



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00672**

(22) Data de depozit: **23/09/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/05/2019** BOPI nr. **5/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2017 BOPI nr. **6/2017**

(73) Titular:

- **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU ȘTIINȚE BIOLOGICE, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE CHIMICO-FARMACEUTICĂ - ICCF, CALEA VITAN NR.112, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **HOFIGAL EXPORT - IMPORT S.A., INTRAREA SERELOR NR.2, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

- **LĂCĂTUȘU IOANA, ALEEA BĂIUȚ NR.4, BL.C7BIS, AP.28, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **BADEA NICOLETA, STR.LEREȘTI NR.3, BL.A 2, SC.6, ET.4, AP.88, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**

- **BADEA GABRIELA, STR. DR. NICULAE D. STAICOVICI NR. 45-49, BL. 3, SC. A, ET. 1, AP. 4, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **MOLDOVAN LUCIA, BD. CONSTRUCTORILOR NR.24, BL. 19, SC.A, ET.2, AP.13, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **PANTELI IRINA- MINERVA, STR. SPĂTARUL NICOLAE MILESCU NR. 46-48, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **RAȘIT IUKSEL, BD.DINICU GOLESCU NR.37, BL.4, SC.2, ET.1, AP.40, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **POPESCU MARIANA, STR.VIIOR II NR.5, PANTELIMON, IF, RO;**
- **BORDEI NATALIȚA, STR. PRIDVORULUI NR. 13, SC. A, ET. 2, AP. 11, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **STAN RALUCA, BD. MATEI BASARAB NR. 87, BL. 121, SC. A, ET. 2, AP. 6, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **ISTRATI DANIELA, ALEEA FUIORULUI NR. 4, BL. Y3C, SC. 2, ET. 5, AP. 65, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **MEGHEA AURELIA, STR.OLIMPULUI NR.76, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

CN 102283809 A; EP 3023105 B1

(54) **NANOTRANSPORTORI LIPIDICI ÎNCĂRCAȚI CU PRINCIPII ACTIVE VEGETALE ȘI SINTETICE, ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTORA**



RO 131955 B1

1 Invenția prezentă se referă la un procedeu de obținere a unor nanotransportori lipidici
pe bază de ulei de măceșe și ulei de negrilică, încărcăți cu principii active vegetale și sintetice -
3 extract de gălbenele și acid azelaic, ce prezintă o bună biocompatibilitate și un efect
antiinflamator amplificat, ceea ce-i conferă un potențial aplicativ ridicat în tratamentul afecțiunilor
5 inflamatoare localizate la nivelul pielii.

În pofida relevanței farmacologice a uleiurilor și a extractelor provenite din diferite surse
7 vegetale, potențialul biologic al multor ingrediente active din plante este încă insuficient explorat
în domeniul nanotehnologiei cu implicații în industriile asociate sănătății. Având în vedere
9 tendințele actuale la nivel mondial, utilizarea resurselor vegetale pentru furnizarea de
ingrediente active naturale, care să manifeste efecte secundare scăzute, precum și multiple
11 efecte terapeutice, deschide noi perspective în domeniul biomedical.

Sistemele coloidale de tip transportori lipidici nanostructurați (NLCs), derivați din
13 nanoparticule lipidice solide (SLNs), prin înlocuirea unor cantități adecvate de lipide solide cu
lipide lichide, și-au dovedit eficiența în transportul și eliberarea controlată a multor compuși
15 activi de natură alimentară, cosmetică și farmaceutică [J. Varshosaz, F. Hassanzadeh, H.
Sadeghi, S. Andalib, Eur. J. Med. Chem., 2012, 54, 429-438. Y. Liu, L. Wang, Y. Zhao, M.
17 He, X. Zhang, M. Niu, N. Feng, Int. J. Pharm., 2014, 476, 169-177]. În formulările NLCs uleiul
încorporat în miezul lipidic creează o matrice lipidică solidă mai puțin ordonată, ceea ce permite
19 o capacitate mai mare de încărcare a medicamentelor, și o posibilitate mai mică de expulzare
a acestora în timpul depozitării, în comparație cu sistemele de tip SLNs [S. Doktorovova, E.
21 B. Souto, A. M. Silva, Eur. J. Pharm. Biopharm., 2014, 87, 1-18]. Deși sunt bine cunoscute
beneficiile ambelor entități naturale, uleiuri vegetale și extracte vegetale, există totuși un deficit
23 major în literatura de specialitate cu privire la asocierea acestora cu sistemele NLCs.

În **US 20130017239 A1** au fost dezvoltate formulări cosmetice pe bază de SLNs și de
25 NLCs, unde au fost utilizate diferite tipuri de lipide solide în asociere cu uleiuri vegetale, printre
care uleiurile de soia, de porumb și de măsline. Într-un brevet similar - **US 2012/0128777 A1**,
27 uleiul de cânepă a fost folosit cu scopul obținerii unor micro- și nanoparticule lipidice, care să
conducă la acumularea la nivel dermic a particulelor solide. Alte sisteme de distribuție de tip
29 NLCs ce încapsulează vitamina C, vitamina A și preparate cu ulei de soia au fost brevetate în
US 2013/0017239 A1. Compoziția unor nanocapsule lipidice pe bază de ulei de oregano, cu
31 proprietăți antibacteriene, antifungice și antiparazitice, a fost descrisă în **US 2014/0045692 A1**.

