale produsului fără a prelungi procesul tehnologic inovativ propus.

Exemplul 4

La formula din exemplul 3, a fost adăugat un formator de gel hidroxietilceluloză (HEC), necesar stabilizării rețelei tridimensionale a hidrogelului.

Compoziție	% (m/m)
Chitosan	2.0
Acid lactic	1.5
Hidroxietil celuloză (HEC)	0.5
Hialuronat de sodiu (HA)	0.5
Glicerol	35
Bentonită	5
L-Arginină HCl	1
Apă purificată	43.50
Propilenglicol	10
Betulină	1
Total	100

Mod de preparare:

Modul de preparare al formulei din exemplu 4 respectă etapele prezentate la exemplul 3, cu mențiunea că peste gelul de chitosan obținut în etapa II.2 se adaugă HEC și se agită continuu timp de 10 minute.

În urma acestei formule se obține un produs cu proprietăți structurale și chimice îmbunătățite, și se adaugă doar 10 minute la procesul descris în *Exemplul 3*.

Exemplul 5

Compoziția este similară exemplului 4, modificându-se cantitatea de HEC din formulă.

Compoziție	% (m/m)
Chitosan	1.5
Acid lactic	1.5
Hidroxietil celuloză (HEC)	0.75
Hialuronat de sodiu (HA)	0.5
Glicerol	35
Bentonită	4
L-Arginină HCl	1
Apă purificată	44.75
Propilenglicol	10
Betulină	1
Total	100

Mod de preparare:

Se procedează ca la *Exemplul 4* cu diferența că HA se aduce direct peste suspensia de bentonită în glicerol, eliminându-se în acest mod etapa II.3 („Obținerea suspensiei de HA în cantitatea minimă de glicerol prin omogenizare 10 minute”), procesul tehnologic fiind scurtat.

Exemplul 6

Compoziția este similară *Exemplului 5*, modificându-se cantitatea de HEC și de chitosan din formulă.

Compoziție	% (m/m)
Chitosan	1.8
Acid lactic	1.5
Hidroxietyl celuloză (HEC)	1
Hialuronat de sodiu (HA)	0.5
Glicerol	35
Bentonită	4.5
L-Arginină HCl	1
Apă purificată	43.7
Propilenglicol	10
Betulină	1
Total	100

Mod de preparare:

Se procedează ca la *Exemplul 5*.

EXPUNEREA DETALIATĂ A CARACTERIZĂRII FORMULELOR OBTINUTE ÎN EXEMPLELE 1-6

Formulele obținute prin procesele tehnologice descrise în exemplele 1-6 au fost caracterizate din punct de vedere al proprietăților fizico-chimice prin analize de reologie, conținut în L-arginină (respectiv betulină), substanțe înrudite ale L-argininei și teste de cedare *in vitro* (celula Franz). Din punct de vedere al activității antimicrobiene, analizele au fost efectuate pe o serie de microorganisme (*Klebsiella pneumoniae* 53153 IP, *Escherichia coli*, *Proteus rettgeri*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans*). S-a evaluat totodată efectul antioxidant prin metode *in vitro* precum și efectul cicatrizant și de regenerare tisulară pe model de plagă indusă la șobolanul diabetic. Analizele efectuate au avut în vedere evidențierea formulei (din exemplele 1-6) care să îndeplinească cerințele unui produs topic stabil, eficient în tratamentul plăgilor cronice.

1. Determinări reologice

Un produs topic ce poate fi folosit în tratamentul plăgilor cronice trebuie să prezinte anumite caracteristici, și anume: să fie stabil chimic și structural, să prezinte o consistență adecvată care să permită o etalare ușoară și uniformă pe suprafața afectată. Pentru a avea un produs stabil structural este necesar ca acesta să aibă o anumită vâscozitate, dar și o rețea tridimensională de gel care să permită încorporarea componentelor active. Măsurătorile reologice oferă informații despre structura internă a formulelor de hidrogel analizate și stabilitatea acestora în timp, furnizând date în ceea ce privește percepția senzorială și consistența gelurilor [31].

Au fost efectuate măsurători reologice atât în regim oscilatoriu, cât și în regim rotațional. Măsurătorile reologice în regim oscilatoriu sunt folosite pentru a obține informații privind stabilitatea sistemelor multifazice.

Parametri tipici mășurați cu ajutorul testelor în regim oscilatoriu sunt:

G' = modul de acumulări (furnizează informații cu privire la energia de deformație acumulată de probă în timpul procesului de forfecare, reprezintă componenta elastică a sistemului),

G'' = modulul de pierderi (furnizează informații cu privire la energia de deformație pierdută de probă în timpul procesului de forfecare, reprezintă componenta vâscoasă a sistemului),

δ = unghiul de fază, $\tan\delta = G''/G'$ (reprezintă raportul dintre componenta vâscoasă și cea elastică)

$|\eta^*|$ = vâscozitatea complexă

Măsurătorile reologice, efectuate în regim rotațional, oferă informații despre proprietățile de curgere ale sistemelor de hidrogel, măsurându-se vâscozitatea (η) probelor.

Metodă de analiză:

Măsurătorile reologice au fost realizate pe un reometru Anton Paar MCR 302. Pentru a menține constantă temperatura de lucru s-a folosit un sistem Peltier, cu control direct asupra temperaturii probei. Toate măsurătorile s-au efectuat la 25°C (dacă nu este specificat altfel), pe sistem placă-placă cu striții (diametru 35 mm, distanță între plăci = 1 mm). O trapă de solvenți a fost folosită pentru a evita uscarea probei în timpul măsurătorilor. Datele au fost prelucrate cu ajutorul softului RheoCompass (Anton Paar).

Rezultate și concluzii:*Teste efectuate în regim oscilatoriu - Baleiaj de amplitudine*

Acest test este folosit pentru determinarea limitei domeniului de vâscoelasticitate liniară (LVE), a limitei maxime de deformare tolerată de probă fără ca structura internă să fie distrusă și este discriminatoriu în selecția formulelor de hidrogel (vezi **Figura 1**). Dacă pe domeniul de vâscoelasticitate liniară, modulul elastic este mai mare decât modulul vâscos, cu alte cuvinte dacă $\tan\delta = G''/G' < 1$, atunci putem vorbi despre existența unei rețele de gel [32]. De asemenea, cu ajutorul softului RheoCompas a fost calculat "Yield point" și "Flow point". Determinarea "Yield point" presupune măsurarea componentei elastice (σ'), care este asociată cu modulul elastic (G'), funcție de amplitudinea deformării. "Yield stress" este calculat ca fiind valoarea maximă a forței de deformație elastice și valoarea amplitudinii de deformare corespunzătoare acesteia. Acest punct este situat între valoarea corespunzătoare intersecției celor două module vâscoelastice ("Flow point") și punctul din care G' începe să scadă [31, 33].

În **Tabelul 1** sunt centralizate rezultatele testului de baleiaj de amplitudine pentru formulele de hidrogel ce fac subiectul acestei invenții.

Parametri setați:

- frecvența oscilației constantă, $\omega = 10$ rad/s
- amplitudinea oscilației variabilă, $\gamma = 0.01 \rightarrow 100\%$

Tabelul 1. Rezultatele testului de baleiaj de amplitudine

Exemplul	Limita de vâscoelasticitate liniară			Yield point, [Pa]	"Flow point" și punctul de intersecție	
	Modulul de acumulari G' [Pa]	$\tan\delta = G''/G'$	Deformația maximă, γ_L [%]		$G'=G''$ [Pa]	„Flow point” τ_F [Pa]
1	64	1,4	3,07	10	-	-
2	22	2,0	14,2	5	-	-
3	35	1.6	19.1	6	-	-
4	249	0,8	15,6	29	124	211
5	288	0,67	6	47	200	167
6	810	0,56	5,43	130	365	569

G' [Pa]= valoarea medie în domeniul de vâscoelasticitate liniară

$\tan\delta = G''/G'$ valoarea medie în domeniul de vâscoelasticitate liniară

Deformația maximă, γ_L [%], Limita de vâscoelasticitate liniară

$G'=G''$ [Pa]valoarea celor două module la tranziția de fază solid-lichid

Yield point, [Pa] valoarea tensiunii de forfecare situată între punctul în care G' începe să scadă și Flow point

Flow point, τ_F [Pa] valoarea tensiunii de forfecare la tranziția de fază solid-lichid

Analizând rezultatele obținute în urma măsurătorilor de baleiaj de amplitudine se constată faptul că hidrogelurile prezentate în *Exemplele 1-3* au o consistență redusă, (valori scăzute ale G' și ale "Yield point") și prezintă caracteristici de lichid structurat ($\tan\delta = G''/G' > 1$). Din cauza consistenței reduse și a caracteristicilor de lichid vâscoelastic este posibil ca, sub acțiunea forței gravitaționale, componentele solide suspendate să sedimenteze. De aceea s-a decis stabilizarea structurală a hidrogelului prin introducerea unui formator de gel (HEC). Astfel, *Exemplele 4-6*, în care s-a adăugat HEC în diferite proporții, prezintă o structură de gel, respectiv de solid vâscoelastic [32]. Consistența formulilor este direct proporțională cu cantitatea de HEC adăugată (crește G' și Yield point), formula cu cea mai mare consistență fiind cea din *Exemplul 6*.

Teste efectuate în regim oscilatoriu - Baleiaj de frecvență

Stabilitatea sistemelor multifazice obținute în *Exemplele 1-6* a fost investigată suplimentar prin testul de baleiaj de frecvență. Acesta oferă informații despre comportarea în timp a sistemelor multifazice în domeniul de vâscoelasticitate liniară. La frecvențe înalte se simulează comportamentul pe termen scurt, la stres, în timp ce la frecvențe mici se obțin informații privind stabilitatea acestora pe termen lung, în condiții de repaus [31].

Parametri setați:

- amplitudinea deformației constantă, în limita LVE;
- frecvența oscilației se variază între 100 și 0,1 rad/s, respectiv 0,01 rad/s.

În funcție de modulul dominant (G' sau G'') la o anumită frecvență, obținem informații despre comportamentul elastic sau vâscos al hidrogelului [31].

