



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00582**

(22) Data de depozit: **05/08/2013**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/11/2018** BOPI nr. **11/2018**

(41) Data publicării cererii:  
**30/03/2015** BOPI nr. **3/2015**

(73) Titular:  
• **UNIVERSITATEA POLITEHNICA  
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI  
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **BADEA GABRIELA,  
STR. DR. NICULAE D. STAIICOVICI  
NR.45-49, BL.3, SC.A, ET.1, AP.4,  
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **LĂCĂTUȘU IOANA, STR.TURNUL  
CHINDIEI NR.9, SECTOR 1, BUCUREȘTI,  
B, RO;**  
• **BADEA MARIA NICOLETA, STR. LERȘTI  
NR. 3, BL. A2, SC. 6, AP. 88, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **STAN RALUCA, STR, MATEI BASARAB  
NR. 87, BL. L121, AP. 9, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **MEGHEA AURELIA, STR. OLIMPULUI  
NR.76, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**RO 128703 A2; G. NICULAE, N. BADEA, A.  
MEGHEA, O. OPREA, I. LĂCĂTUȘU,  
"CO-ENCAPSULATION OF BUTYL-  
METHOXYDIBENZOYLMETHANE AND  
OCTOCRYLENE INTO LIPID  
NANOCARRIERS: UV PERFORMANCE,  
PHOTOSTABILITY AND IN VITO  
RELEASE", PHOTOCHEMISTRY AND  
PHOTOBIOLOGY, VOL. 89, PP. 1085-1094,  
2013; I. LĂCĂTUȘU, N. BADEA, A.  
MURARIU, A. MEGHEA, "THE  
ENCAPSULATION EFFECT OF UV  
MOLECULAR ABSORBERS INTO  
BIOCOMPATIBLE LIPID  
NANOPARTICLES", NANOSCALE  
RESEARCH LETTERS, VOL. 6, P. 73, 2011**

(54) **NANOTRANSPORTORI LIPIDICI PE BAZĂ DE ULEIURI  
VEGETALE CU PROPRIETĂȚI FOTOPROTECTOARE  
ȘI ANTIOXIDANTE**



# RO 130098 B1

1           Invenția prezentă se referă la un procedeu de obținere a unor nanotransportori lipidici  
pe bază de ulei din tărâțe de orez sau ulei din semințe de zmeură pentru încapsularea  
3           filtrelor UV cu aplicații în domeniul cosmetic, și anume în fotoprotecție.

5           Expunerea pielii la radiațiile solare UV reprezintă un risc major în dezvoltarea de  
arsuri, care sunt atribuite radiațiilor de tip UVB (290...320 nm), foto-îmbătrânire și cancer de  
7           piele, care sunt atribuite radiațiilor de tip UVA (320...400 nm). Formulările cosmetice care  
oferă un spectru larg de protecție solară absorb radiația de la 290 la 400 nm și conțin de cele  
mai multe ori diferite filtre moleculare care absorb radiațiile UV din regiunea UVA și UVB.

9           Filtrele moleculare sunt compuși organici care asigură protecția prin absorbția  
selectivă a radiațiilor UV. Majoritatea compușilor care pot acționa ca filtre solare sunt  
11          compuși organici aromatici care au în moleculă o grupare carbonil și un alt substituent donor  
de electroni (grupa aminică sau metoxi) situat în poziția orto sau para față de carbonil.

13          Multe formulări cosmetice conținând filtre moleculare prezintă însă numeroase  
dezavantaje, precum lipsa protecției pe ambele domenii UVA și UVB, toxicitate, penetrarea  
15          pielii, deteriorarea ADN și fotoinstabilitate, cu formarea de produși de fotodegradare  
periculoși pentru sănătate (**R. Haywood et. al., J. Invest. Dermatol., 121:862-868, 2003**).  
17          Datorită caracterului lipofil și a stabilității la degradare, concentrații semnificative de filtre UV  
organice s-au găsit în pești și în grăsimea din laptele uman, sugerând faptul că acestea se  
19          acumulează în lanțul trofic, contaminând astfel mediul înconjurător.

21          Din categoria filtrelor UV organice instabile face parte și butil-metoxidibenzoilmetanul  
(BMDBM) care absoarbe în UVA la  $\lambda_{max}$  între 350 și 365 nm (**G.J. Mturi, B.S. Martincigh,  
J. Photochem. Photobiol. A, 200: 410-420, 2008**). BMDBM există în două forme tautomere  
23          - forma enolică, responsabilă de absorbția în domeniul UVA, și forma cetonică, care  
absoarbe în UVC de la 260 la 280 nm. În urma expunerii la radiațiile UV, BMDBM poate fi  
25          ușor fotoinactivat și supus foto-fragmentării, formând fie produși de reacție care nu prezintă  
proprietăți de absorbție în UV, fie fragmente și intermediari reactivi (**R. K. Chaudhuri et. al.,  
27          Photochem. Photobio., 82: 823-828, 2006; E. Damiani et. al., J. Photochem. Photobiol.  
B, 82: 204-213, 2006**). Conform lui **Damiani et. al.**, aceste specii reactive pot fi implicate în  
29          denaturarea ADN-ului și în peroxidarea lipidelor. În plus, BMDBM este utilizat în combinații  
deoarece singur, în concentrațiile maxime admise de legislație, 5% în Europa și 3% în SUA  
31          (Y Gilaberte, Actas Dermosifiliogr., 101(8):659-672, 2010), nu poate asigura un SPF suficient  
de mare sau o protecție cu spectru larg. Utilizarea combinațiilor poate afecta stabilitatea  
33          formulărilor cosmetice care îl conțin, rezultând produși de fotodegradare toxici.

35          În acest context, în literatură sunt prezentate diferite metode și compoziții cu scopul  
de a stabiliza compușii fotoactivi, printre care și derivații de dibenzoilmetan.

37          De exemplu, au fost utilizate diferite substanțe cu rol de fotostabilizatori, precum  
sulfat de bariu (**US 6210658/2001**), compuși amidici (**US 5672337 A/1997**), polimeri  
(**WO 1994014410 A1/1994, US 6699460 B2/2004, US 6699461 B2/2004, US 6926887  
39          B2/2005, US 7153494 B2/2006, US 7648697 B2/2010, US 7964245 B2/2011, US 7959834  
B2/2011, US 20080317685 A1/2008, US 7364721 B2/2008, EP 2042158 A1/2009, US  
41          6312673 B2/2001**), compuși pe bază de siliciu (**US 5951968 A/1999, US 20010026789  
A1/2001**), derivați de benziliden camfor (**US 5004594/1991**), bemotrizinol (**EP 1280505  
43          B1/2007**), benzoați substituiți cu radicali aril și alchil (**EP 1618870 B1/2012**), derivați de  
cianoacetat (**US 20130064871 A1/2013**), antioxidanți sintetici și naturali din extracte de  
45          plante (**US 6602515/2003; US 6831191/2004; US 66994637/2004**).

# RO 130098 B1

Printre substanțele studiate cu rol de fotostabilizator al BMDDBM se numără și octocriolenul (OCT), un filtru UVB folosit pe scară largă în formulările fotoprotectoare datorită fotostabilității și a proprietăților non-iritante și non-sensibilizante ale acestuia. Acesta s-a dovedit a fi un excelent fotostabilizator al BMDDBM (J. Kockler et. al., J. Photoch. Photobio. C, 13:91-110, 2012), dar studiile recente au raportat alergii de contact și de fotocontact la OCT (A Bennásar et. al., Dermatology Online Journal, 15(12):14, 2009).

În US 7186404 B2/2007, A.D. Gonzalez a utilizat, atât pentru fotostabilizarea BMDDBM, cât și pentru îmbunătățirea proprietăților fotoprotectoare, un extract natural de rădăcină de *Kaempferia galanga* care prezintă proprietăți fotoprotectoare, antiinflamatoare și de albire a pielii.

De asemenea, au fost realizate încapsulări în emulsii și microemulsii de tip ulei/apă (US 20130004440 A1/2013), în particule polimerice (WO 2013059167 A2/2013, WO 2013059166 A1/2013), lipidice (US 20030235540 A1/2003, US 7147841 B2/2006) și silicice - sol-gel (US 7166273 B2/2007, EP 1181001 B1/2011, US 8003082 B2/2011).

Nanoîncapsularea filtrelor UV conduce la obținerea de formulări fotoprotectoare cu impact minim asupra sănătății consumatorului prin utilizarea unor concentrații mici de substanțe active sintetice și, mai mult, reținerea acestora în interiorul nanoparticulelor, astfel încât pericolul penetrării pielii și intrării în circulația sistemică a filtrelor UV sintetice să fie minim. Încapsularea asigură stabilitatea filtrelor UV a căror eficacitate este afectată de expunerea la radiațiile UV, iar astfel, formularea cosmetică care le conține își păstrează proprietățile fotoprotectoare un timp îndelungat după expunerea la soare.

Studii în acest sens au fost realizate prin încorporarea filtrelor moleculare în nanoparticule lipidice solide (SLN) de către Bernd Herzog în US 20030235540 A1/2003 și US 7147841 B2/2006.

US 20030235540 A1/2003 și US 7147841 B2/2006 descriu obținerea unor formulări pe bază de nanoparticule lipidice cu matricea lipidică formată dintr-un lipid solid precum palmitat de cetil, trilaurat de glicerol, tristearat de glicerol, trimiristat de glicerol, tripalmitat de glicerol, tribehenat de glicerol, behenate de glicerol, acid stearic, colesterol, ceară de albine și mono-, di- și tri-gliceride ale acizilor grași C16-C18, și un lipid lichid (trigliceride ale acidului capric și caprilic) sau un filtru UV lichid miscibil cu faza uleioasă (etilhexilmetoxicinamat, octocriolen și Parsol SLX) stabilizate prin prezența unui surfactant, utilizând metoda omogenizării la presiune înaltă (HPH).

Aceste nanoparticule sunt utilizate pentru încorporarea unui filtru UV din diferite clase. Au fost obținute nanoparticule lipidice cu dimensiuni medii de 210 nm, 230 nm și 260 nm cu un indice de polidispersitate de 0,18...0,22 (determinate prin spectroscopie de corelare fonică) conținând 2%, 6%, respectiv 8% filtre moleculare prezentând un SPF de 5, 10, respectiv 16.

Cu toate acestea, fotostabilitatea derivaților de dibenzoilmetan la radiațiile UV rămâne până în prezent o problemă care nu a fost pe deplin rezolvată. Drept urmare, dezvoltarea formulărilor fotoprotectoare eficiente și sigure, bazate pe ingrediente naturale din surse vegetale cu proprietăți antioxidante, și pe utilizarea nanostructurilor funcționale ce pot încapsula și proteja filtrele UV periculoase, reprezintă o necesitate în industria cosmetică. Compușii antioxidanți pot îmbunătăți fotoprotecția oferită de formulările cosmetice prin reducerea speciilor reactive de oxigen induse de radiația UV (S. Gonzalez et. al., Clin. Dermatol., 26:614-626, 2008; SR Pinnell, J. Am. Acad. Dermatol., 48: 1-19, 2003). Utilizarea resurselor vegetale regenerabile poate îndeplini cerințele mediului industrial și ale consumatorului pentru produse naturale datorită siguranței lor și a impactului minim periculos asupra mediului înconjurător.

# RO 130098 B1

1 Referitor la utilizarea uleiurilor vegetale, **Viladot Petit et. al.** în  
2 **US 20130017239 A1/2013** a dezvoltat formulări cosmetice pe bază de capsule de  
3 nanoparticule lipidice, reprezentate de nanoparticule lipidice solide (SLN) și de  
4 nanotransportori lipidici nanostructurați (NLC) acoperite cu polimeri. Pentru sinteza  
5 nanoparticulelor lipidice, au fost utilizate diferite tipuri de lipide solide și lipide lichide, printre  
6 care uleiurile vegetale precum uleiul de soia, uleiul de porumb, uleiul de măsline etc., uleiuri  
7 marine (ulei de pește, ulei de alge), uleiuri derivate din petrol etc. Aceste nanoparticule sunt  
8 acoperite de proteine, polizaharide, poliesteri, poliacrilați, policianoacriilați și/sau un amestec  
9 al acestora. Au fost obținute capsule cu dimensiuni medii cuprinse între 100 nm și 198 nm,  
10 iar studiile au arătat ca acestea sunt potrivite pentru încapsularea a cel puțin un compus  
11 activ, cosmetic sau farmaceutic, ingredient alimentar sau adjuvant, și că pot fi utilizate cu  
12 succes în formulările cosmetice sau farmaceutice cu aplicații topice.

