



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00724

(22) Data de depozit: 11/11/2019

(41) Data publicării cererii:  
28/05/2021 BOPI nr. 5/2021

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

(72) Inventatori:  
• CRĂCIUNESCU OANA,  
BD.NICOLAE GRIGORESCU NR.33, BL.A 1,  
SC.3, AP.33, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• ILIE DANIELA,  
STR.ION IONESCU BRĂILA, NR.5,  
SAT PALANCA, COMUNA  
FLOREȘTI-STOENEȘTI, GR, RO;

• OPRIȚA ELENA IULIA,  
STR.VALEA IALOMIȚEI NR.6, BL.C 10,  
ET.9, SC.C, AP.184, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• STANCIUC ANA MARIA,  
STR.NIȚU VASILE, NR.66, BLOC 25, SC.2,  
AP.52, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;  
• SECIU ANA MARIA,  
BVD.1 DECEMBRIE 1918, NR.22, BL.3,  
SC.1, ET.6, AP.28, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• OANCEA ANCA, STR.PAȘCANI NR.5,  
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) HIDROGEL COSMECEUTIC CU PROBIOTICE ÎNCAPSULATE,  
PEPTIDE BIOACTIVE ȘI PREBIOTICE PENTRU REGLAREA  
MICROBIOMULUI PIELII ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție de hidrogel cu rol farmaceutic și cosmetic pentru reglarea microbiomului pielii. Compoziția, conform invenției, este constituită din 20...25% o fază internă de particule solide de alginat acoperite cu chitosan cu un conținut minim de  $10^{10}$  unități formatoare de colonii din *Lactobacillus paracasei*, eventual în amestec cu *L. rhamnosus*, și 75...80% o fază externă de hidrogel format din 2,5% hidrolizat proteic de pește, 1% acid ascorbic, 1,5% prebiotic,

0,3% clorură de calciu, 1% glicerină, 1% PEG 6000, 0,7% carbomer, 1% conservant natural din extract concentrat de sămburi de grapefruit, 0,3% sorbat de potasiu, respectiv, trietanolamină, 0,5% fenoxietanol, respectiv, ulei esențial de imortele, precum și apă distilată.

Revendicări: 1



## HIDROGEL COSMECEUTIC CU PROBIOTICE INCAPSULATE, PEPTIDE BIOACTIVE SI PREBIOTICE PENTRU REGLAREA MICROBIOMULUI PIELII SI PROCEDEU DE OBTINERE

**Autori:** Oana Craciunescu, Daniela Ilie, Elena Iulia Oprita, Ana-Maria Stanciuc, Ana-Maria Seciu, Anca Oancea

Prezenta invenție se referă la un hidrogel cosmeceutic bioactiv de uz topic, cu efect în reglarea microbiomului pielii, pe baza de probiotice încapsulate, peptide bioactive din pește și prebiotice glucidice și la un procedeu de obținere a acestuia. Hidrogelul destinat îngrijirii pielii este o compoziție cosmeceutică, cu rol farmaceutic și cosmetic, pentru prevenirea și tratarea problemelor dermatologice, în special celor datorate dezechilibrului microbiomului pielii, îmbătrânirii naturale și/sau premature în urma expunerii prelungite la radiațiile solare.

Microbiomul pielii are un rol esențial în protecția împotriva agenților patogeni, precum și în stimularea sistemului imunitar [Byrd A. et al., *Nature Rev. Microbiol.*, 16, 143-155, 2018]. S-au dezvoltat strategii în legătură cu echilibrarea microbiomului pielii, dar există încă numeroase probleme de rezolvat pentru stabilirea unei conduite terapeutice pe baza de bacterii benefice [Arck P. et al., *Exp. Dermatol.*, 2010, 19, 401-405]. S-a arătat că utilizarea microorganismelor vii, probiotice, în anumite cantități pot susține menținerea sănătății la nivelul florei intestinale, dar aplicarea lor direct pe piele nu este încă larg utilizată. Lactobaciliile sunt membrii ai microbiomului pielii și, deși reprezintă un procent relativ mic (6-14%), comparativ cu stafilococii și streptococii, aceștia joacă un rol important în reducerea proceselor inflamatorii și a numărului de stafilococi [Lebeer S. et al., 2018, doi:10.1101/463307].