Probele din *Exemplele 1-3* au comportament reologic similar (vezi *Exemplul 3* din **Figura 2**), cu $G'' > G'$, pe tot domeniul de frecvențe studiat. La frecvențe mari (stres mecanic), G'' și G' au valori apropiate, pentru aceste frecvențe obținându-se și o valoare mare a vâscozității complexe. Cu cât stresul aplicat tinde către frecvențe mici, modulele se distanțează și devin paralele, având profil descrescător, ceea ce susține un comportament de lichid structurat. Formulele obținute în *Exemplele 1-3*, prezentând un comportament de lichid structurat, au dezavantajul unei eventuale sedimentări în timp a ingredientelor naturale active suspendate [33].

Sedimentarea a fost evitată în formulele din *Exemplele 4-6* prin adăugarea formatorului de gel (HEC). Aceste formule prezintă un comportament reologic caracteristic polimerilor nereticulați (vezi **Figura 2**, *Exemplele 5-6*) [31]. O importanță deosebită asupra stabilității structurale o are

cantitatea de HEC din formulă. Valoarea lui G' la frecvențe joase, ($\omega \leq 0.1$ rad/s) oferă informații despre stabilitatea în repaus (G'_0). Este cunoscut faptul că stabilitatea mecanică în timp a hidrogelurilor este dovedită de îndeplinirea simultană a condițiilor: $G' > G''$, iar $G'_0 > 10$ Pa [34]. În **Tabelul 2** sunt prezentați timpii de relaxare ($2\pi/\omega_c$, unde ω_c = punctul de intersecție al celor două module) [35] calculați pentru formulele cu HEC (*Exemplele 4-6*). Timpul de relaxare se poate asocia cu durata de viață a unei rețele de gel structurat.

Din analiza comparativă a rezultatelor obținute pentru formulele din *Exemplele 4-6* și a bazei de gel chitosan + 1% HEC, prezentate în **Tabelul 2**, se observă o creștere exponențială a timpilor de relaxare odată cu creșterea concentrației de HEC din formulă, ceea ce dovedește o stabilizare structurală a rețelei de hidrogel. Stabilitatea crescută a formulei din exemplul 6 (cu cel mai mare timp de relaxare, > 300 s) se datorează introducerii în formulă a sistemului HEC:bentonită (1:4,5). Bentonita contribuie la stabilizarea rețelei de gel prin formarea unor punți de hidrogen în sistemul bentonită – glicerol – chitosan [36].

Tabelul 2. Centralizarea rezultatelor obținute din testul de baleiaj de frecvență pentru probelele cu HEC

Formulă	Raport HEC: bentonită (g/g)	G'_0 , la 0,1 rad/s, [Pa]	Intersecția modulelor		Timp de relaxare, [s]
			$G'=G''$, [Pa]	ω_c , [rad/s]	
Exemplul 4	0,5:5	14	117	3	2,09
Exemplul 5	0,75:4	35	52	0,27	23,27
Bază de gel Chitosan+1% HEC	1:0	268	166	0,03	209,44
Exemplul 6	1:4,5	130	62	0,02	314,16

Teste efectuate în regim rotațional - Curba de curgere

Curba de curgere oferă informații despre variația vâscozității funcție de viteza de forfecare aplicată. Condiții de testare: se variază viteza de forfecare între 0.1 și 100 s⁻¹.

Probele din *Exemplele 1-6* prezintă caracter pseudoplastic, vâscozitatea acestora scăzând cu creșterea vitezei de forfecare (vezi **Figura 3**) [32].

În **Tabelul 3** sunt prezentate valoarea vâscozității înregistrată la 10s⁻¹ (forța de forfecare la etalare) și valoarea “Yield stress” (pragul de curgere, τ_0) calculat cu ajutorul softului RheoCompass,

folosind regresia “Casson advanced”. “Yield stress” reprezintă forța necesară pentru a iniția curgerea în cazul unui hidrogel ambalat într-un tub (ambalaj preferat pentru un astfel de produs) [32].

Formulele din exemplul 1-3 nu au nevoie de aplicarea unei forțe pentru a induce curgerea (vezi **Tabelul 3**), ceea ce dovedește inexistența unei rețele de gel. Rezultatele sunt în acord cu testele efectuate în regim oscilatoriu (**Tabelul 1**).

Prin adăugarea formatorului de gel (HEC) în diferite proporții, între 0,5% - 1%, (Exemplele 4-6), s-a obținut o structură stabilă de gel dovedită prin existența “Yield stress” și în același timp creșterea graduală a vâscozității.

Tabelul 3. Centralizarea rezultatelor obținute din testul de curgere.

Exemplul	Exemplul 1	Exemplul 2	Exemplul 3	Exemplul 4	Exemplul 5	Exemplul 6
Vâscozitate la $10s^{-1}$, [Pa·s]	11,7	4,9	5,7	28,3	30	68,6
Yield stress τ_0 , [Pa]	-	-	-	$1,58 \cdot 10^{-10}$	$1,17 \cdot 10^{-9}$	$5,8 \cdot 10^{-5}$

Pentru formula din Exemplul 6 au fost efectuate teste de curgere suplimentare, la 35°C și la 45°C pentru a simula comportamentul reologic la etalare, dar și în condiții de depozitare extreme.

Tabelul 4. Variația vâscozității probei din Exemplul 6 funcție de temperatură

Vâscozitate, [Pa·s]	Temperatura, [°C]		
	25	35	45
Citită la $10s^{-1}$, *	68,6	54,1	51,4
Citită la $50s^{-1}$, **	18,2	13,4	14,8

*Forță de forfecare echivalentă cu etalarea pe piele

** Forță de forfecare echivalentă cu stresul aplicat hidrogelului în timpul procesului de divizare

Analizând datele obținute din curbele de curgere înregistrate la mai multe temperaturi (vezi **Figura 4, Tabelul 4**), se constată că la etalare (35°C, $10s^{-1}$) vâscozitatea hidrogelului scade cu 21% față de vâscozitatea la temperatura camerei, ceea ce îl face ușor de aplicat. În schimb, o încălzire a hidrogelului generat de procesul de divizare la scară industrială (simulată la extrem prin menținerea acestuia la 45 °C) nu conduce la modificări majore de vâscozitate.

Studiile reologice comparative ale celor 6 hidrogeluri, prezentate în *Exemplele 1-6* evidențiază următoarele:

- pentru obținerea unei rețele stabile tridimensionale este necesară introducerea unui formator de gel care să înglobeze în structura sa principiile active;
- rețeaua cea mai stabilă este obținută pentru sistemul ce conține 1% HEC, iar raportul masic optim dintre HEC și bentonită este 1:4,5;
- în intervalul 35-45°C, hidrogelul prezentat în *Exemplul 6* nu prezintă modificări majore de vâscozitate.
- formula din *Exemplul 6* prezintă următoarele caracteristici structurale: are o rețea de gel cu o consistență ridicată, stabilă în timp (în condiții de repaus, la temperatura camerei), având un comportament pseudoplastic (vâscozitatea fiind invers proporțională cu viteza de forfecare), comportament definitiv produselor topice.

2. Determinarea conținutului în L-arginină

Metodă de analiză:

Formulele din exemplele 1-6 au fost analizate în vederea determinării conținutului în L-arginină (principiu activ cu rol reepitelizant) prin cromatografie de lichide de înaltă performanță cu detecție UV-Vis. Separarea L-argininei a fost realizată pe coloană de tip silice nemodificată, folosindu-se ca fază mobilă un amestec de soluție 50 mM dihidrogenofosfat de potasiu și acetonitril, în raport 50:50 (v/v). Debitul fazei mobile a fost setat la 1,0 mL/min, temperatura coloanei la 30°C. Detecția UV-Vis a fost realizată la $\lambda = 200$ nm. Extracția L-argininei din structura hidrogelului s-a efectuat în fază mobilă prin adăugarea acesteia peste o cantitate cunoscută de gel și agitare magnetică timp de 30 de minute. Conținutul declarat în L-arginină din exemplele 1-6 este de 1%.

Rezultate și concluzii:

Rezultatele obținute în urma determinării conținutului în principiu activ, L-arginină, sunt prezentate în Tabelul 5.

Tabelul 5. Conținut în L-arginină regăsit, pentru formulele analizate (exemplele 1-6)

Parametru	Criteriu de admisibilitate	Formulă analizată					
		Exemplul 1	Exemplul 2	Exemplul 3	Exemplul 4	Exemplul 5	Exemplul 6
Conținut în L-arginină, %	0,95 ÷ 1,05	1,02	1,01	1,02	0,99	1,01	1,03

Cantitatea de L-arginină înglobată în hidrogelurile prezentate în exemplele 1-6 este regăsită conform criteriilor de admisibilitate precizate de Farmacopeea Europeană (0,95% ÷ 1,05%).

3. Determinarea conținutului în substanțe înrudite ale L-argininei

Metodă de analiză:

Exemplele 1-6 descrise în prezenta cerere de invenție au fost caracterizate și din punct de vedere al profilului de impurități înrudite chimic cu L-arginina. Modul în care evoluează impuritățile L-argininei în cadrul formulei este un indicator al stabilității formulei în timp, din punct de vedere chimic. De asemenea, prin această analiză se evidențiază faptul că prin procesul descris se obține un produs sigur, impuritățile fiind în limitele prevăzute de către Farmacopeea Europeană, în cadrul monografiei pentru clorhidrat de L-arginină. Determinarea conținutului în substanțe înrudite ale clorhidratul de L-arginină a fost realizată prin cromatografie de lichide de înaltă performanță cu detecție UV-Vis. Separarea L-argininei și a substanțelor înrudite a fost realizată pe o coloană de tip silice nemodificată, folosindu-se ca fază mobilă un amestec de soluție 50 mM dihidrogenofosfat de potasiu și acetonitril, în raport 25:75 (v/v). Debitul fazei mobile a fost setat la 1,5 mL/min, temperatura coloanei la 30°C. Detecția UV-Vis a fost realizată la $\lambda = 200$ nm. Limita de raportare pentru substanțele înrudite ale L-argininei este după cum urmează: în cromatograma obținută cu soluția test se raportează doar picurile secundare mai mari de 0,05% și se neglijează picurile datorate soluției blanc.