13 Prepararea unor formulări fotoprotectoare conținând nanoparticule lipidice pe bază  
14 de uleiuri vegetale cu proprietăți antioxidante și fotoprotectoare, de tipul uleiului din tărâțe  
15 de orez sau al uleiului din semințe de zmeură, cu rol de nanotransportori lipidici ai filtrelor  
16 UV, butil-metoxidibenzoilmetan și octocriolen, poate determina o îmbunătățire a proprietăților  
17 fotoprotectoare ale produsului final și siguranță în utilizarea acestuia pe piele.

18 Utilizând tehnica omogenizării cu grad înalt de forfecare (HSH) G. Niculae și colab.  
19 (G. Niculae et al. Photochem Photobiol. 89: 1085-1094) au încapsulat butil-  
20 metoxidibenzoilmetan (BMDBM) și octocriolenului (OCT) în nanoparticule lipidice de tip SLN  
21 și NLC, pe bază de Squalenă și Myritol 812 MCT. Nanoparticulele lipidice liofilizate au fost  
22 înglobate în cremă, obținându-se formulări cu proprietăți fotoprotectoare amplificate; astfel,  
23 formularea pe bază de MCT ce conține 2,5% BMDBM și 1% OCT a prezentat cea mai bună  
24 eficiență de absorbție a radiațiilor UV, de 98% a radiațiilor UVA scurte și 94% a radiațiilor  
25 UVB.

26 Lacatușu și colab. descriu încapsularea unui sistem binar de 1% substanțe  
27 fotoprotectoare, format din octocriolen (OCT) și Bis-etil-hexiloxifenol (BEMT) sau octocriolen -  
28 octil metoxi-cinamat (OMC) în nanoparticule lipidice de tip SLN folosind un amestec de 3%  
29 surfactanți: Tween 80: Synperonic PE/F68: Lecitina, 1:0.25:0.25, exprimate în procente de  
30 greutate, iar ca fază lipidică, cetil palmitatul și monostearatul de gliceril (I. Lacatușu et. Al.  
31 Nanoscale Res. Letters, 6:73,2011). Nanoparticulele lipidice obținute au prezentat  
32 dimensiuni de 96,5 nm pentru SLN-OMC-OCT și 79,5 nm pentru SLN-OCT-BEMT, și  
33 stabilitate fizică ridicată. Determinarea *in vitro* a factorului de protecție solară (SPF) pe  
34 formulări ce conțin nanoparticule liofilizate a evidențiat o filtrare de 95% a radiațiilor UV și un  
35 factor de protecție solară cuprins între 19,3...19,8.

36 Uleiului din tărâțe de orez (UO) este un ulei bogat în antioxidanți, precum tocoferoli  
37 și tocotrienoli (vitamina E), și gama-orizanol (un amestec de esteri ai acidului ferulic cu  
38 alcoolii triterpenici și steroli). În concentrații mai mici sunt prezenți și carotenoizii, lecitina,  
39 alcoolii cu catenă lungă, precum 1-octacosanol, și squalenă (MJ Lerma-García et. al., Food  
40 Chem., 115:389-404, 2009; C. Santa-Maria, Food Chem. Toxicol., 48:83-88, 2010).  
41 Conținutul în acizi grași determinat prin metoda derivatizării, FAME este: acid oleic 43,99%,  
42 acid linoleic 34,18%, acid palmitic 16,03%, acid stearic 1,94%, acid linolenic 1,25%, acid  
43 arachidic 0,73%, acid eicosenoic 0,63%, acid lignoceric 0,35% și acid behenic 0,22%.  
44 Prezența numeroșilor compuși fitochimici, a făcut ca UO să fie utilizat în produse cosmetice  
45 și farmaceutice, de exemplu în formulări topice pentru protecție solară, anti-îmbătrânire și  
46 în tratarea unor boli de piele. Cu toate acestea, UO este în prezent utilizat insuficient,  
47 deoarece unele dintre componentele sale grase sunt instabile din cauza prezenței lipazei  
care descompune trigliceridele.

# RO 130098 B1

Uleiul din semințe de zmeură (UZ) este recunoscut pentru proprietățile sale antioxidante, datorită prezenței antocianilor și compușilor polifenolici în concentrații ridicate. De asemenea, UZ prezintă concentrații ridicate de acizi grași polinesaturați cu un raport ideal între acizii  $\omega$ -6 și  $\omega$ -3. Conținutul în acizi grași determinat prin cromatografie de gaze (utilizând metoda derivatizării, FAME) este: acid linoleic 53,66%, acid linolenic 26,02%, acid oleic 12,61%, acid  $\gamma$ -linolenic 3,07%, acid palmitic 2,50%, acid eicosenoic 1,15%, acid stearic și acid arahidic 0,7%.

UZ mai conține flavonoide, acizi fenolici, acid elagic, tocoferoli, carotenoide, acid folic și  $\beta$ -sitosterol. În plus față de activitatea puternic antioxidantă, UZ prezintă și alte efecte biologice, incluzând proprietățile anti-inflamatoare, anti-mutagene și antimicrobiene (W Chen et. al., Food Res. Int., 49:22-26, 2011). În domeniul cosmetic, UZ este folosit ca agent de hidratare, emolient și pentru reducerea efectelor stresului oxidativ la nivelul pielii. Absorbând radiația UVB și UVA (BD Oomah et. al., Food Chem., 69:187-193, 2000), acesta este folosit în formulări cu spectru larg de protecție solară.

Problema tehnică pe care o rezolvă procedeul conform invenției constă în obținerea unor nanoparticule lipidice cu proprietăți antioxidante și fotoprotectoare amplificate.

Un prim obiect al prezentei invenții este reprezentat de nanoparticule lipidice încărcate cu butil-metoxidibenzoilmetan și octocrlen pe bază de uleiuri vegetale, ce încapsulează două categorii de filtre de protecție solară cu proprietăți fotoprotectoare și antioxidante care cuprind:

a. 7%, 14% sau 21% ulei din tărâțe de orez sau ulei din semințe de zmeură dintr-o matrice înalt dezordonată formată prin utilizarea unui amestec complex de lipide solide și lichide;

b. 7% substanțe active totale de natură hidrofobă, din care: 5% și 2%, 3,5% și 3,5% sau 2% și 3,5% butil-metoxidibenzoilmetan, respectiv octocrlen, încapsulate în rețeaua lipidică astfel formată, procentele fiind exprimate în greutate.

Invenția se mai referă și la formulări cosmetice pe bază de cremă ce conțin nanoparticulele lipidice încărcate cu butilmetoxi-dibenzoilmetan și octocrlen menționate, care cuprind:

a. 3,5%, 7% sau 10,5% ulei din tărâțe de orez sau ulei din semințe de zmeură;

b. 3,5% substanțe active totale de natură hidrofobă, din care: 2,5%, 1,75% sau 1% butilmetoxidibenzoilmetan, respectiv 1%, 1,75% sau 2,5% octocrlen, procentele fiind exprimate în greutate.

Nanoparticulele lipidice pe bază de uleiuri naturale conform invenției se obțin printr-un procedeu care cuprinde:

- formarea unei faze lipidice libere, ce conține un amestec de lipide solide și lipide lichide de emulgare SE/PF:palmitat de cetil:ulei din tărâțe de orez sau ulei din semințe de zmeură, într-un raport de greutate 1,63:0,7:1 sau 2,8:1,2:1 sau 6,3:2,7:1 la o temperatură de 85°C, respectiv formarea unei faze lipidice îmbogățite cu o concentrație de 10% componente active de natură hidrofobă, butil-metoxidibenzoilmetan (BMDBM) și octocrlen (OCT), în diferite rapoarte de greutate (7:3 sau 1:1 sau 3:7);

- formarea unei faze apoase ce conține un amestec de surfactanți într-un raport de greutate polisorbit 20:lecitină:copolimer polietilenglicol-polipropilenglicol = 4,66:1:1 și la o temperatură de 85°C;

- formarea unei pre-emulsii lipidice - precursora de nanoparticule lipidice solide - prin contactarea sub agitare magnetică a celor două faze, apoasă și lipidică, și menținere la un regim de temperatură constant de 85°C timp de 1 h;

# RO 130098 B1

1 - formarea unor dispersii apoase de nanotransportori lipidici încărcăți cu filtre  
moleculare, prin supunerea pre-emulsiei lipidice la o energie mecanică externă, aplicând o  
3 omogenizare cu grad înalt de forfecare de 25000 rpm, timp de 10 min, urmată de răcirea  
ușoară, sub agitare magnetică, la temperatură camerei;

5 - obținerea de nanotransportori lipidici în formă solidă prin supunerea nanodispersiilor  
apoase unei etape de liofilizare la -55°C timp de 72 h.

7 Nanotransportorii lipidici încărcăți cu filtre UVA și UVB, obținuți pe bază de lipide  
lichide naturale, cuprind:

9 - 7,14 sau 21% ulei din tărâțe de orez sau ulei din semințe de zmeură dintr-o matrice  
înalt dezordonată formată prin utilizarea unui amestec complex de lipide biocompatibile și  
11 naturale ce imprimă un caracter antioxidant specific întregului transportor lipidic;

13 - 7% substanțe active (reprezentând 5% și 2%, 3,5% și 3,5% sau 2% și 5%  
butilmetoxidibenzoilmetan, respectiv octocriolen) încapsulate în rețeaua lipidică astfel formată,  
procentele fiind exprimate în greutate.

15 Invenția prezintă următoarele avantaje:

17 - asigură încapsularea unor componenți puternic hidrofobi, filtre UV, în particule  
sferice de dimensiune nanometrică, folosind materii prime biocompatibile, concentrații de  
surfactant/co-surfactant în concentrații minime (3,5%) și fără utilizarea unor substanțe  
19 agresive (exemplu: solvenți organici sau surfactanți periculoși);

21 - procedeul de încapsulare a ambelor filtre UVA și UVB în astfel de nanomatrici  
lipidice pe bază de uleiuri naturale se desfășoară în mediu apos, nu utilizează condiții de  
proces care să conducă la denaturarea principiului activ, nu afectează integritatea structurală  
23 a acestuia, ci mai mult îi intensifică proprietățile;

25 - folosește uleiuri naturale, necostisitoare, care manifestă un dublu rol:

a. participă la formarea de matrici lipidice eficiente ce pot fi utilizate ca transportori  
ai unor concentrații semnificative de substanțe active de natură hidrofobă;

27 b. protejează, prin virtutea proprietăților sale antioxidante, compușii chimici  
fotosensibili, cum este cazul butil-metoxidibenzoilmetanului;

29 c. vine cu proprietăți biologice specifice și, ca atare, cu un important potențial  
terapeutic, de natură să îmbunătățească sănătatea publică;

31 d. vine cu proprietăți fotoprotectoare, în completarea celor ale substanțelor active  
selectate pentru încapsulare.

33 Prin acest procedeu se formează o rețea lipidică înalt dezordonată, fapt ce conduce  
la încapsularea unor concentrații ridicate de substanță activă, datorită imperfecțiunilor/  
35 golurilor create prin utilizarea unor lipide cu structuri chimice diferite.

37 Procedeul propus este simplu și eficient, implică etape distincte și ușor de reprodus,  
asigurând același nivel de control și prin transpunerea la scară pilot.

39 Procedeul constituie o metodă optimă pentru obținerea unor nanotransportori lipidici  
pe bază de ulei din tărâțe de orez sau ulei din semințe de zmeură ce manifestă proprietăți  
antioxidante și fotoprotectoare amplificate.

41 Particulele lipidice, îmbogățite cu filtrele UV butil-metoxidibenzoilmetan și octocriolen,  
obținute prin procedeul propus, pot fi utilizate sub ambele forme - ca dispersii apoase sau  
43 sub formă de produs solid - pentru dezvoltarea unor formulări cosmetice ce prezintă  
proprietăți specifice.

