



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01431

(22) Data de depozit: 22.12.2011

(41) Data publicării cererii:
30.08.2013 BOPI nr. 8/2013

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN
BUCUREȘTI, STR. POLIZU NR. 1,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• LĂCĂTUȘU IOANA, ALEEA BĂIUȚ NR.4,
BL.C7BIS, AP.28, SECTOR 6, BUCUREȘTI,
B, RO;

• BADEA MARIA NICOLETA, STR. LERȘTI
NR. 3, BL. A2, SC. 6, AP. 88, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• LIANE GLORIA RALUCA STAN,
BD. MATEI BASARAB NR. 87, BL. 121,
SC. A, ET. 2, AP. 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• HANGANU ANAMARIA, CALEA GIULEȘTI
NR. 337B, BL. 5, AP. 58, ET. 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• MEGHEA AURELIA, STR. OLIMPULUI
NR. 76, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO

(54) NANOPARTICULE LIPIDICE, ANTIOXIDANTE ȘI PROCEDEU
DE OBTINERE A ACESTORA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la nanoparticule lipidice, antioxidante, utilizate ca transportori ai componentelor active în compoziții farmaceutice și la un procedeu de obținere a acestora. Nanoparticulele conform invenției cuprind în procente masice 21,82...22,13% ulei din sămburi de struguri sau ulei de squalenă dintr-o matrice formată dintr-un amestec complex de lipide solide și lichide, și 0,37...1,47% beta-caroten încapsulat în rețeaua lipidică, fiind sub formă sferică, cu un diametru de 85,2...129,2 nm, și având o capacitate de a capta 64...95% din radicalii liberi, oxigenați, formați, în funcție de uleiul utilizat. Procedeu conform invenției constă în formarea

unei preemulsii lipidice, apoase, din 10% amestec de lipide și 3...3,5% surfactanți și 0,20% beta-caroten, componentă activă hidrofobă, la o temperatură de 82...85°C, timp de 2 h, cu agitare, obținerea unor dispersii apoase de nanotransportori lipidici liberi și încărcăți cu beta-caroten, prin omogenizarea, cu forfecare la 25000 rpm, a preemulsiei, timp de 10 min, și după răcire, supunerea nanodispersiei unui proces de liofilizare la o temperatură de -55°C, timp de 72 h.

Revendicări: 11
Figuri: 7



75

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2011 21431
Data depozit 22.12.2011

NANOPARTICULE LIPIDICE ANTIOXIDANTE ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTORA

DESCRIERE

Invenția prezentă se referă la un procedeu de obținere a unor nanoparticule lipidice antioxidante pe baza de ulei din sămburi de strugure și ulei de squalenă ce pot fi utilizate drept nanotransportori siguri și eficienți pentru încapsularea și distribuția compușilor sensibili cum este cazul β -carotenului, cu aplicații în domeniul farmaceutic și bio-alimentar.

Dezvoltarea de nanostructuri funcționale ce pot încapsula, proteja și distribui controlat substanțe organice bio-active sensibile este unul dintre domeniile majore în industriile legate de sănătatea publică, care va fi îmbunătățită în mod semnificativ prin dezvoltarea unor abordări combinate ale nanotehnologiei cu utilizarea de compuși naturali proveniți din plante, fructe sau alte surse naturale. În ultimii ani, multe companii de profil au alocat timp și cercetări intense asupra dezvoltării de produse naturale extrase din plante, cu scopul de a produce remedii mai eficiente și pentru a satisface preferințele consumatorilor pentru produse naturale cu proprietăți multifuncționale.

Nanoîncapsularea de compuși bioactivi, este o condiție esențială pentru producția de alimente sau medicamente multifuncționale destinate să îmbunătățească sănătatea pe termen lung și bunăstarea consumatorilor în toată lumea. Din categoria compușilor bio-activi face parte și β -carotenul, substanță ce furnizează cel mai mare aport de vitamina A și are abilitatea de a capta radicalii liberi oxigenați datorită proprietăților sale antioxidante.

Stresul oxidativ indus de speciile oxigenate reactive joacă un rol cheie în patologiile multor boli, incluzând ateroscleroza, hipertensiune, tromboză, diabet și infarct miocardic. Ca atare combaterea stresului oxidativ vascular este importantă pentru profilaxia și tratamentul acestor maladii. Carotenul a fost implicat în prevenirea sau protecția împotriva unor tulburări grave de sănătate, cum ar fi bolile de inimă, survenite în urma unor procese de stres oxidativ. Cu toate acestea, efectele benefice ale β -carotenului sunt limitate, deoarece fiind un compus puternic hidrofob el este dificil de dispersat, este foarte reactiv și ca atare instabil la oxigen, ceea ce de multe ori duce la apariția de produși de degradare care manifestă efecte pro-oxidante. Aceste efecte nedorite trebuie atent controlate, deoarece modificările fizico-chimice ale β -carotenului pot afecta utilizarea acestui ingredient activ în diferite formulări de natură farmacologică sau bio-alimentară.

În acest context, în literatură sunt prezentate diferite cercetări realizate cu scopul de a solubiliza și stabiliza β -carotenul în sisteme veziculare submicronice, cum ar fi niozomii și nanodispersiile rezultate prin auto-asamblarea monomerilor de agenți tensioactivi. De exemplu,

performanța câtorva emulsifianți (ex: caseinat de sodiu, Tween 20, monolaurat de decaglicerol, proteine), precum și combinații ale acestora în prepararea nanodispersiilor de β-caroten a fost dovedită în două cercetări recente (Nakajima et al., 2007, 2009) prin utilizarea unui proces bazat pe tehnica de evaporare – emulsionare cu solvent. Deasemenea a fost demonstrată și fezabilitatea de a crește stabilitatea β-carotenului prin încapsulare în nanoparticule de acid polilactic (Cao-Hoang et al., 2011). În aceste cercetări, au fost utilizate miclele de Tween 80 pentru a împiedica creșterea și aglomerarea particulelor de caroten. Încapsularea β-carotenului în particule de acid polilactic a condus la organizări supramoleculare mai stabile, care oferă o protecție mai bună împotriva oxidării. Alte studii prezintă utilizarea unor sfere de furcellaran (Laos et al., 2007) și manitol în sinergie cu cationi bivalenți (Sutter et al., 2007), ca matrice eficientă pentru încapsularea β-carotenului, cu același scop de a proteja degradarea acestuia.

U.S. 0028444 A1/2010 descrie utilizarea unor nanoparticule de caroten dispersabile în apă de dimensiuni cuprinse între 100 – 300 nm, ca modulatori de gust pentru reducerea gustului amar din alimente sau băuturi. Brevetul de invenție **U.S. 0112073 A1/2010** prezintă sinteza unor nanoparticule ce prezintă un miez nepolar îmbogățit cu compuși hidrofobi de tipul beta-carotenului, un strat de surfactant intermediar (lecitină) pentru stabilizarea miezului hidrofob și un înveliș protector de polimer glucidic reticulat, de tipul acidului alginic, utilizând o metodă combinată de ultrasonare cu tehnica „layer-by-layer”. Formarea unor nanoparticule organice cu conținut variabil de β-caroten se regăsește și în **U.S. 0021592 A1/2011**. Invenția furnizează un procedeu pentru prepararea unor pulberi redispersabile de nanoparticule de β-caroten, ce implică obținerea unei microemulsii ulei-in-apă formate în sistemul Tween 80/lecitina/toluen/propanol/manitol/apă și β-caroten.

Referitor la tipul de matrice utilizată drept „rezervor” pentru încapsularea altor compuși bio-activi de natură hidrofobă, se cunosc studii destinate obținerii de nanoparticule lipidice solide. De exemplu **U.S. 0247619 A1** relatează producerea și caracterizarea unor vectori lipidici nanostructurați cu conținut de Riluzol, obținuți pe baza amestecurilor de mono-, di- și trigliceride cu acid behenic, precum și utilizarea lor la prepararea unor formulări farmaceutice pentru tratamentul sclerozei. Metoda prezintă dezavantajul utilizării de solvenți organici necesari formării unor sisteme auto-organizate de microemulsie cu ajutorul fosfatidilcolinei și a taurocolatului de sodiu, precum și necesitatea utilizării unor concentrații > 10% de surfactanți. Alte tipuri de nanoparticule lipidice au fost preparate utilizând aceeași metodă a microemulsionării. **U.S. 0233275 A1/ 2010** prezintă un proces pentru prepararea nanoparticulelor lipidice, respectiv a unor nanocapsule ce prezintă un miez lipidic solid încărcat cu un agent bio-activ și un înveliș lipidic solid, utilizând metoda microemulsiei. Similar, **U.S. 0306032 A1/2009** descrie prepararea și utilizarea unor nanoparticule lipidice solide obținute din microemulsii pe bază de propionat de colesteril și/sau butirat de colesteril pentru tratamentul patologiilor inflamatorii sau vasculare.

Nanoparticulele lipidice solide au fost intensiv investigate drept vehicule pentru distribuția de compuși bio-activi. **U.S. 0206341 A1/2008** și **U.S. 0224447 A1/2011** descriu implicarea nanoparticulelor lipidice ca vehicule pentru distribuția acizilor nucleici, în scopuri terapeutice. Încorporarea peptidelor, proteinelor, oligonucleotidelor și a unor absorberi UV în nanoparticule lipidice formate în principal din monogliceride este semnalată în patentele **U.S. 0038941 A1/2011**, **U.S. 0206341 A1**, **U.S. 0224447 A1** și **U.S. 0235540 A1/2003**.

În ceea ce privește formarea unor matrici antioxidante cu rol de nanotransportori eficienți pentru diferite substanțe bio-actives, **U.S. 7597907 B2/2010** prezintă încapsularea unor proteine active (ex: enzime antioxidante implicate în detoxifierea xenobioticelor) în matrici polimerice sintetice, pentru utilizare în prevenirea stresului oxidativ.