Rezultate și concluzii:

Formulele din exemplele 1-6 au fost analizate din punct de vedere al substanțelor înrudite ale L-argininei, imediat după preparare (vezi Tabelul 6) și evoluția acestora la aproximativ o lună de la preparare (vezi Tabelul 7).

Tabelul 6. Profilul substanțelor înrudite ale L-argininei pentru formulele analizate (exemplele 1-6), imediat după preparare

Conținut substanțe înrudite ale L-argininei	Criterii de admisibilitate	Formulă analizată					
		Exemplul 1	Exemplul 2	Exemplul 3	Exemplul 4	Exemplul 5	Exemplul 6
Orice impuritate,	max. 0,2%	SLN	SLN	SLN	SLN	SLN	SLN
Total impurități,	max. 0,5%	SLN	SLN	SLN	SLN	SLN	SLN

SLN = sub limita de neglijare

Procesul tehnologic aplicat nu influențează evoluția substanțelor înrudite ale L-argininei în cazul formulelor prezentate în exemplele 1-6. Valorile obținute pentru acestea se situează sub limita de neglijare și se încadrează în limitele prevăzute în monografia substanței clorhidrat de L-arginină, din Farmacopeea Europeană.

Robustețea formulelor prezentate în exemplele 1-6, din punct de vedere al stabilității lor în timp, s-a realizat prin urmărirea evoluției substanțelor înrudite ale L-argininei, la o lună de la prepararea acestora. Rezultatele obținute sunt prezentate în **Tabelul 7**.

Tabelul 7. Profilul substanțelor înrudite ale L-argininei pentru formulele analizate (exemplele 1-6), la o lună de la preparare

Conținut substanțe înrudite ale L-argininei	Criterii de admisibilitate	Formulă analizată					
		Exemplul 1	Exemplul 2	Exemplul 3	Exemplul 4	Exemplul 5	Exemplul 6
Orice impuritate,	max. 0,2%	0,688	0,308	0,282	0,122	0,074	SLN
Total impurități,	max. 0,5%	1,253	0,625	0,539	0,122	0,125	SLN

SLN = sub limita de neglijare

Analizând rezultatele, se constată faptul că formulele din exemplele 1, 2 și 3 nu sunt stabile din punct de vedere al substanțelor înrudite ale L-argininei, întrucât numai după o lună de la preparare s-a observat o creștere considerabilă a conținutului acestora, peste limitele de admisibilitate precizate de Farmacopeea Europeană. Se observă îmbunătățirea graduală a stabilității din punct de vedere chimic al formulelor din exemplele 4–6 (Tabelul 7). Este de menționat faptul că formula din exemplul 6 este cea mai stabilă din punct de vedere chimic.

4. Teste de cedare in vitro

Metodă de analiză:

Componentul natural activ al formulelor inovative de tip hidrogel este L-arginina. Demonstrarea experimentală a eliberării treptate a L-argininei din matricea hidrogelului, pentru a acționa local se realizează prin teste de cedare *in vitro* prin celule de difuzie verticală Franz. Aceste experimente simulează eliberarea la nivel local a principiului activ din produsul inovator prin măsurarea cantității de L-arginină cedate printr-o membrană sintetică (Nylon) pre-tratată.

Echipamentul utilizat este Vission Microette (Hanson), sistem de difuzie verticală alcătuit din 6 celule Franz. Celulele prezintă o suprafață de sticlă standardizată cu capac deschis, cu orificiu de diametrul 15 mm și cu un diametru total de 25 mm, capacitatea compartimentului receptor fiind de 7 mL. O cantitate medie de 300 mg gel, echivalentă cu 3 mg L-arginină, a fost aplicată într-un strat uniform pe suprafața unei membrane sintetice de Nylon, hidratată în apă timp de 30 minute și amplasată între compartimentul donor și receptor al celulelor de difuzie Franz. Temperatura

mediului receptor a fost controlată și menținută la 32°C, iar agitarea continuă a soluțiilor din interiorul celulelor, la 600 rpm, a fost asigurată de un agitator magnetic încorporat.

Difuzia L-argininei din hidrogel prin membrană a fost monitorizată prin determinarea concentrației de L-arginină din soluțiile colectate periodic la intervale de timp bine definite. Timpii de prelevare în cadrul studiului de cedare *in vitro* au fost de 60, 120, 180, 240, 300 și 360 minute. Soluțiile colectate din mediul receptor au fost analizate prin intermediul cromatografiei de lichide de înaltă performanță în vederea determinării concentrației în L-arginină. Separarea L-argininei a fost realizată pe o coloană de tip silice nemodificată, folosindu-se ca fază mobilă un amestec de soluție 50 mM dihidrogenofosfat de potasiu și acetonitril, în raport 50:50 (v/v). Debitul fazei mobile a fost setat la 1,5 mL/min, temperatura coloanei la 30°C. Detecția UV-Vis a fost realizată la $\lambda = 200$ nm.

Rezultate și concluzii:

Rezultatele obținute pentru concentrația medie în L-arginină cedată (mg/mL) la intervalele de timp stabilite pentru formulele descrise în exemplul 1-6 sunt centralizate în **Tabelul 8**.

Tabelul 8. Profilul de cedare *in vitro* al L-argininei obținute pentru formulele analizate (exemplele 1-6)

Timp (h)	Concentrația medie în L-arginină cedată (mg/mL)					
	Exemplul 1	Exemplul 2	Exemplul 3	Exemplul 4	Exemplul 5	Exemplul 6
1	0,039	0,056	0,054	0,034	0,035	0,042
2	0,177	0,096	0,105	0,099	0,098	0,146
3	0,213	0,105	0,118	0,112	0,110	0,173
4	0,209	0,108	0,124	0,115	0,112	0,181
5	0,247	0,107	0,134	0,116	0,115	0,180
6	0,252	0,105	0,130	0,112	0,112	0,176

Din suprapunerea profilelor de cedare (vezi **Figura 5**), aparent, formula din exemplul 1 prezintă cel mai bun profil de cedare, întrucât a cedat cea mai mare cantitate de L-arginină (de 0,247 mg/mL). Însă, corelând cu datele reologice obținute pentru formula din exemplul 1 (**Figura 1**), se consideră că eliberarea substanței active a fost datorată în primul rând lipsei unei structuri de gel și a unei vâscozități reduse. Profilele de cedare obținute pentru formulele din exemplele 2-5 sunt asemănătoare. Se evidențiază formula din exemplul 6 cu un profil de cedare *in vitro* al L-argininei superior formulelor din exemplele 2-5.

Deoarece formula din exemplul 6 a fost selectată ca prezentând proprietățile fizico-chimice cele mai bune, aceasta a fost caracterizată detaliat și din punct de vedere al cedării *in vitro*, realizându-se o serie de calcule suplimentare.

Se reprezintă grafic dependența liniară dintre cantitatea de L-arginină cedată și rădăcină pătrată din timpul de prelevare și se calculează rata de eliberare a L-argininei ca fiind panta dreptei (**Figura 6**). Rata de eliberare constantă (vezi **Tabelul 9**) este dovada existenței unei rețele tridimensionale stabile a matricei din hidrogelul formulei inovatoare.

Tabelul 9. Rata de eliberare a L-argininei din formula corespunzătoare exemplului 6

Timp ($h^{1/2}$)	Cantitatea de arginină cedată ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)					
	Celulă 1	Celulă 2	Celulă 3	Celulă 4	Celulă 5	Celulă 6
1	150,282	166,102	193,785	177,966	158,192	146,328
1.4	610,734	585,311	601,130	610,734	603,955	602,260
1.7	788,943	791,525	793,785	800,807	793,059	783,212
2	953,061	932,284	934,867	946,847	930,082	922,783
2.2	1085,258	1057,558	1064,464	1074,201	1058,996	1058,564
2.4	1228,430	1192,818	1208,621	1215,794	1194,462	1190,014
P* ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{h}$)	710,40	681,40	671,03	684,61	681,55	686,03

*Panta regresiei liniare a cantitatii eliberate pe unitatea de suprafață reprezentată ca funcție de rădăcină pătrată din timp (P) reprezintă rata de cedare *in vitro* a hidrogelului

Pentru formula din exemplul 6, a fost calculată cantitatea de L-arginină cedată ca procent din cantitatea înglobată în formula de hidrogel inovatoare (vezi Tabel 10).

Tabelul 10. Cantitatea de L-arginină cedată ca % din cantitatea de substanță activă înglobată în formula de hidrogel

Timp ($h^{1/2}$)	Cantitatea de arginină cedată (% din cantitatea înglobată)					
	Celulă 1	Celulă 2	Celulă 3	Celulă 4	Celulă 5	Celulă 6
1	8,87	9,80	11,43	10,50	9,33	8,63
2	36,03	34,53	35,47	36,03	35,63	35,53
3	46,55	46,70	46,83	47,25	46,79	46,21
4	56,23	55,00	55,16	55,86	54,87	54,44
5	64,03	62,40	62,80	63,38	62,48	62,46
6	72,48	70,38	71,31	71,73	70,47	70,21

Se observă că mai mult de 70% din cantitatea de L-arginină înglobată în rețeaua de hidrogel a fost cedată, ceea ce susține eficiența terapeutică a formulei propuse.

5. Determinarea conținutului în betulină

Metodă de analiză:

Formulele din exemplele 3-6 au fost analizate în vederea determinării conținutului în betulină prin cromatografie de lichide de înaltă performanță cu detecție UV-Vis. Separarea betulinei a fost realizată pe coloană de C₁₈, folosindu-se ca fază mobilă un amestec de apă și acetonitril, în raport de 1:9 (v/v). Debitul fazei mobile a fost setat la 1,0 mL/min. Detecția UV-Vis a fost realizată la $\lambda = 210$ nm. Extracția betulinei din rețeaua de hidrogel s-a efectuat în fază mobilă prin adăugarea acesteia peste o cantitate cunoscută de gel și agitare magnetică timp de 30 de minute.