45 Procedeul conform invenției constă în aceea că se formează inițial o pre-emulsie  
lipidică ce conține 10% amestec lipidic și 3,5% amestec de surfactanți, la o temperatură de  
47 85°C, prin contactarea sub agitare magnetică a două faze, o fază lipidică ce conține  
emulgade:palmitat de cetil:ulei din tărâțe de orez sau ulei din semințe de zmeură într-un

# RO 130098 B1

raport de greutate = 1,63:0,7:1 sau 2,8:1,2:1 sau 6,3:2,7:1 și o fază apoasă ce conține polisorbit 20:lecitină:copolimer polietilenglicol-polipropilenglicol într-un raport de greutate = 4,66:1:1; pre-emulsia formată este menținută la un regim de temperatură constant de 85°C, timp de 1 h, după care este supusă unei energii mecanice externe prin aplicarea unei omogenizări cu grad înalt de forfecare de 25000 rpm, timp de 10 min, urmată de răcirea ușoară, sub agitare magnetică, la temperatura camerei și ulterior supunerea la un proces de liofilizare la -55°C timp de 72 h, 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 fotoprotectoare amplificate.	1
În cazul prezentei invenției, pentru observarea efectului și tipului de matrice lipidică asupra obținerii unor nanoparticule lipidice ce manifestă activitate antioxidantă, respectiv pentru analiza gradului de încărcare a acestora cu filtre UV, s-au utilizat două tipuri de matrici:	11
a. nanomatrici lipidice libere (fără conținut de component activ), formate prin combinarea a două lipide solide biocompatibile (emulgade și palmitat de cetil), cu un amestec de ulei vegetal complex (ulei din tărâțe de orez sau ulei din semințe de zmeură);	15
b. nanomatrici lipidice îmbogățite cu concentrații variabile de două componente hidrofobe (butil-metoxidibenzoilmetan - filtru UVA, octocrilen - filtru UVB), formate prin combinarea aceluiași lipide solide biocompatibile cu lipidele lichide naturale, acestea jucând rolul de transportor lipidic nanostructurat (NLC) pentru filtrele UV.	17
Etapele de obținere a nanomatricii lipidice îmbogățite cu două componente hidrofobe sunt:	19
- formarea unei topituri lipidice, prin utilizarea de lipide solide și lichide diferite structural (emulgade, palmitat de cetil și ulei din tărâțe de orez sau ulei din semințe de zmeură);	21
- adăugarea în topitura lipidică a unor concentrații diferite de filtre UV: 7% BMDDBM și 3% OCT; 5% BMDDBM și 5% OCT, 3% BMDDBM și 7% OCT.	23
Se dau, în continuare, trei exemple de realizare a procedurii conform invenției, în legătură cu tabelele și fig. 1...15 care reprezintă:	25
- tabelul 1, compoziția butil-metoxidibenzoilmetan - octocrilen - NLC pe bază de ulei vegetal;	27
- tabelul 2, entalpia, maximul punctului de topire și indicele de cristalinătate (IC %) ale NLC evaluate cu ajutorul calorimetriei de scanare diferențială (DSC);	29
- tabelul 3, parametrii cinetici ai eliberării BMDDBM din NLC în dispersie;	31
- tabelul 4, parametrii cinetici ai eliberării OCT din NLC în dispersie;	33
- fig. 1, dimensiunea nanostructurilor lipidice determinată prin tehnica împrăstierii dinamice a luminii (DLS);	35
- fig. 2, distribuția dimensiunii particulelor lipidice de tip BMDDBM-OCT-NLC preparate cu: a. ulei din tărâțe de orez, și b. ulei din semințe de zmeură;	37
- fig. 3, microscopia de transmisie electronică a probelor de BMDDBM-OCT-NLC preparate cu: a. ulei din tărâțe de orez, și b. ulei din semințe de zmeură;	39
- fig. 4, evaluarea stabilității probelor de BMDDBM-OCT-NLC pe baza potențialului electrocinetic;	41
- fig. 5, eficiență încărcării (%) BMDDBM și OCT în dispersiile de NLC;	43
- fig. 6, curbele DSC pentru BMDDBM-OCT-NLC, în comparație cu NLC libere și amestecul fizic de lipide: a. NLC preparate cu ulei din tărâțe de orez, și b. NLC preparate cu ulei din semințe de zmeură;	45

# RO 130098 B1

1 - fig. 7, determinarea *in vitro* a proprietăților antioxidante a probelor de BMDBM - OCT  
- NLC preparate cu ulei din tărâțe de orez și ulei din semințe de zmeură, în funcție de: a.  
3 concentrația uleiului vegetal; b. concentrația filtrelor UV BMDBM și OCT;

- fig. 8, spectrele de absorbție UV ale BMDBM-OCT-NLC preparate cu: a. ulei din  
5 tărâțe de orez, și b. ulei din semințe de zmeură, cu variația concentrației de ulei vegetal: (1)  
21%; (2) 14%; (3) 7%;

7 - fig. 9, spectrele de absorbție UV ale BMDBM-OCT-NLC preparate cu 21% a. ulei  
din tărâțe de orez și b. ulei din semințe de zmeură, cu variația concentrației de filtre UV: (1)  
9 5% BMDBM și 2% OCT; (2) 3,5% BMDBM și 3,5% OCT; (3) 2% BMDBM și 5% OCT;

11 - fig. 10, FP-UVA și SPF formulărilor cosmetice având 2,5% BMDBM și 1% OCT din  
NLC preparate cu diferite concentrații de ulei din tărâțe de orez și ulei din semințe de  
zmeură;

13 - fig. 11, FP-UVA și SPF formulărilor cosmetice pe bază de BMDBM-OCT-NLC,  
conținând 10,5% ulei vegetal și având diferite concentrații de filtre UV: NLC 3 și 9 cu 2,5%  
15 BMDBM și 1% OCT; NLC 4 și 10 cu 1,75% BMDBM și 1,75% OCT; (3) NLC 5 și 11 cu 1%  
BMDBM și 2,5% OCT;

17 - fig. 12, efectul iradierii fotochimice UV asupra: a. SPF, și b. FP-UVA ale formulărilor  
cosmetice pe bază de BMDBM-OCT-NLC, conținând 10,5% ulei vegetal și având diferite  
19 concentrații de filtre UV: NLC 3 și 9 cu 2,5% BMDBM și 1% OCT; NLC 4 și 10 cu 1,75%  
BMDBM și 1,75% OCT; (3) NLC 5 și 11 cu 1% BMDBM și 2,5% OCT;

21 - fig. 13, efectul iradierii fotochimice UV asupra: a. SPF, și b. FP-UVA ale formulărilor  
cosmetice conținând 2,5% BMDBM și 1% OCT libere și încapsulate în NLC;

23 - fig. 14, spectrele de absorbție UV ale uleiurilor vegetale a. ulei din tărâțe de orez,  
și b. ulei din semințe de zmeură, expuse la două etape de iradiere: (1) inițial; (2) după  
25 etapa I; (3) după etapa II;

- fig. 15, profilele eliberării cantității cumulative procentuale, în mediu de eliberare  
27 tampon salin fosfat: etanol/7:3, de a. BMDBM și b. OCT din NLC în comparație cu  
nanoemulsiile.

## 29 Exemplul 1

31 Se formează o fază lipidică prin topirea la o temperatură de 82...85°C a unui amestec  
de emulgade: palmitat de cetil: ulei din semințe de zmeură sau ulei din tărâțe de orez, într-un  
raport de greutate de 1,63:0,7:1 sau 2,8:1,2:1 sau 6,3:2,7:1. Separat, se formează o fază  
33 apoasă compusă dintr-un amestec de surfactanți neionic și ionic, și un co-surfactant, într-un  
raport de greutate polisorbitat 20:lecitină:copolimer polietilenglicol-polipropilenglicol de  
35 4,66:1:1 și la o temperatură de 85°C. Cele două faze, apoasă și lipidică, se mențin 1/2 h la  
un regim de temperatură de 82...85°C. Se formează o pre-emulsie lipidică prin contactarea  
37 celor două faze, sub agitare magnetică și la o temperatură de 82...85°C, după care se  
menține la regim de temperatură constant, timp de 1 h. Pre-emulsia fierbinte rezultată se  
39 supune ulterior unei energii mecanice externe prin omogenizare cu grad înalt de forfecare,  
aplicând 25000 rpm timp de 10 min, după care se lasă să se răcească lent la temperatura  
41 camerei cu formarea unei dispersii de nanoparticule lipidice libere - NLC (fără conținut de  
componentă activă). Pentru eliminarea excesului de apă și obținerea nanoparticulelor lipidice  
43 în formă solidă, dispersiile de NLC sunt inițial congelate la -25°C timp de 24 h, după care se  
supun unui proces de liofilizare -55°C, pentru o perioadă de 72 h.



## Exemplul 2

Similar exemplului 1, cu deosebirea că se adaugă în faza lipidică încălzită la 85°C diferite cantități de butil-metoxidibenzoilmetan și octocrilen, ce corespund unor concentrații de 7% și 3%, 5% și 5% sau 3% și 7% butil-metoxidibenzoilmetan, respectiv octocrilen, 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 10 min pentru a se asigura o bună dispersare a componentelor 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 butil-metoxidibenzoilmetan și octocrilen pe bază de ulei din tărațe de orez 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 din tărațe de orez este înlocuit cu ulei din semințe de zmeură, cu obținerea unor dispersii de nanoparticule lipidice încărcate cu butil-metoxidibenzoilmetan și octocrilen pe bază de ulei din semințe de zmeură și în final a nanoparticulelor lipidice în formă solidă.

**Distribuția mărimii nanoparticulelor lipidice încărcate cu butil-metoxidibenzoilmetan și octocrilen.** Evaluarea distribuției dimensiunii nanoparticulelor lipidice și a stabilității acestora s-a realizat în funcție de concentrațiile de butil-metoxidibenzoilmetan și octocrilen utilizate pentru încapsulare și de concentrațiile și tipul de ulei vegetal folosit la formarea matricei lipidice. Rezultatele obținute au semnalat faptul că atât nanoparticulele lipidice goale, cât și cele încărcate cu diferite concentrații de BMDBM și OCT (BMDBM-OCT-NLC), prezintă o distribuție de dimensiune relativ îngustă (fig. 1) și o stabilitate excelentă a particulelor lipidice aflate în suspensie apoasă, reflectată prin valorile potențialului electrocinetic. Fig. 2 exemplifică distribuția dimensiunii particulelor a câtorva nanodispersii BMDBM-OCT-NLC preparate cu ulei din tărațe de orez (UO), respectiv ulei din semințe de zmeură (UZ), iar în tabelul 1 sunt prezentate compozițiile tuturor probelor de NLC. Rezultatele obținute în urma analizei DLS au evidențiat prezența unor distribuții monomodale ale dimensiunii particulelor, pentru toate probele de NLC, fapt evidențiat de valorile indicelui de polidispersitate (0,15...0,185), cu diametre medii în jurul valorii de o sută de nanometri (fig. 1). În general, uleiul din semințe de zmeură duce la formarea de nanoparticule lipidice de dimensiuni mai mici, cu aproximativ 10 nm, comparativ cu cele preparate prin utilizarea UO. Pentru ambele tipuri de ulei vegetal, creșterea concentrației de ulei determină o ușoară creștere a dimensiunii particulelor de NLC, de exemplu NLC 7-9, preparate cu concentrații de 1%, 2%, respectiv 3% UZ, prezintă o dimensiune medie de 111,9 nm, 119,8 nm, respectiv 123,1 nm. Încărcarea filtrelor UV, BMDBM și OCT, în NLC determină o creștere a dimensiunii particulelor comparativ cu cea a NLC goale, indiferent de tipul de ulei vegetal folosit. Pentru o concentrație de 3% ulei vegetal, dimensiunea medie a NLC preparate cu diferite concentrații de BMDBM și OCT descrește odată cu scăderea concentrației de BMDBM și cu creșterea concentrației de OCT. Acest lucru se poate datora diferitelor aranjamente spațiale a BMDBM versus OCT.

Pentru a obține mai multe informații legate de dimensiunea particulelor și morfologia lor, s-a fost efectuat analiza TEM (fig. 3) pentru NLC preparate cu 3% ulei vegetal și încărcate cu 0,7% BMDBM și 0,3% OCT (NLC 3 și NLC 9). Analiza TEM confirmă prezența nanoparticulelor monodisperse, cu suprafețe netede și cu formă sferică bine definită, obținute pe bază de UZ și UO. Dimensiunea nanoparticulelor determinată prin TEM este mai mare decât cea determinată prin spectroscopie de corelare fonică astfel, proba BMDBM-OCT-NLC preparată cu UO a prezentat diametre medii de 400 nm, în timp ce proba preparată cu UZ prezintă dimensiuni de 200 nm.