Prepararea unor matrici lipidice cu rol de nanotransportori lipidici antioxidanți pe bază de uleiuri naturale bio-actives de tipul uleiului din sămburi de strugri sau a uleiului de squalenă izolat din ficatul de rechin, nu se regăsește în literatură, deși folosirea unor compuși naturali poate eficientiza un proces de sinteză atât în ceea ce privește costul de producție cât și prin îmbunătățirea proprietăților produsului final. Câteva articole de specialitate au menționat și demonstrat proprietățile biologice, farmacologice și terapeutice ale uleiului din seminte de struguri. Aceste uleiuri de origine vegetală îmbunătățesc sănătatea cardiovasculară, manifestă proprietăți împotriva radicalilor liberi și a stresului oxidativ, inhibă creșterea și formarea anumitor tipuri de cancer, îmbunătățesc performanțele vizuale, reduc simptomele ulcerului gastric și protejează celulele împotriva consumului excesiv de medicamente (Jayaprakasha et al 2003, Yilmaz et al 2004, Leifert et al 2008). Squalena posedă activitate antioxidantă și s-a dovedit a fi un bun agent de prevenire în apariția cancerului (Reddy et al 2009).

II. Problema tehnică pe care o rezolvă procedeul conform invenției constă în obținerea unor nanoparticule lipidice cu proprietăți antioxidante amplificate și activitate antimicrobiană semnificativă. Procedeul de obținere a nanoparticulelor lipidice pe bază de uleiuri naturale conform invenției cuprinde:

- a) formarea unei faze lipidice libere, ce conține un amestec de lipide solide și lipide lichide naturale de monostearat de gliceril : palmitat de cetil : ulei din sămburi de strugure sau ulei de squalena, într-un raport de greutate = 1,16 : 1,16 : 1, la o temperatură de 85°C, respectiv formarea unei faze lipidice îmbogățită cu concentrații cuprinse între 0,05 + 0,20% componenta activă de natură hidrofobă (β -caroten);
- b) formarea unei faze apoase ce conține un amestec de surfactanți într-un raport de greutate derivat monoalchil-polioxietilensorbitan : lecitina : copolimer polietilenglicol-polipropilenglicol = 1 : 0,25 : 0,25 și la o temperatură de 85°C, care ulterior este supusă unei omogenizări cu grad înalt de forfecare, la 25 000 rpm, timp de 2 min.

- c) formarea unei pre-emulsii lipidice – precursorare de nanoparticule lipidice solide – prin contactarea sub agitare magnetica a celor doua faze, apoasa și lipidică, si mentinere la un regim de temperatura constant de 85°C timp de 2h;
- d) formarea unor dispersii apoase de nanotransportori lipidici incarcati cu β-caroten, prin supunerea pre-emulsiei lipidice la o energie mecanica externa – aplicand o omogenizare cu grad inalt de forfecare de 25 000 rpm, timp de 10 min, urmata de racirea usoara, sub agitare magnetica, la temperatura camerei.
- e) obtinerea de nanotransportori lipidici in forma solida prin supunerea nanodispersiilor apoase unei etape de liofilizare la -55°C timp de 72h.

Nanotransportorii lipidici incarcati cu β-caroten obtinuti pe baza de lipide lichide naturale cuprind:

1. 22,13 + 21,82% ulei din samburi de struguri sau ulei de squalenă dintr-o matrice inalt dezordonata formata prin utilizarea unui amestec complex de lipide biocompatibile si naturale ce imprima un caracter antioxidant specific intregului transportor lipidic;
2. 0,37 + 1,47% substanta activa (β-caroten) incapsulata in reseaua lipidica astfel formata, procentele fiind exprimate in greutate.

III. Inventia prezinta urmatoarele avantaje:

- Asigura incapsularea unor componentii puternic hidrofobi (ex: β-caroten) in particule sferice de dimensiune nanometrica, folosind materii prime bio-compatibile, concentratii de surfactant/co-surfactant in concentratii minime (<3.5%) si fara utilizarea unor substante agresive (ex: solventi organici sau surfactanti periculosi).
- Procedul de incapsulare a β-carotenului in astfel de nanomatrici lipidice pe baza de uleiuri naturale se desfasoara in mediu apos, nu utilizeaza conditii de proces care sa conducă la denaturarea principiului bio-activ, nu afecteaza integritatea structurala a acestuia, ci mai mult ii intensifica proprietatile.
- Procedul propus evita utilizarea unor etape de ultrasonare (cum apare deseori in literatura de specialitate) prin introducerea unei etape de omogenizare cu grad inalt de forfecare pe un interval scurt de timp (2 min), ce are ca scop principal distrugerea lipozomilor multilamelari de dimensiuni mai mari de 1μm ce se formeaza preponderent prin utilizarea lecitinei in faza apoasa.
- Foloseste uleiuri naturale, necostisitoare care manifesta un dublu rol:
 - a. participa la formarea de matrici lipidice eficiente ce pot fi utilizate ca transportori ai unor concentratii semnificative de principiu bio-activ de natura hidrofoba;
 - b. protejeaza, prin virtutea proprietatilor sale antioxidante, compusii chimici sensibili la oxidare, cum este cazul β-carotenului;

- c. vine cu proprietati biologice specifice și ca atare un important potențial terapeutic de natura sa imbunatateasca sanatatea publica, in completare la cele ale principiului bio-activ selectat pentru încapsulare.
- Prin acest procedeu se formeaza o retea lipidica inalt dezordonata, fapt ce conduce la încapsularea unor concentratii net superioare de substanta bio-activa, datorita imperfectiunilor/golurilor create prin utilizarea unor lipide cu structuri chimice diferite.
 - Procedeu propus este simplu și eficient, implică etape distincte și ușor de reprodus, asigurând același nivel de control și prin transpunerea la scară pilot.
 - Procedeu constituie o metodă optimă pentru obținerea unor nanotransportori lipidici pe bază de ulei din sâmburi de struguri sau ulei de squalenă ce manifestă proprietăți antioxidante și antibacteriene amplificate.
 - Particulele lipidice îmbogățite cu β -caroten obținute prin procedeu propus pot fi utilizate sub ambele forme – ca dispersii apoase pentru dezvoltarea de alimente funcționale sau sub formă de produs solid pentru dezvoltarea unor formulari farmaceutice ce prezintă proprietăți specifice.

IV. Procedeu conform invenției constă în aceea că se formează initial o pre-emulsie lipidica ce conține 10% amestec lipidic și 3 + 3,5% amestec de surfactanți, la o temperatură de 85°C, prin contactarea sub agitare magnetica a două faze, o fază lipidică ce conține monostearat de gliceril : palmitat de cetil : ulei din samburi de strugure sau ulei de squalena într-un raport de greutate = 1,16 : 1,16 : 1 si o fază apoasă ce contine derivat monoalchil-polioxietylensorbitan : lecitina : copolimer polietilenglicol-polipropilenglicol intr-un raport de greutate = 1 : 0,25 : 0,25, cu mentiunea ca faza apoasa a fost supusa inainte de contactare unei omogenizari cu grad inalt de forfecare, la 15 000 rpm, timp de 2 min; pre-emulsia formata este mentinuta la un regim de temperatura constant de 85°C, timp de 2h, dupa care este supusa unei energii mecanice externe prin aplicarea unei omogenizari cu grad inalt de forfecare de 25 000 rpm, timp de 10 min, urmata de racirea usoara, sub agitare magnetica, la temperatura camerei si ulterior supunerea la un proces de liofilizare la - 55°C timp de 72h, conduce la obținerea de nanoparticule lipidice stabile din punct de vedere fizic, cu diametre medii de ordinul zecilor de nm și valori ale potențialului electrocinetic puternic electronegative, ce manifestă proprietăți antioxidante și antibacteriene amplificate.

În cazul prezentei invenției, pentru observarea efectului si tipului de matrice lipidica asupra obtinerii unor nanoparticule lipidice ce manifesta activitate antioxidanta, respectiv pentru analiza gradului de incarcare a acestora cu β -caroten, s-au utilizat două tipuri de matrici:

a. Nanomatrici lipidice libere (fara continut de component activ), formate prin combinarea a doua lipide solide bio-compatibile (palmitat de cetil si monostearat de gliceril), cu un amestec de

ulei vegetal complex (ulei din samburi de strugure), respectiv un ulei izolat din ficat de rechin (squalena).

b. Nanomatrici lipidice imbogatite cu concentrații variabile de componenta hidrofoba bio-activa (β -caroten), formate prin combinarea acelorasi lipide solide bio-compatibile cu lipidele lichide naturale, acestea jucand rolul de transportor lipidic nanostructurat (NLC) pentru β -caroten.

Etapele de obtinere a nanomatricii lipidice imbogatita cu o componenta hidrofoba bio-activa, sunt:

- formarea unei topituri lipidice, prin utilizarea de lipide solide și lichide diferite structural (monostearat de gliceril, palmitat de cetil și ulei din samburi de struguri sau ulei de squalena);
- adăugarea în topitura lipidica a unor concentratii cuprinse între 0,05 ÷ 0,20% β -caroten.

