



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2013 00582

(22) Data de depozit: 05.08.2013

(41) Data publicării cererii:
30.03.2015 BOPI nr. 3/2015

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA POLITEHNICĂ DIN
BUCUREȘTI, CENTRUL DE CERCETĂRI
PENTRU PROTECȚIA MEDIULUI ȘI
TEHNOLOGII ECOLOGICE, STR. POLIZU
NR. 1, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• NICULAE GABRIELA, ȘOS. ALEXANDRIA
NR. 19, BL. 30, AP. 72, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;

• 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;
• 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

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

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor nanoparticule lipidice antioxidante, cu proprietăți fotoprotectoare, utilizate în industria cosmetică. Procedeu conform invenției cuprinde contactarea unei faze apoase și a unei faze lipidice la o temperatură de 82...85°C, și menținerea la regim de temperatură constantă, timp de 1 h; emulsia formată este supusă omogenizării cu grad ridicat de forfecare la 25000 rpm, timp de 10 min, urmată de răcirea sub agitare

magnetică, la temperatura camerei, rezultând dispersii apoase de nanotransportori lipidici liberi și încărcăți cu filtre UV, care se supun unui proces de liofilizare, la temperatura de -55°C, timp de 72 h, din care rezultă nanoparticule lipidice în formă solidă, având proprietăți fotoprotectoare.

Revendicări: 16
Figuri: 15



NANOTRANSPORTORI LIPIDICI PE BAZĂ DE ULEIURI VEGETALE CU PROPRIETĂȚI FOTOPROTECTOARE ȘI ANTIOXIDANTE

DESCRIERE

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 filtrelor UV cu aplicații în domeniul cosmetic, și anume în fotoprotecție.

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 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.

Filtrele moleculare sunt compuși organici care asigură protecția prin absorbția selectivă a radiațiilor UV. Majoritatea compușilor care pot acționa ca filtre solare sunt 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.

Multe formulări cosmetice conținând filtre moleculare prezintă însă numeroase dezavantaje precum lipsa protecției pe ambele domenii UVA și UVB, toxicitate, penetrarea 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). 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 acumulează în lanțul trofic, contaminând astfel mediul înconjurător.

Din categoria filtrelor UV organice instabile face parte și butil-metoxidibenzoilmetanul (BMDBM) care absoarbe în UVA la λ_{max} între 350 și 365 nm (GJ Mturi, BS Martincigh, J. Photochem. Photobiol. A, 200: 410-420, 2008). BMDBM există în două forme tautomere – 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 ușor fotoinactivat și supus foto-fragmentării, formând fie produși de reacție care nu prezintă proprietăți de absorbție în UV, fie fragmente și intermediari reactivi (RK Chaudhuri et. al., Photochem. Photobiol., 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 denaturarea ADN și în peroxidarea lipidelor. În plus, BMDBM este utilizat în combinații deoarece singur, în concentrațiile maxim admise de legislație, 5% în Europa și 3% în SUA (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 formulărilor cosmetice care îl conține, rezultând produși de fotodegradare toxici.

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

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 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 6312673 B2/2001), compuși pe baza de siliciu (US 5951968 A/1999, US 20010026789 A1/2001), derivați de benziliden camfor (US 5004594/1991), bemotrizinol (EP 1280505 B1/2007), benzoati substituiți cu radicali aril și alchil (EP 1618870 B1/2012), derivați de cianoacetat (US 20130064871 A1/2013), antioxidanți sintetici și naturali din extracte de plante (US 6602515/2003; US 6831191/2004; US 66994637/2004).

Printre substanțele studiate cu rol de fotostabilizator al BMDDBM se numără și octocrienu (OCT), un filtru UVB folosit pe scară largă în formulările fotoprotectoare datorită fotostabilității lui și a proprietăților non-iritante și non-sensibilizante. 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 Bennassar et. al., Dermatology Online Journal, 15(12):14, 2009).

În US 7186404 B2/2007, AD 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, anti-inflamatoare 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 astfel, formularea cosmetică care le conține își pastrează 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 (etilhexilmetoxcinamat, octocrlen 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 astfel 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 González 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.

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

Prepararea unor formulări fotoprotectoare conținând nanoparticule lipidice pe bază de uleiuri vegetale cu proprietăți antioxidante și fotoprotectoare, de tipul uleiului din tărâțe de orez sau a uleiului din semințe de zmeură, cu rol de nanotransportori lipidici ai filtrelor UV, butil-

metoxidibenzoilmetan și octocriren, poate determina o îmbunătățire a proprietăților fotoprotectoare ale produsului final și siguranță în utilizarea acestuia pe piele.

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

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 ω -6 și ω -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 γ -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 β -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.

II. Problema tehnică pe care o rezolvă procedeul conform invenției constă în obținerea unor nanoparticule lipidice cu proprietăți antioxidante și fotoprotectoare amplificate. 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 de emulgade 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 îmbogățită cu o concentrație de 10% componente active de natură hidrofobă, butil-metoxidibenzoilmetan (BMDBM) și octocriken (OCT), în diferite rapoarte de greutate (7 : 3 sau 1 : 1 sau 3 : 7);

- b) 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;
- c) formarea unei pre-emulsii lipidice – precursorare de nanoparticule lipidice solide – prin contactarea sub agitare magnetică a celor doua faze, apoasă și lipidică, și menținere la un regim de temperatură constant de 85°C timp de 1h;
- d) formarea unor dispersii apoase de nanotransportori lipidici încărcăți cu filtre moleculare, prin supunerea pre-emulsiei lipidice la o energie mecanică externă, aplicând o omogenizare cu grad înalt de forfecare de 25 000 rpm, timp de 10 min, urmată de răcirea ușoară, sub agitare magnetică, la temperatură camerei;
- e) obținerea de nanotransportori lipidici în formă solidă prin supunerea nanodispersiilor apoase unei etape de liofilizare la -55°C timp de 72h.

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

1. 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 naturale ce imprimă un caracter antioxidant specific întregului transportor lipidic;
2. 7% substanțe active (reprezentand 5% și 2% sau 3,5% și 3,5% sau 2% și 5% butil-metoxidibenzoilmetan, respectiv octocriken) încapsulate în rețeaua lipidică astfel formată, procentele fiind exprimate în greutate.