## 1 **Evaluarea stabilității sistemelor butil-metoxidibenzoilmetan-octocriolen-NLC.**

2 Analiza stabilității nanodispersiilor lipidice, determinată pe baza valorilor potențialului  
3 electrocinetic, a arătat faptul că toate probele de BMDBM-OCT-NLC prezintă o stabilitate  
4 fizică bună, cu valori medii ale potențialului zeta (PZ) mai electronegative de 25 mV. Fig. 4  
5 prezintă valorile PZ pentru NLC dezvoltate. Comparând valorile potențialului electrocinetic  
6 ale probelor de NLC preparate cu UZ și UO, o ușoară modificare a încărcării electrice la  
7 suprafață a fost observată. NLC preparate cu UZ prezintă PZ mai negative comparativ cu  
8 NLC preparate cu UO. Cele mai bune rezultate au fost obținute pentru NLC 5 (-29 mV) și  
9 NLC 11 (-32,4 mV) preparate cu 3% UZ/UO și o concentrație de 0,3% BMDBM și 0,7% OCT.  
10 Astfel, datorită repulsiilor electrostatice puternice dintre particule, agregarea lor este puțin  
11 probabilă, demonstrând faptul că toate dispersiile NLC, obținute prin utilizarea celor două  
12 uleiuri vegetale și a unui procedeu modificat de omogenizare cu grad înalt de forfecare, sunt  
13 sisteme stabile din punct de vedere fizic.

## 14 **Eficiența încărcării butil-metoxidibenzoilmetanului și a octocriolenului în NLC.**

15 Determinarea eficienței încărcării oferă informații despre rolul uleiului vegetal în formarea  
16 unui miez lipidic eficient pentru acomodarea unor cantități mari de filtre UV. Valorile eficienței  
17 încărcării (EI) BMDBM și a OCT în NLC sunt prezentate în fig. 5. Dintre cele două filtre UV  
18 încărcate, OCT prezintă valori mai bune ale EI cu valori cuprinse între 72% și 90%, în timp  
19 ce valorile eficienței încărcării BMDBM au variat între 70% și 79%. Aceste diferențe pot fi  
20 asociate în primul rând cu dimensiunile nanoparticulelor obținute la DLS. Datorită structurii  
21 moleculare mari, o cantitate semnificativă de BMDBM rămâne captivă în exteriorul  
22 nanoparticulei, în stratul de surfactanți de la suprafață. Astfel, se formează nanoparticule cu  
23 dimensiuni mai mari pe măsură ce concentrația de BMDBM crește, și se obțin valori mai mici  
24 ale eficienței încărcării. O mai bună eficiență a încărcării OCT comparativ cu a BMDBM  
25 poate fi explicată de caracterul mai lipofil al OCT indicat de coeficientul de partiție octanol-  
26 apă ( $\log K_{oa} = 6,9$  pentru OCT și  $\log K_{oa} = 6,1$  pentru BMDBM). În funcție de uleiul vegetal  
27 utilizat, se observă faptul că NLC preparate cu UO prezintă valori ale EI mai mari comparativ  
28 cu NLC preparate cu UZ (de exemplu: încărcarea OCT este de 89% pentru NLC 3 preparat  
29 cu UO și 79% pentru NLC 9 preparat cu UZ). Variația concentrației de ulei de la 1% la 3%  
30 utilizată la prepararea NLC influențează nesemnificativ eficiența încărcării filtrelor UV. De  
31 exemplu, în cazul OCT, NLC 1-3 prezintă EI de aproximativ 90%, în timp ce în cazul  
32 BMDBM, NLC 1-2 prezintă valori ale EI de 77% și NLC 3 de 79%. Pe de altă parte, variația  
33 raportului concentrațiilor filtrelor UV încărcate în NLC determină o creștere a EI odată cu  
34 creșterea raportului BMDBM:OCT.

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

# RO 130098 B1

Evaluarea structurii cristaline a probelor de BMDBM-OCT-NLC a fost realizată pe baza calorimetriei de scanare diferențială (DSC). Parametrii DSC (maximul punctului de topire, entalpia de topire și indicele de cristalinitate) ai probelor de NLC selectate sunt prezentați în tabelul 2. Probele de NLC încărcate cu BMDBM și OCT, și preparate cu cele două tipuri de uleiuri vegetale (21% UO/UZ în liofilizat), au prezentat un comportament endoterm similar (într-un domeniu de temperatură apropiat). În intervalul 20...80°C, s-a observat prezența unui vârf endoterm principal (45,8...7,2°C) fiind atribuit în principal lipidelor solide, palmitat de cetil și emulgade. Curba endotermă la temperaturi < 55°C sugerează prezența unor faze cristaline lipidice diferite și mai puțin ordonate. Acest comportament era de așteptat datorită amestecului de lipide complexe folosite la prepararea matricei transportoare. 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 a structurilor chimice diferite ale acestora.

Prin compararea curbelor DSC ale probelor de NLC încărcate cu BMDBM-OCT, ale NLC libere și ale amestecurilor fizice de lipide (fig. 6), 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 NLC, comparativ cu al amestecurilor fizice de lipide solide și lichide;

- temperaturile de topire ale probelor de NLC încărcate cu filtre UV au fost deplasate cu 0,8...1,4°C față de cele ale NLC libere, ceea ce indică o perturbare a matricei lipidice și o ușoară creștere a dimensiunii particulelor. Mai mult decât atât, prin compararea NLC încărcate cu cele libere, s-a observat că încorporarea BMDBM-OCT în matricea lipidică solidă a condus la o scădere a aranjamentului cristalin, subliniată și de scăderea intensității picului endoterm;

- uleiul vegetal utilizat la prepararea NLC influențează structura cristalină a matricei lipidice. Astfel NLC preparate cu UO determină formarea unei matrice lipidice mai puțin ordonate, fapt evidențiat de valorile mici ale indicelui de cristalinitate (64,9...67,6% pentru NLC 3-5 încărcate și 85,1% pentru NLC 6 gol) comparativ cu cele ale NLC preparate cu UZ (77,5...86,6% pentru NLC 9-11 încărcate și 87,7% pentru NLC 12 gol). Aceste rezultate sunt în concordanță cu valorile eficienței încărcării obținute în cazul UO. Datorită gradului mai mare de dezordine a matricei lipidice, există mai multe imperfecțiuni în structura miezului lipidic, și astfel o cantitate mai mare de OCT este încapsulată în NLC preparate cu UO;

- deplasarea temperaturii, completată de scăderea intensității picului endoterm, este o indicație clară a efectului filtrelor UV asupra solidificării fazei lipidice. Variația rapoartelor concentrațiilor de BMDBM:OCT încapsulate în nanoparticulele lipidice influențează cooperativitatea moleculelor lipidelor. Astfel, pentru un raport al concentrațiilor BMDBM:OCT de 7:3, s-a obținut cel mai mic indice al cristalinității pentru ambele tipuri de uleiuri vegetale (64,9% pentru NLC 3 și 77,5% pentru NLC 9). Acest lucru se datorează unei cantități mai mari de BMDBM în stare amorfă care determină o structură cristalină mai puțin ordonată și astfel, o capacitate de încărcare mai mare a NLC cu substanță activă. Acest lucru se regăsește în eficiența încărcării cu filtre UV, NLC 3 și 9 prezentând cele mai mari valori ale EI (de exemplu încărcarea BMDBM este 79% pentru NLC 3 și NLC 9 preparate cu UO, respectiv cu UZ).

**Determinarea *in vitro* a activității antioxidante a BMDBM-OCT-NLC.** Efectele benefice ale uleiurilor vegetale asupra sănătății sunt bine cunoscute, UZ și UO conținând numeroși compuși bioactivi cu proprietăți antioxidante, precum tocoferolii și antocianii. Prin urmare, această parte de studiu are drept scop investigarea activității antioxidante a probelor de BMDBM-OCT-NLC în funcție de concentrația de BMDBM și OCT și de tipul de ulei vegetal folosit la formarea nanomatricei lipidice.

# RO 130098 B1

1 Evaluarea proprietăților antioxidante ale probelor de BMDBM-OCT-NLC a fost  
realizată prin metoda chemiluminescenței, care este o tehnică adecvată de măsurare a  
3 radicalilor liberi oxigenați. În scop comparativ, probele de NLC încărcate cu BMDBM și OCT,  
NLC libere, precum și soluțiile de uleiuri vegetale și filtre UV libere, au fost expuse la un  
5 sistem generator de radicali liberi care eliberează radicali intermediari liberi cu un bogat  
conținut energetic.

7 În toate probele testate, activitatea antioxidantă (AA%) a BMDBM-OCT-NLC a fost  
amplificată în comparație cu cea a uleiurilor și a filtrelor UV pure, cea mai mare diferență fiind  
9 observată la concentrații mici de ulei vegetal (35 mg/mL) (fig. 7a). De exemplu, pornind de  
la o activitate antioxidantă moderată a soluției de 35 mg/mL UO liber (AA = 54,4%), se  
11 ajunge la o activitate antioxidantă mare în cazul NLC corespunzător (72,4% AA pentru  
NLC 7). Activitatea antioxidantă a UO este mai mare față de cea a UZ și crește odată cu  
13 creșterea cantității de ulei. Proprietățile antioxidante ale uleiurilor vegetale se transmit NLC  
corespunzătoare; astfel, cele mai mari valori ale activității antioxidante se regăsesc la  
15 BMDBM-OCT-NLC preparate cu 3% UO (NLC 3 cu AA = 83,2%) și cu 3% UZ (NLC 9 cu  
AA = 81,2%).

17 La aceeași concentrație de filtru UV liber (17,5 mg/mL), BMDBM prezintă o activitate  
antioxidantă mai mare (74,6%) comparativ cu cea a OCT (64,3%) și ea crește odată cu  
19 creșterea concentrației de filtru UV (fig. 7b). Astfel, NLC încărcate cu cel mai mare raport al  
concentrațiilor BMDBM:OCT (NLC 3 și 9) prezintă cea mai mare activitate antioxidantă.

21 În concluzie, selectarea uleiului vegetal ca principal component al matricei lipidice  
transportoare împreună cu filtrele UV, conduc la o activitate antioxidantă sinergetică a  
23 formulărilor NLC dezvoltate.

**Proprietățile de absorbție în UV.** Determinarea *in vitro* a SPF și FP-UVA. Efectul  
25 de blocare a radiațiilor UV de către NLC liofilizate a fost evaluat folosind banda Transpore®.  
Se observă faptul că BMDBM-OCT-NLC conținând o cantitate mai mare de ulei vegetal (21%  
27 în liofilizat) prezintă spectre de absorbție deplasate către valori mai mari ale absorbantei  
pentru ambele tipuri de ulei, UO (fig. 8a) și UZ (fig. 8b). Maximele intensităților de absorbție  
29 ale NLC preparate cu UO sunt mai mari față de cele ale NLC preparate cu UZ. Aceste  
rezultate sunt în acord cu valorile determinate anterior pentru activitatea antioxidantă și  
31 eficiența încărcării.

Pentru probele de NLC conținând 21% UO sau UZ (fig. 9a și b) și diferite rapoarte  
33 ale concentrațiilor de BMDBM:OCT, s-a observat că, odată cu creșterea concentrației de  
OCT, activitatea de blocare a radiațiilor UVB se îmbunătățește pentru NLC preparate cu UO,  
35 în timp ce pentru probele de NLC preparate cu UZ nu se observă nicio îmbunătățire. Acest  
lucru poate fi explicat prin valorile mai scăzute ale eficienței încărcării OCT în NLC preparate  
37 cu UZ față de cele preparate cu UO. Pe de altă parte, creșterea concentrației de BMDBM  
determină o intensificare a activității de blocare a radiațiilor UVA de către NLC preparate cu  
39 ambele tipuri de ulei vegetal, fiind foarte puternică pentru NLC încărcate cu 5% BMDBM  
(NLC 3 și NLC 9). Observând diferența dintre spectrele de absorbție în domeniul UVA ale  
41 NLC preparate cu diferite concentrații de BMDBM, se constată că aceasta diferență este mai  
pronunțată în cazul NLC preparate cu UZ. Aceste rezultate sunt susținute de valorile  
43 eficienței încărcării BMDBM, NLC 9-11 preparate cu UZ prezentând cele mai mari diferențe  
între valorile eficienței încărcării comparativ cu cele obținute pentru NLC 3-5 preparate cu  
45 UO.