V. Se dau în continuare trei exemple de realizare a procedurii conform invenției, în legătură cu tabelul și figurile care reprezintă:

Tabelul 1 – Compoziția și caracterizarea fizico-chimică a probelor de β -caroten – NLCs

Figura 1 – Distribuția dimensiunii particulelor lipidice de tip β -caroten - NLC preparate cu diferite tipuri de surfactanți și concentrații de β -caroten

Figura 2 – Evaluarea stabilității probelor de β -caroten – NLCs pe baza potențialului electrocinetic

Figura 3 – Microscopia electronica de transmisie pentru probele de β -caroten – NLCs preparate cu ulei din sâmburi de struguri (stânga) și ulei de squalena (dreapta)

Figura 4 – Curbele DSC pentru β -caroten – NLCs, în comparație cu NLCs libere și amestecul fizic de lipide: a. NLCs preparate cu squalena, b. și c. NLCs preparate cu ulei din samburi de strugure

Figura 5 – Spectrele de absorbtie UV-Vis a β -caroten – NLCs preparate cu squalena (A) și ulei din samburi de strugure (B), cu ambele tipuri de surfactanti și o concentrație inițială de 0,20% β -caroten: (a) caroten pur; (b) NLC liber; (c) β -caroten – NLCs

Figura 6 – Determinarea *in vitro* a proprietatilor antioxidante, a probelor de β -caroten – NLCs, funcție de concentrația de caroten, tipul de ulei natural folosit și surfactant neionic principal: a. NLCs preparate cu ulei de squalena; b. NLCs preparate cu ulei din samburi de strugure

Figura 7 – Activitatea antibacteriană manifestata de probele de β -caroten – NLCs determinata împotriva creșterii bacteriei de *E. Coli*.

Exemplul 1. Se formează o fază lipidică prin topirea la o temperatura de 82...85°C a unui amestec de monostearat de gliceril : palmitat de cetil : ulei din samburi de strugure sau ulei de squalena, intr-un raport de greutate de 1,16 : 1,16 : 1. Separat, se formează o faza apoasă compusă dintr-un amestec de surfactanți neionic și ionic și un co-surfactant, intr-un raport de greutate derivat monoalchil-polioxietilensorbitan : lecitina : copolimer polietilenglicol-polipropilenglicol de 1 : 0,25 : 0,25 și la o temperatură de 85°C. Cele două faze apoasă și lipidică

se mențin ½ h la un regim de temperatură de 82...85°C, după care faza apoasă se supune unui proces de omogenizare cu grad înalt de forfecare, la 15 000 rpm, timp de 2 min. Se formează o pre-emulsie lipidică prin contactarea celor două faze, sub agitare magnetică și la o temperatură de 82...85°C, după care se menține la regim de temperatura constant, timp de 2h. Pre-emulsia fierbinte rezultată se supune ulterior unei energii mecanice externe prin omogenizare cu grad înalt de forfecare, aplicând 25 000 rpm timp de 10 minute, după care se lasă să se răcească lent la temperatura camerei cu formarea unei dispersii de nanoparticule lipidice libere – NLCs (fără conținut de componentă activă). Pentru eliminarea excesului de apă și obținerea nanoparticulelor lipidice în formă solidă, dispersiile de NLCs sunt inițial congelate la -25 °C timp de 24 ore, după care se supun unui proces de liofilizare -55 °C, pentru o perioadă de 72 ore.

Exemplul 2. Similar exemplului 1, cu deosebirea că se adaugă în faza lipidică încălzită la 85°C diferite cantități de β-caroten, ce corespund unor concentrații de 0.05 + 0,20% în dispersia de NLC obținută conform procedurii descris anterior, cu formarea unei soluții limpede de topitură lipidică. Topitura lipidică se menține la 85°C timp de 5 min. pentru a se asigura o bună dispersare a componentei active, după care are loc contactarea celor două faze, apoasă și lipidică. Etapele ulterioare corespund celor descrise în cadrul exemplului 1, cu obținerea unor dispersii de nanoparticule lipidice încărcate cu β-caroten pe bază de ulei din sămburi de strugure și în final a nanoparticulelor lipidice în formă solidă. Compoziția fiecărei formulări de NLC este prezentată în Tabelul 1.

Exemplul 3. Similar exemplului 2, cu deosebirea că uleiul natural de origine vegetală este înlocuit cu un ulei de origine animală (ulei din ficatul de rechin - squalena), cu obținerea unor dispersii de nanoparticule lipidice încărcate cu β-caroten pe bază de ulei de squalenă și în final a nanoparticulelor lipidice în formă solidă.

Distribuția mărimii și stabilitatea fizică a nanoparticulelor lipidice încărcate cu β-caroten. Evaluarea distribuției dimensiunii nanoparticulelor lipidice și stabilitatea acestora s-a realizat în sistemele optimizate de tip Tween 20 sau 80/lecitină/copolimer bloc, funcție de concentrațiile de β-caroten încapsulate și tipul de ulei natural folosit la formarea matricei lipidice. Rezultatele obținute au semnalat faptul că nanoparticulele lipidice încărcate cu diferite concentrații de β-caroten (β-caroten – NLCs) prezintă o distribuție de dimensiune relativ îngustă (figura 1) și o stabilitate excelentă a particulelor lipidice aflate în suspensie apoasă, reflectată prin valorile potențialului electrokinetic (figura 2). Figura 1 exemplifică distribuția dimensiunii particulelor a câtorva nanodispersii de β-caroten – NLCs preparate cu ulei din sămburi de struguri (GSO) și respectiv ulei de squalenă (Sq), iar în tabelul 1 sunt prezentate caracteristicile tuturor probelor de

NLC încărcate cu componenta activă. În general, uleiul din semințe de struguri duce la nanoparticule lipidice mai mici, comparativ cu cele preparate prin utilizarea Sq. Rezultatele obținute în urma analizei DLS au evidențiat prezența unor distribuții monomodale a dimensiunii particulelor pentru majoritatea probelor de β -caroten NLCs, cu diametre medii în jurul valorii de o sută de nanometri (figura 2).

În cazul folosirii amestecului de surfactanți ce utilizează Tween 20 drept surfactant neionic principal, pentru ambele tipuri de uleiuri naturale nu au existat diferențe semnificative între diametrele medii ale nanoparticulelor lipide, comparativ cu sistemul Tween 80/Lecitină/copolimer bolc care au arătat o ușoară creștere a Z_{av} pe măsură ce concentrația de β -caroten a crescut de la 0.05 la 0.20%. Cele mai mici nanoparticule lipidice au fost obținute pentru primul sistem și o concentrație inițială de 0,07% caroten ($Z_{av} = 85,2 \pm 1,677$ nm pentru GSO și $Z_{av} = 89,2 \pm 1,604$ nm pentru Sq), cu un indice de polidispersitate mai mic de 0,19, ceea ce indică prezența particulelor monodisperse. Analiza TEM (figura 3) confirmă prezența nanoparticulelor monodisperse obținute pe baza uleiului din sămburi de struguri. Probele de β -caroten – NLCs preparate cu Tween 80 ca surfactant neionic principal au prezentat diametre medii mai mari de 100 nm, cu valori ale indicelui de polidispersitate relativ ridicate (Pdl: $0,24 \div 0,33$ pentru cazul GSO și $0,21 \div 0,24$ pentru Sq). Nanodispersia preparată cu 0,20% caroten și ulei de squalenă a prezentat cea mai mare valoare a diametrului mediu, de 129,2 nm și o polidispersitate de 0,239.

Evaluarea stabilității sistemelor caroten – NLCs. Analiza stabilității nanodispersiilor lipidice, determinată pe baza valorilor potențialului electrocinetic, a relevat faptul că aproape toate probele de β -caroten – NLCs prezintă o stabilitate fizică excelentă, cu valori medii ale ξ mai electronegative de 30 mV (tabelul 1). În figura 2 este reprezentată distribuția valorilor potențialului zeta pentru câteva probe reprezentative.

În cazul probelor de β -caroten – NLCs preparate cu Sq nu au fost semnalate modificări distincte ale potențialelor zeta (valori ce se situează la ~ -40 mV, tabelul 1 și figura 2), în timp ce probele preparate cu ulei din sămburi de strugure prezintă o creștere a ξ pe măsură ce concentrația de β -caroten a crescut (ex: -39,8 mV pentru o concentrație de 0,05% și de -26,3 mV pentru o concentrație de 0,20%, în cazul în care s-a folosit sistemul Tween 20/Lecitină/Sinperonic F68; respectiv de -30,2 mV pentru o concentrație de 0,05% și -22,4 mV pentru o concentrație de 0,20%, caz în care a fost folosit sistemul Tween 80/Lecitina/Sinperonic F68), ceea ce evidențiază o scădere ușoară a stabilității fizice a sistemelor analizate. Cu toate acestea, valorile mai electronegative de -25 mV demonstrează faptul că aproape toate dispersiile NLCs obținute prin folosirea celor două uleiuri naturale și un procedeu modificat de omogenizare cu grad înalt de forfecare, sunt sisteme stabile din punct de vedere fizic.

Este de remarcat faptul că nu există o corelație directă între dimensiunea nanoparticulelor lipidice și proprietățile antioxidante ale probelor de β -caroten – NLCs, în timp ce dacă observăm stabilitatea fizică a dispersiilor preparate cu 0,20% caroten și GSO, valoarea a crescut de până la -22 mV (care sugerează o scădere moderată a stabilității în timp) ce ar putea fi asociată cu scăderea activității antioxidante până la 80% (figura 6). În plus, aceasta presupunere este de asemenea susținută de analiza comparativă prin calorimetrie de scanare diferențială, care a arătat că nanoparticulele preparate cu GSO și o concentrație de 0,20% caroten au suferit o rearanjare a rețelei lipidice, fapt ce a condus la o rețea mai ordonată și, ca rezultat, la o expulzare potențială a substanței active.

Caracterizarea morfologica. O imagine TEM reprezentativă a nanoparticulelor lipidice obținute plecând de la o concentrație de 0,07% β -caroten, în sistemul Tween 20/Lecitină/Sinperonic F68 și ambele tipuri de uleiuri naturale este prezentată în figura 3. Se poate observa că indiferent de tipul de ulei natural utilizat, particulele au o formă sferică, cu o dimensiune mai mică de 100 nm (figura 3). Acest ultim aspect subliniază o structura cristalină a fazei lipidice mai puțin ordonată (forma α de cristalizare), deoarece o structură ordonată (forma β) este caracteristică unor cristale de formă alungită. Prevenirea conformației β este de dorit, deoarece acesta este asociată cu expulzarea componentei active încapsulate. Această observație este de asemenea confirmată de analiza DSC.

