

(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
București

ROMÂNIA



(11) **RO 131264 B1**

(51) **Int.Cl.**
A61K 9/127 ^(2006.01);
A23P 10/30 ^(2016.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 01000**

(22) Data de depozit: **14/12/2015**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/07/2021** BOPI nr. **7/2021**

(41) Data publicării cererii:
29/07/2016 BOPI nr. **7/2016**

(73) Titular:
• **FAZAKAS ZITA, STR. PĂDURII NR. 5A,
TÂRGU-MUREȘ, MS, RO**

(72) Inventatori:
• **FAZAKAS ZITA, STR. PĂDURII NR. 5A,
TÂRGU-MUREȘ, MS, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**EP 1519714 B1; EP 2153820 A1;
KR 20090040144 A; CN 1850054 A**

(54) **PROCEDEU DE ÎNCAPSULARE A NUTRACEUTICELOR
ÎN LIPOZOMI**

Examinator: **biochimist EREMIA LAURA**



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 131264 B1

RO 131264 B1

1 Invenția se referă la o metodă de încapsulare a nutraceuticelor respectiv vitamine și/sau nutrienți în lipozomi.

3 lipozomii sunt vezicule lipidice formate din straturi duble lipidice concentrice separate prin compartimente apoase. Aceste vezicule se formează spontan la dispersarea fosfolipidelor în apă.

5 Moleculele fosfolipidice sunt principalele componente ale lipozomilor. Datorită proprietăților lor amfipatice, ele se orientează cu grupele polare spre faza apoasă și cu resturile de acizi grași spre interiorul straturilor duble lipidice. Cele mai folosite lipide sunt: fosfatidilcoline naturale (lecitina de ou sau soia) sau sintetice (dipalmitoilfosfatidilcolina, distearoilfosfatidilcolina); fosfatidilserina din creier bovin, diferite tipuri de fosfatidilgliceroli; sfingomielină; fosfatidilinozitolul. Toate aceste fosfolipide formează în soluție apoasă structuri care depind de o serie de factori: prezența colesterolului, prezența unei substanțe încărcate electric, pH-ul, forța ionică și temperatură.

7 Se cunosc diverse metode de încapsulare a unor substanțe în lipozomi ca de exemplu cele descrise în brevetele **US 2015125393**, **TW 200520788**, **US 2014356416**.

9 Brevetul **EP 1519714 B1** se referă la aparate și procedee pentru producerea de lipozomi. Prin furnizarea unei soluții tampon într-un prim rezervor și o soluție lipidică într-un al doilea rezervor, diluarea continuă a soluției lipidice cu soluția tampon într-o cameră de amestecare produce un lipozom. Soluția lipidică cuprinde, de preferință, un solvent organic, cum ar fi un alcanol inferior.

11 În brevetul **EP 2153820 A1** este descris un preparat lipozomal care este un lipozom, are o membrană cu lipidică compusă dintr-o membrană interioară constituită dintr-o lipidă care include unul sau mai multe tipuri de lipide funcționale (o lipidă capabilă să interacționeze chimic cu un alt compus, cum ar fi o lipidă încărcată, o lipidă polarizabilă, o lipidă solubilă în lipide sau o lipidă solubilă în apă) și o membrană exterioară constituită dintr-o lipidă cu sau fără a include unul sau mai multe tipuri de lipide funcționale și este caracterizată prin aceea că cel puțin o condiție ca cantitatea de orice tip de lipidă funcțională conținută în membrana interioară este mai mare decât în membrana exterioară este satisfăcut. Preparatul de lipozomi este adecvat ca lipozom pentru încapsularea unui agent de contrast (o substanță neutră având o grupare hidroxil), siRNA (o substanță anionică) având o activitate anticancer sau altele asemenea. Raportul de încapsulare a agenților medicamentoși, stabilitatea dispersiei, eliberarea controlului și altele asemenea au fost îmbunătățite.

