



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

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

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

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

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

(54) **METODĂ DE ÎNCAPSULARE ÎN LIPOZOMI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de încapsulare în lipozomi a unor vitamine și/sau nutrienți. Metoda conform invenției constă în amestecarea unei soluții de fosfolipide cu o soluție de vitamine și/sau nutrienți hidrosolubili, timp de 3 min, la temperatura de 21°C, la o turație de 4000 rot/min, adăugarea sub agitare a

vitaminelor/nutrienților liposolubili, ultrasonare timp de 30 min la o putere a câmpului de 100 W/cm², rezultând încapsularea vitaminelor și/sau nutrienților sub formă de vezicule lipozomale cu o dimensiune de 1...3 μm.

Revendicări: 1



Metoda de incapsulare în liposomi

Invenția se referă la o metodă de incapsulare a nutraceuticelor respectiv vitamine și/sau nutrienți în liposomi.

Liposomii sunt vezicule lipidice formate din straturi duble lipidice concentrice separate prin compartimente apoase. Aceste vezicule se formează spontan la dispersarea fosfolipidelor în apă. Moleculele fosfolipidice sunt principalele componente ale liposomilor. 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 temperatura.

Se cunosc diverse metode de incapsulare a unor substanțe în lipozomi ca de exemplu cele descrise în brevetele US2015125393, TW200520788, US2014356416.

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 micrometri.

Problema pe care o rezolvă invenția este 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 micrometri care vor penetra celulele fără nici un alt consum de energie.

Metoda de incapsulare a nutraceuticelor respectiv vitamine și/sau nutrienți în liposomi înlătură dezavantajele menționate anterior prin aceea că este constituită din următoarele etape în ordine succesivă:

- amestecarea fosfolipidei cu apă fiartă în raport de 1:8,33 (m/m) timp de 2 minute la o viteză de 4000 rotații pe minut ;
- amestecarea vitaminelor și/sau nutrienților hidrosolubili cu apă distilată la temperatura de 21°C, viteză de 400 rotații/minut, timp de 2-5 min în funcție de tipul vitaminelor/nutrienților folosiți;
- amestecarea soluției de fosfolipide cu soluția de vitamine și/sau nutrienți hidrosolubili timp de 3 minute la temperatură de 21°C la viteză de 4000 rotații pe minut;

-adaugarea sub agitare a vitaminelor/nutrientilor liposolubili in amestecul solutiei de fosfolipide cu solutia de vitamine si/sau nutrienti hidrosolubili si agitare timp de 2 minute la temperatura de 21°C la o turatie de 400 rotatii/minut;

-ultrasonare timp de 30 minute la o putere a campului ultrasonor de 100 wati/cm² pana la incapsularea vitaminelor si/sau a nutrientilor sub forma de vezicule lipozomale cu dimensiunea cuprinsa intre 1-3 microni.

- ajustarea pH-ului dispersiei de lipozomi la 7-7,5 dupa operatia de ultrasonare.

Prin aplicarea inventie se obtin urmatoarele avantaje:

-vitaminele/nutrienții încapsulati în liposomi fosfolipidici pot penetra ușor membrana celulelor bistratificate, astfel are loc o absorbție intestinală bună și vitaminele/nutrienții ajung direct în celulă.

-liposomii încapsulează mai multe vitamine/nutrienți simultan, respective atat cele lipofilice cat și cele hidrofilice.

-liposomii 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 liposomilor, vitaminele/nutrienții sunt livrați în celulă fără nici un cost energetic din partea corpului. Administrată în altă formă , chiar și cea intravenoasă a vitaminelor/nutrientilor va avea nevoie de insulină (transportatorul) care o va duce în celulă.

-o doză mult mai mică de vitamine/nutrienti încapsulati în liposomi pot avea efecte terapeutice egale sau chiar mai mari decât doze mult mai mari de vitamine/nutrienți administrate intravenos.

-metoda este foarte simpla si poate fi folosita chiar de utilizatori casnici.

In continuare se dau cateva exemple de realizare a inventiei:

Exemplul 1:

Incapsularea vitaminelor în liposomi : vitamina C si vitamina A

Obținerea solutiei de fosfolipide (A): In balonul rotavaporului de 1 L se amesteca 30 g DPPC (dipalmitoil fosfatidil colina – de puritate Sigma-Aldrich & Merck) cu 250 g apa bidistilata de 100 °C timp de 2 minute la o turatie de 4000 rotatii pe minut, la presiune atmosferică. Astfel se formeaza o emulsie apa/ulei (W/O).