Potențialul NLC sintetizate pe bază de UO și UZ în dezvoltarea unor formulări  
47 fotoprotectoare este evaluat după incorporarea NLC liofilizate într-o bază de cremă urmată  
de determinarea valorilor SPF și FP-UVA. Pornind de la NLC încărcate cu filtre UV, au fost

# RO 130098 B1

formulate diverse creme conținând 2,5% BMDBM și 1% OCT, 1,75% BMDBM și 1,75% OCT, și 1% BMDBM și 2,5% OCT. Filtrele UV încapsulate în NLC și formulate în cremă sunt prezente în concentrații mai mici față de concentrația maximă admisă de legislația europeană. Ambele uleiuri vegetale prezintă un impact puternic asupra proprietăților fotoprotectoare ale cremelor cu NLC, fapt ce se observă din valorile SPF și FP-UVA. Astfel, crescând concentrația de ulei în NLC de la 3,5% la 7% și la 10,5%, se observă o creștere substanțială (aproximativ de două ori) a SPF și a FP-UVA (fig. 10). Cele mai bune rezultate s-au obținut pentru cremele conținând 2,5% BMDBM și 1% OCT încapsulate în NLC pe bază de UO (NLC 3 cu SPF 17,3 și FP-UVA de 40,2) și în NLC pe bază de UZ (NLC 9 cu SPF 13 și FP-UVA de 34,9) (fig. 11).

**Studii de fotostabilitate ale formulărilor cosmetice pe bază de BMDBM și OCT încapsulate în NLC.** Stabilitatea chimică a filtrelor UV supuse fotoiradierii reprezintă un factor major de îngrijorare, fiind în atenția cercetărilor recente în ceea ce privește acțiunea fotoprotectoare. Mai mult, BMDBM este cunoscut pentru stabilitatea redusă la radiațiile UV, acestea afectându-i drastic proprietățile de absorbție în domeniul UVA. Astfel, studiul fotostabilității reprezintă o premisă în estimarea eficienței formulărilor cosmetice dezvoltate pe baza NLC care conțin două filtre de tip UVA și UVB. Studiul fotostabilității a fost efectuat prin expunerea cremelor pe bază de NLC, la iradiere fotochimică UVA și UVB, cu o energie joasă care simulează energia solară din timpul zilei. Efectul iradierii asupra SPF și a FP-UVA ale cremelor îmbogățite cu BMDBM-OCT-NLC este prezentat în fig. 11a și b. Rezultatele obținute au indicat faptul că SPF și FP-UVA ale formulărilor cosmetice preparate cu BMDBM și OCT încapsulate în NLC au crescut ușor după iradiere. Cremele supuse iradierii conținând 2,5% BMDBM și 1% OCT, obținute pe baza NLC 3 și 9, prezintă cele mai bune proprietăți fotoprotectoare. Astfel, FP-UVA al formulării cosmetice pe bază de NLC 3 (preparat cu UO) a crescut cu 14,5% (de la 40,2 la 47) și al formulării pe bază de NLC 9 (preparat cu UZ) a crescut cu 8,4% (de la 34,9 la 38,1) după iradiere. Valorile SPF ale cremelor pe bază de NLC au crescut mai puțin după iradiere comparativ cu FP-UVA, cu aproximativ 5% pentru toate cremele.

Pentru a stabili îmbunătățirea proprietăților fotoprotectoare ale formulărilor cosmetice conținând filtre UV încapsulate în NLC, s-a realizat un studiu comparativ între fotostabilitatea cremelor conținând filtrele UV încapsulate și cea a cremelor conținând filtrele UV neîncapsulate. Crema de referință a fost preparată pornind de la formularea cu NLC pentru care s-a obținut cea mai bună acțiune fotoprotectoare (NLC 3 și NLC 9). Astfel, cremele de referință au fost preparate cu 2,5% BMDBM, 1% OCT, 10,5% UO sau UZ și baza de cremă. SPF și FP-UVA ale formulărilor supuse iradierii sunt prezentate în fig. 13. Efectul fotoprotector al cremelor conținând filtrele UV libere a scăzut după iradiere. După perioada îndelungată de iradiere, FP-UVA a scăzut cu 34,1% și cu 27,3%, iar SPF a scăzut cu 32,2% și cu 45,7% pentru crema de referință preparată cu UO, respectiv pentru cea preparată cu UZ. Cremele conținând BMDBM și OCT încapsulate în NLC prezintă o îmbunătățire a capacității de blocare a radiațiilor UVA și UVB comparativ cu cele conținând filtrele UV libere. Filtrele UV cuplate cu uleiurile vegetale cunoscute pentru proprietățile lor fotoprotectoare și, de asemenea, proprietatea NLC de a ecrana radiațiile UV, datorită caracterului lor de particulă, rezultă într-un efect sinergic. Uleiurile de orez și de zmeură libere au fost supuse aceluiași proces de iradiere și s-a observat că sunt instabile (fig. 14). Astfel, prezența uleiurilor vegetale nu ajută la îmbunătățirea stabilității cremelor, dar joacă un rol important în creșterea proprietăților de blocare a radiațiilor UVA și UVB.

1           **Studiul eliberării *in vitro* a BMDBM și OCT din NLC.** Profilul eliberării ambelor filtre  
2 UVA și UVB prezintă o importanță deosebită pentru domeniul cosmetic. Deoarece filtrele UV  
3 prezintă un potențial pericol pentru sănătatea oamenilor este important ca o cantitate cât mai  
4 mică din acești compuși să penetreze pielea și să ajungă în sistemul sanguin. Astfel, au fost  
5 selectate două probe de NLC, cele cu proprietățile fotoprotectoare cele mai bune (NLC 3  
6 preparat cu UO și NLC 9 preparat cu UZ), pentru a fi supuse experimentelor de eliberare  
7 *in vitro*. Pentru scop comparativ au fost preparate două nanoemulsii (NE) pe bază de UO și,  
8 respectiv, de UZ. Profilele de eliberare *in vitro* ale BMDBM și OCT din aceste probe sunt  
9 prezentate în fig. 14a și b. Profilele eliberării BMDBM (fig. 14a) au arătat o eliberare rapidă  
10 în prima oră, urmată de o eliberare lentă pentru următoarele 7 h și 8 h. După eliberarea  
11 susținută s-a obținut un platou al eliberării, probabil datorită solubilității scăzute a BMDBM  
12 în soluția de 30% etanol în tampon fosfat salin. OCT prezintă, de asemenea, o eliberare  
13 rapidă în prima oră, urmată de o eliberare lentă pentru următoarele 24 h. Procentul scăzut  
14 al eliberării filtrelor UV din nanotransportori în prima oră a experimentului este asociat cu  
15 prezența filtrelor UV la suprafața nanoparticulei, în stratul de surfactanți. Aceste valori ale  
16 eliberării inițiale a filtrelor UV din nanotransportorii lipidici sunt bine corelate cu rezultatele  
17 anterioare ale eficienței încărcării. NLC obținute pe baza uleiurilor vegetale prezintă modelul  
18 de încorporare „înveliș îmbogățit cu substanță activă” datorită temperaturii ridicate din timpul  
19 procesului de emulsionare în fază topită, urmată de temperatura joasă din timpul fazei de  
20 răcire folosite la prepararea NLC. Această eliberare bruscă a substanței active din  
21 nanoparticule lipidice obținute la temperatură înaltă a fost confirmată de numeroase studii.  
22 Pentru NE, eliberarea bruscă poate fi explicată prin transferul de masă a filtrelor UV care se  
23 realizează mai rapid în mediu lichid față de în cel solid. Eliberarea OCT (12...19%) din  
24 nanoparticulele lipidice se realizează mai rapid comparativ cu BMDBM (1,4...3,9%). Acest  
25 lucru poate fi atribuit următoarelor considerații (i) OCT este mai solubil în mediul de eliberare  
26 față de BMDBM; (ii) eliberarea BMDBM este restricționată de structura sa moleculară mare.

27           Pentru a obține modelul cinetic care corespunde cel mai bine modului de eliberare  
28 *in vitro* al filtrelor UV din nanoparticulele lipidice dezvoltate, au fost testate cinci ecuații  
29 matematice, incluzând ecuația cinetică de ordin zero, și de ordin unu, Higuchi, Peppas-  
30 Korsmeyer și Hixon-Crowell. În acest sens, au fost utilizate rezultatele eliberării pornind de  
31 la 1 h, pentru a exclude efectul inițial de eliberare bruscă. Coeficientul de corelație ( $R^2$ ),  
32 constanta de eliberare ( $k$ ) și exponentul de eliberare ( $n$ ) a BMDBM eliberat din NLC și din  
33 NE, în cele 7 h, respectiv 8 h, sunt prezentate în tabelul 3. Parametrii cinetici ai eliberării  
34 OCT în cele 24 h sunt prezentați în tabelul 4. Rezultatele se potrivesc cel mai bine cu  
35 modelul Higuchi pentru eliberarea BMDBM și cu modelul Peppas-Korsmeyer ( $n < 0,5$ ) pentru  
36 eliberarea OCT. Ambele modele de eliberare descriu un proces de difuzie după legea lui  
37 Fick. Mai mult, valorile mici ale constantelor de eliberare ale BMDBM ( $k_2 = 0,71$  și  $k_2 = 0,93$   
38 pentru NLC 3, respectiv NLC 9) și OCT ( $k_3 = 11,33$  și  $k_3 = 12,62$  pentru NLC 3, respectiv  
39 NLC 9) din NLC sugerează o încapsulare omogenă a filtrelor UV în sistem. Constantele de  
40 eliberare ale filtrelor UV din NE sunt ușor mai mari comparativ cu cele din NLC, sugerând  
41 faptul că matricea lipidică solidă a NLC oferă o mai bună încapsulare a filtrelor UV.  
42 Eliberarea mai rapidă a filtrelor UV din NLC preparate cu UZ față de NLC preparate cu UO  
43 este corelată cu structura mai ordonată a matricei lipidice a NLC cu UZ, ceea ce rezultă într-  
44 o expulzare mai rapidă a BMDBM și OCT din nanoparticulele lipidice. Principalul avantaj al  
45 acestui studiu îl constituie acomodarea unei cantități mari de compuși cu proprietăți  
46 fotoprotectoare, atât naturali, cât și sintetici, co-încapsulați înăuntrul formulărilor de tip NLC.  
47 Acest lucru conduce la îmbunătățirea semnificativă a efectului fotoprotector asociat cu  
reducerea efectelor adverse ale filtrelor sintetice libere, BMDBM și OCT.