13 Documentul **KR 20090040144 A** se referă la o compoziție cosmetică de nanoemulsie de lipozomi cuprinzând un derivat de vitamina C furnizat pentru a menține conținutul încapsulând stabil un derivat de vitamina C la lipozom în mediul extern și pentru a îmbunătăți rata de absorbție percutană și efectul de albire. O metodă de fabricare a unei compoziții cosmetice de nanoemulsie de lipozomi cuprinzând un derivat de vitamina C care cuprinde etapele următoare: (a) fabricarea lipozomului care conține un derivat de vitamina C; (b) fabricarea unui amestec de emulsie prin dizolvarea componentelor de emulsie de 1-30% în greutate la 70-75°C; (c) fabricarea amestecului apos prin dizolvarea componentelor apoase, inclusiv a lipozomului care conține un derivat de vitamina C la 80°C; (d) fabricarea primei compoziții de emulsie prin injectarea amestecului de emulsie în amestecul apos, menținând condiția până la 75-80°C și emulsionând-o; și (e) în al doilea rând, emulsionarea primei compoziții de emulsie injectând-o într-un microfluidizator în timp ce le agită sub 500-2000 bar de trei ori.

15 În **CN 1850054 A** se face referire la o picătură de lacrimi artificiale a unui lipozom cu vitamina A pentru prevenirea și vindecarea xeroftalmiei și oftalmokopiei. Compoziția sa include vitamina A solubilă în grăsimi, material de încapsulare a lipozomului, vitamina E și lichid hidratant cu lacrimi artificiale, în care vitamina A solubilă în grăsimi este palmitat de

RO 131264 B1

vitamina A sau acetat de vitamina A, materialul de încapsulare a lipozomului este lecitina de fasole de soia și colesterolul și compoziția lichidului hidratant cu lacrimi artificiale include carbonat acid de sodiu, clorură de sodiu, glucoză, clorură de potasiu, clorură de calciu și apă.	1
În plus, în conformitate cu cerințele, pot fi adăugate unul sau mai multe tipuri de componente auxiliare de mentanol, PVP și HPMC etc.	3
Dezavantajele acestor metode sunt reproductibilitatea redusă, încorporează exclusiv medicamente fără nutrienți sau vitamine și se obține un randament redus în lipozomi cu dimensiunea medie optimă a particulei respectiv mai mică de 3 microni.	5
Problema pe care o rezolvă invenția constă în descrierea unui procedeu de încapsulare a nutraceuticelor în lipozomi.	7
Procedeu de încapsulare a nutraceuticelor în lipozomi, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că se amestecă fosfolipidele cu apă bidistilată la 90°C în raport de 1:8,33 (m/m), timp de 2 min la o turație de 4000 rot/min, se amestecă vitaminele și/sau nutrienții hidrosolubili cu apă distilată la temperatura de 21°C la turația de 400 rot/min, timp de 2...5 min în funcție de tipul vitaminelor/nutrienților folosiți, se amestecă soluția de fosfolipide cu soluția de vitamine și/sau nutrienți hidrosolubili timp de 3 min la temperatura de 21°C la turația de 4000 rot/min, se adaugă sub agitare vitaminele/nutrienții iposolubili în amestecul soluției de fosfolipide cu soluția de vitamine și/sau nutrienți hidrosolubili și agitare timp de 2 min la temperatura de 21°C la o turație de 400 rot/min, se ultrasonează timp de 30 min la o putere a câmpului ultrasonor de 100 wati/cm ² până la încapsularea vitaminelor și/sau a nutrienților sub formă de vezicule lipozomale cu dimensiunea cuprinsă între 1...3 microni și se ajustează pH-ul dispersiei de lipozomi la 7...7,5 după operația de ultrasonare.	9
Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:	11
- vitaminele/nutrienții încapsulați în lipozomi fosfolipidici pot penetra ușor membrana celulelor bistratificate, astfel are loc o absorbție intestinală bună și vitaminele/nutrienții ajung direct în celulă;	13
- lipozomii încapsulează mai multe vitamine/nutrienți simultan, respective atât cele lipofilice cât și cele hidrofilice;	15
- lipozomii sunt vezicule care asigură cea mai bună modalitate de a încapsula cantitatea necesară de vitamine/nutrienți, va transporta la celule țintă și va asigura penetrarea în celule fără nici un alt consum de energie. Deci în cazul lipozomilor, vitaminele/nutrienții sunt livrați în celulă fără nici un cost energetic din partea corpului. Administrată în altă formă, chiar și cea intravenoasă a vitaminelor/nutrienților va avea nevoie de insulină (transportatorul) care o va duce în celulă;	17
- o doză mult mai mică de vitamine/nutrienți încapsulați în lipozomi pot avea efecte terapeutice egale sau chiar mai mari decât doze mult mai mari de vitamine/nutrienți administrate intravenos;	19
- metoda este foarte simplă și poate fi folosită chiar de utilizatori casnici.	21
Problema pe care o rezolvă invenția constă în asigurarea unor etape și a unor parametri de lucru care să permită obținerea unor lipozomi cu vitamine și/sau nutrienți încapsulați la o dimensiune mai mică de 3 microni care vor penetra celulele fără niciun alt consum de energie.	23
Procedeu de încapsulare a nutraceuticelor respectiv vitamine și/sau nutrienți în lipozomi înlătură dezavantajele menționate anterior prin aceea că este constituită din următoarele etape în ordine succesivă:	25
- amestecarea fosfolipidei cu apă fiartă în raport de 1:8,33 (m/m) timp de 2 min la o turație de 1000 rot/min;	27
- amestecarea vitaminelor și/sau nutrienților hidrosolubili cu apă distilată la temperatura de 21°C,	29

