



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00727

(22) Data de depozit: 27/09/2018

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

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA TEHNICĂ DIN
CLUJ-NAPOCA, STR.MEMORANDUMULUI
NR.28, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" DIN
CLUJ-NAPOCA, STR.MIHAIL
KOGĂLNICEANU NR.1, CLUJ-NAPOCA,
CJ, RO

(72) Inventatori:
• POPESCU VIOLETA, STR. OAȘULUI
NR.340J, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• MOLDOVAN MARIOARA,
STR. VIILE NADAȘEL NR. 52,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• POPESCU GEORGE, STR. OAȘULUI
NR.340J, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• PREJMEREAN CRISTINA ALEXANDRA,
BD. 1 DECEMBRIE 1918 NR. 24,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• PRODAN DOINA,
STR. PROFESOR CIORTEA NR. 5, SC, 2,
AP. 44, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• GHERMAN TIMEA, STR. FAGULUI NR.2,
BL.C7, AP.15, GHERLA, CJ, RO;
• SAROȘI LIANA CODRUȚA,
STR. GURGHIU NR. 4, AP. 25,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) HIDROGELURI CU HIDROLIZATE PROTEICE
CU PROPRIETĂȚI SPECIALE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei compoziții antimicrobiene utilizată ca material matrice pentru medicamente. Procedeu conform invenției constă în etapele de preparare a unei suspensii de izolat proteic de zer sau soia în apă preîncălzită la temperatura de lucru de 50°C, hidratarea și dispersarea proteinei în apă distilată prin ultrasonare timp de 15 min, ajustarea la pH de 7...8, hidroliza enzimatică a suspensiei de proteine sub agitare la temperatură

constantă timp de 6 h, rezultând un hidrolizat care se complexează cu clorură de calciu sau sulfat de cupru, se adaugă gelatină, glicerină și ulei volatil cu rol antimicrobian, rezultând un hidrogel având o grosime medie a foliei de 266...278 μm și un grad de îmbibare de 2,7...9,2 g apă/g hidrogel.

Revendicări: 2



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MARC
 Cerere de brevet de invenție
 Nr. a 2018 00727
 Data depozit 27-09-2018

DESCRIEREA INVENȚIEI

Obiectivul actualului brevet îl constituie elaborarea unei compoziții antimicrobiene, de hidrogeluri pe bază de hidrolizate proteice având proprietăți speciale și utilizări multiple, ca pansamente, plasturi respectiv matrice pentru eliberarea controlată de medicamente.

De secole oamenii au folosit pansamente pentru tratamentul unor leziuni ale tegumentelor. Din punct de vedere istoric, rolul principal al unui pansament tradițional în procesul de vindecare a fost și este protejarea pasivă a plăgii, și menținere uscată a rănii. În ultimele decenii, un pansament este o componentă activă a procesului de vindecare, care este proiectat pentru a controla infecția și pentru a oferi un micromediu de vindecare favorabil. Un mediu cald, umed este acum recunoscut ca fiind unul care favorizează vindecarea rapidă și eficientă, în procesele de regenerare și protecție a țesutului rănii. În consecință, la ora actuală, pansamentele au depășit rolul lor pasiv și joacă un rol activ în procesul de vindecare. În acest sens, există o tendință marcantă de creștere a utilizării plasturilor pentru tratamente transdermice, atât pentru afecțiuni dermatologice, dureri articulareⁱ, cât și pentru tratarea unor maladii neurologice grave (Parkinsonⁱⁱ, Alzheimerⁱⁱⁱ), tratarea dependenței de nicotină, a dereglărilor hormonale^{iv}, contracepție, detoxifiere, etc.

Cerințele actuale ale unui "pansament ideal" sunt exigente, el trebuie să asigure un mediu umed, izolare termică, circulația efectivă de oxigen, drenare de lichid, ajutor în absorbția plăgilor exudate, să asigure o protecție a rănii împotriva bacteriilor și a infecțiilor secundare, trebuie să fie ușor de aplicat iar îndepărtarea trebuie să fie lipsită de durere și nu în ultimul rând trebuie, să fie biocompatibil fără a provoca reacții alergice^v. Procesul de recuperare al plăgii depinde de tipul pansamentului folosit, de tipul plăgilor tratate, condițiile de sănătate a pacientului (prezența altor boli, de exemplu, diabet, anemie) și de mediul social^{vi}.