Rezultate și concluzii:

Rezultatele obținute în urma determinării conținutului de principiu activ, betulină, sunt prezentate în Tabelul 11.

Tabelul 11. Conținut în betulină regăsit, pentru formulele analizate (exemplele 3-6)

Parametru	Criteriu de admisibilitate	Exemplul 3	Exemplul 4	Exemplul 5	Exemplul 6
Conținut în betulină, %	1% ± 5%	0,99	1,00	1,00	1,02

Cantitatea de betulină înglobată în hidrogelurile prezentate în exemplele 3, 5, 6 este regăsită conform criteriilor de admisibilitate prevăzute de Farmacopeea Europeană (0,95% ÷ 1,05%).

6. Activitate antimicrobiană

Metodă de analiză:

Deoarece produsul dezvoltat sub formă de hidrogel va fi aplicat pe răni, plăgi cronice, etc., o caracteristică importantă pe care trebuie să o prezinte este activitatea antimicrobiană pe o gamă cât mai largă de microorganisme specifice. Activitatea antimicrobiană a formulelor prezentate în exemplele 1-6 a fost testată prin metoda difuziei în agar. Probele au fost încălzite prin incubare la 37°C, timp de 20 minute, au fost agitate timp de 5-10 minute în recipientul original utilizând un

agitator vortex și din nou incubate la 37°C timp de 20-24 ore. Efectul antibacterian a fost bine evidențiat pe toate testele pozitive.

Rezultate și concluzii:

Activitatea antimicrobiană a formulelor din exemplele 1-6 este prezentată în **Tabelul 12**.

Tabelul 12. Activitatea antimicrobiană a formulelor analizate (exemplele 1-6)

Microorganismul test	Activitate antimicrobiană pentru formulele analizate					
	Exemplul 1	Exemplul 2	Exemplul 3	Exemplul 4	Exemplul 5	Exemplul 6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 53153 IP	++	++	+++	+++	+++	+++
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-
<i>Proteus rettgeri</i>	++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Proteus vulgaris</i>	++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Salmonella enterica</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	++	++	+++	+	+	++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	++	++	++	++	++	++
<i>Candida albicans</i>	+	++	++	+	+	+

„+” : efect inhibitor redus; „++” : efect inhibitor mediu; „+++” : efect inhibitor semnificativ; „-” : nu prezintă efect inhibitor.

Formulele obținute din *Exemplele 1-6* au demonstrat efect antibacterian pe următoarele microorganisme: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*. Efectul antifungic a fost evidențiat pentru *Candida albicans*.

Formula din *Exemplul 6* prezintă efect inhibitor semnificativ pe microorganisme precum *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus rettgeri*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enterica* și efect mediu pe *Staphylococcus aureus*. Efectul antifungic (testat pe *Candida albicans*) prezentat a fost de nivel redus (vezi **Tabelul 12**).

7. Activitate antioxidantă

7.1. Determinarea efectului antiradicalic față de radicalul cation ABTS^{•+}

Metodă de analiză:

Generarea radicalului cation ABTS^{•+} s-a realizat prin tratarea soluției apoase de acid 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) (7 mM) cu persulfat de potasiu (2,45 mM). Amestecul rezultat a fost păstrat la întuneric timp de 12 – 16 ore pentru a favoriza formarea radicalului monocation ABTS^{•+} [37, 38]. S-au luat în lucru 0,5 mL din soluția stoc de ABTS^{•+} și 40 mL de alcool etilic absolut. Formulele studiate (*Exemplul 1-3 și Exemplul 6*) au fost liofilizate, după care s-a cântărit din fiecare tip de formulă câte 0,15 g probă care s-a adus în 10 mL metanol și s-a menținut pe baie de apă timp de 30 minute. Din soluția metanolică rezultată s-a măsurat un volum de 100 μL, peste care s-au adăugat 1900 μL de soluție alcoolică de ABTS^{•+}. Amestecul rezultat s-a lăsat în repaus 6 minute, după care s-a citit absorbanta la $\lambda = 734$ nm, utilizând alcool etilic absolut ca blank. În paralel, s-a prelucrat o probă control care conține 100 μL metanol și 1900 μL de soluție alcoolică de ABTS^{•+}. Ca martor pozitiv s-a folosit acidul ascorbic în concentrație de 1 mg/mL. Toate determinările au fost realizate în triplicat. Rezultatele s-au exprimat ca medie aritmetică ± deviația standard.

Activitatea antioxidantă (scavenger) a formulelor analizate, exprimată ca procent de inhibiție (Inhibiție %) a radicalului cation ABTS^{•+}, s-a determinat cu ajutorul următoarei formule de calcul:

$$\text{Inhibiție, \%} = (A_{\text{control}} - A_p / A_{\text{control}}) \times 100$$

unde, A_{control} = valoarea absorbantei probei control la 734 nm; A_p = valoarea absorbantei probei din formula analizată la 734 nm, citită la 6 minute după adăugarea soluției de ABTS^{•+}.

Rezultate și concluzii:

Activitatea antioxidantă față de radicalul cation ABTS⁺ a formulelor din *Exemplele 1-3 și 6* este prezentată în **Tabelul 13**.

Tabelul 13. Activitatea antioxidantă (scavenger) a formulelor analizate (exemplele 1-3 și 6) față de radicalul ABTS⁺

Formula analizată	Absorbanța	Inhibiție ABTS (%)
Exemplul 1	0.130 ± 0.065	80.74 ± 0.96
Exemplul 2	0.137 ± 0.034	79.89 ± 0.87
Exemplul 3	0.123 ± 0.023	81.77 ± 0.91
Exemplul 6	0.098 ± 0.004	85.48 ± 0.79
Acid ascorbic	0.064 ± 0.072	90.51 ± 0.56
Control	0.675 ± 0.078	

Rezultatele obținute au evidențiat faptul că formulele analizate au un efect antioxidant față de radicalul cation ABTS⁺ comparabil cu cel al acidului ascorbic. Pentru formulele analizate valorile procentelor de inhibiție au variat între 79,89% și 85,48%, în timp ce valoarea înregistrată pentru acidul ascorbic, în concentrație de 1 mg/mL, a fost de 90,51%. Cel mai mare procent de inhibiție și respectiv cel mai intens efect antioxidant a fost înregistrat pentru formula din *Exemplul 6* pentru care valoarea a fost de 85,48%. Efect antioxidant apreciabil au prezentat însă și celelalte formule analizate (*Exemplele 1-3*).

7.2. Determinarea efectului antiradicalic față de radicalul DPPH

Metodă de analiză:

Formulele studiate (*Exemplele 1-3,6*) au fost liofilizate, după care s-a cântărit din fiecare tip de formulă câte 0,15 g probă care s-a adus în 10 mL metanol și s-a menținut pe baie de apă timp de 30 minute. Din soluția metanolică rezultată s-a măsurat un volum de 1000 μL peste care s-a adăugat 3000 μL soluție metanolică de DPPH 0,1 mM [39, 40]. Amestecul rezultat s-a menținut la întuneric timp de 30 minute, după care s-a citit absorbanta la 517 nm față de metanol. În paralel s-a lucrat o probă control care conține 1000 μL metanol și 3000 μL soluție metanolică de DPPH 0,1 mM. Ca martor pozitiv s-a folosit acidul ascorbic în concentrație de 1 mg/mL. Toate determinările au fost realizate în triplicat. Rezultatele s-au exprimat ca medie aritmetică ± deviația standard.

Activitatea antioxidantă (scavenger) a formulelor analizate, exprimată ca procent de inhibiție (Inhibiție %) a radicalului liber DPPH, s-a determinat cu ajutorul următoarei formule de calcul:

$$\text{Inhibiție \%} = [(A_{\text{control}} - A_P) / A_{\text{control}}] \times 100$$

unde, A_{control} = valoarea absorbanței probei control la 517 nm; A_P = valoarea absorbanței probei din formula analizată la 517 nm, citită la 30 minute, după adăugarea soluției de DPPH.

Rezultate și concluzii:

Activitatea antioxidantă față de radicalul DPPH a formulelor din *Exemplele 1-3, 6* este prezentată în **Tabelul 14**.

Tabelul 14. Activitatea antioxidantă (scavenger) a formulelor analizate (exemplele 1-3, 6) față de radicalul DPPH

Formula analizată	Absorbanța	Inhibiție DPPH (%)
Exemplul 1	0.609 ± 0.054	43.34 ± 0.45
Exemplul 2	0.637 ± 0.097	40.74 ± 0.97
Exemplul 3	0.623 ± 0.084	42.04 ± 0.51
Exemplul 6	0.598 ± 0.071	44.37 ± 0.68
Acid ascorbic	0.404 ± 0.027	62.24 ± 0.98
Control	1.075 ± 0.721	

Rezultatele obținute au evidențiat faptul că toate probele analizate au prezentat un efect antioxidant similar față de radicalul DPPH, procentul de inhibiție variind între 40,74% (*Exemplul 2*) și 44,37% (*Exemplul 6*). În condiții experimentale identice efectul antioxidant înregistrat pentru acidul ascorbic, experimentat ca procent de inhibiție față de radicalul DPPH, a fost de 62,24%.

8. Activitate cicatrizantă și de regenerare tisulară

Metoda de analiză:

Efectul cicatrizant și regenerant tisulat al formulelor dezvoltate (*Exemplul 1, 3, 6*) a fost evaluat pe model de plagă cronică indusă la șobolanul diabetic. Studiul s-a realizat pe șobolani albi, rasa Wistar, adulți, masculi, cu greutatea cuprinsă între 280 - 400g, crescuți în condiții identice de laborator și aclimatizați timp de 7 zile înainte de începerea experimentului, în condiții de mediu relativ constante: temperatura 23±2°C, umiditate 40–60%, ciclul de 12 ore lumină/întuneric. Diabetul zaharat a fost indus prin administrare intraperitoneală de streptozotocin, în doză de 55 mg/kg corp [41-42]. După inducerea diabetului, șobolanii au fost ținuți sub supraveghere timp de 7 zile, perioadă în care au fost monitorizați din punct de vedere al glicemiei. Șobolanii care au

prezentat valori ale glicemiei mai mari de 250 mg/dL, au fost considerați diabetici și au fost selectați pentru evaluarea efectului cicatrizant al formulelor dezvoltate [43]. Inducerea plăgii la șobolanii diabetici s-a realizat prin incizie circulară, pe desenul rotund preoperator, cu margine superioară la 0,5 cm sub scapular și margine medială la 1 cm de limita corpului vertebral cel mai apropiat. S-a excizat un disc de țesut cutanat cu diametru de 2,5 cm, ce include toată grosimea tegumentului până la nivelul suprafascial muscular. Pentru fiecare șobolan diabetic s-au realizat câte două incizii. După realizarea plăgii, șobolanii au fost repartizați randomizat în loturi a câte 6 șobolani, cărora li s-a aplicat pe suprafața lezată, formulele dezvoltate (*Exemplele 1, 3, 6*).