RO 131264 B1

- 1 - turația de 400 rot/min, timp de 2...5 min în funcție de tipul vitaminelor/nutrienților
folosiți;
- 3 - amestecarea soluției de fosfolipide cu soluția de vitamine și/sau nutrienți
hidrosolubili timp de 3 min la temperatură de 21°C la turația de 4000 rot/min;
- 5 - adăugarea sub agitare a vitaminelor/nutrienților liposolubili în amestecul soluției de
fosfolipide cu soluția de vitamine și/sau nutrienți hidrosolubili și agitare timp de 2 min la
7 temperatura de 21°C la o turație de 400 rot/min;
- 9 - ultrasonare timp de 30 min la o putere a câmpului ultrasonor de 100 wati/cm² până
la încapsularea vitaminelor și/sau a nutrienților sub formă de vezicule lipozomale cu
dimensiunea cuprinsă între 1...3 micrometri;
- 11 - ajustarea pH-ului dispersiei de lipozomi la 7...7,5 după operația de ultrasonare.
În continuare se dau câteva exemple de realizare a invenției.

13 Exemplul 1

Încapsularea vitaminelor în lipozomi: vitamina C și vitamina A

15 Obținerea soluției de fosfolipide (A): în balonul rotavaporului de 1 L se amestecă 30 g
DPPC (dipalmitoil fosfatidil colina - de puritate Sigma-Aldrich & Merck) cu 250 g apă bidisti-
17 lată de 100°C timp de 2 min la o turație de 4000 rot/min, la presiune atmosferică. Astfel se
formează o emulsie apă/ulei (W/O).

19 Obținerea soluției vitaminice-hidrosolubile (B): într-un recipient de 500 mL se adaugă
10 g vitamina C-hidrosolubilă (acidul L-ascorbic - de puritate Sigma-Aldrich & Merck). Peste
21 cantitatea vitaminei se toarnă 250 mL apă distilată de 21°C. Recipientul se așează pe
agitatorul magnetic fără încălzire și dizolvarea are loc la turația de 400 rot/min, timp de 2 min.

23 Încapsularea vitaminei C-hidrosolubilă în emulsia apă/ulei (W/O): se realizează prin
amestecarea soluției vitaminice-hidrosolubile (B) cu soluția de fosfolipide (A) în rotavapor,
25 timp de 3 min la temperatură de 21°C la turația de 4000 rot/min la presiune atmosferică. Se
obține o emulsie apă-vitamina C/ulei (W-vit.C/O).

27 Încapsularea vitaminei A-liposolubilă în emulsia apă-vitamina C/ulei (W-vit.C/O): se
așează balonul rotavaporului care conține emulsia W-vit.C/O pe agitatorul magnetic fără
29 încălzire și se adaugă sub agitare 5 g vitamina A-liposolubilă (de puritate Sigma-Aldrich &
Merck). Timpul de agitare cu agitatorul magnetic este 1 min la temperatura de 21°C la o
31 turație de 400 rot/min, și timpul de agitare cu rotavaporul este 1 min la temperatura de 21°C
la o turație de 4000 rot/min.