III. Invenția prezintă următoarele avantaje:

- 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 agresive (ex: solvenți organici sau surfactanți periculoși).
- Procedul 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 a acestuia, ci mai mult îi intensifică proprietățile.
- 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;
 - b. protejează, prin virtutea proprietăților sale antioxidante, compușii chimici fotosensibili, cum este cazul butil-metoxidibenzoilmetanului;
 - c. vine cu proprietăți biologice specifice și ca atare un important potențial terapeutic de natura să îmbunătățească sănătatea publică;
 - d. vine cu proprietăți fotoprotectoare, în completare la cele ale substanțelor active selectate pentru încapsulare.
- Prin acest procedeu se formează o rețea lipidică înalt dezordonată, fapt ce conduce la încapsularea unor concentrații ridicate de substanță activă, datorită imperfecțiunilor/ 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 tărâțe de orez sau ulei din semințe de zmeură ce manifestă proprietăți antioxidante și fotoprotectoare amplificate.
 - Particulele lipidice, îmbogățite cu filtrele UV butil-metoxidibenzoilmetan și octocrlen, obținute prin procedeu propus pot fi utilizate sub ambele forme – ca dispersii apoase sau sub formă de produs solid – pentru dezvoltarea unor formulări cosmetice ce prezintă proprietăți specifice.

IV. Procedeu 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 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 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 polisorbate 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 1h, 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 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 fotoprotectoare amplificate.

În cazul prezentei invenții, 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:

- a. Nanomatrici lipidice libere (fără conținut de component activ), formate prin combinarea a doua 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).
- b. Nanomatrici lipidice îmbogățite cu concentrații variabile de două componente hidrofobe (butil-metoxidibenzoilmetan – filtru UVA, octocriolen – filtru UVB), formate prin combinarea aceluiași lipide solide biocompatibile cu lipidele lichide naturale, acestea jucând rolul de transportor lipidic nanostructurat (NLC) pentru filtrele UV.

Etapele de obținere a nanomatricei lipidice îmbogățită cu două componente hidrofobe, sunt:

- 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);
- adăugarea în topitura lipidică a unor concentrații diferite de filtre UV: 7% BMDBM și 3% OCT; 5% BMDBM și 5% OCT, 3% BMDBM și 7% OCT.

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

Tabelul 1 – Compoziția butil-metoxidibenzoilmetan – octocriolen – NLC pe bază de ulei vegetal

Tabelul 2 – Entalpia, maximul punctului de topire și indicele de cristalinitate (IC %) ale NLC evaluate cu ajutorul calorimetriei de scanare diferențială (DSC)

Tabelul 3 – Parametrii cinetici ai eliberării BMDBM din NLC în dispersie

Tabelul 4 – Parametrii cinetici ai eliberării OCT din NLC în dispersie

Figura 1 – Dimensiunea nanostructurilor lipidice determinată prin tehnica împrăștierei dinamice a luminii (DLS)

Figura 2 – Distribuția dimensiunii particulelor lipidice de tip BMDBM – OCT – NLC preparate cu a. ulei din tărâțe de orez și b. ulei din semințe de zmeură

Figura 3 – Microscopia de transmisie electronică a probelor de BMDBM – OCT – NLC preparate cu a. ulei din tărâțe de orez și b. ulei din semințe de zmeură

Figura 4 – Evaluarea stabilității probelor de BMDBM – OCT – NLC pe baza potențialului electrocinetic

Figura 5 – Eficiență încărcării (%) BMDBM și OCT în dispersiile de NLC

Figura 6 – Curbele DSC pentru BMDBM – 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

Figura 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 funcție de a. concentrația uleiului vegetal; b. concentrația filtrelor UV BMDBM și OCT

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

Figura 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) 5% BMDBM și 2% OCT; (2) 3,5% BMDBM și 3,5% OCT; (3) 2% BMDBM și 5% OCT

Figura 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

Figura 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% 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

Figura 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 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

Figura 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

Figura 14 – Spectrele de absorbție UV ale uleiurilor vegetale a. ulei din tărâțe de orez și b. ulei din semințe de zmeură expuse la doua etape de iradiere: (1) inițial; (2) după etapa I; (3) după etapa II

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

Exemplul 1. 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 faza apoasă compusă dintr-un amestec de surfactanți neionic și ionic și un co-surfactant, într-un raport de greutate polisorbit 20 : lecitină : copolimer polietilenglicol-polipropilenglicol de 4,66 : 1 : 1 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. 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 temperatură constant, timp de 1h. Pre-emulsia fierbinte rezultată se supune ulterior unei energii mecanice externe prin omogenizare cu grad înalt de forfecare, aplicând 25000 rpm timp de 10 minute, după care se lasă să se răcească lent la temperatură camerei cu formarea unei dispersii de nanoparticule lipidice libere – NLC (fără conținut de componentă activă). Pentru eliminarea excesului de apă și obținerea nanoparticulelor lipidice în formă solidă, dispersiile de NLC 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 butil-metoxidibenzoilmetan și octocrilen, ce corespund unor concentrații de 7% și 3% sau 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 tărâțe 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 tărâțe 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 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 (figura 1) și o stabilitate excelentă a particulelor lipidice aflate în suspensie apoasă, reflectată prin valorile potențialului electrocinetic. Figura 2 exemplifică distribuția dimensiunii particulelor a câtorva nanodispersii BMDBM – OCT – NLC preparate cu ulei din tărâțe 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 ($0.15 \div 0.185$), cu diametre medii în jurul valorii de o sută de nanometri (figura 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. Încarcarea 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 (figura 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.