# RO 130098 B1

## Revendicări

1. Nanoparticule lipidice încărcate cu butilmetoxidibenzoilmetan și octocrilen pe bază de uleiuri vegetale, ce încapsulează două categorii de filtre de protecție solară cu proprietăți fotoprotectoare și antioxidante, **caracterizate prin aceea că** vor cuprinde:
  - a. 7%, 14% sau 21% ulei din tărâțe de orez sau ulei din semințe de zmeură dintr-o matrice înalt dezordonată, formată prin utilizarea unui amestec complex de lipide solide și lichide;
  - b. 7% substanțe active totale de natură hidrofobă din care: 5% și 2%, 3,5% și 3,5% sau 2% și 5% butilmetoxidibenzoilmetan, respectiv octocrilen, încapsulate în rețeaua lipidică astfel formată, procentele fiind exprimate în greutate.
2. Nanoparticule lipidice conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** sunt de formă sferică și au un diametru mediu cuprins între 113,7...136,7 nm, în cazul utilizării uleiului din tărâțe de orez, și între 105,6...124,4 nm, în cazul utilizării uleiului din semințe de zmeură.
3. Nanoparticule lipidice conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** prezintă o polidispersitate ce variază între 0,161...0,185, în cazul utilizării uleiului din tărâțe de orez, și între 0,152...0,179, în cazul utilizării uleiului din semințe de zmeură.
4. Nanoparticule lipidice conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** prezintă valori ale potențialului electrocinetic ce variază între -25,5...-29,0 mV, în cazul utilizării uleiului din tărâțe de orez, și între -26,8...-32,4 mV, în cazul utilizării uleiului din semințe de zmeură.
5. Nanoparticule lipidice conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** prezintă valori ale eficienței încărcării octocrilenului ce variază între 87...90%, în cazul utilizării uleiului din tărâțe de orez, și între 72...80%, în cazul utilizării uleiului din semințe de zmeură.
6. Nanoparticule lipidice conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** prezintă valori ale eficienței încărcării butil-metoxidibenzoilmetanului ce variază între 72...79%, în cazul utilizării uleiului din tărâțe de orez, și între 70...79%, în cazul utilizării uleiului din semințe de zmeură.
7. Nanoparticule lipidice conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** au abilitatea de a capta între 73...83% din radicalii liberi oxigenați formați în sistemul de chemiluminescență, în cazul utilizării uleiului din tărâțe de orez, respectiv între 72...81%, în cazul utilizării uleiului din semințe de zmeură.
8. Formulări cosmetice pe bază de cremă ce conțin nanoparticule lipidice încărcate cu butilmetoxi-dibenzoilmetan și octocrilen, **caracterizate prin aceea că** vor cuprinde:
  - a. 3,5%, 7% sau 10,5% ulei din tărâțe de orez sau ulei din semințe de zmeură;
  - b. 3,5% substanțe active totale de natură hidrofobă din care: 2,5%, 1,75% sau 1% butilmetoxidibenzoilmetan, respectiv 1%, 1,75% sau 2,5% octocrilen, procentele fiind exprimate în greutate.
9. Formulări cosmetice conform revendicării 7, ce conțin nanoparticulele lipidice pe baza de ulei din tărâțe de orez definite în revendicarea 1, **caracterizate prin aceea că** prezintă proprietăți fotoprotectoare amplificate, cu o valoare a factorului de protecție solară în domeniul UVB cuprinsă între 8,3...17,3 și o valoare a factorului de protecție solară în domeniul UVA cuprinsă între 13,3...40,2.
10. Formulări cosmetice conform revendicării 1, ce conțin nanoparticulele lipidice pe bază de ulei din semințe de zmeură definite în revendicarea 1, **caracterizate prin aceea că** prezintă proprietăți fotoprotectoare amplificate, cu o valoare a factorului de protecție solară în domeniul UVB cuprinsă între 6,7...13 și o valoare a factorului de protecție solară în domeniul UVA cuprinsă între 10,9...34,9.
11. Formulări cosmetice conținând 10,5% ulei vegetal conform revendicării 7, **caracterizate prin aceea că** nu prezintă o scădere a proprietăților fotoprotectoare după ce au fost supuse unor etape de iradiere fotochimică.

# RO 130098 B1

(51) Int.Cl.

**A61K 8/11** (2006.01),  
**A61Q 17/04** (2006.01),  
**A61K 8/04** (2006.01),  
**A61K 8/92** (2006.01)

Lista tabelelor și a figurilor

Tabelul 1

*Compoziția butil-metoxidibenzoilmetan-octocrien-NLC pe baza de ulei vegetal*

Proba *		NLC 1	NLC 2	NLC 3	NLC 4	NLC 5	NLC 6	NLC 7	NLC 8	NLC 9	NLC 10	NLC11	NLC 12
Compoziția dispersiilor de NLC **	BMDBM%	0,7	0,7	0,7	0,5	0,3	-	0,7	0,7	0,7	0,5	0,3	-
	OCT %	0,3	0,3	0,3	0,5	0,7	-	0,3	0,3	0,3	0,5	0,7	-
	Ulei vegetal %	1,0	2,0	3,0	3,0	3,0	3,0	1,0	2,0	3,0	3,0	3,0	3,0

\* Probele NLC 1+6 sunt preparate cu ulei din tărâțe de orez, iar probele NLC 7+12 sunt preparate cu ulei din semințe de zmeură; \*\* NLC sunt preparate cu 10% (m/m) amestec lipidic din care cantitatea de ulei vegetal variază, Em:PC:UO/UZ cu diferite raporte: 1,63:0,7:1; 2,8:1,2:1 și 6,3:2,7:1.

Tabelul 2

*Entalpia, maximul punctului de topire și indicele de cristalinitate (IC %) ale NLC determinate prin calorimetrie de scanare diferențială (DSC)*

Proba	Amestec fizic UO	NLC 3	NLC 4	NLC 5	NLC 6	Amestec fizic UZ	NLC 9	NLC 10	NLC 11	NLC 12
Entalpia (J/g)	140,0	82,6	85,2	86,0	108,3	122,5	86,3	96,1	96,4	97,6
Punct topire (°C)	47,2	45,8	46,4	46,2	47,2	47,4	46,9	46,1	47,1	46,9
IC (%)	100,0	64,9	66,9	67,6	85,1	100,0	77,5	86,4	86,6	87,7

Tabelul 3

*Parametrii cinetici ai eliberării BMDBM din NLC în dispersie*

BMDBM	Ordin zero		Ordin unu		Higuchi		Peppas-Korsmeyer			Hixon-Crowell	
	R <sup>2</sup>	k <sub>0</sub>	R <sup>2</sup>	k <sub>1</sub>	R <sup>2</sup>	k <sub>2</sub>	R <sup>2</sup>	k <sub>3</sub>	n	R <sup>2</sup>	k <sub>4</sub>
NE-UO	0,9871	0,289	0,9876	0,0013	0,9912	1,13	0,9819	2,28	0,31	0,9582	0,0058
NLC 3-UO	0,9928	0,192	0,9928	0,0009	0,9968	0,71	0,9622	2,46	0,20	0,9962	0,0031
NE-UZ	0,9855	0,342	0,9860	0,0015	0,9886	1,34	0,9702	2,47	0,48	0,9858	0,0054
NLC 9-UZ	0,9876	0,252	0,9880	0,0011	0,9946	0,93	0,9894	1,57	0,35	0,9879	0,0040

Tabelul 4

*Parametrii cinetici ai eliberării BMDBM din NLC în dispersie*

OCT	Ordin zero		Ordin unu		Higuchi		Peppas-Korsmeyer			Hixon-Crowell	
	R <sup>2</sup>	k <sub>0</sub>	R <sup>2</sup>	k <sub>1</sub>	R <sup>2</sup>	k <sub>2</sub>	R <sup>2</sup>	k <sub>3</sub>	n	R <sup>2</sup>	k <sub>4</sub>
NE-UO	0,8572	0,857	0,8647	0,0011	0,9696	1,37	0,9870	13,08	0,11	0,8622	0,0037
NLC 3-UO	0,8164	0,816	0,8252	0,0011	0,9494	1,43	0,9940	11,33	0,13	0,8223	0,0037
NE-UZ	0,8556	0,112	0,8602	0,0006	0,9696	0,73	0,9903	16,98	0,05	0,8587	0,0020
NLC 9-UZ	0,7458	0,746	0,7542	0,0010	0,9073	1,28	0,9863	12,62	0,11	0,7035	0,0032



(51) Int.Cl.

A61K 8/11 (2006.01);  
A61Q 17/04 (2006.01);  
A61K 8/04 (2006.01);  
A61K 8/92 (2006.01)

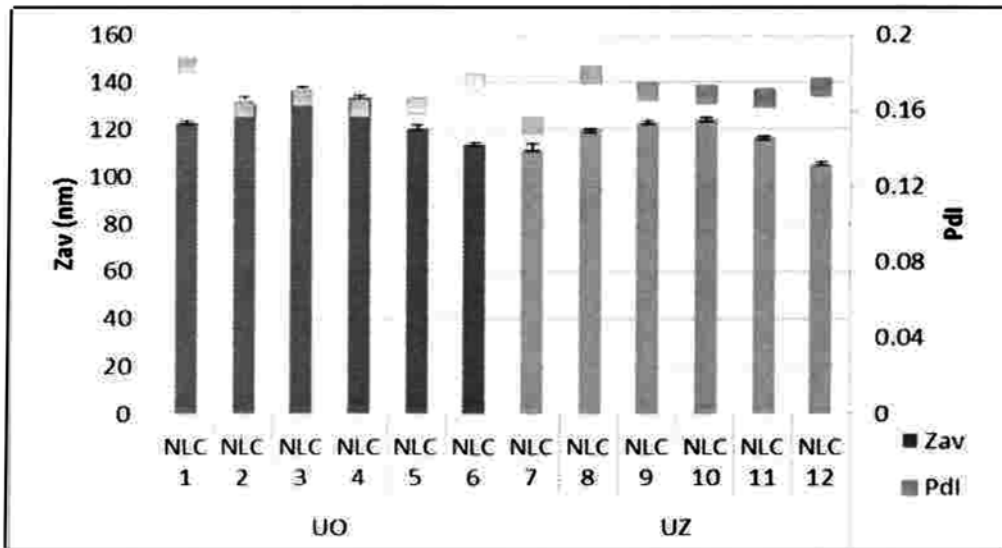


Fig. 1

(51) Int.Cl.

**A61K 8/11** (2006.01);  
**A61Q 17/04** (2006.01);  
**A61K 8/04** (2006.01);  
**A61K 8/92** (2006.01)

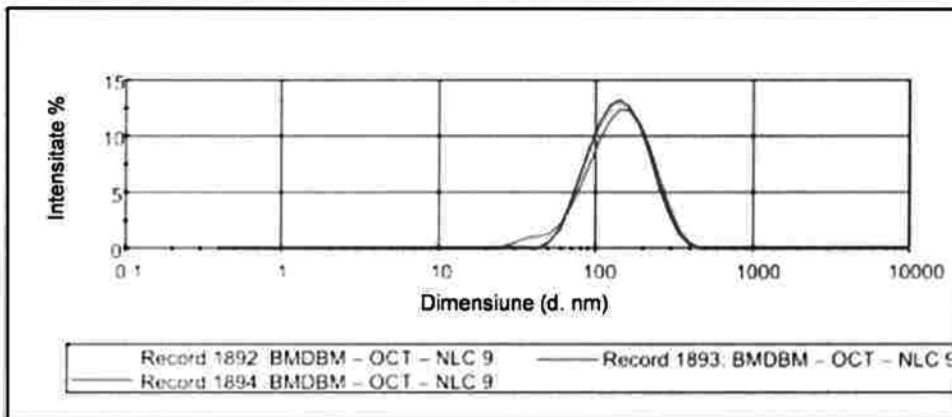
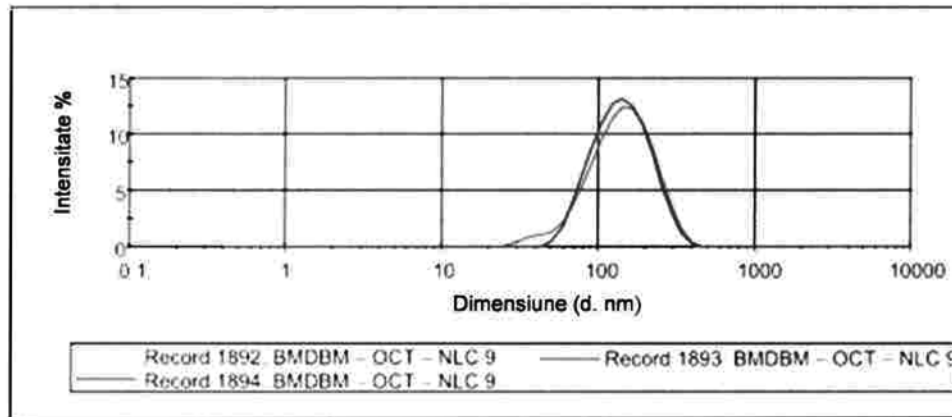


Fig. 2

(51) Int.Cl.