S-a observat un proces de creștere a duratei de viață a populației, ceea ce conduce la un număr mare de vârstnici care prezintă fenomene de degradare a pielii. În plus, expunerea prelungită la radiații UV sau lumina solară determină o îngroșare și ridare a pielii. Cele mai daunătoare pentru celulele pielii sunt radiațiile UV-B (280-320 nm), care blochează procesul de pigmentare naturală a pielii, produc arsuri ale pielii și eritem, prezentând și un efect bactericidal [Faergemann J. & Larko O., *Acta Dermatol. Venereol.*, 1987, 67, 69-72]. Radiațiile UV-A (320-400 nm) determină pierderea elasticității, formarea de riduri și îmbătrânirea prematură la nivelul pielii expuse.

Se cunoaște că microîncapsularea bacteriilor probiotice în materiale polimerice sintetice sau naturale se poate realiza prin tehnici chimice, fizice sau fizico-chimice [Chavarri M. et al., 2012, In: *Probiotics, IntechOpen*, E.C. Rigobelo ed., 501-538]. Alginatul de sodiu este un polizaharid de origine marină, extras din alge, biocompatibil și necitotoxic, care poate forma structuri sferice prin

inretelarea lanturilor de polimer cu ajutorul ionilor de calciu [Huq T. et al., 2017, *Carbohydr. Polym.*, 168, 61-69; Ji R. et al., 2019, *Front. Microbiol.*, doi: 10.3389/fmicb.2019.01389]. Diferite tehnici, precum cea de extrudare si emulsificare, au fost aplicate pentru microincapsularea in alginat a probioticelor destinate produselor alimentare, dar emulsificarea a fost mai utila in cazul productiei pe scara larga [Sarao L.K. & Arora M., 2017, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 57, 344-371]. S-a raportat si utilizarea altor tehnici, precum atomizarea sau coacervarea, in cazul microincapsularii uleiurilor de origine vegetala, marina sau esentiale [Bakry A.M. et al., 2016, *Compr. Rev. Food Sci Food Safety*, 15, 143-182]. Procesul de microincapsulare a probioticelor este de asteptat sa confere mentinerea viabilitatii pe parcursul prelucrarii, supravietuirea pe durata stocarii, rezistenta crescuta la variatii de temperatura, precum si pastrarea activitatii biologice si a beneficiilor la situsul tintit, comparativ cu microorganismele libere [Praepanitchai O.A. et al., 2019, *BioMed Res. Intern.*, 2019, Art. ID 9768152, 8 pages]. Desi liofilizarea bacteriilor probiotice le asigura o supravietuire de lunga durata, in conditii adecvate, la contactul cu apa sunt reactivate si expuse noilor conditii de mediu. De aceea, **brevetul WO2018002248/2018** propune un sistem format din doua compartimente, unul pentru mentinerea microorganismelor intr-un mediu neapos in interiorul microcapsulelor si altul continand un acid organic cu rol de conservant, util in formularea de produse topice pe baza de apa. **Brevetul US2012263826A1/2012** descrie microincapsularea probioticelor in miezul anhidru al capsulelor gelatinoase formate dintr-un amestec de proteine din zer si alginat suspendate intr-un mediu apos si propune utilizarea acestora in produsele comestibile, cum ar fi bauturile.

În prezent, există abordări in literatura de specialitate care propun cercetarea și dezvoltarea unor formule de probiotice microincapsulate prin tehnica miez-invelis, suspendate in emulsii de tip ulei in apa pentru tratamentul pacientilor cu acnee si leziuni inflamatoare [Lebeer S. et al., 2018, doi:10.1101/463307]. Studii de evaluare *in vitro* si *in vivo* au aratat ca lactobacilii pot fi aplicati in multiple situsuri ale corpului uman pentru a modula activitatea microbiomului existent, dar si a sistemului imunitar [Sanders M.E. et al., 2018, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 49, 207-216]. Alte studii au propus ca micromasa de bacterii sa fie immobilizata intr-un amestec de acetat de celuloza, glicerina si maltodextrina, supusa atomizarii, iar pulberea obtinuta contine microcapsule impermeabile care protejeaza microorganismele [Antunes A. et al., 2013, *LWT - Food Sci. Technol.*, 54, 125-131].