Efectele tipului de ulei natural și a prezenței β -carotenului asupra cristalinității lipidelor. Beneficiile nanoparticulelor lipidice solide, cum ar fi de exemplu stabilitatea fizică și chimică a acestora, reies în principal pornind de la starea solidă a particulelor. După cristalizare, particulele pot suferi diferite tranziții polimorfe, care sunt în principal un rezultat al tipului de constituenți lipidici. Componentii matricei lipidice determina tipurile de modificări cristaline care se pot forma. Structura cristalină lipidică este în general corelată cu capacitatea de încărcare cu substanță activă și cu comportarea la eliberare a acesteia. Structurile lipidice amorse furnizează o capacitate de încărcare superioară față de structurile cristaline. Pe măsură ce nanoparticulele lipidice trec de la o stare solidă mai puțin ordonată la una ordonată, apare fenomenul nedorit de eliberare bruscă a componentei active, în detrimentul unei eliberări controlate a acesteia. Prin urmare, este esențială verificarea stării lipidice solide și a polimorfismului nanoparticulelor lipidice.

Evaluarea structurii cristaline a probelor de β -caroten – NLCs a fost realizată pe baza calorimetriei de scanare diferențială (DSC). Probele de NLCs încărcate cu β -caroten și preparate cu cele două tipuri de uleiuri naturale au prezentat un comportament endoterm similar (într-un domeniu de temperatură apropiat), ceea ce indică faptul că tipul de ulei natural nu a condus la modificări semnificative ale rețelei lipidice (figura 4). În intervalul 30 - 100 °C, s-a observat prezența

unui varf endoterm principal (la $54 \pm 60^\circ\text{C}$) și a unui umăr (la $62 \pm 64^\circ\text{C}$), primul fiind atribuit în principal lipidelor solide de palmitat de cetil și monostearat de gliceril, în timp ce umărul este rezultatul prezenței uleiului din sâmburi de struguri sau a uleiului de squalenă. Curba endotermă la temperaturi $<65^\circ\text{C}$ sugerează prezența unor faze cristaline lipidice diferite și mai puțin ordonate. Acest comportament era de așteptat, datorită amestecului de lipide complexe folosit la prepararea matricei transportor. Acest lucru reprezintă un avantaj, având în vedere că obținerea unei structuri cristaline ordonate este puțin probabilă ca urmare a numărului crescut de componente lipidice și heterogenității chimice a acestora.

Prin compararea curbelor DSC ale probelor de NLCs încărcate cu β -caroten, a NLCs libere și a amestecurilor fizice de lipide (figura 4), se pot face următoarele afirmații:

- Prezența agenților tensioactivi conferă rețelei lipidice un aranjament ordonat, după cum se poate observa prin îngustarea domeniului de topire în cazul probelor de NLCs comparativ cu amestecurile fizice de lipide solide și lichide.
- Temperaturile de topire ale probelor de NLCs încărcate cu caroten au fost deplasate cu $1-3^\circ\text{C}$ față de cele ale NLCs libere, ceea ce indică o perturbare a matricei lipidice și o ușoară creștere a dimensiunii particulelor. Mai mult decât atât, prin compararea NLCs încărcate cu cele libere, s-a observat că încorporarea β -carotenului în matricea lipidică solidă a condus la o scădere a aranjamentul cristalin, subliniată și de scăderea intensității picului endoterm.
- Deplasarea temperaturii completată de scăderea intensității picului endoterm este o indicație clară a efectului compusului activ asupra agregării fazei lipidice. Carotenul încapsulat, chiar și într-o concentrație foarte mică, poate afecta modul de cristalizare a rețelei lipidice. Efectul concentrațiilor de β -caroten încapsulat în nanoparticulele lipidice asupra cristalinității fazei lipidice este prezentat în figura 4b. Pe măsură ce concentrația de caroten crește de la 0,05% la 0,07%, curbele DSC adopta un aranjament cristalin mai puțin ordonat. Cu toate acestea, trebuie remarcat faptul că un comportament diferit a fost observat pentru NLCs încărcate cu 0,20% β -caroten, preparate cu ulei din sâmburi de struguri și Tween 80 ca surfactant principal (caroten – NLC 6). Creșterea intensității picului endoterm localizat la $56,7^\circ\text{C}$ (figura 4c), comparativ cu NLC liber este o indicație a faptului că miezul lipidic a suferit o rearanjare a rețelei cristaline, ceea ce înseamnă că a avut loc o tranziție în matricea lipidică, de la o rețea mai puțin ordonată la una mai ordonată. Acest aspect a fost confirmat și de scăderea capacității antioxidante pentru aceste probe, ca urmare a unei potențiale expulzări a β -carotenului (figura 6).

Spectroscopia UV-VIS. β -carotenul este un pigment care absoarbe puternic în regiunea vizibil (400-500 nm). Drept urmare înregistrarea spectrelor UV-VIS reprezintă o dovadă clară a

prezenței β -carotenului în nanoparticulele lipidice preparate cu cele două uleiuri naturale. Stabilitatea β -carotenului este o condiție esențială în vederea menținerii proprietăților sale.

Stabilitatea β -carotenului la oxidare depinde de forma sa și poate fi crescută prin încapsulare. Pentru observarea prezenței acestuia precum și a stabilității lui după încapsulare au fost comparate spectrele UV-Vis ale probelor de β -caroten – NLCs, NLC-libere precum și ale carotenului pur. β -carotenul nativ prezintă două picuri majore la 464 nm și 492 nm responsabile pentru culoarea lui portocaliu-roșiatică, în timp ce NLC liber-prezintă numai picuri de absorbție în domeniul NIR, caracteristice grupărilor OH libere și asociate din amestecurile lipidice și de surfactanți (figura 5). Prin investigarea spectrelor de absorbție UV-VIS în intervalul 350 + 550 nm a probelor de β -caroten – NLCs se poate observa că în ambele tipuri de NLC preparate cu Sq sau GSO, absorbțiile sunt în general similare și prezintă două domenii de absorbție. În primul domeniu de absorbție, picurile specifice carotenului pur sunt întâlnite în probele de β -caroten – NLCs sub forma unei benzi puternice largi, situate între 450 + 500 nm. În cel de-al doilea domeniu de absorbție, apariția unui umăr situat la aproximativ 530 nm (care nu a fost observat în spectrul β -carotenului nativ), ar putea fi asociat structurii supramoleculare adoptate de caroten. Conform unor cercetări recente, există doi parametri majori care afectează spectrele UV-VIS (Auweter et al., 1999): dimensiunea particulelor și tipul de agregare a moleculelor supramoleculare de β -caroten. Datorită hidrofobicității sale ridicate, chiar și în mediu lipofil, doar o mică proporție de caroten rămâne în formă monomerică. Auweter și colab. au identificat două agregate într-un studiu realizat asupra nanoparticulelor de β -caroten, ca o consecință a dimensiunii diferite a particulelor: agregat-H, cu o dimensiune medie de 150 nm și agregat-J, cu o dimensiune medie de 250 nm. Aceste aspecte menționate în literatură sunt confirmate și de rezultatele analizelor DLS și UV-VIS realizate în acest studiu.

Apariția umărului la 530 nm, care a fost observată în toate probele de β -caroten – NLCs, este caracteristică unei absorbții a β -carotenului ce se află într-o stare de tip triplet - triplet (Dad et al., 2005). Mai mult, un studiu realizat de Hoang et al. asupra stabilității și structurii supramoleculare a β -carotenului, prin încapsulare în nanoparticule de acid polilactic, a demonstrat faptul că formarea unor compuși pro-oxidanți nedorți este redusă atunci când β -carotenul se află într-o stare de excitare triplet, care este caracterizată prin apariția unui pic de absorbție la 520 nm (Cao-Hoang, 2011). Această ultimă afirmație, cu privire la evitarea formării compușilor pro-oxidanți a fost de asemenea confirmată de rezultatele obținute în acest studiu, prin analiza chemiluminescenței.

Determinarea in vitro a activității antioxidante a β -caroten – NLCs. Efectele benefice ale β -carotenului asupra sănătății sunt recunoscute, însă mai puțin cunoscut este faptul că β -

carotenul are proprietăți antioxidante controversate, deoarece el poate acționa și ca un pro-oxidant din cauza sensibilității sale precare, ce are ca rezultat direct formarea produșilor de oxidare. Acest efect nefavorabil cu rezultate neașteptate, de exemplu, un risc mai mare de cancer pulmonar a fost dovedit de către Palozza și colab. (2003). Prin urmare, această parte de studiu are drept scop investigarea activității antioxidante a probelor de β-caroten – NLCs în funcție de concentrația de β-caroten și tipul de ulei natural folosit la formarea nanomatricei lipidice.

Evaluarea proprietăților antioxidante a probelor de β-caroten – NLCs a fost realizată prin metoda chemiluminescenței, care este o tehnică adecvată de măsurare a radicalilor liberi oxigenați. În scop comparativ, probele de NLCs încărcate cu b-caroten, soluțiile de caroten nativ precum și NLCs liberi au fost expuse la un sistem generator de radicali liberi care eliberează radicali intermediari liberi cu un bogat conținut energetic.

În toate probele testate, activitatea antioxidantă (AA%) a β-caroten – NLCs a fost amplificată în comparație cu cea a carotenului pur (figura 6), cea mai mare diferență fiind observată la concentrații mici de β-caroten (3,4 μM). De exemplu, pornind de la o activitate antioxidantă slabă a soluției de 3,4 μM caroten nativ (AA = 29,1% ± 1.42), la o activitate antioxidantă moderată în cazul NLCs preparate cu ulei de squalenă (69% ± 3.43 pentru sistemul Tween 20/Lecitină/Sinperonic F 68, respectiv de 64,4% ± 0.37 pentru Tween 80/Lecitină/Sinperonic F 68), se ajunge la o capacitate de a capta radicalii liberi de 87,2% ± 0.21 și respectiv 92,8% ± 0,20 (figura 6), atunci când se utilizează uleiul din sămburi de struguri.