Obținerea solutiei vitaminice-hidrosolubile (B): Intr-un recipient de 500 mL se adauga 10 g vitamina C-hidrosolubila (acidul L-ascorbic - de puritate Sigma-Aldrich & Merck). Peste cantitatea vitaminei se toarna 250 mL apa distilata de 21°C. Recipientul se aseaza pe agitatorul magnetic fara incalzire si dizolvarea are loc la turatia de 400 rotatii/minut, timp de 2 minute.

Incapsularea vitaminei C - hidrosolubila în emulsia apa/uiei (W/O): se realizeaza prin amestecarea solutiei vitaminice-hidrosolubila (B) cu solutia de fosfolipide (A) in rotavapor, timp de 3 minute la temperature de 21°C la turatia de 4000 rotatii pe minut la presiune atmosferica. Se obtine o emulsie apa-vitaminaC/uiei (W-vit.C/O).

Incapsularea vitaminei A - liposolubila în emulsia apa-vitamina C/uiei (W-vit.C/O): se aseaza balonul rotavaporului care contine emulsia W-vit.C/O pe agitatorul magnetic fara incalzire si se adauga sub agitare 5 g vitamina A – liposolubila (de puritate Sigma-Aldrich & Merck). Timpul de agitare cu agitatorul magnetic este 1 minut la temperatura de 21°C la o turatie de 400 rotatii/minut, si timpul de agitare cu rotavaporul este 1 minut la temperatura de 21°C la o turatie de 4000 rotatii/minut.

Incapsularea efectiva a ambelor vitamine C și A in liposomi: se realizeaza in baia de ultrasonare timp de 30 minute la o putere a campului ultrasonor de 100 wati/cm² pana la incapsularea totala a vitaminelor C+A sub forma de vezicule lipozomale cu dimensiunea cuprinsa intre 1-3 microni.

Ajustarea pH-ului dispersiei de lipozomi la 7-7,5 dupa operatia de ultrasonare.

Caracteristicile produsului obtinut sunt prezentate in tabelul 1.

Tabel 1. Caracterizarea liposomilor incapsulat cu vitaminele C+A.

Metodele de laborator folosite pentru caracterizarea liposomilor incapsulati sunt:

- a. Scanarile DSC (Calorimetru cu Scanare Diferentiala) au servit pentru stabilirea diametrului liposomal cu toate parametrele termodinamice si pentru monitorizarea stabilitatii liposomale.
- b. Metoda detergentilor (surfactantul Triton X-100, 10 mM) pentru urmarirea eliberarii vitaminice, cu scopul determinarii eficienta incapsularii.
- c. Analiza spectrala in domeniul IR cu spectrofotometrul FT-IR Shimadzu Prestige-21, echipat cu Reflectanta totala Atenuata Orizontala (HATR), cu accesoriu de ZnSe. Masuratorile au fost efectuate in domeniul infrarosu 650-4000 cm⁻¹, 100 scanari fiecare proba la rezolutia 2 cm⁻¹. Analiza aceasta a servit pentru urmarirea protectiei produsului impotriva oxidarii, ceea ce furnizeaza informatii despre stabilitatea preparatului liposomal.

Nr.	Exemplul 1	Valorile determinarilor
1	Diametru (μm)	1-3 microni
2	Volum apos (ul/mg)	4,1
3	Stabilitatea liposomala (luni)	13



4 Eficienta incapsularii (%)

50-55

Exemplul 2:

Incapsularea nutrientilor in liposomi : fitoestrogenii

Fitoestrogenii contin atat parti hidrofile respective grupe hidroxilice cat si parti lipofilice respective structura steranica, motiv pentru care metoda de lucru se micsoreaza cu o etapa comparativ cu exemplul 1.

Obținerea dispersiei de liposomi fosfolipidici (A): In balonul rotavaporului de 1 L se amesteca 30 g DPPC (dipalmitoil fosfatidil colina – de puritate Sigma-Aldrich & Merck) cu 250 g apa bidistilata de 100 °C timp de 2 minute la o turatie de 4000 rotatii pe minut, la presiune atmosferică. Astfel se formeaza o emulsie apa/uiei (W/O).

Obtinerea solutiei de fitoestrogen (B): Intr-un recipient de 500 mL se adauga 10 g pulberea din soia, peste care se toarna 250 mL apa distilata de 21°C. Recipientul se aseaza pe agitatorul magnetic fara incalzire si dizolvarea are loc la turatia de 400 rotatii/minut, timp de 2 minute.

Incapsularea fitoestrogenului în emulsia apa/uiei (W/O): se realizeaza prin amestecarea solutiei de fitoestrogen (B) cu solutia de liposomi fosfolipidici (A) in rotavapor, timp de 3 minute la temperature de 21°C la turatia de 4000 rotatii pe minut la presiune atmosferica. Se obtine o emulsie apa-fitoestrogen/uiei (W-fitoestr/O).