33 Încapsularea efectivă a ambelor vitamine C și A în lipozomi: se realizează în baia de
ultrasonare timp de 30 min la o putere a câmpului ultrasonor de 100 wati/cm² până la
35 încapsularea totală a vitaminelor C+A sub formă de vezicule lipozomale cu dimensiunea
cuprinsă între 1...3 micrometri.

37 Ajustarea pH-ului dispersiei de lipozomi la 7...7,5 după operația de ultrasonare.
Caracteristicile produsului obținut sunt prezentate în tabelul 1.

39 Caracterizarea lipozomilor încapsulați cu vitaminele C+A

41 Tabelul 1

Nr. Crt.	Exemplul 1	Valorile determinărilor
43 1	Diametru (μm)	1-3 micrometri
2	Volum apos (μl/mg)	4,1
45 3	Stabilitatea lipozomală (luni)	13
4	Eficiența încapsulării (%)	50-55

RO 131264 B1

Metodele de laborator folosite pentru caracterizarea lipozomilor încapsulați sunt:	1
a. Scanările DSC (Calorimetru cu Scanare Diferențială) au servit pentru stabilirea diametrului liposomal cu toate parametrele termodinamice și pentru monitorizarea stabilității liposomale.	3
b. Metoda detergenților (surfactantul Triton X-100, 10 mM) pentru urmărirea eliberării vitaminice, cu scopul determinării eficienței încapsulării.	5
c. Analiza spectrală în domeniul IR cu spectrofotometrul FT-IR Shimadzu Prestige-21, echipat cu Reflectanta totală Atenuată Orizontală (HATR), cu accesoriu de ZnSe.	7
Măsurătorile au fost efectuate în domeniul infraroșu 650-4000 cm^{-1} , 100 scanări fiecare probă la rezoluția 2 cm^{-1} . Analiza aceasta a servit pentru urmărirea protecției produsului împotriva oxidării, ceea ce furnizează informații despre stabilitatea preparatului liposomal.	11
Exemplul 2	13
<i>Încapsularea nutrienților în lipozomi: fitoestrogenii</i>	
Fitoestrogenii conțin atât părți hidrofile respective grupe hidroxilice cât și părți lipofilice respective structura sterică, motiv pentru care metoda de lucru se micșorează cu o etapă comparativ cu exemplul 1.	15
Obținerea dispersiei de lipozomi fosfolipidici (A): în balonul rotavaporului de 1 L se amestecă 30 g DPPC (dipalmitoil fosfatidil colina - de puritate Sigma-Aldrich & Merck) cu 250 g apă bidistilată de 100°C timp de 2 min la o turație de 4000 rot/min, la presiune atmosferică. Astfel se formează o emulsie apă/ulei (W/O).	19
Obținerea soluției de fitoestrogen (B): într-un recipient de 500 mL se adaugă 10 g pulberea din soia, peste care se toarnă 250 mL apă distilată de 21°C. Recipientul se așează pe agitatorul magnetic fără încălzire și dizolvarea are loc la turația de 400 rot/min, timp de 2 min.	21
Încapsularea fitoestrogenului în emulsia apă/ulei (W/O): se realizează prin amestecarea soluției de fitoestrogen (B) cu soluția de lipozomi fosfolipidici (A) în rotavapor, timp de 3 min la temperatură de 21°C la turația de 4000 rot/min la presiune atmosferică. Se obține o emulsie apă-fitoestrogen/ulei (W-fitoestr/O).	23
Încapsularea propriu-zisă a fitoestrogenului în lipozomi: se realizează în baia de ultrasonare timp de 30 min la o putere a câmpului ultrasonor de 100 wati/cm ² până la încapsularea totală a fitoestrogenului sub formă de vezicule liposomale cu dimensiunea cuprinsă între 1...3 micrometri.	25
Ajustarea pH-ului dispersiei de lipozomi la 7...7,5 după operația de ultrasonare. Caracteristicile produsului obținut sunt prezentate în tabelul 2.	27