Evaluarea stabilității sistemelor butil-metoxidibenzoilmetan – octocrilen – NLC. Analiza stabilității nanodispersiilor lipidice, determinată pe baza valorilor potențialului electrocinetic, a arătat faptul că toate probele de BMDBM – OCT – NLC prezintă o stabilitate fizică bună, cu valori

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

Eficiența încărcării butil-metoxidibenzoilmetanului și a octocriolenului în NLC. Determinarea eficienței încărcării oferă informații despre rolul uleiului vegetal în formarea unui miez lipidic eficient pentru acomodarea unor cantități mari de filtre UV. Valorile eficienței încărcării (EI) BMDBM și a OCT în NLC sunt prezentate în figura 5. Dintre cele două filtre UV încărcate, OCT prezintă valori mai bune ale EI cu valori cuprinse între 72% și 90%, în timp ce valorile eficienței încărcării BMDBM au variat între 70% și 79%. Aceste diferențe pot fi asociate în primul rând cu dimensiunile nanoparticulelor obținute la DLS. Datorită structurii moleculare mari, o cantitate semnificativă de BMDBM rămâne captivă în exteriorul nanoparticulei, în stratul de surfactanți de la suprafață. Astfel, se formează nanoparticule cu dimensiuni mai mari pe măsură ce concentrația de BMDBM crește și se obțin valori mai mici ale eficienței încărcării. O mai bună eficiență a încărcării OCT comparativ cu a BMDBM poate fi explicată de caracterul mai lipofil al OCT indicat de coeficientul de partiție octanol – apă ($\log K_{oa} = 6.9$ pentru OCT și $\log K_{oa} = 6.1$ pentru BMDBM). În funcție de uleiul vegetal utilizat, se observă faptul că NLC preparate cu UO prezintă valori ale EI mai mari comparativ cu NLC preparate cu UZ (de ex: încărcarea OCT este de 89% pentru NLC 3 preparat cu UO și 79% pentru NLC 9 preparat cu UZ). Variația concentrației de ulei de la 1% la 3% utilizată la prepararea NLC influențează nesemnificativ eficiența încărcării filtrelor UV. De exemplu, în cazul OCT, NLC 1 – 3 prezintă EI de aproximativ 90%, în timp ce în cazul BMDBM, NLC 1 – 2 prezintă valori ale EI de 77% și NLC 3 de 79%. Pe de altă parte, variația raportului concentrațiilor filtrelor UV încărcate în NLC determină o creștere a EI odată cu creșterea raportului BMDBM : OCT.

Efectele tipului de ulei vegetal și a prezenței butil-metoxidibenzoilmetanului și octocriolenului asupra cristalinității lipidelor. Beneficiile nanoparticulelor lipidice solide, cum ar fi 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. Componenții matricei lipidice determină 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 amorfe 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 BMDBM – OCT – NLC a fost realizată pe baza calorimetriei de scanare diferențială (DSC). Parametrii DSC (maximul picului 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 + 47,2 °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 (figura 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 a 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.

108

- 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 ex: 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.

Evaluarea proprietăților antioxidante ale probelor de BMDBM – OCT – NLC a fost realizată prin metoda chemiluminescenței, care este o tehnică adecvată de măsurare a 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 sistem generator de radicali liberi care eliberează radicali intermediari liberi cu un bogat conținut energetic.

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 observată la concentrații mici de ulei vegetal (35 mg/mL) (figura 7 a). De exemplu, pornind de la o activitate antioxidantă moderată a soluției de 35 mg/mL UO liber (AA = 54,4%), se 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 creșterea cantității de ulei. Proprietățile antioxidante ale uleiurilor vegetale se transmit NLC corespunzătoare astfel, cele mai mari valori ale activității antioxidante se regăsesc la BMDBM – OCT – NLC preparate cu 3% UO (NLC 3 cu AA = 83,2%) și cu 3% UZ (NLC 9 cu AA = 81,2%).

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 creșterea concentrației de filtru UV (figura 7b). Astfel, NLC încărcate cu cel mai mare raport al concentrațiilor BMDBM : OCT (NLC 3 și 9) prezintă cea mai mare activitate antioxidantă.

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

Proprietățile de absorbție în UV. Determinarea in vitro a SPF și FP-UVA. Efectul 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% în liofilizat) prezintă spectre de absorbție deplasate către valori mai mari ale absorbției pentru ambele tipuri de ulei, UO (figura 8a) și UZ (figura 8b). Maximele intensităților de absorbție 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 eficiența încărcării.

Pentru probele de NLC conținând 21% UO sau UZ (figura 9a și b) și diferite rapoarte ale concentrațiilor de BMDBM : OCT, s-a observat că odată cu creșterea concentrației de OCT activitate de blocare a radiațiilor UVB se îmbunătățește pentru NLC preparate cu UO, 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 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 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 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 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 UO.

Potențialul NLC sintetizate pe bază de UO și UZ în dezvoltarea unor formulări fotoprotectoare este evaluat după încorporarea 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 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 maxim 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 (figura 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) (figura 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 figura 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 crema. SPF și FP-UVA ale formulărilor supuse iradierii sunt prezentate în figura 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 sinergetic. Uleiurile de orez și de zmeură libere au fost supuse aceluiași proces de iradiere și s-a observat că sunt instabile (figura 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.

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

Pentru a obține modelul cinetic care corespunde cel mai bine modului de eliberare *in vitro* al filtrelor UV din nanoparticulele lipidice dezvoltate, au fost testate cinci ecuații matematice incluzând ecuația cinetică de ordin zero, de ordin unu, Higuchi, Peppas-Korsmeyer și Hixon-Crowell. În acest sens, au fost utilizate rezultatele eliberării pornind de la 1 h, pentru a exclude efectul inițial de eliberare bruscă. Coeficientul de corelație (R^2), constanta de eliberare (k) și exponentul de eliberare (n) a BMDBM eliberat din NLC și din NE, în cele 7 h, respectiv 8 h, sunt prezentate în tabelul 3. Parametrii cinetici ai eliberării OCT în cele 24 de ore sunt prezentați în tabelul 4. Rezultatele se potrivesc cel mai bine cu modelul Higuchi pentru eliberarea BMDBM și cu modelul Peppas-Korsmeyer ($n < 0,5$) pentru eliberarea OCT. Ambele modele de eliberare descriu un proces de difuzie după legea lui Fick. Mai mult, valorile mici ale constantelor de eliberare ale

