



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2023 00755**

(22) Data de depozit: **28/11/2023**

(41) Data publicării cererii:
29/03/2024 BOPI nr. **3/2024**

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

(72) Inventatori:
• **GASPAR-PINTILIESCU ALEXANDRA,
ȘOS. COLENTINA, NR.55, BLOC.83, SC.1,
AP.17, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **CRĂCIUNESCU OANA,
BD. NICOLAE GRIGORESCU NR.33,
BL.A 1, SC.3, AP.33, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SECIU-GRAMA ANA- MARIA,
BD. 1DECEMBRIE 1918, NR.22, BL.3, SC.1,
ET.6, AP.28, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **IOSĂGEANU ANDREEA, STR.SIRIULUI,
NR.39, BL.19D, AP.15, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PRELIPCEAN ANA-MARIA, STR.SG.NIȚU
VASILE NR.66, BL.25, ET.3, SC.2, AP.52,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **HIDROGEL MULTIFUNCȚIONAL PE BAZĂ DE
COMPONENTE DE ORIGINE MARINĂ ȘI VEGETALĂ
PENTRU TRATAMENTUL RĂNILOR CRONICE ȘI PROCEDEU
DE OBȚINERE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un hidrogel multifuncțional destinat tratamentului rănilor cronice, pe bază de componente polimerice naturale de natură proteică și polizaharidică de origine marină, suplimentată cu o nanoemulsie din componente de origine vegetală și la un procedeu de obținere al acestuia. Hidrogelul conform invenției este constituit din trei compoziții I, II și III, realizate din următoarele componente exprimate în procente masice:

a) compoziția I este un gel carbomer realizat din 5...10% Carbopol 940, 0,01...0,05% acid citric, 0,5...1% agent de neutralizare trietanolamină și 90...95% apă pură,

b) compoziția II este un amestec de componente naturale de origine marină format din: 45...55% hidrolizat proteic din piele de biban de mare (*Dicentrarchus labrax*) conținând 1...2% substanță uscată cu greutatea moleculară medie de 50...150 kDa, pH = 6...7 și 45...55% polizaharide sulfatate din alga macrofită marină *Cladophora vagabunda* conținând 1...2% substanță uscată, 30...35% carbohidrați totali și 20...25% sulf, care se adaugă în compoziția finală în proporție de 2...10% și

c) compoziția III este o nanoemulsie din 45...50% fază uleioasă formată din proporții egale de ulei de soia și etanol de puritate analitică, 45...50% fază apoasă de hidrosol obținut din pelin cu un conținut de 1...3% substanță uscată, 10...15% polifenoli totali și 2...10% agent de emulsifiere Tween 20, care se adaugă în compoziția finală în proporție de 0,1...1%. Procedeu conform invenției constă în amestecarea în picătură, sub agitare continuă a compoziției I cu compoziția II și cu compoziția III, în raport de greutate cuprins între 40:9:1...90:9:1, continuând agitarea la temperatura camerei, timp de 1 oră, până la omogenizare, după care hidrogelul se condiționează în cutii de plastic de 50 ml și se păstrează la o temperatură de 4°C, timp de 6 luni.

Revendicări: 2

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



HIDROGEL MULTIFUNCȚIONAL PE BAZĂ DE COMPONENTE DE ORIGINE MARINĂ ȘI VEGETALĂ PENTRU TRATAMENTUL RĂNILOR CRONICE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

Autori: Alexandra Gaspar-Pintilieșcu, Oana Crăciunescu, Ana-Maria Seciu-Grama,
Andreea Iosăgeanu, Ana-Maria Prelipcean

Invenția se referă la o compoziție de hidrogel multifuncțional destinată tratamentului rănilor cronice, pe bază de componente polimerice naturale de natură proteică și polizaharidică de origine marină, suplimentată cu o nanoemulsie din componente de origine vegetală, precum și la procedeul de obținere al acesteia.

Se știe că rănilor cronice de la nivelul țesutului dermal sunt caracterizate de o fază inflamatorie persistentă cauzată de prezența în exces a macrofagelor, monocitelor și neutrofilelor, celule care eliberează cantități mari de citokine pro-inflamatoare de tipul TNF- α , IL-1 β , IL-6. De asemenea, supraproducția de metaloproteinaze matriceale, responsabile de degradarea matricei extracelulare, precum și infecțiile persistente și biofilmele microbiene sunt alți factori implicați în cronicizarea rănilor (**Schilrreff P. & Alexiev U., *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4928, 2022**).