Pe parcursul experimentului, care a durat 24 zile, formulele dezvoltate (*Exemplele 1, 3, 6*) au fost aplicate la fiecare 3 zile. La fiecare aplicare s-a realizat și curățarea plăgii în vederea îndepărtării țesutului lezat, a celulelor moarte, a cheagurilor de fibrină și a excesului de exudat. La momentul aplicării periodice s-a realizat și analiza macroscopică a plăgii, măsurându-se diametrul acesteia (ziua 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24).

Rezultate și concluzii:

Rezultatele analizei macroscopice, respectiv monitorizarea plăgii pe parcursul experimentului prin măsurarea diametrului acesteia sunt prezentate în **Tabelul 15** și **Figura 7**.

Tabelul 15. Diametrul plăgii (mm), la diferite intervale de timp (ziua 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24)

Lot 1/Exemplul 1		Lot 2/Exemplul 3		Lot 3/Exemplul 6	
zi	Medie ± DS	zi	Medie ± DS	zi	Medie ± DS
0	25,35 ± 0,51	0	25,35 ± 0,51	0	25,74 ± 0,25
3	24,09 ± 0,18	3	23,06 ± 0,23	3	23,96 ± 0,14
6	20,05 ± 0,56	6	20,48 ± 0,75	6	21,34 ± 0,29
9	18,96 ± 1,08	9	18,65 ± 0,31	9	18,19 ± 0,84
12	13,51 ± 0,25	12	13,21 ± 0,52	12	14,15 ± 0,14
15	8,13 ± 0,32	15	8,13 ± 0,48	15	12,82 ± 0,32
18	6,85 ± 0,78	18	6,38 ± 0,39	18	8,72 ± 0,67
21	5,17 ± 0,15	21	vindecat	21	5,34 ± 0,54
24	vindecat	24	vindecat	24	vindecat

Analiza rezultatelor obținute a evidențiat faptul că pentru toate formulele dezvoltate (*Exemplele 1, 3, 6*) s-a observat o reducere progresivă a diametrului zonei plăgii, comparativ cu diametrul inițial

(ziua 0). Cele mai bune rezultate au fost obținute pentru lotul tratat cu formula 3 (*Exemplul 3/ lot 2*) pentru care vindecarea completă a plăgii a fost observată încă din ziua a 21. Pentru formula 1 (*Exemplul 1/lot 1*) și formula 6 (*Exemplul 6/lot 3*) au fost obținute rezultate similare, observându-se vindecarea completă a plăgii în ziua a 24-a a experimentului.

Pentru șobolanii tratați cu formulările dezvoltate (*Exemplele 1, 3, 6*), s-a observat că plaga este lipsită de zone de supurație și are aspect rosaceu, ceea ce denotă o bună vascularizație. Totodată începând cu ziua a 9-a a experimentului s-au observat zone lucioase, ce reprezintă noile straturi de celule epiteliale formate ca urmare a procesului de regenerare tisulară.

CONCLUZII:

- 1) Prin introducerea unui formator de gel (hidroxietilceluloză) se stabilizează din punct de vedere fizic și chimic formulele din *Exemplele 3-6*. Înglobate în rețeaua de gel, componentele active sunt *protejate* de procesele de degradare chimică.
- 2) Formula din *Exemplul 6* prezintă cele mai bune proprietăți reologice.
- 3) Formula din *Exemplul 6* prezintă cea mai bună stabilitate chimică, prin înglobarea în rețeaua structurată a principiilor active.
- 4) Matricea de gel conținând principii active, așa cum este prezentată în *Exemplul 6*, permite eliberarea controlată a L-argininei la aplicare topică. Procesul de eliberare controlată al acestui principiu activ are loc cu un randament de peste 70% la 6 ore de la aplicare.
- 5) Ingredientele naturale active înglobate în formula din *Exemplul 6* conferă acesteia proprietăți antimicrobiene demonstrate, dovedind eficacitate față de microorganismele specifice ce pot fi prezente în plăgi.
- 6) Rezultatele obținute din testele de determinare a activității antioxidante au demonstrat faptul că toate formulele analizate au efect antioxidant față de radicalul cation ABTS⁺ și DPPH comparabil cu cel al acidului ascorbic, cele mai bune rezultate obținându-se pentru formula din *Exemplul 6*.
- 7) Testele *in vivo* efectuate pe model de plagă cronică indusă la șobolanul diabetic au demonstrat acțiunea cicatrizantă și de regenerare tisulară a formulelor studiate. Vindecarea plăgilor are loc în 21-24 de zile.
- 8) Comparativ cu produsul sub formă de "sponge" prezentat în stadiul tehnicii (vezi lucrarea de doctorat "Sinteza și evaluarea biologică a unor noi derivați de α -aminoacizi"),

hidrogelul obținut în *Exemplul 6*, prezintă complianță mai bună pentru pacient prin aplicarea cu ușurință a acestui hidrogel pe plăgi cronice.

- 9) Procesul tehnologic de obținere a hidrogelului prezentat în invenție presupune adăugarea ingredientelor naturale active la temperatura camerei, astfel protejându-le de o eventuală degradare chimică.
- 10) Procesul tehnologic prezentat în invenție poate fi transpus la scară industrială, având o serie de avantaje precum: timp de procesare scurt (maxim 3 ore), temperatură de lucru apropiată de temperatură camerei. Aceste avantaje îl transformă într-un process rentabil din punct de vedere economic.

Această lucrare a fost susținută de un grant al Autorității Naționale pentru Cercetare Științifică și Inovare, CNCS / CCCDI - UEFISCDI, număr de proiect PN-III-P2-2.1-PED-2016-1807, în cadrul programului PNCDI III.

4

BIBLIOGRAFIE:

- [1] V. Arana, Y. Paz, A. González, V. Méndez, and J. D. Méndez, "Healing of diabetic foot ulcers in l-arginine-treated patients," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 58, no. 10, pp. 588–597, Dec. 2004.
- [2] R. Blakytyn and E. Jude, "The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes," *Diabet. Med.*, vol. 23, no. 6, pp. 594–608, Jun. 2006.
- [3] A.-T. Pânzariu, M. Apotrosoaei, I. M. Vasincu, M. Drăgan, S. Constantin, F. Buron, S. Routier, L. Profire, and C. Tuchilus, "Synthesis and biological evaluation of new 1,3-thiazolidine-4-one derivatives of nitro-l-arginine methyl ester," *Chem. Cent. J.*, vol. 10, no. 1, p. 6, Dec. 2016.
- [4] N. Collins, "Arginine and wound healing,," *Adv. Skin Wound Care*, vol. 14, no. 1, pp. 16–17, 2001.
- [5] N. Mayet, Y. E. Choonara, P. Kumar, L. K. Tomar, C. Tyagi, L. C. Du Toit, and V. Pillay, "A Comprehensive Review of Advanced Biopolymeric Wound Healing Systems," *J. Pharm. Sci.*, vol. 103, no. 8, pp. 2211–2230, Aug. 2014.
- [6] A. Mohandas, B. S. Anisha, K. P. Chennazhi, and R. Jayakumar, "Chitosan–hyaluronic acid/VEGF loaded fibrin nanoparticles composite sponges for enhancing angiogenesis in wounds," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 127, pp. 105–113, Mar. 2015.
- [7] G. D. Mogoşanu and A. M. Grumezescu, "Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing," *Int. J. Pharm.*, vol. 463, no. 2, pp. 127–136, Mar. 2014.
- [8] M. Litwiniuk, A. Krejner, M. S. Speyrer, A. R. Gauto, and T. Grzela, "Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration.,," *Wounds a Compend. Clin. Res. Pract.*, vol. 28, no. 3, pp. 78–88, Mar. 2016.
- [9] N. Y. Leslie L. Balassa, Blooming Grove, "United states patent office," 1972.
- [10] B. I. Escudero-Abarca, M. G. Aguilar-Uscanga, P. M. Hayward-Jones, P. Mendoza, M. Ramirez, and L. Gomez-Rivas, "Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 31, no. 1, pp. 16–22, Jan. 2004.
- [11] Y.-J. Zhang, B. Gao, and X.-W. Liu, "Topical and effective hemostatic medicines in the battlefield,," *Int. J. Clin. Exp. Med.*, vol. 8, no. 1, pp. 10–9, 2015.
- [12] A. E. Pusateri, S. J. McCarthy, K. W. Gregory, R. A. Harris, L. Cardenas, A. T. McManus, and C. W. Goodwin, "Effect of a chitosan-based hemostatic dressing on blood loss and survival in a model of severe venous hemorrhage and hepatic injury in swine,," *J. Trauma*, vol. 54, no. 1, pp. 177–82, Jan. 2003.
- [13] A. S. Pandit, "United States Patent 5836970," 1998.
- [14] N. Mnasri, Y. Moussaoui, E. Elaloui, R. ben Salem, S. Lagerge, J. M. Douillard, and L. C. de Menorval, "Study of interaction between chitosan and active carbon in view of optimising composite gels devoted to heal injuries," *EPJ Web Conf.*, vol. 29, p. 00028, Jun. 2012.
- [15] P. T. S. Kumar, G. Praveen, M. Raj, K. P. Chennazhi, and R. Jayakumar, "Flexible, micro-porous chitosan–gelatin hydrogel/nanofibrin composite bandages for treating burn wounds," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 110, pp. 65081–65087, 2014.
- [16] S. A. Agnihotri, N. N. Mallikarjuna, and T. M. Aminabhavi, "Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery," *J. Control. Release*, vol. 100, no. 1, pp. 5–28, Nov. 2004.
- [17] V. Abramyan, Ara Beklemyshev, V. Filatov, I. Makhonin, U. O. G. Maugeri, V. Ryltsev, and V. Solodovnikov, "WO2011160862A1, Wound bandage with antimicrobial properties,"