BMDBM ($k_2=0,71$ și $k_2=0,93$ pentru NLC 3, respectiv NLC 9) și OCT ($k_3=11,33$ și $k_3=12,62$ pentru NLC 3, respectiv NLC 9) din NLC sugerează o încapsulare omogenă a filtrelor UV în sistem. Constantele de eliberare ale filtrelor UV din NE sunt ușor mai mari comparativ cu cele din NLC, sugerând faptul că matricea lipidică solidă a NLC oferă o mai bună încapsulare a filtrelor UV. Eliberarea mai rapidă a filtrelor UV din NLC preparate cu UZ față de NLC preparate cu UO este corelată cu structura mai ordonată a matricei lipidice a NLC cu UZ, ceea ce rezultă într-o expulzare mai rapidă a BMDBM și OCT din nanoparticulele lipidice. Principalul avantaj al acestui studiu îl constituie acomodarea unei cantități mari de compuși cu proprietăți fotoprotectoare, atât naturali cât și sintetici, co-încapsulați înăuntrul formulărilor de tip NLC. Acest lucru conduce la îmbunătățirea semnificativă a efectului fotoprotector asociat cu reducerea efectelor adverse ale filtrelor sintetice libere, BMDBM și OCT.

Revendicări

1. Procedeu de obținere a unor nanoparticule lipidice antioxidante pe bază de uleiuri naturale (libere) și cu proprietăți fotoprotectoare pentru nanoparticule lipidice încărcate cu filtre de tip UVA și UVB, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde:
 - a. formarea unei pre-emulsii lipidice libere și îmbogățite cu două componente active hidrofobe (BMDBM și OCT), obținute prin contactarea, sub agitare magnetică, a unei faze apoase și a unei faze lipidice, la o temperatură de 82...85°C, și mentinere la regim de temperatură constantă, timp de 1h;
 - b. obținerea unor dispersii apoase de nanotransportori lipidici liberi și încărcăți cu filtre UV, prin supunerea pre-emulsiei lipidice unui proces de omogenizare cu grad înalt de forfecare, la 25000 rpm, timp de 10 min, urmată de răcirea ușoară, sub agitare magnetică, la temperatura camerei;
 - c. obținerea de nanotransportori lipidici în formă solidă prin supunerea nanodispersiilor apoase unui proces de liofilizare, la -55°C timp de 72h.
2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, faza lipidică este formată dintr-un amestec de lipide solide și lichide naturale de emulgade : palmitat de cetil : 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, la o temperatură de 82...85°C.
3. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că**, în loc de ulei din tărâțe de orez se folosește ulei din semințe de zmeură.
4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, faza apoasă este formată dintr-un amestec de surfactanți, neionici și ionici, și un co-surfactant, într-un raport de greutate polisorbit 20 : lecitină : copolimer polietilenglicol-polipropilenglicol de 4.66 : 1 : 1 și la o temperatură de 85°C.
5. Procedeu conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 4, **caracterizat prin aceea că**, pre-emulsia lipidică conține 10% amestec lipidic din care conținutul de ulei variază (10%, 20%, sau 30% ulei vegetal din totalul de 10% lipide), 3,5% amestec de surfactanți și 1% componente active totale de natura hidrofoba cu diferite concentrații de BMDBM și OCT (0,7% și 0,3% sau 0,5% și 0,5% sau 0,3% și 0,7%).
6. Procedeu conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 5, **caracterizat prin aceea că**, nanoparticulele lipidice încărcate cu substanțe active sunt încorporate într-o bază de cremă în raport de 1 : 1 pentru a obține **formulări cosmetice**.

7. Nanoparticule lipidice încarcate cu BMDBM și OCT obținute pe bază de uleiuri vegetale și având proprietăți fotoprotectoare și antioxidante, obținute prin procedeul definit în oricare din revendicările de la 1 la 5, **caracterizate prin aceea că**, cuprind:
 - a. 7%, 14% și 21% ulei din tărâțe de orez și 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% sau 3,5% și 3,5% sau 2% și 3,5% BMDBM, respectiv OCT, încapsulate în rețeaua lipidică astfel formată, procentele fiind exprimate în greutate.
8. Nanoparticule lipidice conform revendicării 7 obținute prin procedeul definit în oricare din revendicările de la 1 la 5 **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.
9. Nanoparticule lipidice conform revendicărilor 7 și 8 obținute prin procedeul definit în oricare din revendicările de la 1 la 5 **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.
10. Nanoparticule lipidice conform revendicării 7 obținute prin procedeul definit în oricare din revendicările de la 1 la 5 **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 în cazul utilizării uleiului din semințe de zmeură.
11. Nanoparticule lipidice conform revendicării 7 obținute prin procedeul definit în oricare din revendicările de la 1 la 5 **caracterizate prin aceea că** prezintă valori ale eficienței încărcării octocrilenui 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.
12. Nanoparticule lipidice conform revendicării 7 obținute prin procedeul definit în oricare din revendicările de la 1 la 5 **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.
13. Nanoparticule lipidice conform revendicării 7 obținute prin procedeul definit în oricare din revendicările de la 1 la 5 **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.
14. Formulările cosmetice având proprietăți fotoprotectoare obținute pe baza nanoparticulelor lipidice conținând uleiuri vegetale și cu proprietăți antioxidante, obținute conform procedeeului definit prin revendicarea 6, **caracterizate prin aceea că**, cuprind:

- a. 3,5%, 7% și 10,5% ulei din tărâțe de orez și ulei din semințe de zmeură;
 - b. 3,5% substanțe active totale de natură hidrofobă din care: 2,5%, 1,75% și 1% BMDBM, respectiv 1%, 1,75% și 2% OCT, procentele fiind exprimate în greutate.
15. Formulările cosmetice conform revendicării 14, obținute prin procedeul definit în revendicarea 6, **caracterizate prin aceea că**, au proprietăți fotoprotectoare cu SPF între 8,3 – 17,3, FP-UVA între 13,3 - 40,2, în cazul utilizării uleiului din tărâțe de orez, respectiv SPF între 6,7 – 13, FP-UVA între 10,9 – 34,9, în cazul utilizării uleiului din semințe de zmeură.
16. Formulările cosmetice conținând 10,5% ulei vegetal conform revendicării 14, obținute prin procedeul definit în revendicarea 6, **caracterizate prin aceea că** nu prezintă o scădere a proprietăților fotoprotectoare după ce au fost supuse iradierii fotochimice, prezentând după etapa prelungită de iradiere SPF între 12,2 – 18,5, FP-UVA între 15,6 -47, în cazul utilizării uleiului din tărâțe de orez, respectiv SPF între 12,2 – 15,2, FP-UVA între 11,5 – 38,1, în cazul utilizării uleiului din semințe de zmeură.