Prin creșterea concentrațiilor de b-caroten, s-a observat o intensificare a activității antioxidante a probelor de β-caroten – NLCs pentru ambele tipuri de uleiuri naturale și amestecuri de surfactanți. NLC-urile obținute au capacitatea de a capta între 64 + 82% radicalii liberi oxigenați formați în sistemul de chemiluminescență (pentru probele de β-caroten-NLCs obținute cu ulei de squalenă) și respectiv între 87 + 95% (în cazul probelor de β-caroten – NLCs preparate cu ulei din sămburi de struguri). Există o excepție în cazul uleiului din sămburi de struguri, unde la o concentrație maximă de 15 μM caroten încapsulat are loc o scădere a capacității AA%. La această concentrație, probele de β-caroten – NLCs au prezentat cele mai mici valori ale activității antioxidante (82,4% ± 0.38 pentru amestecul tensioactiv prima și 80,3% ± 0.33 pentru a doua). Așa cum a fost observat anterior, această scădere a AA% poate fi rezultatul unei expulzări a β-carotenului datorate unei rearanjări în timp a rețelei lipidice, respectiv formării unei rețele mai ordonate.

Există doar o mica diferență între AA% a probelor de β-caroten – NLCs preparate cu cele două tipuri de amestec de surfactanți (valabilă pentru ambele uleiuri naturale). Deasemenea nu a existat o diferență semnificativă în activitatea antioxidantă a probelor de β-caroten – NLCs preparate cu ulei din sămburi de struguri ce conțin între 3,4 + 7.5 μM caroten. Cu toate acestea,

capacitatea de a capta radicalii liberi este mai mare în cazul uleiului din sămburi de struguri decât în cazul folosirii uleiului de squalenă. Valorile mai mici ale AA% întâlnite în cazul utilizării Sq, comparativ cu GSO, ar putea fi rezultatul unei activități antioxidante proprii GSO, dar și unui aranjament mai bun al carotenului în matricea lipidică formată cu GSO decât cu Sq, fiind posibilă apariția unui efect de împiedicare sterică datorită faptului că Sq este o triterpenă cu lanț lung.

Nanoparticulele lipidice preparate cu GSO și Tween 80 ca agent tensioactiv principal au prezentat cea mai mare activitate antioxidantă împotriva radicalilor liberi oxigenați, prezentând o amplificare cu 35% pentru probele cu 5,4 μM caroten ($\text{AA} = 93\% \pm 0.86$, comparativ cu 60 ± 0.33 pentru carotenul nativ) și cu 30% pentru 7,5 μM caroten ($\text{AA}\% = 94.6 \pm 0.27$, comparativ cu 67 ± 0.49 pentru carotenul nativ).

O prima explicație pentru comportamentul antioxidant manifestat de probele de β -caroten - NLCs a fost inițial asociată dimensiunii și efectului de încapsulare a carotenului, dar având în vedere proprietățile antioxidante cunoscute ale celor două uleiuri naturale selectate, activitatea antioxidantă a NLCs libere trebuie să fie, de asemenea, luată în considerare. Astfel, a fost determinată AA% și pentru probele de nanoparticule lipidice neîncărcate cu substanță activă: $\text{AA}\% = 67.3 \pm 2.06$ și 63.8 ± 1.63 (pentru NLC-libere preparate cu Sq și Tween 20, respectiv Tween 80); $\text{AA}\% = 76.9 \pm 2.63$ și 73.7 ± 0.62 (pentru NLC preparate cu GSO și ambele sisteme de agenți tensioactivi). Valorile relativ ridicate ale activității antioxidante manifestate de NLCs-libere pot fi asociate cu ideea că ambele tipuri de nanomatrici lipidice au potențialul de a capta radicalii liberi oxigenați și de a dezvolta o acțiune de blocare a reacțiilor în lanț. Această ultimă afirmație este susținută și de literatura de specialitate care menționează faptul că un acid gras saturat, cum ar fi acidul palmitic prezintă o activitate antioxidantă scăzută, cu o reducere a speciilor de radicali liberi de 15,2% (Nieman et al, 1995).

Având în vedere toate aceste aspecte, capacitatea antioxidantă a probelor de β -caroten - NLCs poate fi asociată unui efect combinat:

- Efectul dimensiunii β -carotenului încapsulat, în combinație cu folosirea unor uleiuri naturale antioxidante care împiedică oxidarea acestuia;
- Performanța matricei lipidice complexe, ceea ce înseamnă apariția unui efect sinergic între componentele lipidice. Acizii grași din uleiul din sămburi de struguri poate acționa în sinergie, afectând astfel activitatea antioxidantă totală a NLCs obținute. Capacitatea de a capta radicalii liberi a compușilor din GSE este mai mare decât cea a altor antioxidanți individuali, deoarece există multe grupări disponibile pentru a neutraliza radicalii liberi.

Oricare ar fi factorul-cheie care duce la efectul de amplificare a activității antioxidante, cel mai important aspect rămâne capacitatea ridicată a probelor de β -caroten - NLCs pe bază de ulei

din sâmburi de strugure de a capta peste 93% din radicalii liberi formați în sistemul de chemiluminescenta.

Activitatea antimicrobiana. Uleiurile naturale pot reprezenta o sursă bogată de agenți antimicrobieni. Astfel, probele de β -caroten – NLCs au fost testate pentru capacitatea lor de a dezvolta activitate antimicrobiană împotriva unei bacterii de *Escherichia coli*, care reprezintă un indicator de contaminare a produselor alimentare. Toate probele de caroten – NLCs testate au fost rezistente la bacteria *E. Coli*. Mai mult decât atât, în unele cazuri acestea dezvoltă o zonă de inhibiție eficientă împotriva creșterii bacteriene.

Investigațiile realizate au arătat o variație semnificativă în activitatea antibacteriană a β -caroten – NLCs care variază, în principal, funcție de uleiul natural utilizat și concentrația de β -caroten. Probele de β -caroten – NLCs preparate cu ulei din semințe de struguri au prezentat o activitate antibacteriană mai bună împotriva bacteriei testate, în ceea ce privește zona de inhibiție, în comparație cu cele pe bază de squalenă (figura 7), demonstrând astfel că plantele sunt agenți antibacterieni mai buni decât alți compuși sintetici.

Printre probele de β -caroten – NLCs preparate cu ulei din sâmburi de struguri, sistemul de surfactanți Tween 20/Lecitină/F 68 a prezentat cea mai bună activitate antibacteriană, inhibând tulpina de *E. Coli* la o concentrație de 0,50 mM caroten (5 mm rază medie de inhibiție), urmată de NLC care conține 1 mM caroten (cu o rază de inhibare de 4 mm). Scăderea activității antimicrobiene pentru probe preparate cu 1 mM caroten și ulei de struguri este justificată de asemenea prin pierderea de β -caroten confirmată în analizele anterioare.

Probele de β -caroten – NLCs preparate în sistemul Tween 80/Lecithin/F 68 pe bază de ulei de struguri și o concentrație de 0.50 mM caroten prezintă deasemenea o activitate antibacteriană semnificativă, cu o zonă de inhibare de 4 mm. O activitate moderată față de dezvoltarea bacteriei a fost găsită pentru NLC încărcate cu 0,35 mM și 1 mM caroten, cu o rază de inhibare de 3 mm. În cazul sistemelor de NLCs preparate pe bază de squalena, doar o concentrație de 1 mM caroten conduce la obținerea unei activități antibacteriene semnificative. Raza de inhibiție în aceste cazuri a fost de 5 mm în cazul utilizării sistemului de surfactanți Tween 80/Lecitină/ Sinperonic F68 și 4 mm pentru NLC preparate cu Tween 20 ca surfactant neionic principal. O concentrație mai mică de caroten nu a demonstrat o îmbunătățire a activității antibacteriene (figura 7).

Nanotransportorii lipidici încărcăți cu β -caroten obținuți prin procedeul propus pot fi utilizați la prepararea de formulări farmaceutice pentru prevenirea patologiei vasculare în virtutea capacității acestora de a capta până la 94% din radicalii liberi oxigenați formați în urma unor reacții de degradare.

Revendicări

1. Procedeu de obținere a unor nanoparticule lipidice antioxidante pe bază de uleiuri naturale, libere și îmbogățite cu component bio-activ, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde:
 - a. formarea unei pre-emulsii lipidice libere și îmbogățite cu componentă activă hidrofobă (β -caroten), obținute prin contactarea, sub agitare magnetica, a unei faze apoase și a unei faze lipidice, la o temperatura de 82...85°C, și menținere la regim de temperatura constantă, timp de 2h;
 - b. obținerea unor dispersii apoase de nanotransportori lipidici liberi și încarcati cu β -caroten, prin supunerea pre-emulsiei lipidice unui proces de omogenizare cu grad înalt de forfecare, la 25 000 rpm, timp de 10 min., urmata de racirea usoara, sub agitare magnetica, la temperatura camerei;
 - c. obținerea de nanotransportori lipidici în forma solida prin supunerea nanodispersiilor apoase unui proces de liofilizare, la -55°C timp de 72h.
2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, faza lipidica este formată dintr-un amestec de lipide solide și lichide naturale de monostearat de gliceril : palmitat de cetil : ulei din samburi de strugure, într-un raport de greutate de 1,16 : 1,16 : 1, la o temperatura de 82...85°C.
3. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că**, în loc de uleiul din sâmburi de struguri se folosește ulei de squalena.
4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, faza apoasă este formată dintr-un amestec de surfactanți neionic și ionic și un co-surfactant, într-un raport de greutate derivat monoalchil-polioxiethylensorbitan : lecitina : copolimer polietilenglicol-polipropilenglicol de 1 : 0,25 : 0,25 și la o temperatura de 85°C.
5. Procedeu conform oricăreia dintre revendicările 1 și 4, **caracterizat prin aceea că** înainte de contactare cu faza lipidică, faza apoasă se supune unui proces de omogenizare cu grad înalt de forfecare, la 25 000 rpm, timp de 2 min.
6. Procedeu conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 5, **caracterizat prin aceea că**, pre-emulsia lipidică conține 10% amestec lipidic, 3 ÷ 3.5% amestec de surfactanți și 0 ÷ 0.20% componentă activă de natura hidrofoba (β -caroten).
7. Nanoparticule lipidice încarcate cu β -caroten obtinute pe baza de uleiuri naturale și având proprietăți antioxidante și antibacteriene, obținute prin procedeul definit în oricare din revendicările de la 1 la 6, **caracterizate prin aceea că**, cuprind:

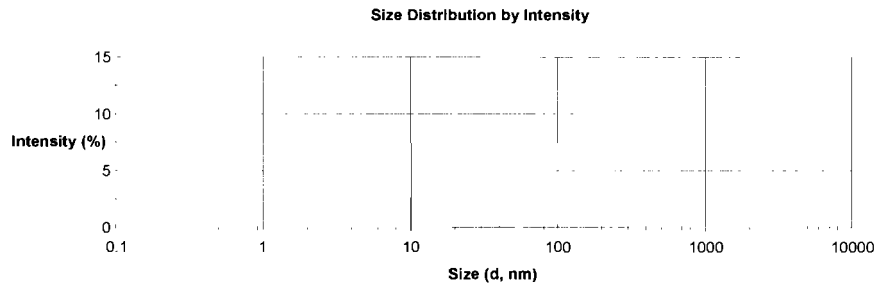
- a. $22,13 \pm 21,82\%$ ulei din samburi de struguri sau ulei de squalenă dintr-o matrice inalt dezordonata formata prin utilizarea unui amestec complex de lipide solide și lichide;
 - b. $0,37 \pm 1,47\%$ β -caroten încapsulat în rețeaua lipidică astfel formată, procentele fiind exprimate in greutate.
8. Nanoparticule lipidice conform revendicării 7 obținute prin procedeul definit în oricare din revendicările de la 1 la 6 **caracterizate prin aceea că** sunt de formă sferică și au un diametru mediu cuprins între $85,2 \pm 117,2$ nm, în cazul utilizării uleiului din sâmburi de struguri și între $89,2 \pm 129,2$ nm în cazul utilizării uleiului de squalenă.
 9. Nanoparticule lipidice conform revendicărilor 7 și 8 obținute prin procedeul definit în oricare din revendicările de la 1 la 6 **caracterizate prin aceea că** prezintă o polidispersitate ce variază între $0,184 \pm 0,335$, în cazul utilizării uleiului din sâmburi de struguri și între $0,180 \pm 0,237$ în cazul utilizării uleiului de squalenă.
 10. Nanoparticule lipidice conform revendicării 7 obținute prin procedeul definit în oricare din revendicările de la 1 la 6 **caracterizate prin aceea că** prezintă valori ale potențialului electrocinetic ce variază între $-22,4 \pm -39,8$ mV, în cazul utilizării uleiului din sâmburi de struguri și între $-36,8 \pm -41,0$ în cazul utilizării uleiului de squalenă.
 11. Nanoparticule lipidice conform revendicării 7 obținute prin procedeul definit în oricare din revendicările de la 1 la 6 **caracterizate prin aceea că** au abilitatea de a capta între $64 \pm 82\%$ din radicalii liberi oxigenați formați in sistemul de chemiluminescență, în cazul utilizării uleiului din sâmburi de struguri și respectiv între $87 \pm 95\%$, în cazul utilizării uleiului de squalenă.

Lista tabelor și a figurilor

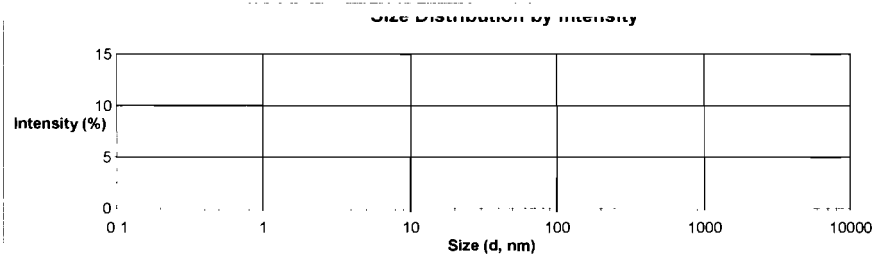
Tabel 1. Compoziția și caracterizarea fizico-chimică a caroten – NLCs

Proba*	Compoziția dispersiilor de NLC		Z_{av} [nm] \pm SDS	PDI \pm SDS	ξ [mV] \pm SDS
	Caroten, %	Surfactant principal			
Caroten – NLC 1	0.05	2.5% Tween 20	85.7 \pm 2.136	0.184 \pm 0.004	- 39.8 \pm 0.557
Caroten – NLC 2	0.07	2.5% Tween 20	85.2 \pm 1.677	0.190 \pm 0.017	- 37.6 \pm 0.368
Caroten – NLC 3	0.20	2.5% Tween 20	90.0 \pm 1.320	0.198 \pm 0.013	- 29.3 \pm 0.458
Caroten – NLC 4	0.05	2% Tween 80	108.4 \pm 3.119	0.238 \pm 0.009	-30.2 \pm 1.112
Caroten – NLC 5	0.07	2% Tween 80	111.0 \pm 3.751	0.245 \pm 0.010	-29.9 \pm 0.404
Caroten – NLC 6	0.20	2% Tween 80	117.2 \pm 2.818	0.335 \pm 0.041	-22.4 \pm 0.503
Caroten – NLC 7	0.05	2.5% Tween 20	94.0 \pm 0.404	0.180 \pm 0.090	- 40.4 \pm 0.520
Caroten – NLC 8	0.07	2.5% Tween 20	89.2 \pm 1.604	0.191 \pm 0.010	- 41.0 \pm 0.061
Caroten – NLC 9	0.20	2.5% Tween 20	100.3 \pm 1.601	0.224 \pm 0.013	- 36.8 \pm 0.208
Caroten – NLC 10	0.05	2% Tween 80	100.4 \pm 3.037	0.210 \pm 0.017	-37.5 \pm 1.300
Caroten – NLC 11	0.07	2% Tween 80	115.5 \pm 2.113	0.230 \pm 0.003	-39.2 \pm 0.529
Caroten – NLC 12	0.20	2% Tween 80	129.2 \pm 2.335	0.237 \pm 0.016	-40.5 \pm 0.850

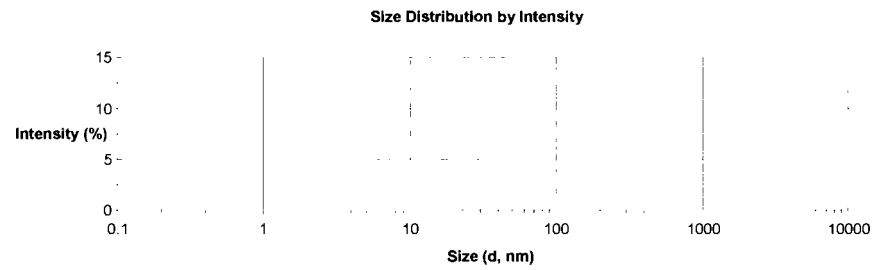
* probele caroten – NLC 1 + 6 sunt preparate cu ulei din sămburi de struguri, iar probele caroten – NLC 7 + 12 sunt preparate cu ulei de squalena.



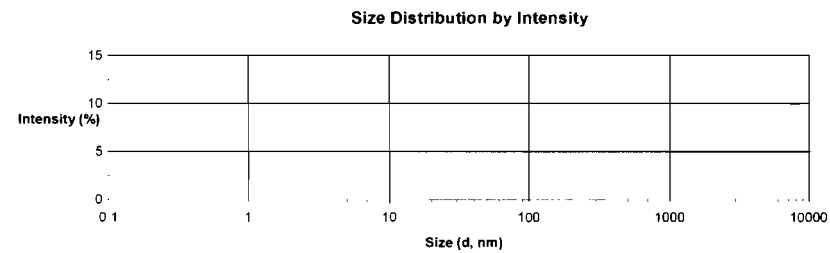
Record 2078: Carotene - NLC 1 Record 2079: Carotene - NLC 1
Record 2080: Carotene - NLC 1



Record 2081: Carotene - NLC 2 Record 2083: Carotene - NLC 2
Record 2082: Carotene - NLC 2



Record 1966: Carotene - NLC 7 Record 1968: Carotene - NLC 7
Record 1967: Carotene - NLC 7



Record 1996: Carotene - NLC 8 Record 1998: Carotene - NLC 8
Record 1997: Carotene - NLC 8