Se cunosc unele produse naturale utilizate pentru tratamentul rănilor pielii, destinate unei anumite faze a procesului de vindecare, cum sunt: pansamentele care conțin miere (MediHoney[®]) sau colagenază (Collagenase SANTYL[®]) pentru debridarea plăgii, pansamentele care au în compoziție argint (AQUACEL[®] Hydrofiber[®]) sau derivați ai iodului (Iodoflex[®]) pentru controlul infecțiilor, și pansamentele pe bază de alginat și colagen bovin (Algosteril[®], CollaSorb[®]) pentru absorbția exudatului în exces (**Bowers S. & Franco E., *American Family Physician*, 101(3), 159-166, 2020; Shi C. et al., *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 182, 2020**). Totuși, nu există produse naturale care să rezolve problema complexă a rănilor cronice.

Este cunoscută utilizarea colagenului, singur sau în asocieră cu extracte din plante, în dezvoltarea de biomateriale de tip pansament (**Brevet RO131950 B1**), hidrogel (**Brevet RO122181 B1**) sau film topic (**Brevet RO127488 B1**) pentru regenerarea țesutului dermic lezat datorită accesibilității surselor de extracție și biocompatibilității sale cu țesuturile lezate. Totuși, dezavantajul colagenului și al

derivaților acestuia (de tipul colagenului hidrolizat sau gelatinei) extrași din surse de origine terestră (țesuturi bovine, porcine sau ovine) este reprezentat de posibilitatea transmiterii unor boli ale animalelor sursă către utilizatorii finali.

De aceea, s-a propus substituirea colagenului obținut din diferite surse terestre cu un extract de colagen izolat din piele de pește, cu o capacitate superioară de absorbție a apei, proprietăți de biocompatibilitate și biodegradabilitate similare, și imunogenitate scăzută (Furtado M. et al., *Engineered Regeneration*, 3(3), 217-231, 2022; Geahchan S. et al., *Marine Drugs*, 20(1), 61, 2022). Totuși, biomaterialele pe bază de colagen din pește prezintă dezavantajul unei structuri cu biodegradabilitate rapidă.

Se cunoaște din brevetul **CN111632189B/2020** utilizarea colagenului denaturat sub formă de gelatină, de origine marină, modificat chimic, împreună cu un fotoinițiator și un agent de fotoreticulare, în prezenta radiațiilor UV, pentru obținerea unui hidrogel injectabil destinat hemostazei țesuturilor animale și umane cu răni accidentale sau chirurgicale. Astfel, a fost rezolvată rezistența mecanică a biomaterialului colagenic, dar masa moleculară mare a acestuia determină un proces lent de regenerare tisulară.

Se știe că există un număr mare de polimeri polizaharidici cu un grad variabil de sulfatare în algele macrofite marine. Studiile au evidențiat că aceștia prezintă proprietăți imunomodulatoare, anti-inflamatoare și antioxidante, care alături de caracterul non-citotoxic îi recomandă pentru dezvoltarea de noi produse destinate vindecării rănilor și pentru regenerarea tisulară (Andryukov B.G. et al., *Biomedicines*, 8(9), 301, 2020; Zaitseva O.O. et al., *Algal Research*, 68, 102885, 2022).

Sunt cunoscute compoziții formate din gelatină de origine marină și polizaharide sulfatate din alge, de tipul alginatului sau ulvanului, condiționate sub forma de hidrogeluri și, respectiv, matrici de nanofibre, care au stimulat procesele de proliferare a keratinocitelor și contracție a rănilor și au diminuat procesul inflamator pe modele animale cu arsuri experimentale (Boonyagul S. et al., *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(8), e15864, 2022; Terezaki A. et al., *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 74, 103535, 2022). O altă compoziție de tip hidrogel pe bază de gelatină marină și polizaharidul fucoidan, reticulată cu acid tanic a prezentat proprietăți antioxidante, antimicrobiene, anti-inflamatoare și pro-

angiogenice, utile în accelerarea procesului de regenerare a pielii lezate (Lu Y. et al., *International Journal of Biological Macromolecules*, **223**, 36-48, 2022).