Pentru a menține un mediu umed se folosesc hidrogelurile. În ultimul timp hidrogelurile sunt utilizate tot mai mult pentru tratamentul rănilor cronice și a arsurilor. Acestea pot fi naturale sau sintetice, fiind formate din rețele reticulate de lanțuri polimerice, umplute cu o cantitate semnificativă de lichid pentru a oferi un mediu propice pentru regenerarea țesutului. Hidrogelul are rolul de a elibera la locul țintit substanța activă pe care o conține.

Conform studiilor lui De Buddy^{vii}, plasturii pe bază de hidrogeluri pot fi adaptați pentru eliberare de medicamente, pentru vindecarea țesuturilor, pentru livrare de proteine și peptide sau a altor agenți bioactivi, pentru regenerarea accelerată a țesuturilor

deteriorate. Aceste materiale au avantajul că urmează conturul suprafeței plăgii, asigură oxigenarea, pătrunderea apei, și în același timp protejează suprafața împotriva invaziei bacteriene^{viii, ix}.

Hidrogelurile sunt structuri polimerice tridimensionale cu caracter hidrofil, iar încorporarea de hidrolizate proteice poate provoca schimbări majore în proprietățile microstructurale, morfologice și mecanice al acestora.

Un hidrogel derivat din surse naturale care este utilizat pe scară largă pentru producerea de pansamente este celuloză bacteriană (BC). BC este un polimer produs de unele bacterii aparținând genurilor *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, etc. Utilizarea (BC) prezintă un important interes pentru managementul plăgilor avansate datorită biocompatibilității, non-toxicității, stabilității mecanice și a conținutului ridicat de umiditate. Czaja et al.^x, susține că BC în sine nu are proprietăți antimicrobiene ci reprezintă doar o barieră fizică împotriva infecției bacteriene. Helenius et al.^{xi} și Pertile^{xii} susțin că o parte din inconvenientele legate de pansamentele pe bază de BC depind de caracteristicile fizice și chimice ale BC, cum ar fi distribuția dimensiunilor porilor, morfologia fibrelor și prezența unor centri reactivi noi introduși prin modificări chimice.

Problema tematică, pe care o rezolvă invenția, se referă la obținerea unor formule optime de derivați cu proprietăți superioare care să înlăture dezavantajele BC și care să poată fi înglobați în masa unor hidrogeluri pe bază de peptide sau proteine având domenii largi de aplicare: eliberarea controlată de medicamente administrate intern sau transdermic, eliberarea sau creșterea de celule, cosmetice, inginerie tisulară, tratarea cicatricilor, tratarea verucilor, a herpesului, acneei sau pentru tratarea arsurilor tegumentelor.

Dezavantajele menționate au fost înlăturate prin aplicarea compoziției de hidrogel pe bază de:

- a) 1...10% Izolat proteic de zer sau soia / Hidrolizat proteic de zer sau soia (grad de hidroliză 2 ... 10%)
- b) 2...10% Gelatină 99,5% (biopolimer)
- c) 1...20% Glicerină (plastifiant)
- d) 0,2-5 % Sulfat de cupru pentahidrat sau Clorură de calciu (agent de complexare / reticulare)
- e) 0,004...1% Acid salicilic (agent de reticulare, agent antibacterian)
- f) 0,01-0,05 Uleiuri volatile de *Galium Verum* sau *Salvia officinalis* (agent antimicrobian)

Pentru obținerea hidrolizatului proteic (amestec de aminoacizi și peptide) s-a

aplicat hidroliza enzimatică a zerului din lapte sau a izolatului proteic de soia. Prin hidroliza proteinelor are loc scindarea legăturilor peptidice pentru formarea unor lanțuri mai mici de peptide sau aminoacizi. Spre deosebire de hidroliza acidă, care atacă toate legăturile peptidice distrugând o parte a aminoacizilor și o mare parte a vitaminelor, hidroliza enzimatică este mult mai delicată, nu necesită temperaturi ridicate și țintește de obicei anumite legături peptidice, obținându-se un amestec de aminoacizi și polipeptide cu lanțuri de diferite lungimi. Un alt avantaj al proceselor enzimatică este absența produșilor secundari de reacție care rezultă dacă procesul de hidroliză se desfășoară prin procese chimice.

Hidroliza enzimatică s-a realizat utilizându-se soluții cu conținut de izolat de zer (IWP) ISOLAC DigeZime Multi-Enzyme Complex produs de Carbery Group, Bio-Zer pulbere (BWP) și izolat proteic de soia (ISP) de la Tonik Pharm. Pentru realizarea hidrolizei s-au folosit 4 proteaze: tripsina, pepsina, bromelaina și papaina. Condițiile optime de hidroliză (pH, temperatură) au fost stabilite pentru fiecare enzimă în parte.