Lista tabelelor și a figurilor

Tabel 1. Compoziția butil-metoxidibenzoilmetan – octocriolen – 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	NLC 11	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	2	3	3	3	3	1	2	3	3	3	3

* 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.

Tabel 2. Entalpia, maximul punctului de topire și indicele de cristalinitate (IC %) ale NLC determinate prin calorimetrie de scanare diferentia (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	-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	64.9	66.9	67.6	85.1	100	77.5	86.4	86.6	87.7

Tabel 3. Parametrii cinetici ai eliberării BMDBM din NLC în dispersie

BMDBM	Ordin zero		Ordin unu		Higuchi		Peppas-Korsmeyer			Hixon-Crowell	
	R ²	k ₀	R ²	k ₁	R ²	k ₂	R ²	k ₃	n	R ²	k ₄
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

Tabel 4. Parametrii cinetici ai eliberării BMDBM din NLC în dispersie

OCT	Ordin zero		Ordin unu		Higuchi		Peppas-Korsmeyer			Hixon-Crowell	
	R ²	k ₀	R ²	k ₁	R ²	k ₂	R ²	k ₃	n	R ²	k ₄
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

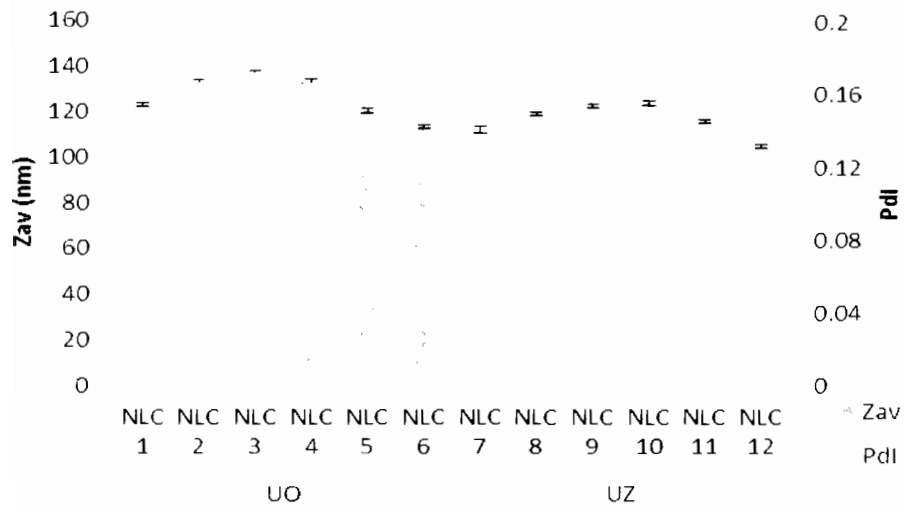
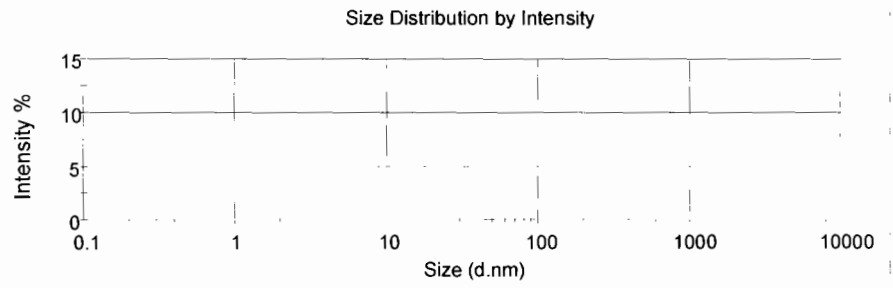
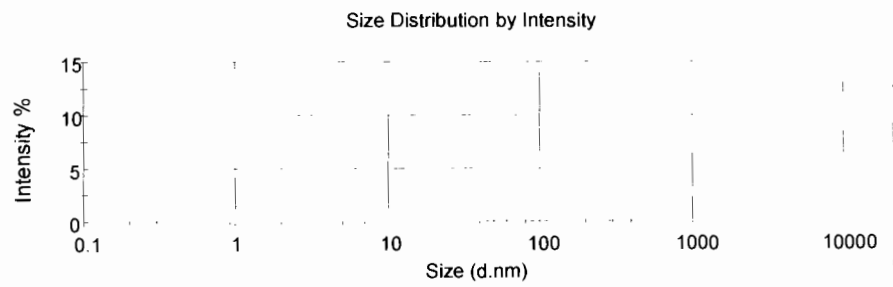


Figura 1



Record 1892: BMDBM - OCT - NLC 9
Record 1894: BMDBM - OCT - NLC 9



Record 1892: BMDBM - OCT - NLC 9
Record 1893: BMDBM - OCT - NLC 9
Record 1894: BMDBM - OCT - NLC 9