Figura 1

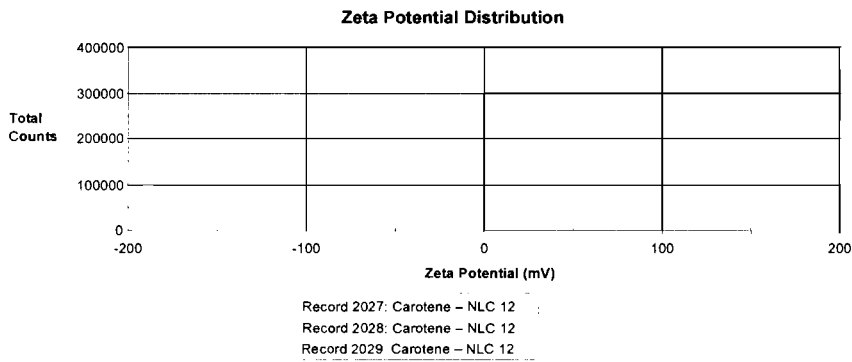
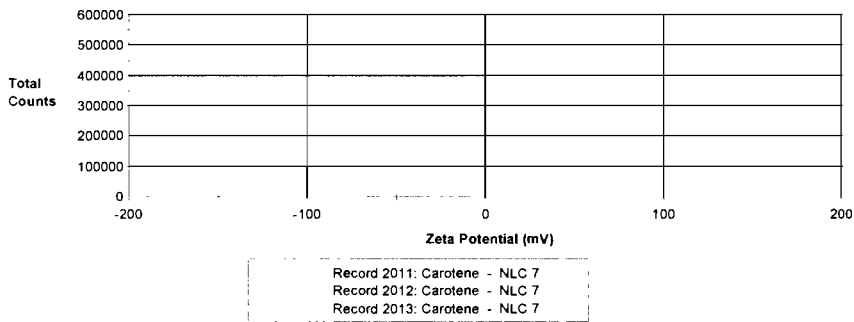
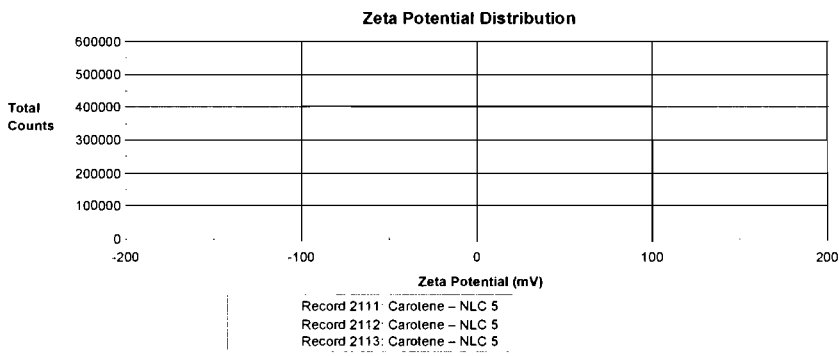
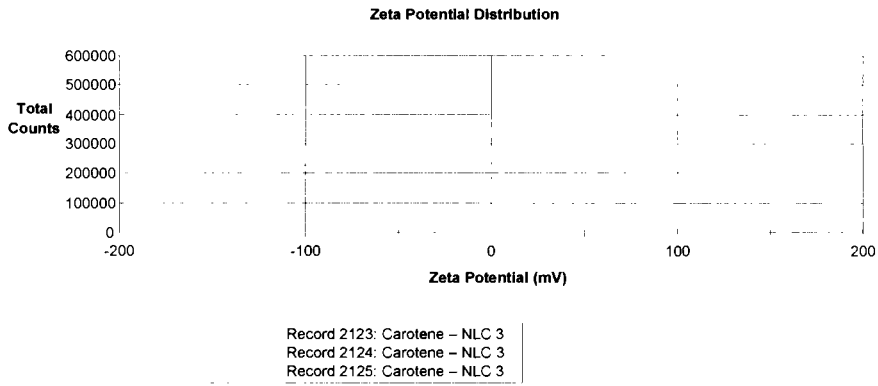