**A61K 8/11** (2006.01);  
**A61Q 17/04** (2006.01);  
**A61K 8/04** (2006.01);  
**A61K 8/92** (2006.01)

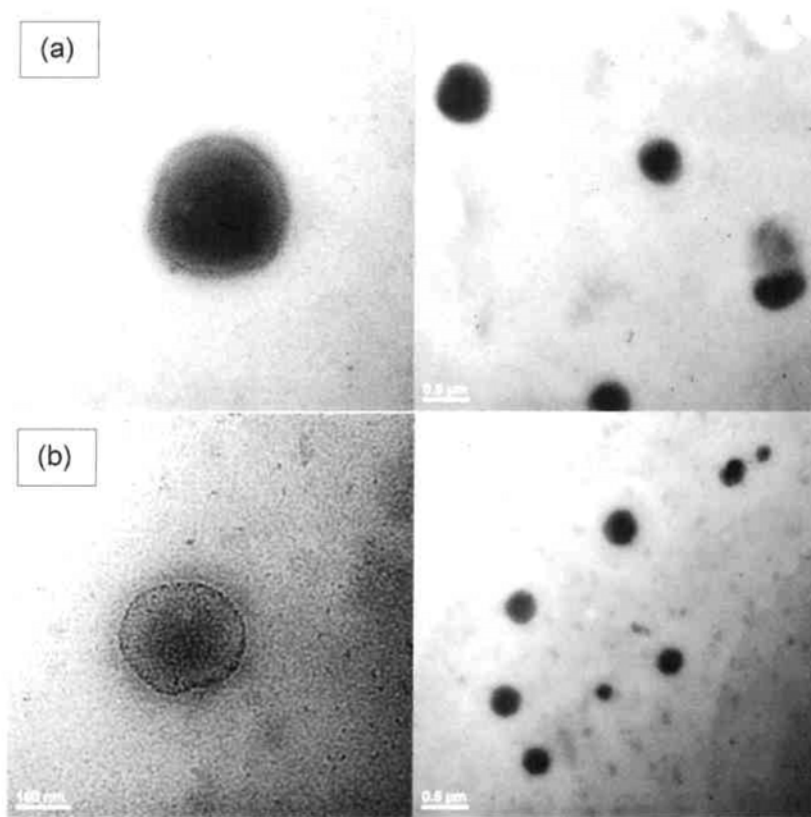


Fig. 3

(51) Int.Cl.

**A61K 8/11** (2006.01);  
**A61Q 17/04** (2006.01);  
**A61K 8/04** (2006.01);  
**A61K 8/92** (2006.01)

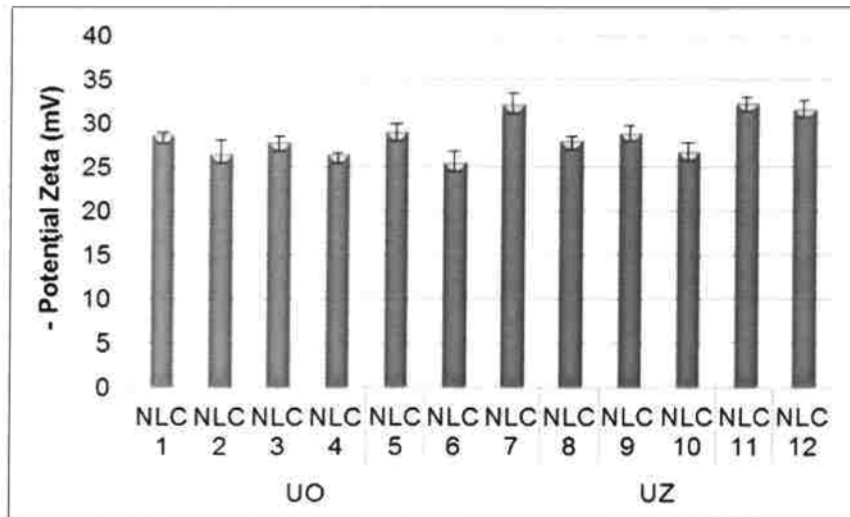


Fig. 4

(51) Int.Cl.

**A61K 8/11** (2006.01);  
**A61Q 17/04** (2006.01);  
**A61K 8/04** (2006.01);  
**A61K 8/92** (2006.01)

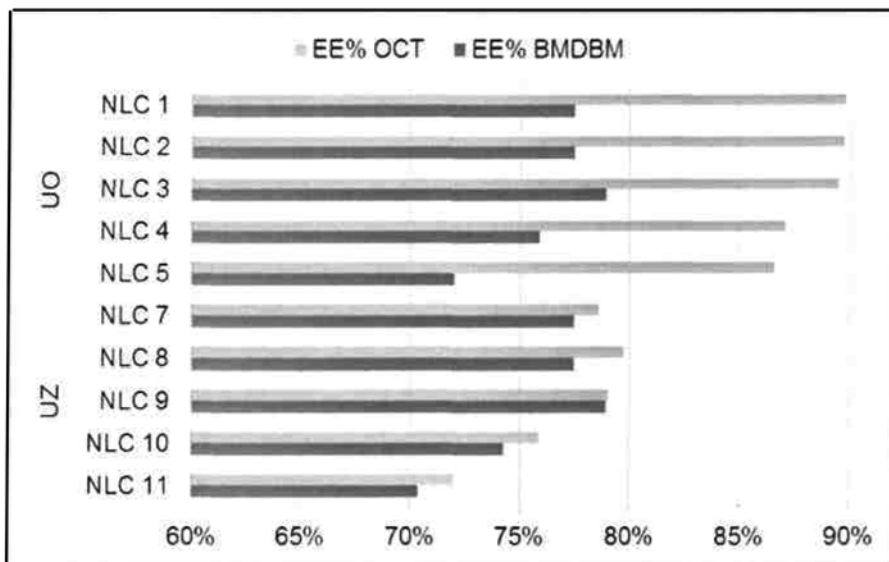


Fig. 5

(51) Int.Cl.

**A61K 8/11** (2006.01);  
**A61Q 17/04** (2006.01);  
**A61K 8/04** (2006.01);  
**A61K 8/92** (2006.01)

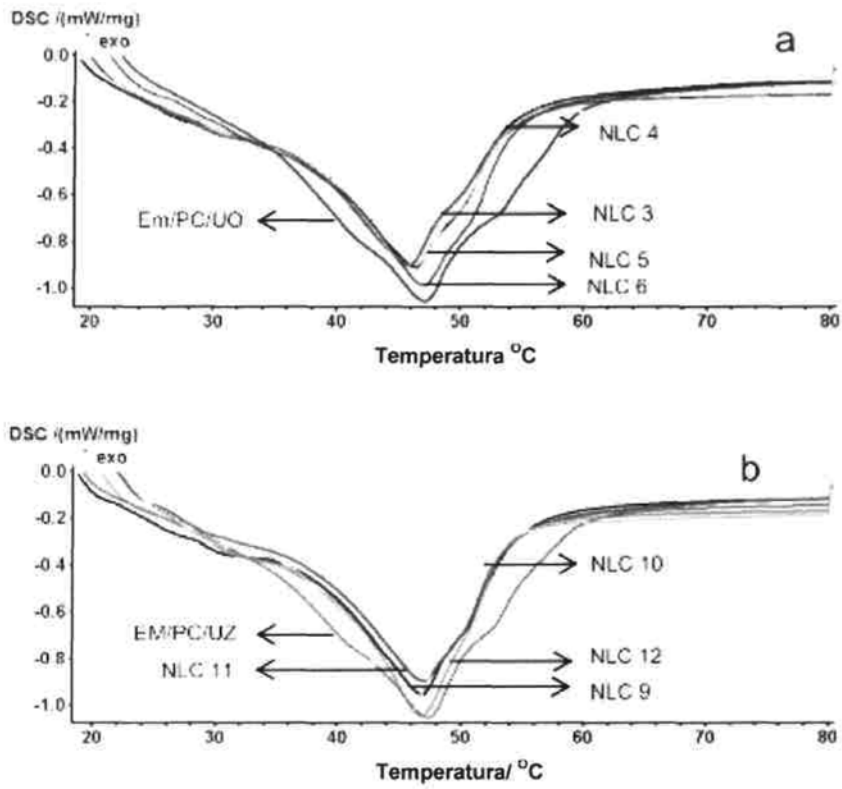


Fig. 6

(51) Int.Cl.

**A61K 8/11** (2006.01);  
**A61Q 17/04** (2006.01);  
**A61K 8/04** (2006.01);  
**A61K 8/92** (2006.01)

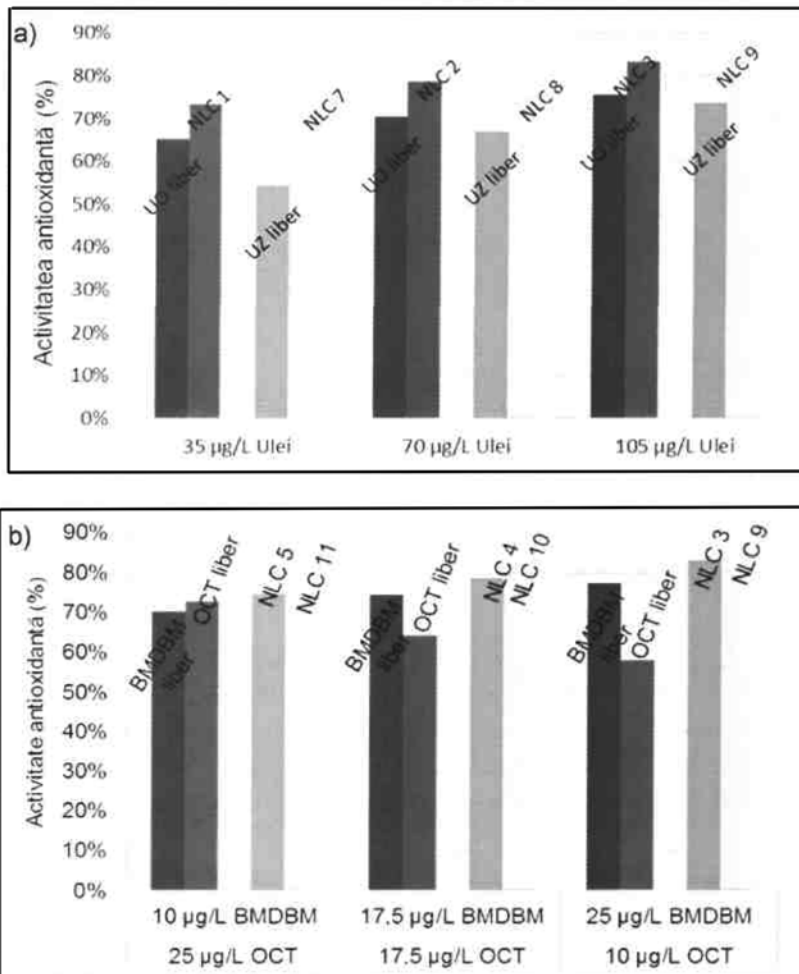


Fig. 7

(51) Int.Cl.

**A61K 8/11** (2006.01);  
**A61Q 17/04** (2006.01);  
**A61K 8/04** (2006.01);  
**A61K 8/92** (2006.01)

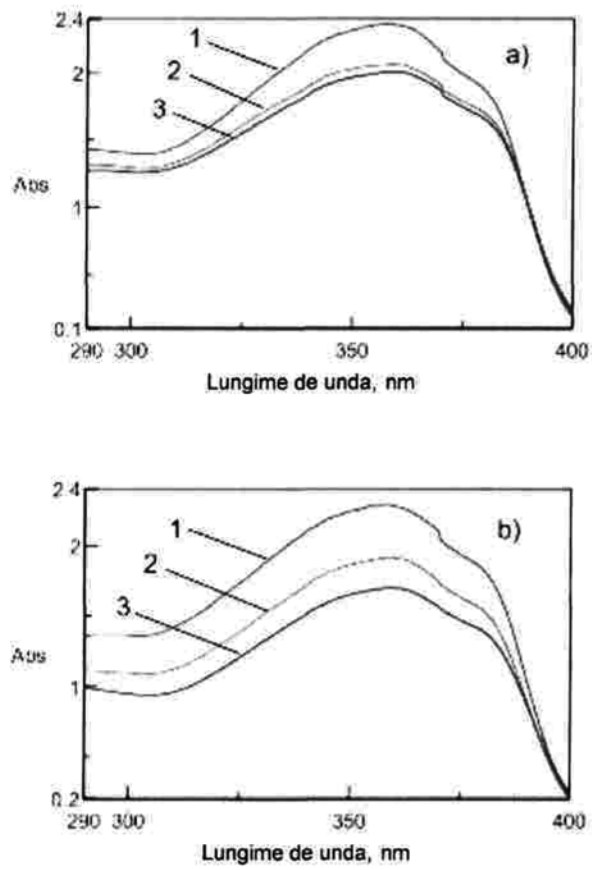


Fig. 8



(51) Int.Cl.