Se știe că unii constituenți fitochimici, de tipul uleiurilor volatile, polifenolilor, alcaloizilor, saponinelor și terpenelor, izolați din diferite specii de plante medicinale au o acțiune antioxidantă, anti-inflamatoare și antimicrobiană, care stimulează proliferarea, migrarea și aderarea celulară și luptă împotriva infecțiilor, accelerând astfel procesul de vindecare a rănilor (Criollo-Mendoza M.S. et al., *Molecules*, **28(2)**, 598, 2023). Totuși, aplicarea extractelor din plante direct pe zona lezată poate conduce la iritații locale și la apariția unor reacții alergice.

De aceea, s-a propus încorporarea constituenților fitochimici în sisteme cu eliberare controlată cu dimensiuni mai mici de 500 nm pentru acoperirea unei suprafețe mai mari a stratului cornos și difuziei acestora în straturile profunde ale pielii (Singh Y. et al., *Journal of Controlled Release*, **252**, 28-49, 2017). Astfel, se cunoaște că nanoemulsia pe bază de curcumină administrată transdermal pe modele animale prezintă activitate anti-inflamatoare, care poate stimula procesul de vindecare a rănilor (Ahmad N. et al., *RSC Advances*, **9(35)**, 20192-20206, 2019). Extractul obținut din *Achyrocline satureioides* încorporat într-o nanoemulsie și, apoi, într-un gel de tip carbomer protejează țesutul dermic împotriva stresului oxidativ generat de radiațiile UVA/UVB (Balestrin L.A. et al., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **163**, 269-276, 2016). Se cunoaște că un pansament preparat din gelatină marină, acetat de celuloză și o nanoemulsie pe bază de ulei esențial din *Zataria multiflora* cu activitate antimicrobiană a fost eficient în tratamentul arsurilor pe modele animale (Farahani H. et al., *International Journal of Biological Macromolecules*, **162**, 762-773, 2020). Totuși, uleiurile esențiale au un proces de extracție cu durată lungă și un preț de cost ridicat.

De aceea, se propune utilizarea hidrosolilor (denumiți și hidrolați sau ape florale) rezultați ca produși secundari în urma procesului de obținere a uleiurilor volatile prin hidrodistilarea unor plante aromatice. Hidrosolii au în compoziție polifenoli și compuși volatili de tipul alcoolilor monoterpenici, aldehydelor, cetonelelor sau alcoolilor sesquiterpenici cu proprietăți antioxidante, anti-inflamatoare și antimicrobiene, având și acțiune insecticidă și nematocidă (Tavares C.S. et al., *Phytochemistry Reviews*, **21(5)**, 1661-1737, 2022). Ca urmare, hidrosolii sunt utilizați în aromaterapie, industria cosmetică, alimentară, precum și în agricultura ecologică. Recent, s-a arătat că o formulă de tip cremă îmbogățită cu hidrosol din

Nigella sativa prezintă activitate antioxidantă și potențial de vindecare a rănilor pe defecte ale pielii realizate pe modele animale (Erdoğan Ü. et al., *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 26(1), 45-60, 2023).

Deși există un număr foarte mare de compoziții și produse destinate îngrijirii rănilor, dezavantajul lor este că niciunul nu este de tip multifuncțional și, astfel, nu prezintă o eficiență maximă în cazul tratamentului rănilor cronice, caracterizate de un răspuns inflamator excesiv, supraproducție a metaloproteinazelor matriceale care degradează componentele țesutului dermic și contactare rapidă a unor infecții cu agenți microbieni patogeni.

Având în vedere dezavantajele menționate și numărul mare de pacienți cu arsuri și răni cronice, prezenta invenție are ca scop soluționarea acestor probleme tehnice și propune o compoziție de hidrogel pe bază de carbomer care conține componente naturale de hidrolizat proteic și polizaharide sulfatate de origine marină, care are capacitatea de a acționa asupra tuturor acestor factori responsabili de întârzierea procesului normal de vindecare a rănilor, suplimentat cu hidrosol de pelin condiționat sub formă de nanoemulsie, cu rol de combatere a infecțiilor bacteriene cronice. În plus, procedeul de obținere valorifică produse secundare ale industriei de prelucrare a peștelui și algelor marine, precum și ale industriei de prelucrare a plantelor medicinale, contribuind la reducerea poluării mediului.