Pentru o mai mare eficiență a hidrogelurilor, aminoacizii și proteinele obținute prin hidroliză au fost complexate cu ioni de interes biologic, și anume calciu și cupru. Complecșii cu calciu contribuie la metabolismul mineralelor și al vitaminelor, reglează funcția cardiacă, reduc oboseala, în timp ce chelații cu cupru cresc rezistența la stres și imunitatea, favorizează vindecarea țesuturilor, contribuie la sănătatea pielii și a părului, și la formarea mielinei. Aminoacizii și peptidele pot forma cu ușurință complecși chelatici datorită grupărilor COOH și NH₂ capabile să doneze electroni unor ioni metalici și să formeze legături covalente coordinative, devenind astfel liganzi bidentați.

Conform prezentei invenții, procesele de hidroliză, complexare și obținere a hidrogelurilor s-au realizat într-o singură etapă, metoda de obținere fiind redată în continuare.

Se prepară suspensia de izolat proteic de zer sau soia în apă preîncălzită la temperatura de lucru. Hidratarea și dispersarea proteinei în apă distilată se realizează prin ultrasonare, pH-ul soluției fiind adus la valoarea prestabilită (între 7 și 8) cu soluție de hidroxid de sodiu sau acid clorhidric. Se aduce suspensia de proteine la temperatura (între 50°C și 60°C) și volumul de lucru prestabilite, se introduce în vasul de reacție după care se introduce enzima și se menține sub agitare la temperatură constantă timp de 6 ore. La sfârșitul procesului de hidroliză se dezactivează enzima prin încălzire la temperatura de 90°C timp de 10 minute, apoi se introduce suspensia de hidrolizat într-un balon cotat și se aduce la un volum prestabilit în vederea utilizării ulterioare. Hidrolizatului proteic se conservă prin congelare sau liofilizare. Pentru complexare se adaugă clorura de calciu sau



sulfatul de cupru în soluția de hidrolizat, alături de gelatină, glicerină și uleiul volatil cu rol antimicrobian.

Prin aplicarea invenției se obțin produse cu proprietăți superioare, rezistența la tracțiune (RT) cuprinsă între 2,01...4 Mpa, modulul lui Young $E=110-737$ MPa, alungirea la rupere $\mathcal{E}=0,5-2,3$.

În continuare se prezintă 4 exemple nelimitative de realizare a hidrogelurilor conform prezentei invenții.

Exemplul 1

0,5g gelatină se dispersează în 2 ml apă, se adaugă 0,4g glicerină și se lasă în repaus 10-15 minute pentru o cât mai bună hidratare. În acest amestec se adaugă 4 ml soluție de izolat proteic de zer (IWP) ISOLAC DigeZime Multi-Enzyme Complex produs de Carbery Group și 8 μ L ulei volatil de Galium Verum. Amestecul obținut se încălzește la microunde în etape, pentru o perioadă totală de 25 secunde, iar apoi se adaugă 0,036g soluție 30 % sulfat de cupru. Rezultă un hidrogel cu o grosime medie a foliei de 266 μ m, și un grad de îmbibare de 3 g apă/g de hidrogel. -Produsul poate fi folosit ca material pentru plasturi.

Exemplul 2

10g zer IWP se dispersează în 100g apă. Soluția se ultrasonează timp de 15 minute într-o baie cu ultrasunete Elmasonic S30H. Se aduce pH-ul la 7 cu ajutorul acidului clorhidric/hidroxidului de sodiu și se ridică temperatura la 50°C. Se introduce în suspensie tripsina în cantitate de 0,1 g și se menține sub agitare la temperatură constantă cu ajutorul unui agitator Velp Scientifica timp de 6 ore. La sfârșitul procesului de hidroliză se dezactivează enzima prin încălzire la temperatura de 90°C timp de 10 minute, apoi se introduce suspensia de hidrolizat într-un balon cotat și se aduce la un volum de 200 mL. Separat se pregătește amestecul de gelatină (0,5g) și glicerină (0,4g) după metoda arătată la exemplul 1. La acest amestec se adaugă 4 ml hidrolizat proteic de zer, și se încălzește amestecul nou obținut la microunde în etape, pentru o perioadă totală de 25 secunde. În final se adaugă 0,06g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sub formă de soluție de 30%. Rezultă un hidrogel cu o grosime medie a foliei de 286 μ m, și un grad de îmbibare de 2,7 g apă/g de hidrogel.