**A61K 8/11** (2006.01);  
**A61Q 17/04** (2006.01);  
**A61K 8/04** (2006.01);  
**A61K 8/92** (2006.01)

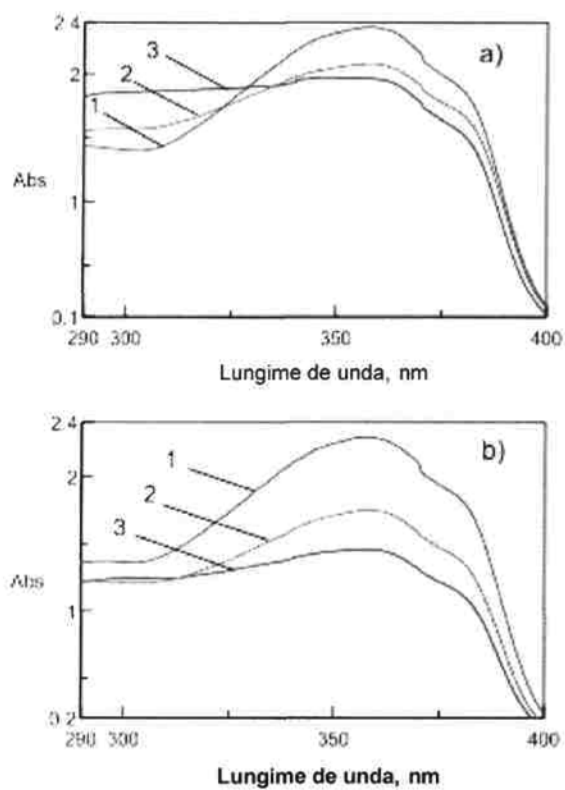


Fig. 9

(51) Int.Cl.  
**A61K 8/11** (2006.01);  
**A61Q 17/04** (2006.01);  
**A61K 8/04** (2006.01);  
**A61K 8/92** (2006.01)

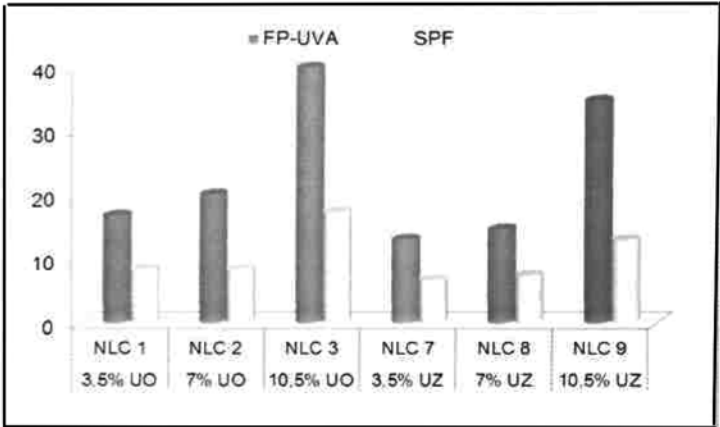


Fig. 10

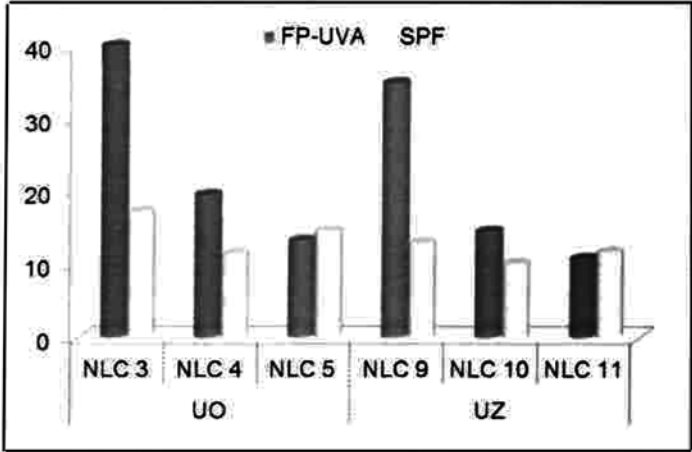
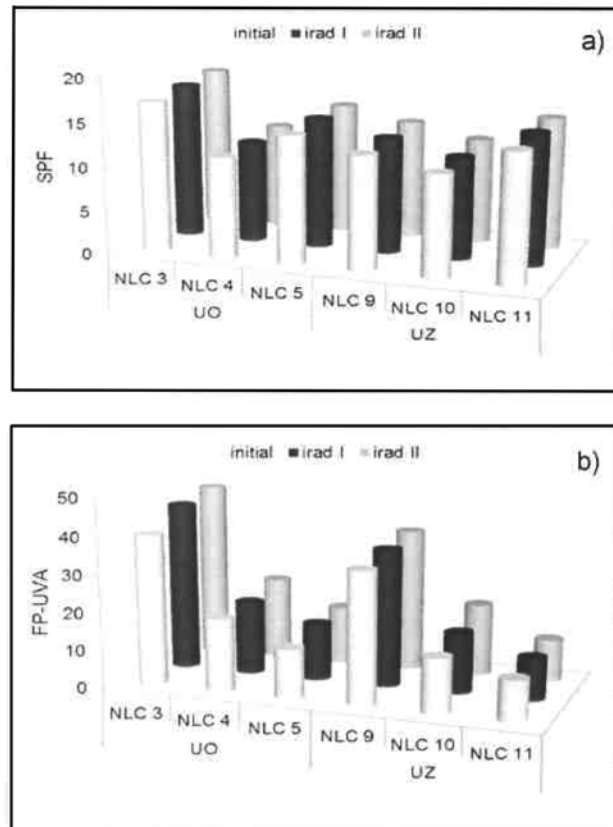


Fig. 11

(51) Int.Cl.

**A61K 8/11** (2006.01);  
**A61Q 17/04** (2006.01);  
**A61K 8/04** (2006.01);  
**A61K 8/92** (2006.01)



**Fig. 12**

(51) Int.Cl.

**A61K 8/11** (2006.01);  
**A61Q 17/04** (2006.01);  
**A61K 8/04** (2006.01);  
**A61K 8/92** (2006.01)

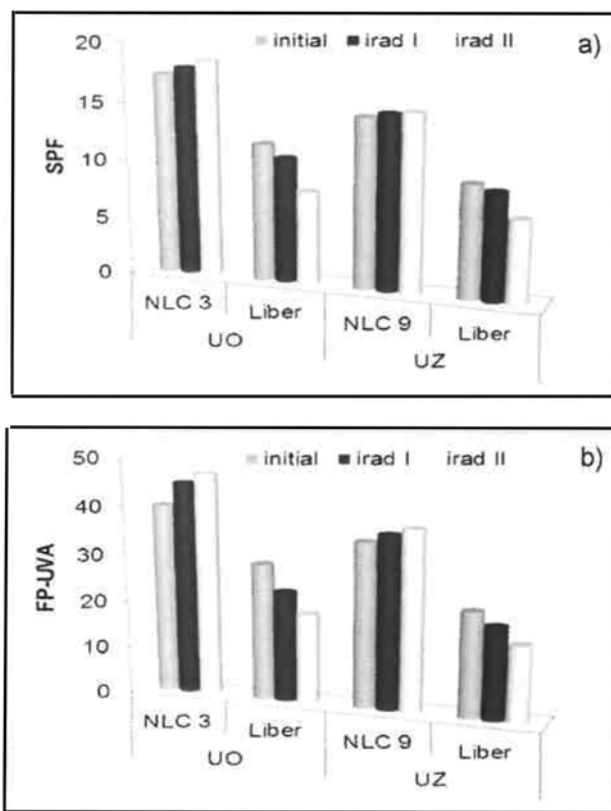


Fig. 13

(51) Int.Cl.

**A61K 8/11** (2006.01);  
**A61Q 17/04** (2006.01);  
**A61K 8/04** (2006.01);  
**A61K 8/92** (2006.01)

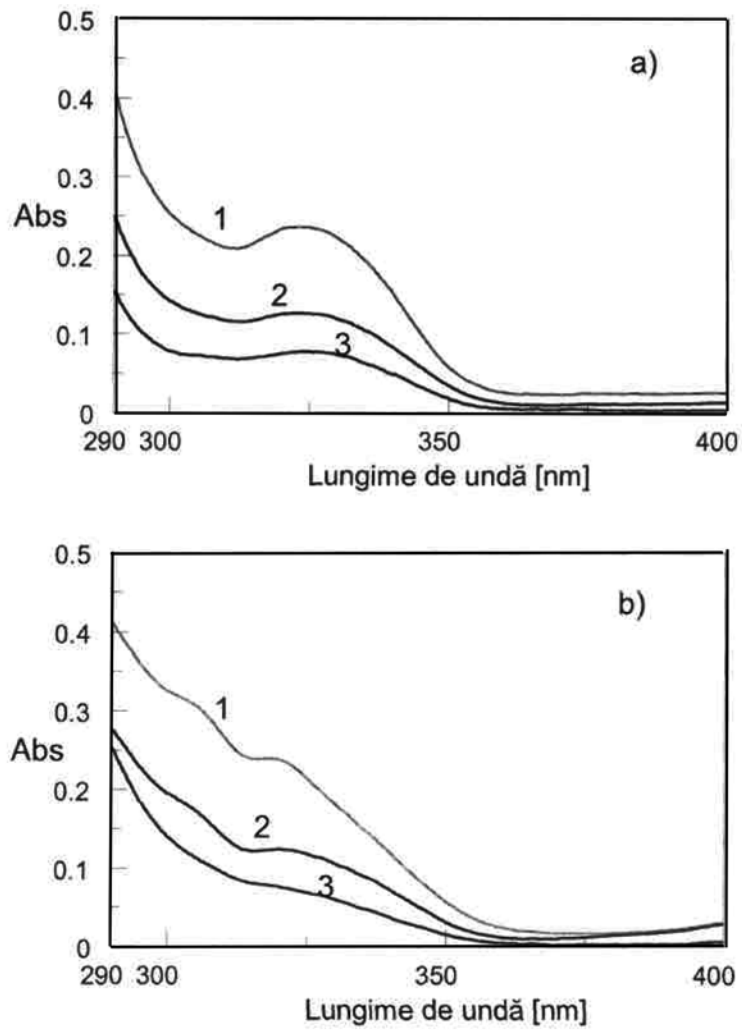


Fig. 14

(51) Int.Cl.

**A61K 8/11** (2006.01);  
**A61Q 17/04** (2006.01);  
**A61K 8/04** (2006.01);  
**A61K 8/92** (2006.01)

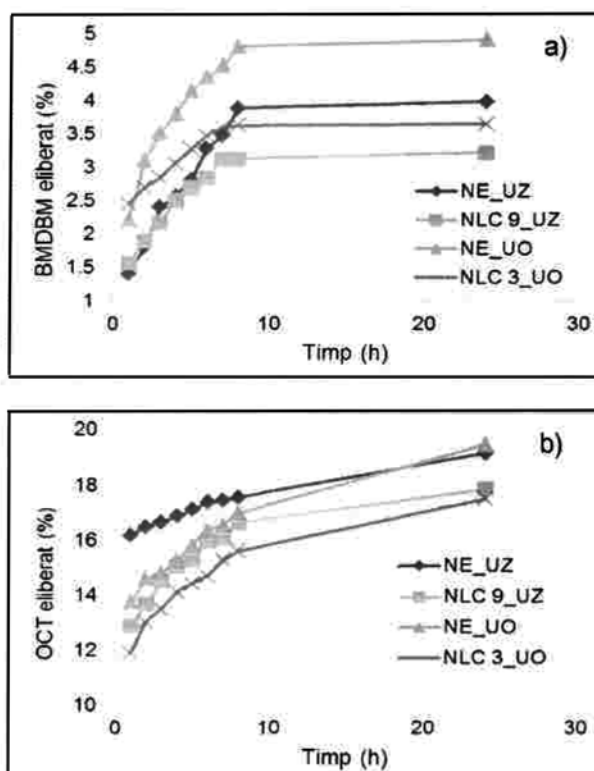


Fig. 15



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
 Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
 sub comanda nr. 534/2018