O alta inventie descrie autoasamblarea microparticulelor pe baza de proteine din soia sub actiunea ionilor metalici bi- sau trivalenti pentru protejarea bacteriilor probiotice de uz nutraceutic, cosmeceutic si farmaceutic [Brevet US20190192439A1/2019]. Microsferele solide de tip matrice permit distributia omogena a probioticelor in intreaga structura si o protectie a viabilitatii celulare cu 4 saptamani mai lunga, comparativ cu liofilizatul. Mai multe formulari topice, care includ probiotice,

in particular lactobacili, se adreseaza dermatitelor atopice si acneei prin activarea imunitatii naturale [Dreno B. et al., *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2016, 30, 2038-2047].

Problema pe care o rezolva prezenta inventie este realizarea unui nou hidrogel cosmeceutic natural cu efect de echilibrare a microbiomului pielii si, implicit, in tratarea inflamatiilor si ridurilor de la nivelul pielii afectate de expunerea prelungita la radiatii UV, intr-un mod mai eficient, prin asocierea proprietatilor stimuloare ale lactobacililor microincapsulati, cu cele de protectie si mentinere a unei viabilitati celulare ridicate ale prebioticelelor glucidice, precum si cele antioxidante si de stimulare a refacerii componentelor matricei extracelulare ale peptidelor bioactive din peste in prezenta vitaminei C.

Compozitia cosmeceutica, conform inventiei, reprezinta un hidrogel bioactiv constituit dintr-o faza interna de particule solide formata din 0,05...0,5% probiotic liofilizat, ales dintre *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* si *Lactobacillus plantarum* sau un amestec din aceste tulpini bacteriene, cu un continut de minim  $10^{10}$  unitati formatoare de colonii, incapsulat in 0,5...1% alginat de calciu, 0,05...0,5% chitosan cu greutatea moleculara intre 50...190 kDa si o faza externa de hidrogel vascos, transparent format din 1...5% hidrolizat proteic din peste cu un continut de minim 25 mg/ml peptide cu greutatea moleculara medie de 3000 Da, 0,5...1% acid ascorbic, 0,5...3% prebiotic, ales dintre pectina, inulina, amidon, 0,1...0,3% clorura de calciu, 0,5...3% glicerina, 0,5...3% PEG 6000, 0,5...3% carbomer, 0,3...1% conservant natural din extract concentrat de samburi de grapefruit, 0,1...0,5% sorbat de potasiu, 0,5...1% fenoxietanol, 0,1...0,5% trietanolamina, 0,1...1% ulei esential de imortele pentru parfumare si apa distilata pana la 100 g produs.

Hidrogelul cosmeceutic, obtinut in conformitate cu prezenta inventie, prezinta urmatoarele avantaje:

- Capsulele de alginat contin o cantitate mare de probiotice pe care le protejeaza, le prelungesc viabilitatea si le imbunatatesc disponibilitatea si eficienta la nivelul pielii;
- Acoperirea capsulelor de alginat cu chitosan imbunatateste supravietuirea celulelor bacteriene;
- Polimerii utilizati pentru microincapsulare sunt naturali, biocompatibili si biodegradabili si nu produc citotoxicitate dupa administrare la nivelul pielii;
- Faza externa contine atat prebiotice pentru activarea probioticului eliberat din capsule, cat si ingrediente bioactive reprezentate de peptide de peste si vitamina C cunoscute pentru capacitatea de stimulare a sintezei de colagen la nivelul celulelor pielii;
- Formularea produsului cu doua faze asigura o eliberare treptata a ingredientelor si o

eficacitate mai mare a complexului probiotic-prebiotic-ingredientes bioactive;

- Aplicarea topica a produsului permite absorbtia rapida si livrarea ingredientelor direct la locul afectat, permitand refacerea echilibrului la nivelul microbiomului pielii;
- Produsul asigura atat un rol farmaceutic datorita prezentei unei concentratii mari de bacterii probiotice viabile, cat si un rol cosmetic prin continutul in peptide bioactive derivate din colagen, implicate in stimularea metabolismului celulelor pielii.

Probioticul, ales din genul *Lactobacillus* spp. si repartizat pe zona lezata, poate modula temporar microbiomul pielii, micșorand populatia de stafilococi si streptococi si poate stimula sistemul imunitar. Microincapsularea in particule solide de alginat acoperite cu chitosan si includerea intr-un gel bioactiv asigura o eliberare gradata, patrunderea in piele si/sau formarea unui film topic, protector.