Hidrogelul multifuncțional destinat tratamentului rănilor cronice, conform invenției, este constituit din următoarele componente: a) un gel carbomer din 5...10% Carbopol 940, 0,01...0,05% acid citric, 0,5...1% agent de neutralizare trietanolamină și în rest apă pură, care se adaugă în compoziția finală în proporție de 90...95%; b) un amestec de componente naturale de origine marină format din 45...55% hidrolizat proteic obținut din piele de biban de mare (*Dicentrarchus labrax*) cu un conținut de 1...2% substanță uscată și greutate moleculară medie de 50...150 kDa, pH 6...7, și 45...55% polizaharide sulfatate din alga macrofită marină *Cladophora vagabunda* cu un conținut de 1...2% substanță uscată, 30...35% carbohidrați totali și 20...25% sulf, care se adaugă în compoziția finală în proporție de 2...10%; și c) o nanoemulsie din 45...50% fază uleioasă formată din proporții egale de ulei de soia și etanol de puritate analitică, 45...50% fază apoasă de hidrosol obținut din pelin (*Artemisia absinthium*) cu un conținut de 1...3% substanță uscată, 10...15% polifenoli totali și 2...10% agent de emulsifiere Tween 20, care se adaugă în compoziția finală în proporție de 0,1...1%, părțile fiind exprimate în greutate.

Procedul de obținere a hidrogelului, conform invenției, constă din amestecarea a 90...95 părți compoziție I, constituită dintr-un gel carbomer preparat din Carbopol 940 de concentrație 5...10% lăsat în repaus timp de 24 ore în apă pură în care s-au dizolvat, în prealabil, 0,01...0,05% acid citric cu rol de conservant, prin agitare magnetică, la temperatura camerei, și corectarea pH-ului gelului la 6...7 cu o soluție de 0,2% trietanolamină, cu 2...10 părți compoziție II de amestec de componente naturale de origine marină constituită din 45...55% soluție de hidrolizat proteic cu o substanță uscată de 1...2% și greutate moleculară medie de 50...150 kDa, obținută prin incubarea țesutului mărunțit de piele de biban de mare în acid acetic 0,5 M (în raport 1:105 g/g), timp de 24 ore, la 4 °C, sub agitare magnetică, corectarea pH-ului 6...7 cu NaOH 0,5 M și apoi ultrasonicarea filtratului la 37 kHz, la 60 °C, timp de 3...5 ore, și 45...55% soluție de polizaharide sulfatate cu un conținut de 1...2% substanță uscată, 30...35% carbohidrați totali și 20...25% sulf, obținută prin extracția pudrei de *Cladophora vagabunda* în apă pură (în raport 1:10 g/g), într-un echipament Soxhlet, la 100 °C, timp de 3...5 ore, precipitarea filtratului cu etanol rece la o concentrație de 75%, 18 ore, la 4 °C și reluarea precipitatului în apă pură, cele două soluții fiind amestecate în proporții egale cu un omogenizator la 2000 rpm, la 4 °C, 1 oră, și cu 0,1...1 părți compoziție III de nanoemulsie vegetală constituită din 45...50% fază uleioasă din ulei de soia și etanol de puritate analitică în proporții egale, 45...50% fază apoasă de hidrosol cu un conținut de 1...3% substanță uscată, 10...15% polifenoli totali, obținut prin hidrodistilarea pudrei de pelin (*Artemisia absinthium*) în apă pură (în raport 1:10 g/g) într-un echipament de reflux de tip Clevenger, la 100 °C, timp de 1,5...3 ore și separarea de uleiul esențial, și 2...10% agent de emulsifiere Tween 20, preparată prin adăugarea fazei uleioase, încălzită în prealabil la 50...60 °C, în picătură peste faza apoasă, sub agitare magnetică, urmată de adăugarea emulsifiantului și omogenizare prin agitare magnetică timp de 30...60 minute și ultrasonicare în baie de sonicare la frecvența de 37 kHz, timp de 5...10 minute. În final, peste compoziția I se adaugă în picătură, sub agitare continuă compoziția II și apoi compoziția III, în raport de greutate de 40:9:1...90:9:1, continuând agitarea la temperatura camerei, timp de 1 oră, până la omogenizare. Hidrogelul se condiționează în cutii de plastic de 50 mL și se păstrează la o temperatura de 4 °C, timp de 6 luni.