Figura 2

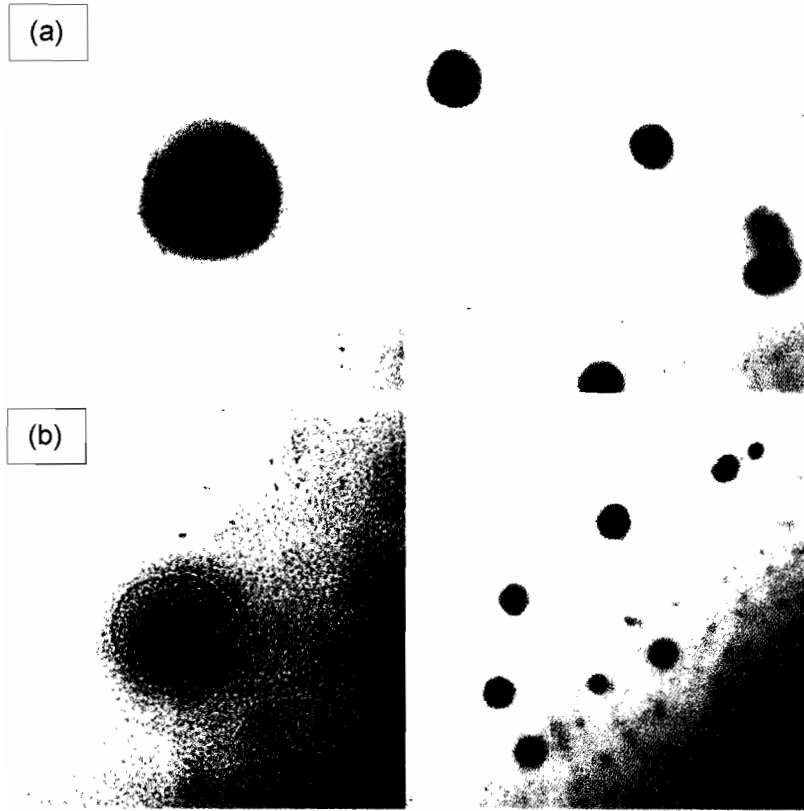


Figura 3

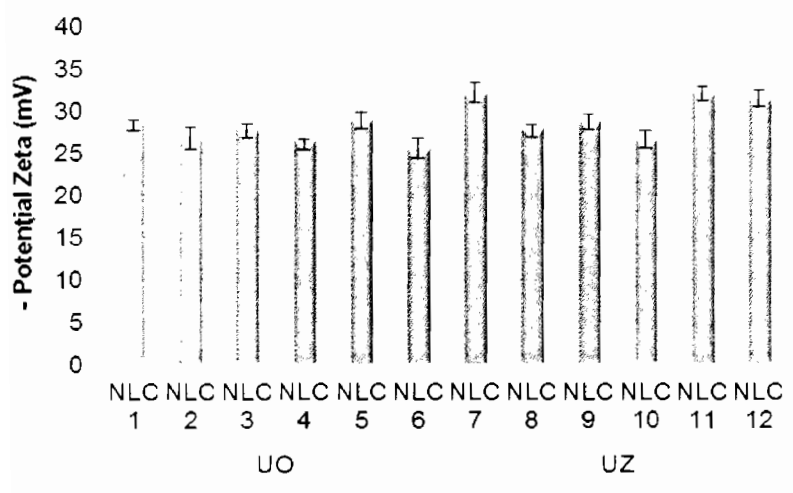


Figura 4

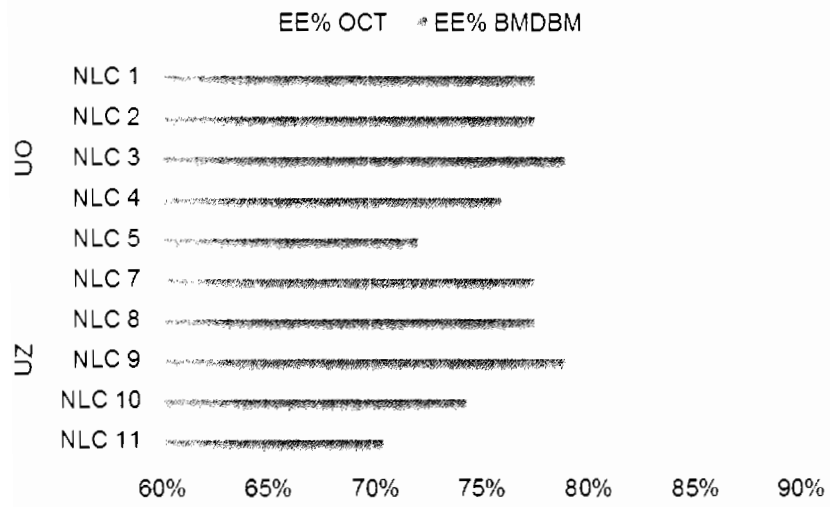


Figura 5