Hidrolizatul proteic din peste are dublu rol, actionand la nivelul celulelor pielii, dar si in stimularea celulelor bacteriene, asigurand o intensificare a metabolismului celular si un efect regenerativ. Hidrolizatul proteic din peste poate fi ales dintre un produs obtinut din colagen din piele de peste sau un produs obtinut din alte deseuri de peste (oase, solzi, etc), cu un continut de minim 85% peptide cu masa moleculara medie de 3000 Da. Peptidele pot actiona si ca substrat pentru microbiota pielii, deci ca substante prebiotice, sprijinind dezvoltarea si mentinerea viabilitatii lactobacililor [Gao M.T. et al., *Bioresour. Technol.*, 2006, 97, 2414–2420].

Pe langa acestea, prebioticul glucidic, ales dintre pectina, inulina si amidon constituie un nutrient pentru bacteriile probiotice si imbunatateste productia de acid lactic.

Acidul ascorbic are o actiune antioxidanta, iar cuplarea ei cu peptidele de peste ii asigura o protectie fata de oxidarea in prezenta aerului, prelungind activitatea acesteia.

In continuare, se prezinta doua exemple de realizare a inventiei:

#### **Exemplul 1.**

Pentru a obtine 100 g hidrogel cosmeceutic bioactiv, se asociaza 20 g particule solide de alginat acoperite cu chitosan care incapsuleaza  $10^{10}$  unitati formatoare de colonii din *Lactobacillus paracasei*, cu 80 g hidrogel bioactiv care contine 2,5 g hidrolizat proteic de peste, 1 g acid ascorbic, 1,5 g pectina, 0,3 g clorura de calciu, 1 g glicerina, 1 g PEG 6000, 0,7 g carbomer, 1 g extract concentrat de samburi de grapefruit, 0,3 g sorbat de potasiu, 0,5 g fenoxietanol, 0,3 g trietanolamina, 0,5 g ulei esential de imortele si apa distilata.

Procedeul de obtinere a hidrogelului cosmeceutic bioactiv consta din aceea ca, se realizeaza un hidrogel bioactiv prin amestecarea a 10...25 parti faza interna de particule solide rezistente la acid lactic cu 75...90 parti faza externa de hidrogel bioactiv. In prima etapa, 0,7 g alginat de sodiu se

dizolva in 35 ml apa distilata prin agitare si incalzire pana la 40 °C pe o plita prevazuta cu agitare magnetica, apoi se raceste la temperatura camerei, se adauga liofilizat de *L. paracasei* si se continua incorporarea prin agitare magnetica usoara, timp de 30 minute. Intr-un vas de 300 ml in care se introduce un agitator inclinat la 15 grade fata de verticala se pun 100 ml solutie de clorura de calciu 1% in care se lasa sa cada picaturi din amestecul de alginat-probiotic, care formeaza imediat particule solide care se mentin in solutie, sub agitare usoara, la temperatura camerei, timp de 2 ore, pana devin de culoare alba. Se strecoara printr-o sita cu ochiuri mai mici de 1 mm si se pun intr-o solutie de chitosan 0,05%, pH 6, cu agitare usoara, la temperatura camerei, timp de 30 minute si apoi se pastreaza la 4 °C peste noapte. Se strecoara si se cantaresc. In etapa 2, intr-un vas de 250 ml asezat pe un suport prevazut cu agitare magnetica se prepara un gel din 0,7 g carbomer peste care se adauga pe rand 50 ml apa distilata, o solutie opalescenta de peptide bioactive din peste in care s-a dizolvat in prealabil acidul ascorbic, prin agitare magnetica, la intuneric, apoi se adauga solutiile de pectina, clorura de calciu, sorbat de potasiu, fenoxietanol si PEG 6000, se omogenizeaza si se lasa in repaus, la temperatura camerei, timp de 24 h. Sub agitare se adauga ingredientele lichide glicerina, extractul concentrat de samburi de grapefruit si uleiul esential de imortele. Se corecteaza aciditatea solutiei cu trietanolamina pana la un pH de 5,5...6 si se completeaza cu apa pana la 80 g, continuand agitarea usoara pana la omogenizare completa. Peste compozitia 2, se adauga amestecand usor, particulele solide, pana la incorporare si distribuire omogena. Hidrogelul cosmeceutic cu particule solide este transparent, cu miros caracteristic si pH neutru. Se ambaleaza in cutii de 30 ml si se pastreaza la temperaturi cuprinse intre 4-25 °C, timp de 6 luni. Hidrogelul cosmeceutic bioactiv poate fi aplicat pe pielea sanatoasa sau lezata si are un efect de modulare a microbiomului pielii, de regenerare si antioxidant, prevenind fotoimbatranirea pielii si stimuland procesul de aparare naturala impotriva agentilor fizici si biologici externi.