- 2011.
- [18] S.-T. Oh, W.-R. Kim, S.-H. Kim, Y.-C. Chung, and J.-S. Park, "The preparation of polyurethane foam combined with pH-sensitive alginate/bentonite hydrogel for wound dressings," *Fibers Polym.*, vol. 12, no. 2, pp. 159–165, Apr. 2011.
- [19] H.-R. Metelmann, F. Podmelle, and P. D. Waite, "Long-Term Cosmetic Benefit of Wound Healing by Betuline," *Am. J. Cosmet. Surg.*, vol. 29, no. 1, pp. 19–24, Mar. 2012.
- [20] A. Schwieger-Briel, D. Kiritsi, C. Schempp, C. Has, and H. Schumann, "Betulin-Based Oleogel to Improve Wound Healing in Dystrophic Epidermolysis Bullosa: A Prospective Controlled Proof-of-Concept Study," *Dermatol. Res. Pract.*, vol. 2017, pp. 1–10, 2017.
- [21] A. Breithaupt and R. Fitzgerald, "Collagen Stimulators," *Facial Plast. Surg. Clin. North Am.*, vol. 23, no. 4, pp. 459–469, Nov. 2015.
- [22] S. Sun, H. Li, J. Chen, and Q. Qian, "Lactic Acid: No Longer an Inert and End-Product of Glycolysis," *Physiology*, vol. 32, no. 6, pp. 453–463, Nov. 2017.
- [23] E. Vågesjö, E. Öhnstedt, A. Mortier, H. Lofton, F. Huss, P. Proost, S. Roos, and M. Phillipson, "Accelerated wound healing in mice by on-site production and delivery of CXCL12 by transformed lactic acid bacteria," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 115, no. 8, pp. 1895–1900, Feb. 2018.
- [24] I. Quijada-Garrido, V. Iglesias-Gonzalez, J. Mazon-Arechederra, and J. Barrales-Rienda, "The role played by the interactions of small molecules with chitosan and their transition temperatures. Glass-forming liquids: 1,2,3-Propantriol (glycerol)," *Carbohydr. Polym.*, vol. 68, no. 1, pp. 173–186, Mar. 2007.
- [25] R. M. Pereira, G. S. S. Andrade, H. F. De Castro, and M. G. N. Campos, "Performance of Chitosan/Glycerol Phosphate Hydrogel as a Support for Lipase Immobilization," *Mater. Res.*, vol. 20, no. suppl 2, pp. 190–201, Jun. 2017.
- [26] T. K. Giri, A. Thakur, A. Alexander, Ajazuddin, H. Badwaik, and D. K. Tripathi, "Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications," *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 2, no. 5, pp. 439–449, Oct. 2012.
- [27] L. I. F. Moura, A. M. A. Dias, E. Carvalho, and H. C. de Sousa, "Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 7, pp. 7093–7114, Jul. 2013.
- [28] O. M. Dragostin, S. K. Samal, M. Dash, F. Lupascu, A. Pânzariu, C. Tuchilus, N. Ghetu, M. Danciu, P. Dubruel, D. Pieptu, C. Vasile, R. Tatia, and L. Profire, "New antimicrobial chitosan derivatives for wound dressing applications," *Carbohydr. Polym.*, vol. 141, pp. 28–40, May 2016.
- [29] V. Patrulea, V. Ostafe, G. Borchard, and O. Jordan, "Chitosan as a starting material for wound healing applications," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 97, pp. 417–426, Nov. 2015.
- [30] B. O. Oyebanji, A. B. Saba, and O. A. Oridupa, "Studies on the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of betulinic acid derived from *Tetracera potatoria*," *African J. Tradit. Complement. Altern. Med. AJTCAM*, vol. 11, no. 1, pp. 30–3, 2014.
- [31] T. G. Mezger, *Applied Rheology*, 4th Ed. Austria: Anton Paar GmbH, 2017.
- [32] T. G. Mezger, *The Rheology Handbook*, 2nd Ed. Hannover: Vincentz Network, 2006.
- [33] M. Instruments., *Rheological analysis of dispersions by frequency sweep testing*. Malvern Guides, 1–2, 2005.
- [34] C. Ibănescu, M. Danu, A. Nanu, M. Lungu, and B. C. Simionescu, "Stability of disperse systems estimated using rheological oscillatory shear tests," *Rev. Roum. Chim.*, vol. 55, no. 11–12, pp. 933–940, 2010.
- [35] M. T. Islam, N. Rodríguez-Hornedo, S. Ciotti, and C. Ackermann, "Rheological

- Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different pH,” *Pharm. Res.*, vol. 21, no. 7, pp. 1192–1199, Jul. 2004.
- [36] F. J. Rubio-Hernández, A. I. Gómez-Merino, C. del Pino, L. Parras, L. Campo-Deaño, F. J. Galindo-Rosales, and J. F. Velázquez-Navarro, “Perspectives in Fundamental and Applied Rheology,” p. 456, 2013.
- [37] T. Thanyacharoen, P. Chuysinuan, S. Techasakul, P. Nooeaid, and S. Ummartyotin, “Development of a gallic acid-loaded chitosan and polyvinyl alcohol hydrogel composite: Release characteristics and antioxidant activity,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 107, pp. 363–370, Feb. 2018.
- [38] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 26, no. 9–10, pp. 1231–7, May 1999.
- [39] A. Floegel, D. O. Kim, S. J. Chung, S. I. Koo, and O. K. Chun, “Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 24, no. 7, pp. 1043–1048, 2011.
- [40] Z. Chen, R. Bertin, and G. Froidi, “EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH· assay using several statistical programs.,” *Food Chem.*, vol. 138, no. 1, pp. 414–20, May 2013.
- [41] S. Kumar, R. Singh, N. Vasudeva, and S. Sharma, “Acute and chronic animal models for the evaluation of anti-diabetic agents,” *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 11, no. 1, p. 9, 2012.
- [42] K. Nagarchi, S. Ahmed, A. Sabus, and S. H. Saheb, “Effect of Streptozotocin on glucose levels in albino wister rats,” *J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 7, no. 2, pp. 67–69, 2015.
- [43] H. Soleimani, A. Amini, S. Taheri, E. Sajadi, S. Shafikhani, L. A. Schuger, V. B. Reddy, S. K. Ghoreishi, R. Pouriran, S. Chien, and M. Bayat, “The effect of combined photobiomodulation and curcumin on skin wound healing in type I diabetes in rats,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 181, pp. 23–30, Apr. 2018.

8

**Produs topic conținând principii active naturale folosit în tratamentul plăgilor cronice și
procedeul industrial de obținere a acestuia**

Inventatori: Claudia Andrieș, Lenuța Profire, Lăcrămioara Ștefania Moisuc, Andreea Teodora Iacob, Mihaela Nicoară, Irina Draga Căruntu, Liliana Potorac, Luminița Georgeta Confederat, Anca Daniela Rusu, Iustina Mihaela Avram, Amalia Diana Telișcă, Simona Eliza Giusca

REVENDICĂRI:

1. Compoziția farmaceutică pentru tratamentul plăgilor cronice care conține: 0,1...5% hialuronat de sodiu, 0,1...5% L-arginină, 0,5...10% bentonită, 0,1...5% chitosan, 5...50% glicerol, 0,02...6% acid lactic, fără sau cu adaos de formator de gel 0,1...5%, 20...85% apă purificată, fără sau cu adaos de 0,1...5% triterpene, fără sau cu adaos de 5...15% vehicul acceptabil farmaceutic cu rol de umectant.
2. Compoziție farmaceutică conform revendicării 1 caracterizată prin aceea că formatorul de gel este reprezentat de un polizaharid natural.
3. Compoziție farmaceutică conform revendicării 2 caracterizată prin aceea că formatorul de gel este hidroxiethylceluloză.
4. Compoziție farmaceutică conform revendicării 3 caracterizată prin aceea că raportul masic între hidroxiethyl celuloză:bentonită este de 1:4,5.
5. Compoziție farmaceutică conform revendicării 1 caracterizată prin aceea că vehiculul acceptabil farmaceutic ca umectant este reprezentat de un polioli.
6. Compoziție farmaceutică conform revendicării 5 caracterizată prin aceea că vehiculul acceptabil farmaceutic ca umectant este propilenglicol.
7. Compoziție farmaceutică conform revendicării 1 în care familia triterpenelor este reprezentată de extract natural de betulină.
8. Procesul de obținere a hidrogelului conform revendicării 1 utilizat în tratamentul plăgilor cronice și obținut astfel:
 - 8.1. Obținerea gelului de chitosan prin hidratare la 45°C și solubilizare prin acidfiere cu acid lactic;
 - 8.2. Suspendarea hialuronatului de sodiu în glicerol;
 - 8.3. Suspendarea bentonitei;
 - 8.4. Reunirea componentelor obținute în etapele 1, 2 și 3;
 - 8.5. Introducerea ingredientelor naturale active menționate în revendicarea 1 și omogenizare la temperatura camerei.

**Produs topic conținând principii active naturale folosit în tratamentul plăgilor cronice și
procedeul industrial de obținere a acestuia**

Inventatori: Claudia Andrieș, Lenuța Profire, Lăcrămioara Ștefania Moisuc, Andreea Teodora Iacob, Mihaela Nicoară, Irina Draga Căruntu, Liliana Potorac, Luminița Georgeta Confederat, Anca Daniela Rusu, Iustina Mihaela Avram, Amalia Diana Telișcă, Simona Eliza Giusca

SCURTĂ DESCRIERE A FIGURILOR

Figura 1 reprezintă testul baleiaj de amplitudine pentru formulele din *Exemplele 3, 5 și 6*.