Aplicarea invenției prezintă următoarele avantaje:

- hidrogelul este un biomaterial multifuncțional având în compoziția sa componente proteice și polizaharidice de origine marină cu efect de stimulare a proliferării principalelor tipuri celulare implicate în vindecarea țesutului dermal (fibroblaste, keratinocite), anti-inflamator și de inhibare a metaloproteinazelor matriceale, suplimentate cu o emulsie de origine vegetală cu efect antimicrobian, fiind destinat managementului complex al rănilor cronice;
- hidrogelul îmbunătățește biodisponibilitatea compușilor biologic activi pe tip polifenoli și monoterpene datorită încapsulării acestora în nanoemulsia vegetală, reducând riscul apariției iritațiilor în tratamentul local al rănilor cronice;
- accelerează procesul de vindecare în răni cronice datorită principiilor naturale biologic active din compoziție (hidrolizat proteic, polizaharide sulfatate, polifenoli, monoterpene);
- produsul este biodegradabil și biocompatibil și nu posedă antigenicitate;
- procedeul de preparare este fezabil, utilizează tehnici și solvenți ecologici și nu necesită echipamente complexe;
- procedeul este sustenabil deoarece se bazează pe valorificarea unor produse secundare din industria piscicola și cea a prelucrării plantelor medicinale;
- produsul este stabil timp de 6 luni la 4 °C.

Hidrolizatul proteic obținut din pielea de biban de mare (*Dicentrarchus labrax*) constituie un suport natural pentru migrarea, proliferarea și diferențierea celulară, având capacitatea de stimulare a metabolismului celulelor implicate în repararea și regenerarea țesutului dermic lezat.

Polizaharidele sulfatate izolate din specia de alge verzi *Cladophora vagabunda* îi conferă hidrogelului proprietăți anti-inflamatoare și de inhibare a enzimelor responsabile de degradarea matricei extracelulare.

Hidrosolul de pelin (*Artemisia absinthium*), bogat în compuși fenolici și terpenoide contribuie la procesul de vindecare tisulară prin activitățile antioxidante și antimicrobiene.

Nanoemulsia permite eliberarea controlată a compușilor activi din extractul de pelin și difuzia acestora în straturile profunde ale țesutului dermal lezat.

În continuare, se prezintă două exemple de realizare a invenției:

Exemplul 1.

Etapa I. Prepararea gelului carbomer

Separat, într-un vas de inox cu o capacitate de 3 L, prevăzut cu agitator, se introduc 50 g carbopol 940 și se completează la 1000 g cu apă pură în care s-au dizolvat, în prealabil, 0,5 g de acid citric prin agitare magnetică la temperatura camerei, timp de 20 minute. Soluția se lasă în repaus timp de 24 ore, la temperatura camerei, se ajustează pH-ul la valoarea de 6,5 cu o soluție de 0,2% trietanolamină, rezultând o soluție vâscoasă.

Etapa II. Obținerea amestecului de componente naturale de origine marină

Într-un vas de sticlă cu capacitatea de 1 L, se introduc 50 g piele de biban de mare spălată, în prealabil, cu apă de robinet și mărunțită în bucăți de 1 cm, peste care se adaugă 500 g acid acetic 0,5 M și se incubează la 4 °C cu agitare magnetică. După 24 h, amestecul se filtrează prin pâlnie Buchner prevăzută cu hârtie de filtru cu porozitate mare și se corectează pH-ul la o valoare de 6,5 cu o soluție de NaOH 0,5 M. Soluția rezultată se introduce într-un pahar Berzelius și se menține în baie cu ultrasunete, la o frecvență de 37 kHz, la 60 °C, timp de 3 ore. Paharul se scoate din baie, iar soluția răcită la temperatura camerei, reprezentând hidrolizatul proteic cu o substanță uscată de 1%, se păstrează la frigider timp de 7 zile.