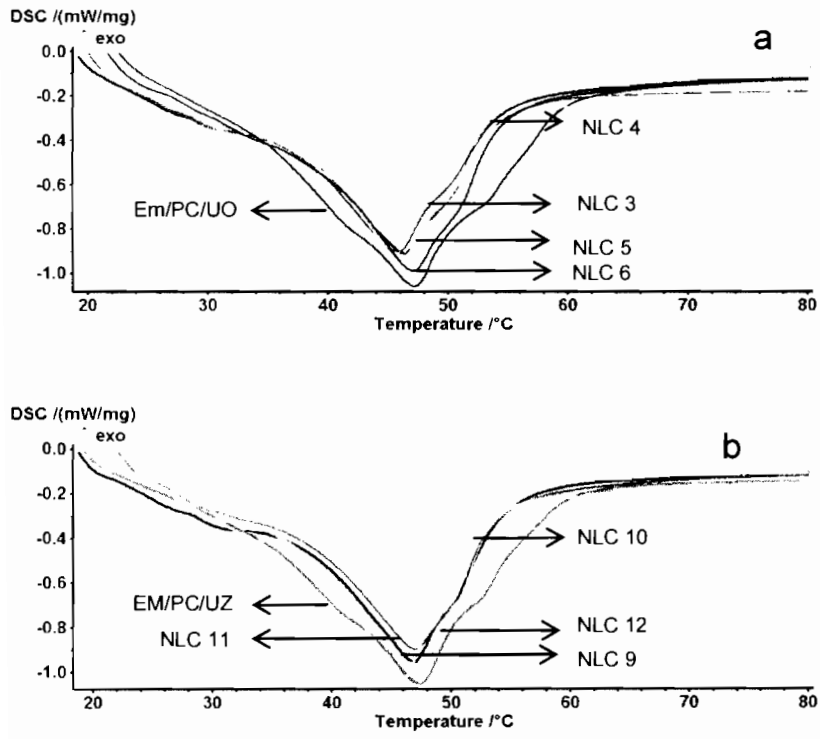


Figura 6

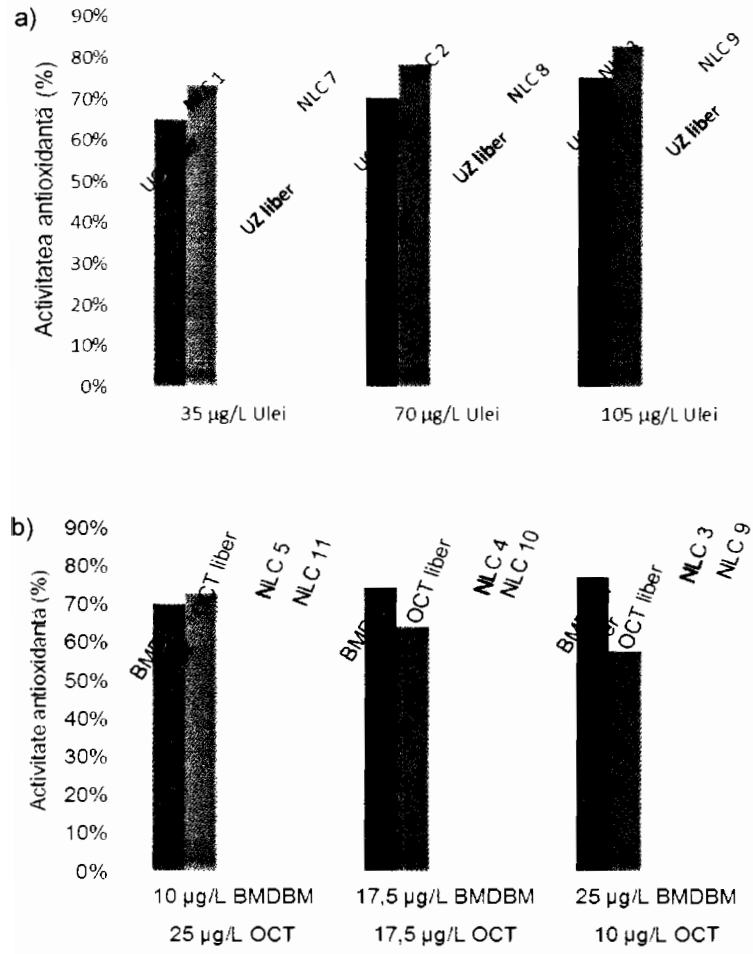


Figura 7

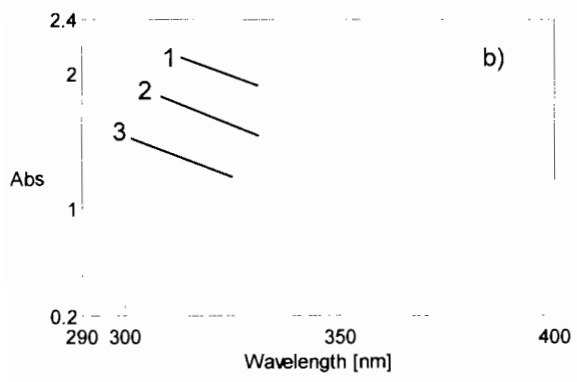
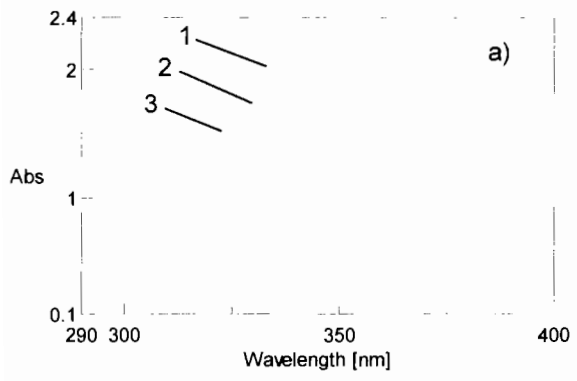