Incapsularea propriuzisa a fitoestrogenului in liposomi: se realizeaza in baia de ultrasonare timp de 30 minute la o putere a campului ultrasonor de 100 wati/cm2 pana la incapsularea totala a fitoestrogenului sub forma de vezicule lipozomale cu dimensiunea cuprinsa intre 1-3 microni.

Ajustarea pH-ului dispersiei de lipozomi la 7-7,5 dupa operatia de ultrasonare.

Caracteristicile produsului obtinut sunt prezentate in tabelul 2.

Tabel 2. Caracterizarea liposomilor incapsulati cu fitoestrogen.

Nr.crt.	Exemplul 2	Valorile determinarilor
1	Diametru (µm)	1-3 microni
2	Stabilitatea liposomala (luni)	24
3	Eficienta incapsularii (%)	70

FJ

Exemplul 3:

Incapsularea vitaminelor și nutrientilor in liposomi : pulberea din orz verde

Pentru exemplul 3 s-a folosit pulberea de orz verde, care contine vitamine, minerale si enzime. Astfel se incapsuleaza vitaminele din pulberea de orz verde si nutrientii respectiv mineralele si enzimele din pulberea de orz verde. Metoda de lucru corespunde cu cea din exemplul 2.

Obținerea dispersiei de liposomi fosfolipidici (A): In balonul rotavaporului de 1 L se amesteca 30 g DPPC (dipalmitoil fosfatidil colina – de puritate Sigma-Aldrich & Merck) cu 250 g apa bidistilata de 100 °C timp de 2 minute la o turatie de 4000 rotatii pe minut, la presiune atmosferică. Astfel se formeaza o emulsie apa/ulei (W/O).

Obținerea solutiei de vitamine-nutrienti (B): Intr-un recipient de 500 mL se adauga 10 g pulberea din orz verde, peste care se toarna 250 mL apa distilata de 21°C. Recipientul se aseaza pe agitatorul magnetic fara incalzire si dizolvarea are loc la turatia de 400 rotatii/minut, timp de 2 minute.

Incapsularea complexului vitamine-nutrienti in emulsia apa/ulei (W/O): se realizeaza prin amestecarea solutiei de vitamine-nutrienti (B) cu solutia de liposomi fosfolipidici (A) in rotavapor, timp de 3 minute la temperature de 21°C la turatia de 4000 rotatii pe minut la presiune atmosferica. Se obtine o emulsie apa-complex/ulei (W-complex/O).

Incapsularea propriuzisa a complexului vitamine-nutrienti in liposomi: se realizeaza in baia de ultrasonare timp de 30 minute la o putere a campului ultrasonor de 100 wati/cm2 pana la incapsularea totala a complexului sub forma de vezicule lipozomale cu dimensiunea cuprinsa intre 1-3 microni.

Ajustarea pH-ului dispersiei de lipozomi la 7-7,5 dupa operatia de ultrasonare.

Caracteristicile produsului obtinut sunt prezentate in tabelul 3.

Tabel 3. Caracterizarea liposomilor incapsulati cu vitamine si nutrienti.

Nr.crt	Exemplul 3	Valorile determinarilor
1	Diametru (μm)	1-3 microni
2	Stabilitatea liposomala (luni)	4
3	Eficienta incapsularii (%)	30

Revendicare:

1. Metoda de incapsulare a nutraceuticelor respectiv vitamine si/sau nutrienți în liposomi caracterizata prin aceea ca este constituita din urmatoarele etape in ordine succesiva:

-amestecarea fosfolipidei cu apa fiarta in raport de 1:8,33 (m/m) timp de 2 minute la o turatie de 4000 rotatii pe minut ;

-amestecarea vitaminelor si/sau nutrientilor hidrosolubili cu apa distilata la temperatura de 21°C, turatia de 400 rotatii/minut, timp de 2-5 min in functie de tipul vitaminelor/nutrienților folositi;

-amestecarea solutiei de fosfolipide cu solutia de vitamine si/sau nutrienti hidrosolubili timp de 3 minute la temperature de 21°C la turatia de 4000 rotatii pe minut;

-adaugarea sub agitare a vitaminelor/nutrientilor liposolubili in amestecul solutiei de fosfolipide cu solutia de vitamine si/sau nutrienti hidrosolubili si agitare timp de 2 minute la temperatura de 21°C la o turatie de 400 rotatii/minut;

-ultrasonare timp de 30 minute la o putere a campului ultrasonor de 100 wati/cm² pana la incapsularea vitaminelor si/sau a nutrientilor sub forma de vezicule lipozomale cu dimensiunea cuprinsa intre 1-3 microni.

- ajustarea pH-ului dispersiei de lipozomi la 7-7,5 dupa operatia de ultrasonare.