### **Exemplul 2.**

Pentru a obtine 100 g produs cosmeceutic, se asociaza 25 g particule solide de alginat acoperite cu chitosan care incapsuleaza  $10^{11}$  unitati formatoare de colonii dintr-un amestec de *L. Paracasei* si *L. rhamnosus*, cu 75 g hidrogel bioactiv care contine 2,5 g hidrolizat proteic de peste, 1 g acid ascorbic, 1,5 g inulina, 0,3 g clorura de calciu, 1 g glicerina, 1 g PEG 6000, 0,7 g carbomer, 1 g extract concentrat de samburi de grapefruit, 0,3 g sorbat de potasiu, 0,5 g fenoxietanol, 0,3 g trietanolamina, 0,5 g ulei esential de imortele si apa distilata.

Procedeul de obtinere este cel descris la exemplul 1.

Morfologia particulelor solide de alginat, care incapsuleaza bacteriile probiotice si sunt acoperite cu chitosan a fost observata prin microscopie optica si de fluorescenta. S-a observat o structura relativ sferica, atat in stare hidratata cat si uscata. Colorarea ADN-ului nuclear al probioticelor cu reactivul DAPI a confirmat prezenta lactobacililor la interior, distribuiti uniform sau sub forma de agregate. Efectul lactobacililor asupra viabilitatii celulelor pielii (fibroblaste, keratinocite) a fost testat pe un model experimental de co-cultura, utilizand liniile celulare NCTC clona L929 si, respectiv, HaCaT. Rezultatele testului MTS au demonstrat ca tipurile de lactobacili utilizati in formularea hidrogelului bioactiv au exercitat o activitate necitotoxica asupra celor doua tipuri celulare. Valorile densitatii optice masurate la 450 nm in cazul co-culturii au fost similare martorului de celule cultivat in absenta probioticelor. Alte teste pe culturi de celule ale pielii (fibroblaste, keratinocite) s-au realizat prin metoda MTT, modelul experimental de zgariere si evidentierea imunocitochimica a componentelor citoscheletului, actina si tubulina. Rezultatele au demonstrat ca, in prezenta peptidelor bioactive din peste, a fost stimulata proliferarea, migrarea si aderarea celulara, favorizand procesele de vindecare a pielii, intr-un mod similar cu actiunea acidului ascorbic. De asemenea, aceste ingrediente bioactive au avut un rol de protectie a celulelor supuse iradierii cu UV-B, asa cum s-a demonstrat intr-un model experimental *in vitro*.

## REVENDICARE

Hidrogel cosmeceutic cu probiotice incapsulate, peptide bioactive si prebiotice pentru reglarea microbiomului pielii, **caracterizat prin aceea ca** este constituit dintr-o faza interna de particule solide formata din 0,05...0.5% probiotic liofilizat, ales dintre *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* si *Lactobacillus plantarum* sau un amestec din aceste tulpini bacteriene, cu un continut de minim  $10^{10}$  unitati formatoare de colonii, incapsulat in 0,5...1% alginat de calciu, 0,05...0,5% chitosan si o faza externa de hidrogel vascos, transparent format din 1...5% hidrolizat proteic din peste, 0,5...1% acid ascorbic, 0,5...3% prebiotic, ales dintre pectina, inulina, amidon, 0,1...0,3% clorura de calciu, 0,5...3% glicerina, 0,5...3% PEG 6000, 0,5...3% carbomer, 0,3...1% conservant natural din extract concentrat de samburi de grapefruit, 0,1...0,5% sorbat de potasiu, 0,5...1% fenoxietanol, 0,1...0,5% trietanolamina, 0,1...1% ulei esential de imortele pentru parfumare si apa distilata, partile fiind exprimate in greutate.