Figura 8

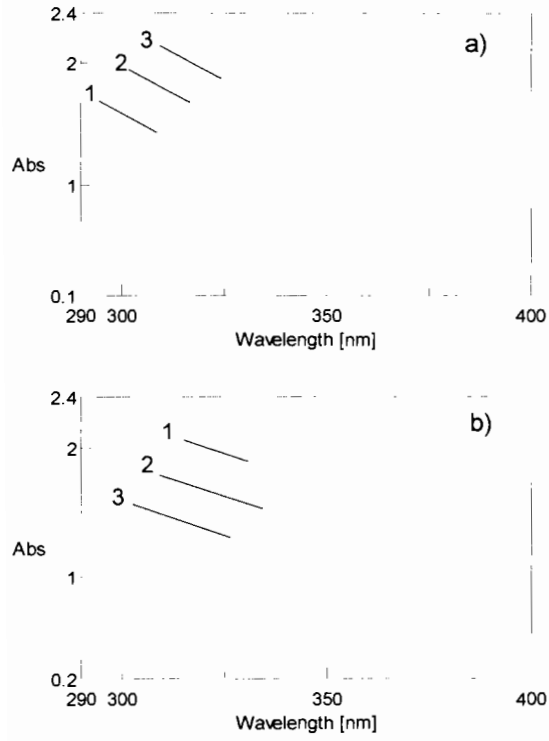


Figura 9

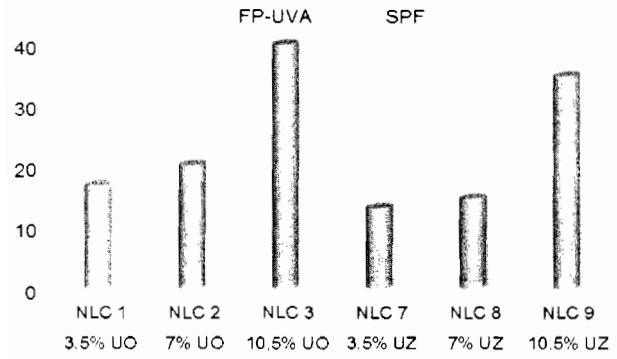


Figura 10

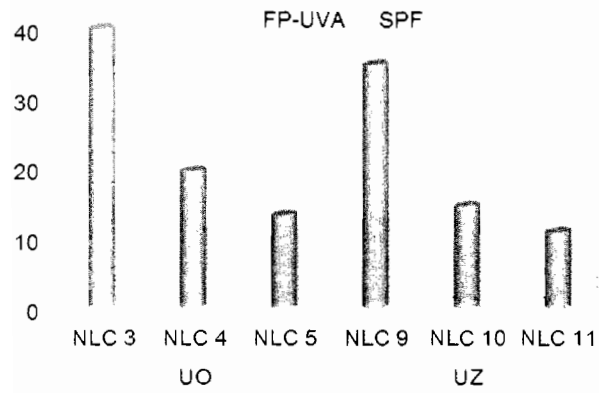


Figura 11

85

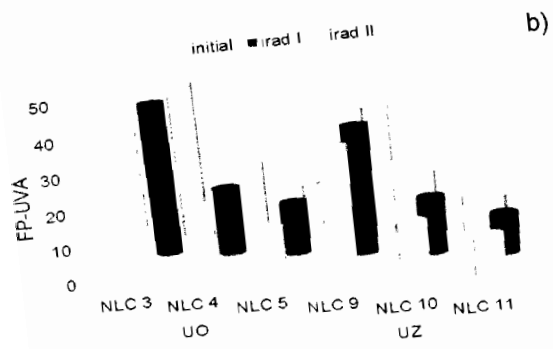
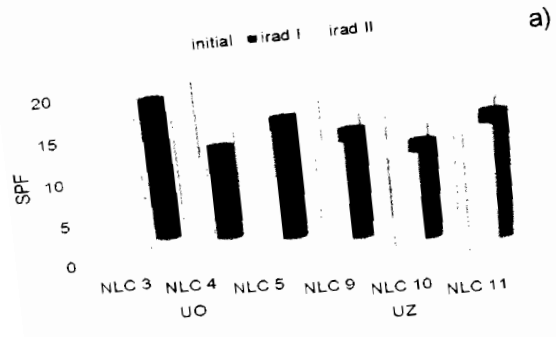


Figura 12

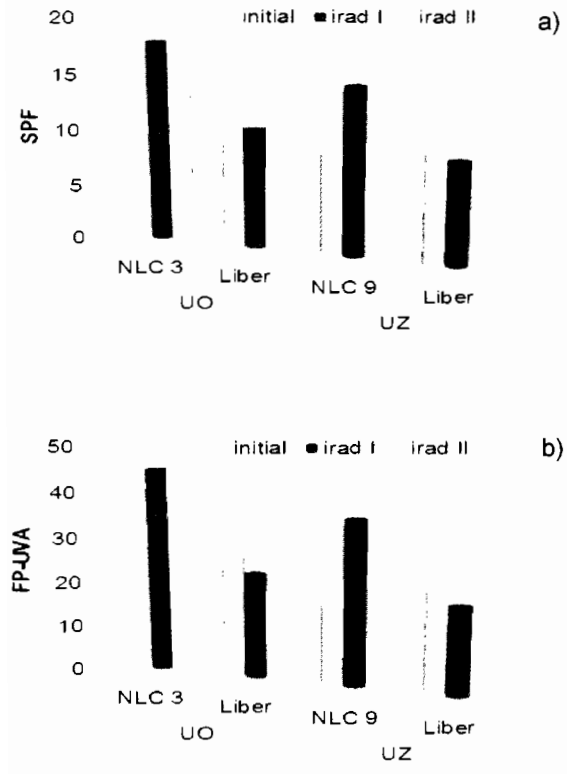


Figura 13

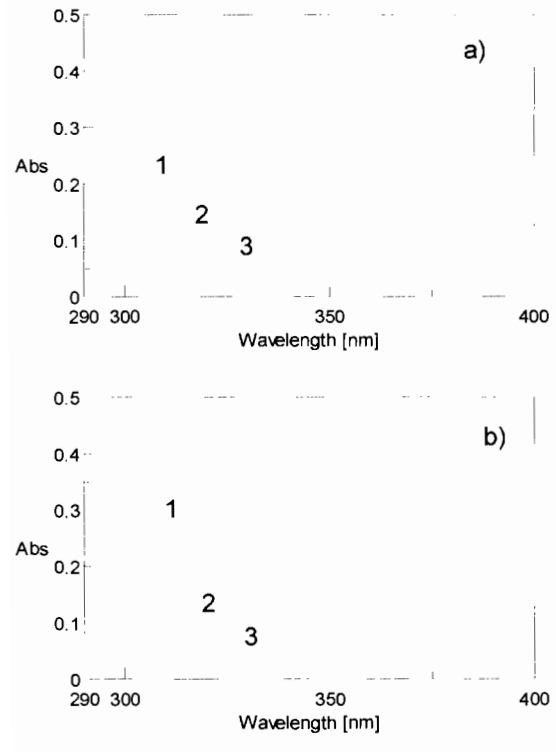


Figura 14

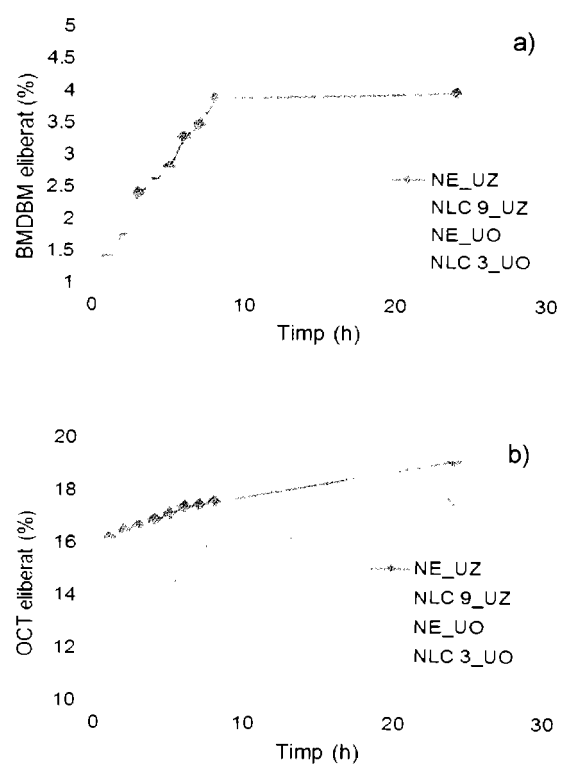


Figura 15