Figura 2 reprezintă testul baleiaj de frecvență pentru formulele din *Exemplele 3, 5 și 6*.

Figura 3 reprezintă curbele de curgere pentru formulele din *Exemplele 1-6*.

Figura 4 reprezintă curbele de curgere pentru formula din *Exemplul 6* înregistrate la 25°C, 35°C și respectiv 45°C.

Figura 5 reprezintă profilele de cedare *in vitro* pentru hidrogelurile din *Exemplele 1-6*.

Figura 6 reprezintă rata de cedare *in vitro* pentru hidrogelul din *Exemplul 6*, celulele 1-6.

Figura 7 reprezintă imagini macroscopice ale plăgii la aplicarea formulilor dezvoltate (*Exemplele 1, 3, 6*).

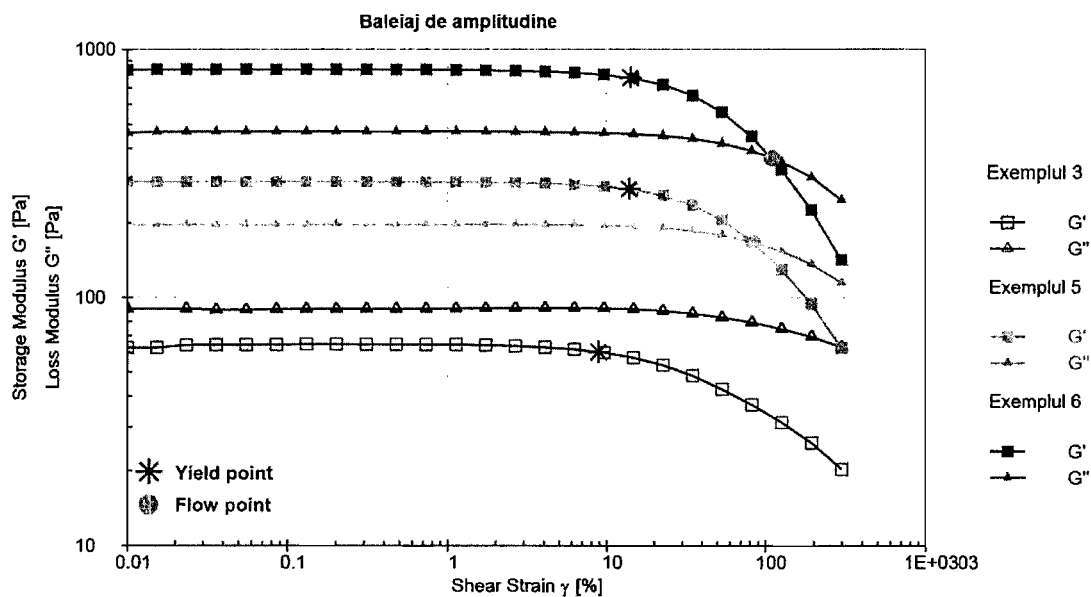


Figura 1.

Figura 1. Testul baleiaj de amplitudine pentru formulele din *Exemplele 3, 5 și 6*

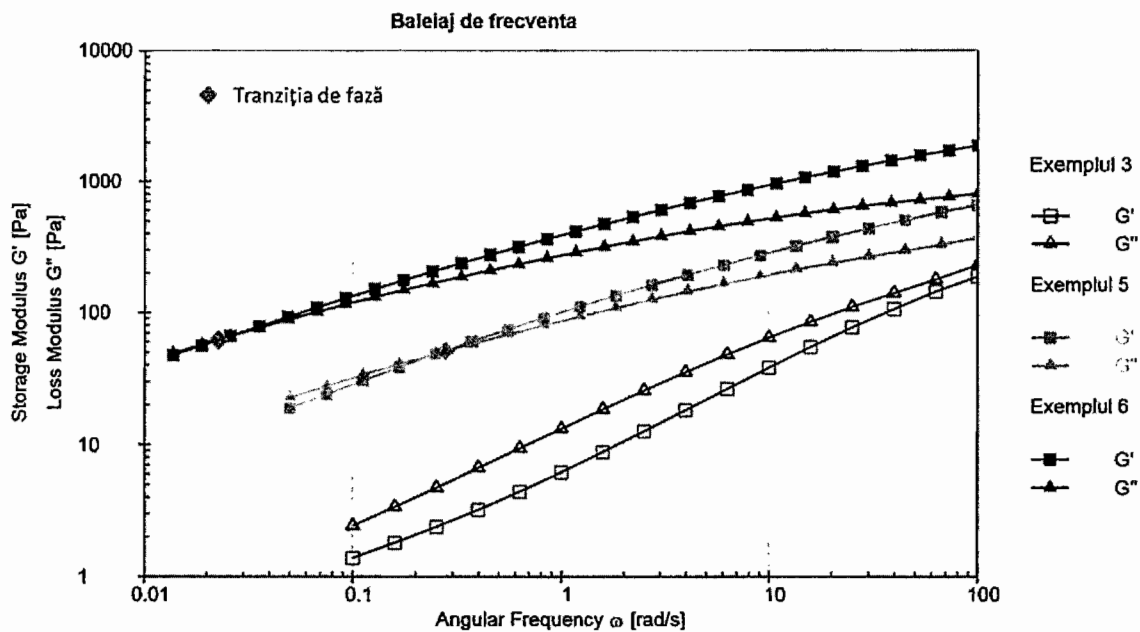


Figura 2. Testul baleiaj de frecvență pentru formulele din *Exemplele 3, 5 și 6*

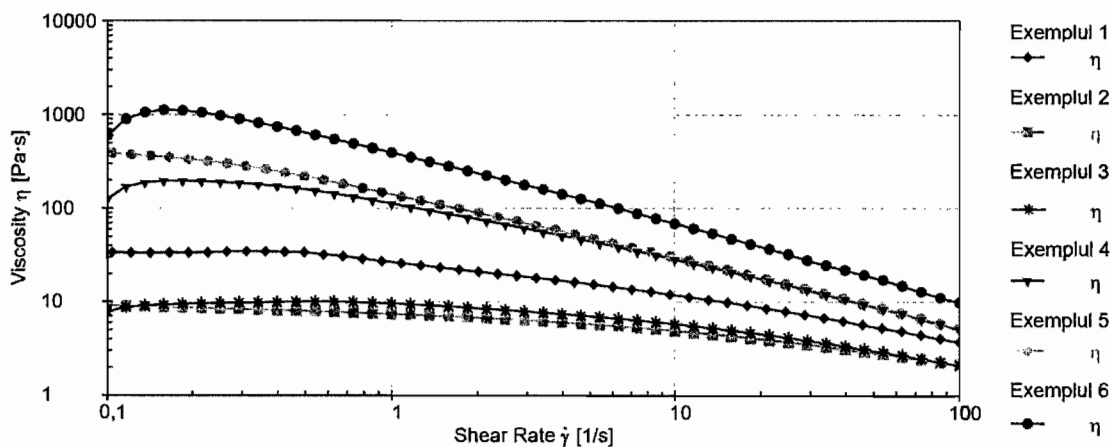


Figura 3. Curbele de curgere pentru formulele din *Exemplele 1-6*

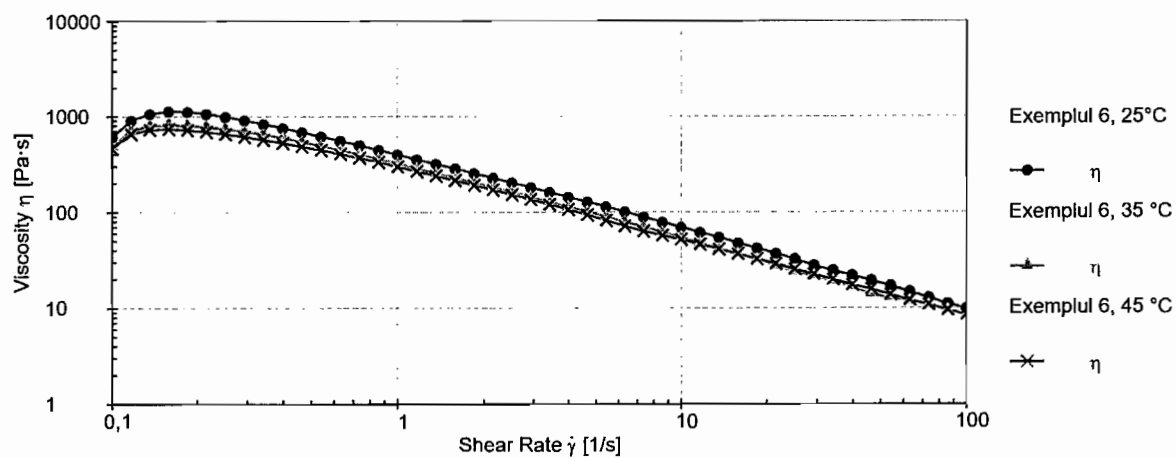


Figura 4. Curbele de curgere pentru formula din *Exemplul 6* înregistrate la 25°C, 35°C și respectiv 45°C