Separat, într-un balon de sticlă cu fund rotund cu capacitatea de 2 L, se introduc 100 g din alga verde *Cladophora vagabunda* spălată, în prealabil, cu apă de robinet, uscată la temperatura camerei și mărunțită într-o râșniță electrică până la obținerea unei pudre, peste care se adaugă 1000 g apă pură și se montează la un echipament Soxhlet, operat la 100 °C, timp de 3 ore. După răcire, soluția rezultată se filtrează prin pâlnie Buchner prevăzută cu hârtie de filtru cu porozitate mică. Apoi, peste soluția filtrată se adaugă 675 g etanol de puritate analitică rece, se pune pe un agitator magnetic și apoi, se menține în frigider timp de 18 ore. Soluția etanolică se centrifughează la 10000 g, la 4 °C, timp de 20 minute, se recuperează precipitatul, care se dizolvă în 500 g apă pură prin agitare magnetică și se obține o soluție reprezentând polizaharide sulfatate cu substanță uscată de 1%, care se păstrează la frigider timp de 7 zile.

Pentru obținerea amestecului din componente marine, într-un vas Berzelius cu capacitatea de 1,5 L, se adaugă 500 g soluție rece de hidrolizat proteic din piele de

pește și 500 g soluție rece de polizaharide sulfatate din alga *Cladophora vagabunda* și se amestecă la un omogenizator, la 2000 g, la 4 °C, timp de 1 oră.

Etapa III. Obținerea nanoemulsiei vegetale

O cantitate de 100 g pelin uscat și măcinat se introduce într-un balon de sticlă cu fund rotund cu o capacitate de 2 L peste care se adaugă 1000 g apă pură și se montează la un echipament de reflux de tip Clevenger, operat la 100 °C, timp de 2 ore. După separarea uleiului esențial de pelin, se transferă într-un vas Berzelius de sticlă 500 g soluție apoasă reprezentând hidrosolul de pelin cu o substanță uscată de 3%, care se păstrează la frigider timp de 7 zile.

Separat, într-un vas de sticlă cu capacitatea de 1500 mL se adaugă 500 g hidrosol de pelin peste care se adaugă, în picătură, 250 g ulei de soia amestecat, în prealabil, cu 250 g etanol de puritate analitică și se încălzește la 50 °C. Amestecul se menține sub agitare magnetică, la 50 °C, timp de 2 ore. Apoi, se adaugă treptat 25 g Tween 20 și se continuă agitarea timp de 1 oră până la omogenizare, urmată de introducerea vasului în baia de sonicare, la frecvența de 37 kHz, timp de 10 minute, pentru formarea nanoemulsiei.

Etapa IV. Obținerea hidrogelului multifuncțional

Într-un vas de inox cu o capacitate de 7 L, prevăzut cu agitator, se adaugă 4500 g gel carbomer. Apoi, se adaugă, în picătură, 450 g amestec de componente marine, sub amestecare continuă, la temperatura camerei, timp de 1 oră și 50 g nanoemulsie vegetală și se continuă agitarea magnetică, timp de 1 oră, până la omogenizarea completă. Hidrogelul multifuncțional obținut se condiționează în cutii de plastic de 50 mL și se păstrează la o temperatură de 4 °C timp de 6 luni.

Exemplul 2.

Este similar exemplului 1, cu deosebirea că pentru obținerea amestecului din componente marine, se amestecă 600 g soluție rece de hidrolizat proteic din piele de pește de concentrație 1% cu 300 g soluție rece de polizaharide sulfatate din alga *Cladophora vagabunda* de concentrație 1%, iar pentru obținerea hidrogelului multifuncțional, se amestecă 2000 g gel carbomer cu 450 g amestec de componente marine și 50 g nanoemulsie vegetală. Toate celelalte etape respectă cele descrise în exemplul 1.

Hidrogelul obținut conform exemplilor de mai sus a fost testat pe culturi de fibroblaste dermale și keratinocite umane (HaCaT) în vederea stabilirii gradului de biocompatibilitate. Rezultatele testului Roșu Neutru au indicat faptul că viabilitatea celulară a fost ridicată pentru toate concentrațiile testate, cu valori cuprinse între 100,25 și 118,75% (Tabelul 1).