Caracterizarea lipozomilor încapsulați cu fitoestrogen

Tabelul 2

Nr.crt.	Exemplul 2	Valorile determinărilor	39
1	Diametru (μm)	1-3 micrometri	
2	Stabilitatea liposomală (luni)	24	41
3	Eficiența încapsulării (%)	70	

RO 131264 B1

1 Exemplul 3

Încapsularea vitaminelor și nutrienților în lipozomi: pulberea din orz verde

3 Pentru exemplul 3 s-a folosit pulberea de orz verde, care conține vitamine, minerale și enzime. Astfel se încapsulează vitaminele din pulberea de orz verde și nutrienții respectiv
5 mineralele și enzimele din pulberea de orz verde. Metoda de lucru corespunde cu cea din exemplul 2.

7 Obținerea dispersiei de lipozomi fosfolipidici (A): în balonul rotavaporului de 1 L se amestecă 30 g DPPC (dipalmitoil fosfatidil colina - de puritate Sigma-Aldrich & Merck) cu
9 250 g apă bidistilată de 100°C timp de 2 min la o turație de 4000 rot/min, la presiune atmosferică. Astfel se formează o emulsie apă/ulei (W/O).

11 Obținerea soluției de vitamine-nutrienți (B): într-un recipient de 500 mL se adaugă 10 g pulberea din orz verde, peste care se toarnă 250 mL apă distilată de 21°C. Recipientul
13 se așează pe agitatorul magnetic fără încălzire și dizolvarea are loc la turația de 400 rot/min, timp de 2 min.

15 Încapsularea complexului vitamine-nutrienți în emulsia apă/ulei (W/O): se realizează prin amestecarea soluției de vitamine-nutrienți (B) cu soluția de lipozomi fosfolipidici (A) în
17 rotavapor, timp de 3 min la temperatură de 21°C la turația de 4000 rot/min la presiune atmosferică. Se obține o emulsie apă-complex/ulei (W-complex/O).

19 Încapsularea propriu-zisă a complexului vitamine-nutrienți în lipozomi: se realizează în baia de ultrasonare timp de 30 min la o putere a câmpului ultrasonor de 100 wati/cm² până
21 la încapsularea totală a complexului sub formă de vezicule lipozomale cu dimensiunea cuprinsă între 1...3 microni.

23 Ajustarea pH-ului dispersiei de lipozomi la 7...7,5 după operația de ultrasonare.
25 Caracteristicile produsului obținut sunt prezentate în tabelul 3.

Caracterizarea lipozomilor încapsulați cu vitamine și nutrienți

Tabelul 3

Nr. crt .	Exemplul 3	Valorile determinărilor
29 1	Diametru (μm)	1-3 microni
2	Stabilitatea lipozomală (luni)	4
31 3	Eficiența încapsulării (%)	30

RO 131264 B1

Revendicare

1

Procedeu de încapsulare a nutraceuticelor în lipozomi, caracterizată prin aceea că,	3
se amestecă fosfolipidele cu apă bidistilată la 90°C în raport de 1:8,33 (m/m), timp de 2 min la o turație de 4000 rot/min, se amestecă vitaminele și/sau nutrienții hidrosolubili cu apă	5
distilată la temperatura de 21°C la turația de 400 rot/min, timp de 2...5 min în funcție de tipul	7
vitaminelor/nutrienților folosiți, se amestecă soluția de fosfolipide cu soluția de vitamine și/sau	9
nutrienți hidrosolubili timp de 3 min la temperatura de 21°C la turația de 4000 rot/min, se	11
adaugă sub agitare vitaminele/nutrienții iposolubili în amestecul soluției de fosfolipide cu	13
soluția de vitamine și/sau nutrienți hidrosolubili și agitare timp de 2 min la temperatura de	15
21°C la o turație de 400 rot/min, se ultrasonează timp de 30 min la o putere a câmpului	
ultrasonor de 100 wati/cm ² până la încapsularea vitaminelor și/sau a nutrienților sub formă	
de vezicule lipozomale cu dimensiunea cuprinsă între 1...3 microni și se ajustează pH-ul	
dispersiei de lipozomi la 7...7,5 după operația de ultrasonare.	



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 307/2021