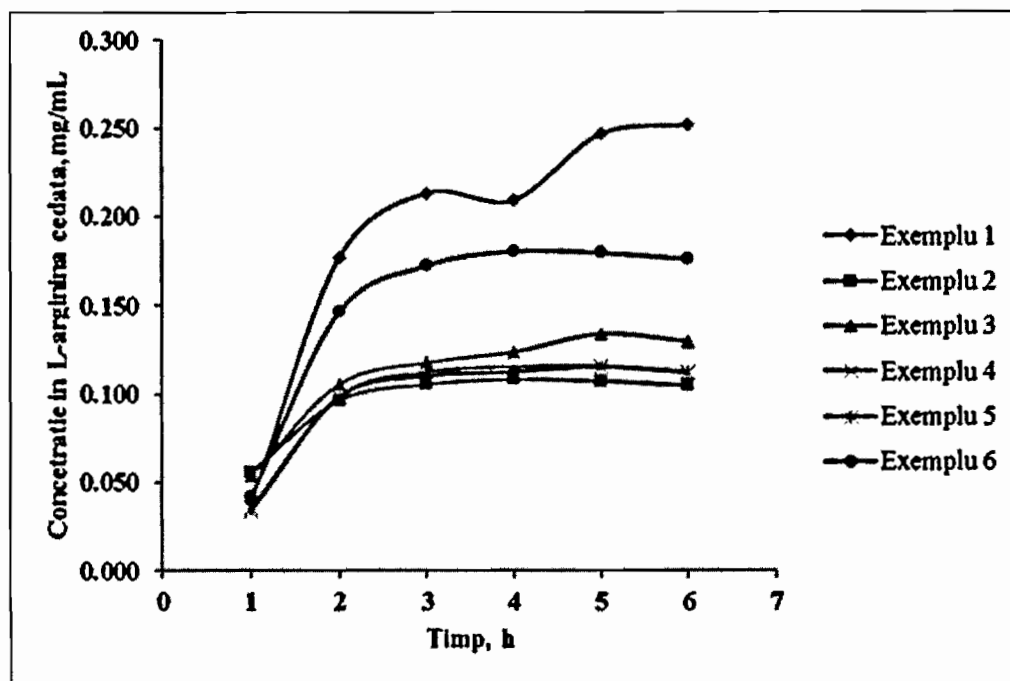


Figura 5. Profilele de cedare *in vitro* pentru hidrogelurile din *Exemplele 1-6*

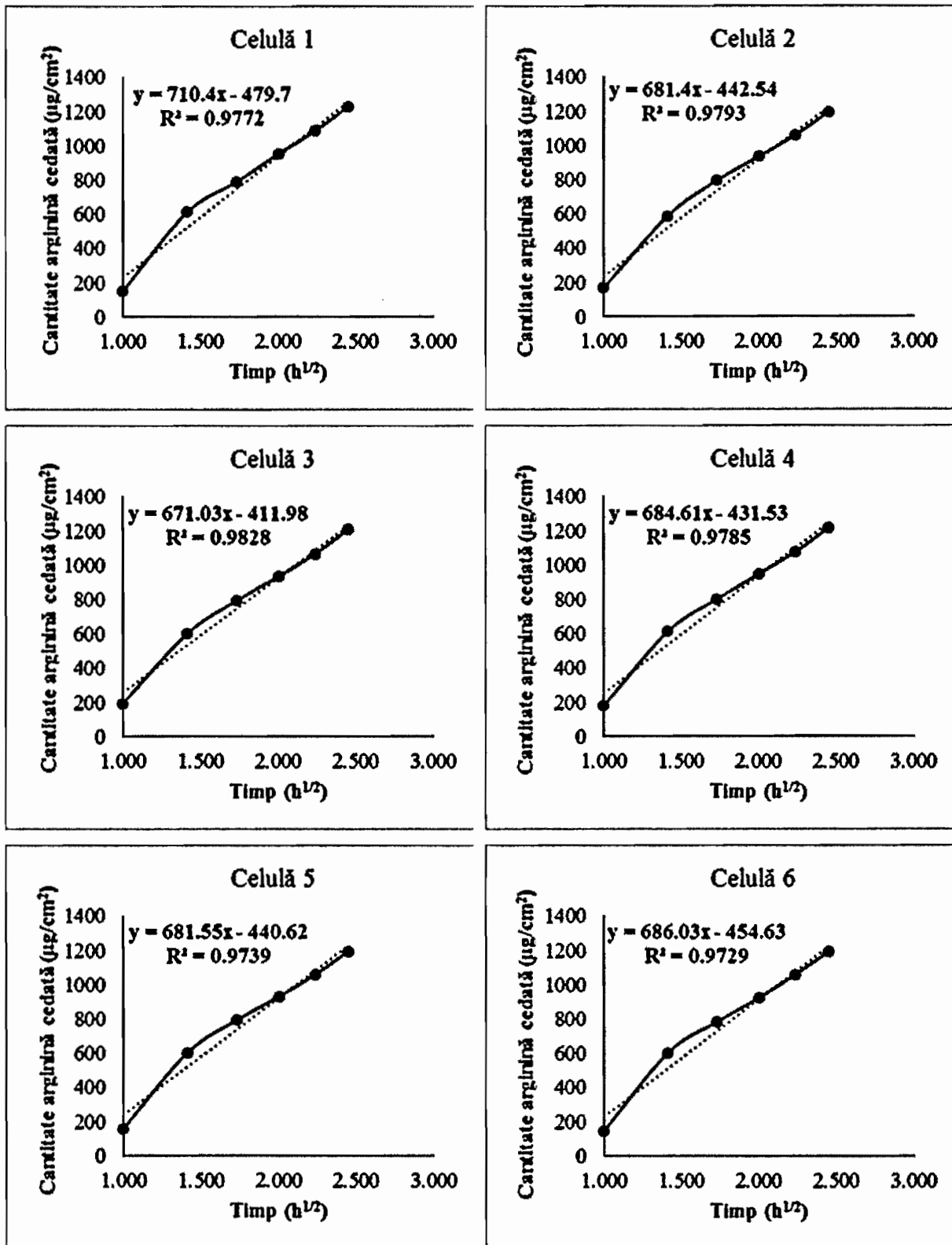


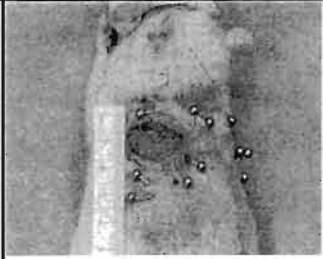
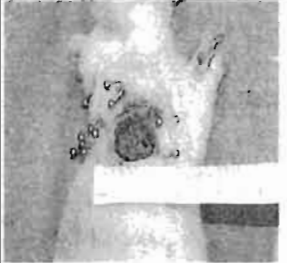
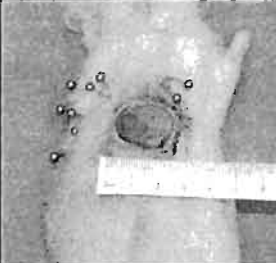
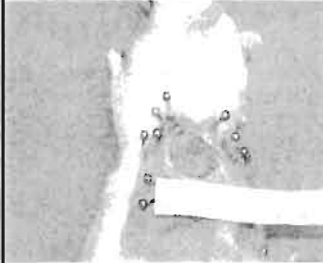











Figura 6. Rată de cedare *in vitro* pentru hidrogelul din *Exemplul 6*, celulele 1-6

Ziua	Lot 1/Exemplul 1	Lot 2/Exemplul 3	Lot 3/Exemplul 6
3			
6			
9			
12			
15			

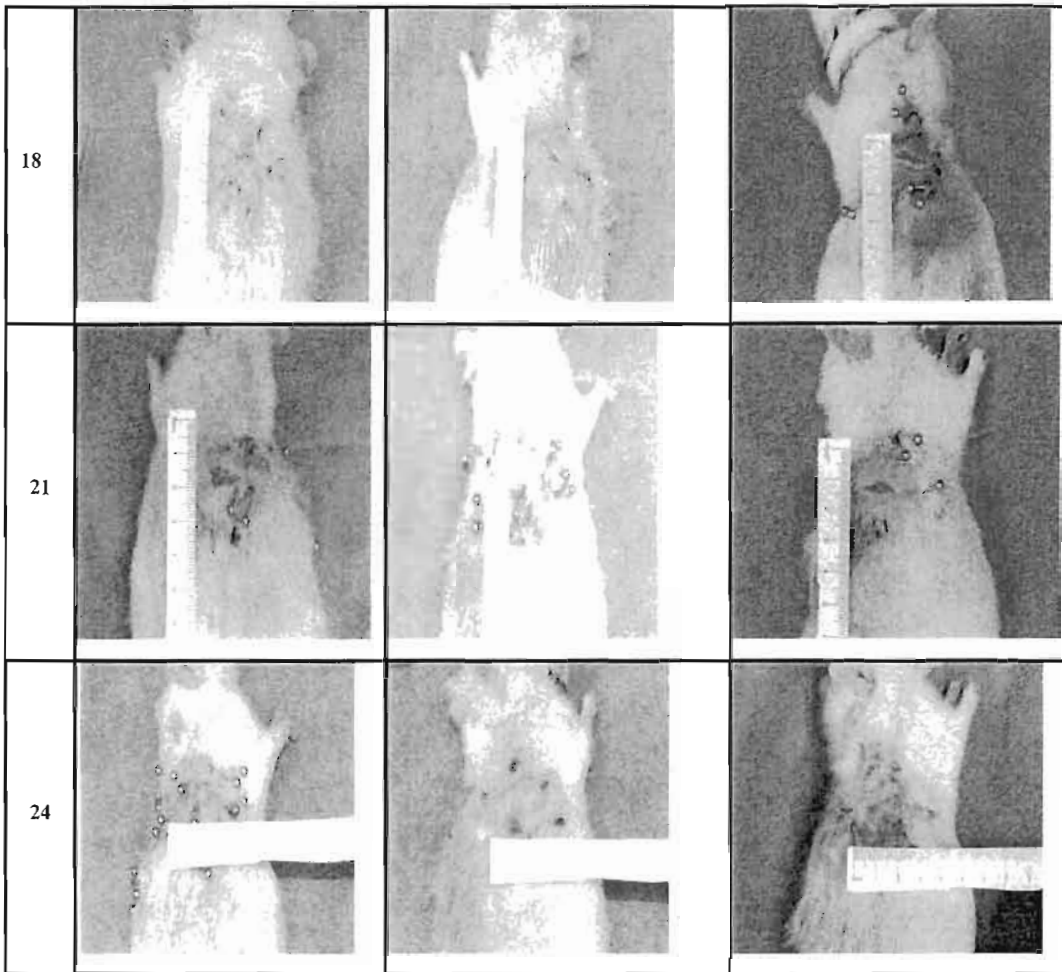


Figura 7. Imagini macroscopice ale plăgii la aplicarea formulelor dezvoltate (Exemplele 1, 3, 6) la diferite intervale de timp.