Exemplul 3

Se prepară amestecul de glicerină și gelatină ca la exemplul 1. În acest amestec se adaugă 4 ml soluție de izolat proteic de soia și 8 μ L ulei volatil de Salvia officinalis.

Amestecul obținut se încălzește la microunde în etape, pentru o perioadă totală de 25 secunde, iar apoi se adaugă 0,12g soluție 30% sulfat de cupru. Rezultă un hidrogel cu o grosime medie a foliei de 269 μm , și un grad de îmbibare de 8,3 g apă/g de hidrogel.

Exemplul 4

10 g izolat proteic de soia se dispersează în 200 g apă. Soluția se ultrasonează timp de 15 minute într-o baie cu ultrasunete Elmasonic S30H. Se aduce pH-ul la 7 cu ajutorul acidului clorhidric/hidroxidului de sodiu și se ridică temperatura la 60°C. Se introduce în suspensie bromelaina în cantitate de 0,1 g și se menține sub agitare la temperatură constantă cu ajutorul unui agitator Velp Scientifica timp de 6 ore. La sfârșitul procesului de hidroliză se dezactivează enzima prin încălzire la temperatura de 90°C timp de 10 minute. Hidrolizatul obținut se congelează. Separat se pregătește amestecul de gelatină (0,5g) și glicerină (0,4g) după metoda arătată la exemplul 1. La acest amestec se adaugă 4 ml hidrolizat proteic de zer 5%, și se încălzește amestecul nou obținut la microunde în etape, pentru o perioadă totală de 25 secunde. În final se adaugă 0,24g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sub formă de soluție de 30%. Rezultă un hidrogel cu o grosime medie a foliei de 278 μm , și un grad de îmbibare de 9,2 g apă/g de hidrogel $RT=2,01 \dots 4$ MPa, modulul lui Young $E=110-737$ MPa, alungirea la rupere $\epsilon=0,5-2,3$. Produsul poate fi folosit ca material pentru matrice pentru medicamente cu eliberare controlată.

REVENDICĂRI

1. Compoziție de hidrogel antimicrobian proteice cu utilizări multiple, ca pansamente, plasturi sau ca și matrice pentru eliberarea controlată de medicamente, pe bază de hidrolizat proteic de zer sau soia, **caracterizată prin aceea că** este constituit din următorii componenți:

- g) 1...10% Izolat proteic de zer sau soia / Hidrolizat proteic de zer sau soia (grad de hidroliză 2 ... 10%)
- h) 2...10% Gelatină 99,5% (biopolimer)
- i) 1...20% Glicerină (plastifiant)
- j) 0,2-5 % Sulfat de cupru pentahidrat sau Clorură de calciu (agent de complexare / reticulare)
- k) 0,004...1% Acid salicilic (agent de reticulare, agent antibacterian)
- l) 0,01-0,05 Uleiuri volatile de Galium Verum sau Salvia officinalis (agent antimicrobian)

2. Metoda de obținere a hidrogelului antimicrobian cu compoziția descrisă la revendicarea 1, conform căreia procesul de hidroliză, complexare și obținere a hidrogelului s-a realizat într-o singură etapă. Pentru început se prepară suspensia de izolat proteic de zer sau soia în apă preîncălzită la temperatura de lucru de 50°C. Hidratarea și dispersarea proteinei în apă distilată se realizează prin ultrasonare timp de 15 minute într-o baie de ultrasunete, pH-ul soluției fiind adus la o valoare cuprinsă între 7 și 8, cu soluție de hidroxid de sodiu sau acid clorhidric. Se aduce suspensia de proteine la o temperatura între 50°C și 60 °C și la volumul de lucru de 200 mL, care se introduce în vasul de reacție, după care se introduce enzima și se menține sub agitare la temperatură constantă timp de 6 ore. La sfârșitul procesului de hidroliză se dezactivează enzima prin încălzire la temperatura de 90°C timp de 10 minute, apoi se introduce suspensia de hidrolizat într-un balon cotat și se aduce la un volum 200 mL în vederea utilizării ulterioare. Hidrolizatul proteic se conservă prin congelare sau liofilizare. Pentru complexare se adaugă clorura de calciu sau sulfatul de cupru în cantități cuprinse între 0,25-5 % în soluția de hidrolizat, alături de gelatină, glicerină și uleiul volatil.