Tabelul 1. Viabilitatea fibroblastelor dermale și keratinocitelor umane HaCaT cultivate în prezența diferitelor concentrații de hidrogel multifuncțional. Rezultatele reprezintă media a 3 determinări.

Proba	Concentrația ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilitatea fibroblastelor dermale (%)	Viabilitatea keratinocitelor HaCaT (%)	Grad de biocompatibilitate
Hidrogel	1500	101,4 \pm 5,40	100,51 \pm 4,00	ridicat
	750	106,25 \pm 5,55	100,25 \pm 3,05	ridicat
	375	103,69 \pm 3,60	101,28 \pm 5,03	ridicat
	200	113,29 \pm 3,75	108,76 \pm 2,01	ridicat
	100	118,75 \pm 3,65	116,23 \pm 5,02	ridicat
Martor de celule	0	100 \pm 3,00	100 \pm 2,02	ridicat

În plus, capacitatea produsului de a stimula procesul de vindecare a fost demonstrată într-o cultură confluentă de fibroblaste murine în care s-a realizat o zgâriere a stratului celular cu un vârf de pipetă și apoi, cultivarea celulelor în prezența diferitelor concentrații de hidrogel. După 24 de ore de cultivare, imaginile de microscopie optică au arătat faptul că celulele cultivate în prezența hidrogelului au migrat într-o măsură mai mare pentru acoperirea zonei lezate, comparativ cu celulele martor netratate, stimulând procesul de reparare a unei leziuni dermice.

De asemenea, hidrogelul a fost testat pe un model experimental *in vitro* de cocultură, reprezentat de keratinocite umane HaCaT și macrofage umane derivate din THP-1 cultivate într-un sistem Transwell. Celulele au fost inflamate cu lipopolizaharida bacteriană (LPS) și tratate apoi cu diferite concentrații de hidrogel multifuncțional. După 24 de ore de cultivare în condiții standard, s-a analizat producția de citokine pro-inflamatoare IL-1 β și TNF- α , precum și nivelul de

metaloproteinaze matriceale MMP-2 și MMP-9, cu ajutorul kiturilor specifice ELISA. Rezultatele obținute au demonstrat că hidrogelul prezintă activitate anti-inflamatoare prin reducerea producției de citokine IL-1 β și TNF- α . În plus, nivelul de MMP-2 și MMP-9 a fost redus semnificativ în cazul celulelor tratate cu formula brevetată, comparativ cu celulele martor (Tabelul 2).

Tabelul 2. Nivelul producției de citokine și metaloproteinaze matriceale secretate în co-cultura de keratinocite umane HaCaT și macrofage umane THP-1 în sistem Transwell, inflamate cu LPS și tratate cu diferite concentrații de hidrogel. Rezultatele reprezintă media a 3 determinări.

Marker biologic	Concentrația de hidrogel		Martor stresat cu LPS	Martor nestresat
	375 $\mu\text{g/mL}$	750 $\mu\text{g/mL}$		
IL-1 β (pg/mL)	154,19 \pm 6,74	130,49 \pm 4,71	329,68 \pm 5,92	105,08 \pm 6,51
TNF- α (ng/mL)	17,97 \pm 0,20	17,06 \pm 0,17	28,17 \pm 0,11	16,70 \pm 0,19
MMP-2 (ng/mL)	2,07 \pm 0,05	1,81 \pm 0,03	2,19 \pm 0,07	1,82 \pm 0,09
MMP-9 (ng/mL)	4,18 \pm 0,21	3,77 \pm 0,19	5,29 \pm 0,11	3,15 \pm 0,15

Testele microbiologice au urmărit evaluarea activității antimicrobiene a hidrogelului pe o tulpină de *Staphylococcus aureus* folosind metoda de difuzie în gel de agar. Rezultatele au indicat capacitatea hidrogelului de a inhiba creșterea bacteriilor patogene de *S. aureus*, observându-se în urma tratamentului o zonă de inhibiție cu diametrul de 25 mm.