Figura 2

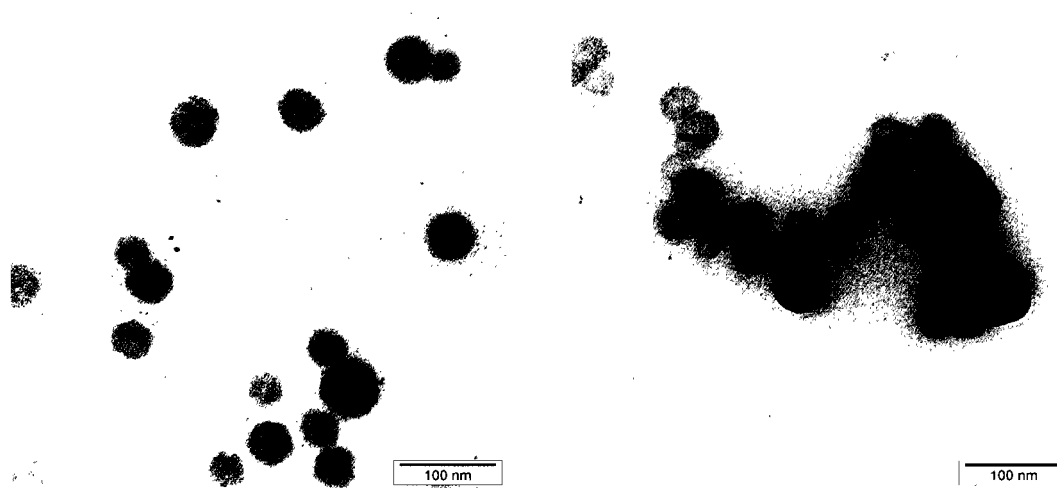


Figura 3

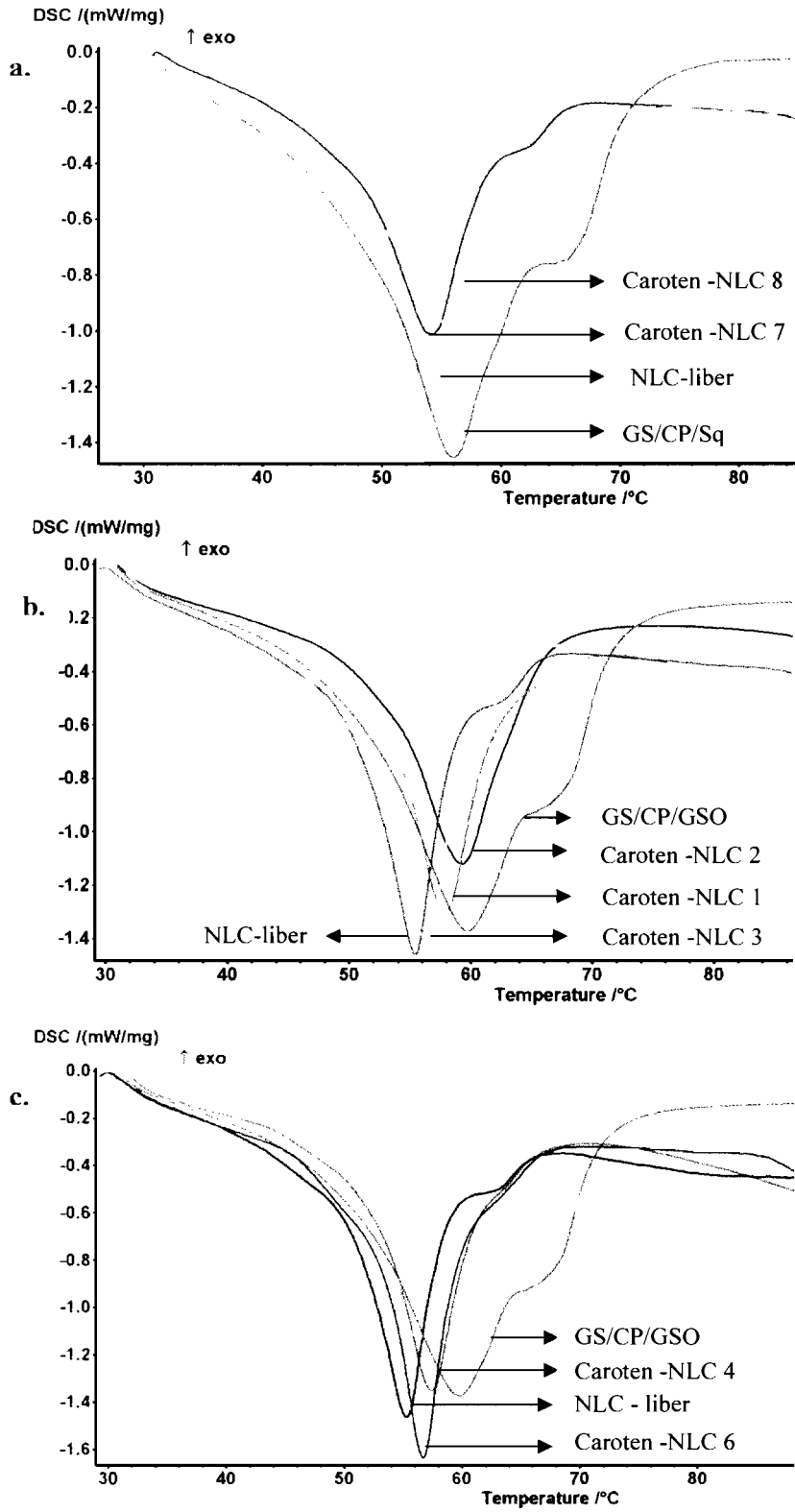


Figura 4

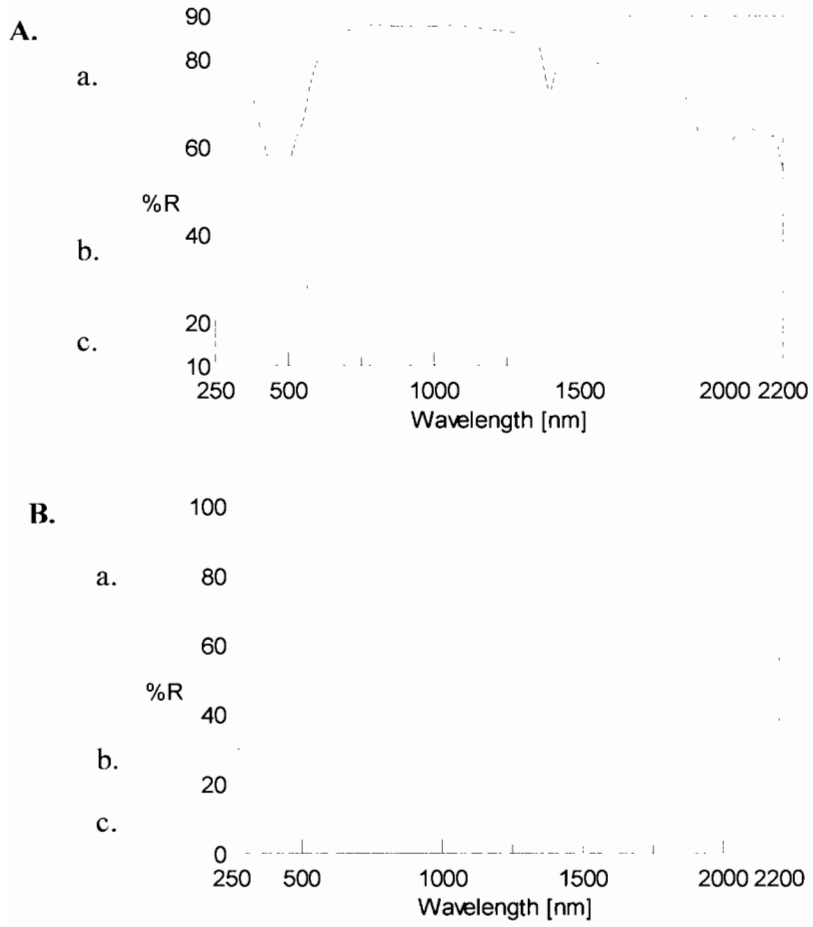


Figura 5

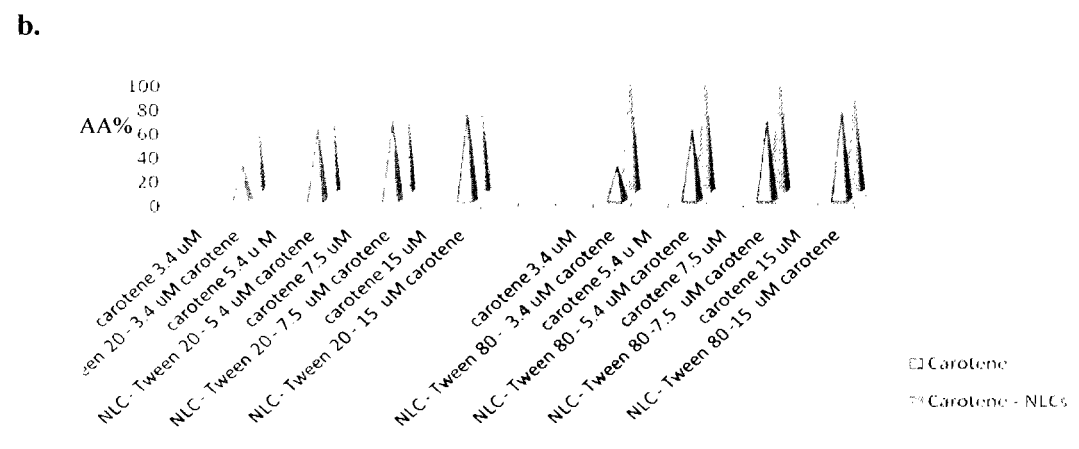
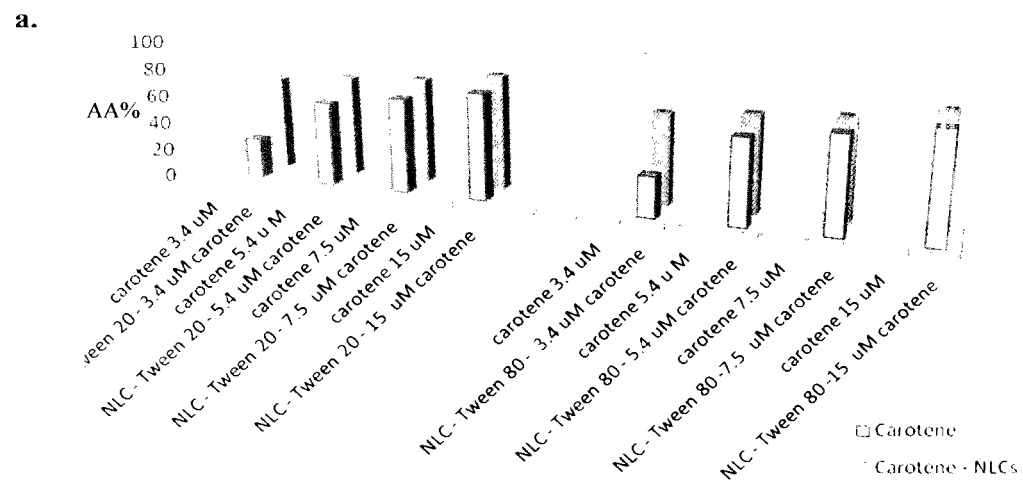
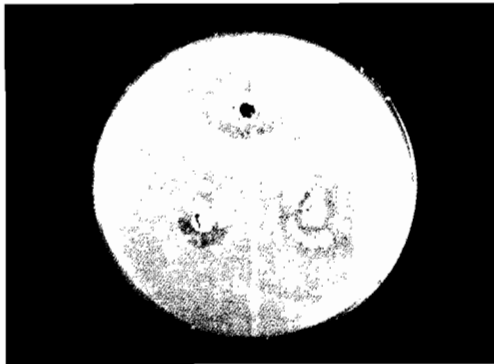
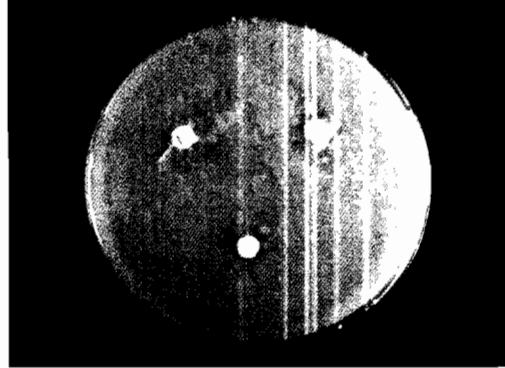


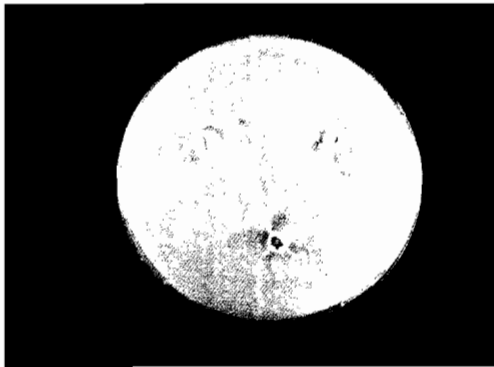
Figura 6



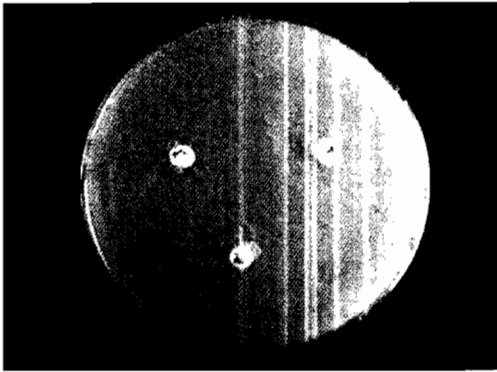
Caroten - NLC 2



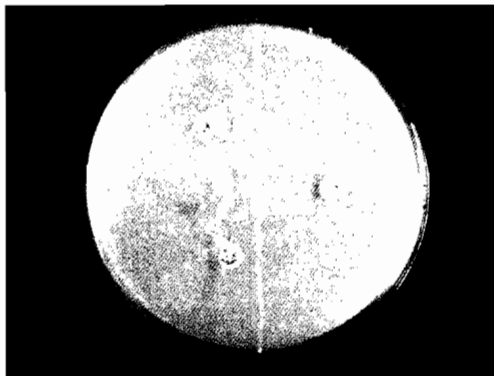
Caroten - NLC 3



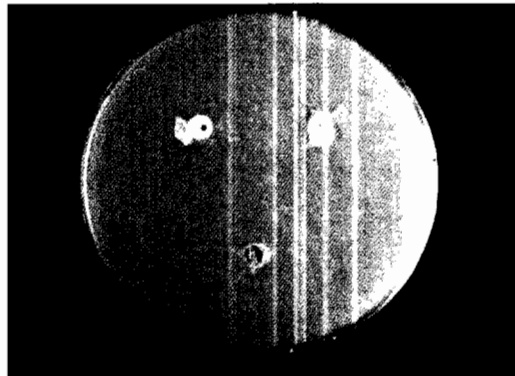
Caroten - NLC 4



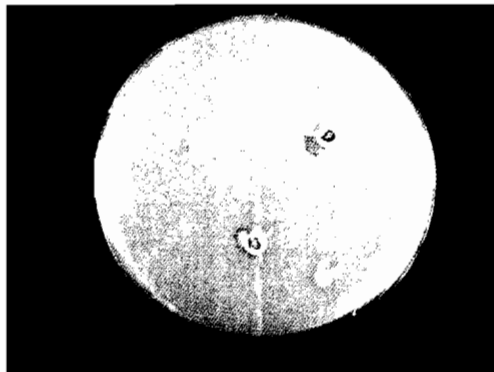
Caroten - NLC 5



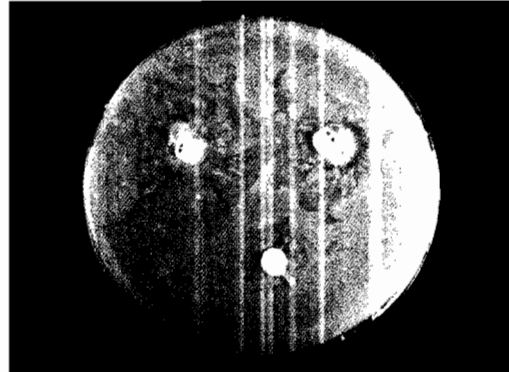
Caroten - NLC 8



Caroten - NLC 10



Caroten - NLC 11



Caroten - NLC 12

Figura 7