REVENDICĂRI

1. **Hidrogelul multifuncțional** destinat tratamentului rănilor cronice, **caracterizat prin aceea că**, este constituit din următoarele componente: a) un gel carbomer din 5...10% Carbopol 940, 0,01...0,05% acid citric, 0,5...1% agent de neutralizare trietanolamină și în rest apă pură, care se adaugă în compoziția finală în proporție de 90...95%; b) un amestec de componente naturale de origine marină format din 45...55% hidrolizat proteic obținut din piele de biban de mare (*Dicentrarchus labrax*) cu un conținut de 1...2% substanță uscată și greutate moleculară medie de 50...150 kDa, pH 6...7, și 45...55% polizaharide sulfatate din alga macrofită marină *Cladophora vagabunda* cu un conținut de 1...2% substanță uscată, 30...35% carbohidrați totali și 20...25% sulf, care se adaugă în compoziția finală în proporție de 2...10%; și c) o nanoemulsie din 45...50% fază uleioasă formată din proporții egale de ulei de soia și etanol de puritate analitică, 45...50% fază apoasă de hidrosol obținut din pelin (*Artemisia absinthium*) cu un conținut de 1...3% substanță uscată, 10...15% polifenoli totali și 2...10% agent de emulsifiere Tween 20, care se adaugă în compoziția finală în proporție de 0,1...1%, părțile fiind exprimate în greutate.

2. **Procedeul de obținere** a hidrogelului multifuncțional, conform invenției, **caracterizat prin aceea că**, se amestecă 90...95 părți compoziție I, constituită dintr-un gel carbomer preparat din Carbopol 940 de concentrație 5...10% lăsat în repaus timp de 24 ore în apă pură în care s-au dizolvat, în prealabil, 0,01...0,05% acid citric cu rol de conservant, prin agitare magnetică, la temperatura camerei, și corectarea pH-ului gelului la 6...7 cu o soluție de 0,2% trietanolamină, cu 2...10 părți compoziție II de amestec de componente naturale de origine marină constituită din 45...55% soluție de hidrolizat proteic cu o substanță uscată de 1...2% și greutate moleculară medie de 50...150 kDa, obținută prin incubarea țesutului mărunțit de piele de biban de mare în acid acetic 0,5 M (în raport 1:105 g/g), timp de 24 ore, la 4 °C, sub agitare magnetică, corectarea pH-ului 6...7 cu NaOH 0,5 M și apoi ultrasonicarea filtratului la 37 kHz, la 60 °C, timp de 3...5 ore, și 45...55% soluție de polizaharide sulfatate cu un conținut de 1...2% substanță uscată, 30...35% carbohidrați totali și 20...25% sulf, obținută prin extracția pudrei de *Cladophora vagabunda* în apă pură (în raport 1:10 g/g), într-un echipament Soxhlet, la 100 °C, timp de 3...5 ore, precipitarea filtratului cu etanol rece la o concentrație de 75%, 18 ore la 4 °C și reluarea precipitatului în

apă pură, cele două soluții fiind amestecate în proporții egale cu un omogenizator la 2000 rpm, la 4 °C, 1 oră, și cu 0,1...1 părți compoziție III de nanoemulsie vegetală constituită din 45...50% fază uleioasă din ulei de soia și etanol de puritate analitică în proporții egale, 45...50% fază apoasă de hidrosol cu un conținut de 1...3% substanță uscată, 10...15% polifenoli totali, obținut prin hidrodistilarea pudrei de pelin (*Artemisia absinthium*) în apă pură (în raport 1:10 g/g) într-un echipament de reflux de tip Clevenger, la 100 °C, timp de 1,5...3 ore și separarea de uleiul esențial, și 2...10% agent de emulsifiere Tween 20, preparată prin adăugarea fazei uleioase, încălzită în prealabil la 50...60 °C, în picătură peste faza apoasă, sub agitare magnetică, urmată de adăugarea emulsifiantului și omogenizare prin agitare magnetică timp de 30...60 minute și ultrasonicare în baie de sonicare la frecvența de 37 kHz, timp de 5...10 minute. În final, peste compoziția I se adaugă în picătură, sub agitare continuă compoziția II și apoi compoziția III, în raport de greutate de 40:9:1...90:9:1, continuând agitarea la temperatura camerei, timp de 1 oră, până la omogenizare. Hidrogelul se condiționează în cutii de plastic de 50 mL și se păstrează la o temperatură de 4 °C, timp de 6 luni.