Referitor la încapsularea extractelor vegetale în sistemele SLNs și NLCs, doar câteva
33 studii publicate în 2015 au fost efectuate pentru a înlocui total sau parțial nano-încapsularea
medicamentelor sintetice cu fitochimicale, cu scopul de a îmbunătăți efectele terapeutice, sau
35 de a furniza proprietăți biologice suplimentare. Câteva exemple includ încapsularea *Calendula*
officinalis în SLNs cu scopul de a îmbunătăți activitatea de reparare epitelială în linia celulară
37 WKD conjunctivală [L. Arana, C. Salado, S. Vega, O. Aizpurua-Olaizola, I. de la Arada, T.
Suarez, A. Usobiaga, J. L. R. Arrondo, A. Alonso, F. M. Goni, I. Alkorta, Colloids Surf. B.,
39 2015, 135, 2015, 18-26], sinteza *Salvia officinalis* și *Satureja montana* încărcate în SLNs, cu
o stabilitate ridicată în timpul digestiei la nivelul intestinului subțire [D. A. Campos, A. R.
41 Madureira, B. Sarmiento, A. M. Gomes, M. M. Pintado, Food Res Int., 2015, 78, 131-140],
sau prepararea sistemelor Curcumina-SLNs, care pot reduce în mod eficient expresia
43 citokinelor pro-inflamatoare din ser [J. Wang, H. Wang, R. Zhu, Q. Liu, J. Fei, S. Wang,
Biomaterials, 2015, 53, 475-483]. În ceea ce privește exploatarea sistemelor NLCs pentru
45 încapsularea extractelor de plante, aceasta a debutat recent, cu un studiu elaborat de Oliveira
și colab., care descrie captarea unui extract bogat în eugenol în NLCs, principalul scop fiind
47 acela de a îmbunătăți caracteristicile nutraceutice ale antioxidantilor naturali [D. F. Cortes-

Rojas, C. R. F. Souza, W. P. Oliveira, J. of Food Eng., 2014, 127, 34-42]. În literatura 1
brevetelor, o singură invenție furnizează compoziții de nanoparticule funcționale ce conțin 1
extract de ginkgo biloba - **US 2008/0254126 A1**, preparate utilizând metode umede și uscate 3
de spargere a extractului, care prezintă efecte semnificative în activarea celulelor de la nivelul 5
creierului. 5

NLCs pot fi preparați prin diferite metode, incluzând dispersarea unei faze uleioase, ce 7
conține diferite tipuri de lipide solide și lichide, într-o fază apoasă, formată dintr-un amestec de 7
surfactant și co-surfactanți. Metodele de omogenizare de energie ridicată și formarea unui 9
înveliș protector de surfactanți sunt necesare pentru obținerea dispersiilor de nanoparticule 9
lipidice stabile. În **US 2014/0205722 A1** este descrisă prepararea de NLCs cu dimensiuni medii 11
cuprinse între 50 și 500 nm, pentru conservarea avansată a fructelor și legumelor din diferite 11
produse alimentare, un obiectiv specific fiind alocat păstrării prospețimii și proprietăților 13
nutriționale. Procedul de omogenizare la presiune ridicată (HPH) a fost folosit în 13
US 2016/0022550 A1, pentru obținerea de nanotransportori lipidici cu grad alimentar, utilizați 15
în distribuția orală și parenterală a ingredientelor active lipofile sau amfifile, și în 15
WO 2011116963 A2, pentru sinteza de sisteme de distribuție de tip SLNs și NLCs a 17
ingredientelor active alimentare, cosmetice și farmaceutice. În literatura brevetelor sunt furnizate 17
și alte metode de obținere a NLCs utilizând tehnici precum microemulsionarea 19
(**US 2010/0247619 A1**; **US 7611733**) și difuzia cu solvenți (**CN 103417481**, **US 20110038941** 19
A1). De exemplu, tehnica microemulsionării a fost brevetată în **WO 2013105101 A1** și 21
US 7611733 B2, pentru încapsularea unei game destul de largi de medicamente de natură 21
hidrofilă și amfifilă. Pe aceeași linie științifică este încadrată și invenția din **EP 2037889 B1**, 23
pentru sinteza de NLCs obținuți prin metoda microemulsionării din amestec de gliceroli și acid 23
behenic, utilizând drept surfactanți fosfatidilcolina și taurocolatul de sodiu. Aceste sisteme 25
transportor au fost utilizate pentru distribuția unei cantități semnificative de Riluzol la nivelul sis- 25
temului nervos central, cu aplicabilitate în tratamentul sclerozei. Deși tehnica microemulsionării 27
permite obținerea unor nanoparticule lipidice de ordinul zecilor de nm, prezintă dezavantajul 27
utilizării unor concentrații mari de surfactanți care pot ridica probleme majore în ceea ce privește 29
existența unui risc ridicat de toxicitate. În metoda difuziei cu solvenți, emulsiile dezvoltate 29
implică utilizarea solvenților organici care limitează utilizarea acestora pentru aplicabilitate 31
directă în industriile asociate sănătății, din cauza riscului lor toxicologic. Mai mult, aceste ultime 31
două metode sunt dificil de adaptat la scară industrială.

Alte dezavantaje, precum stabilitatea fizică și chimică scăzută (de exemplu: apariția 33
fenomenelor de agregare, oxidare etc.), dificultatea de obținere a unor distribuții relativ înguste 33
de dimensiune a particulelor lipidice, precum și eficiența de încapsulare scăzută a principiilor 35
active hidrofile au ca rezultat direct scăderea calității formulării farmaceutice/cosmetice și, 37
implicit, a acțiunii terapeutice a principiului activ încapsulat în sistemele nanotransportor. 37

Obținerea unor noi sisteme NLCs care, pe lângă rolul de transportor eficient, manifestă 39
și capacitatea de a prezenta proprietăți terapeutice care să substituie dozele ridicate de 39
substanțe active farmaceutic rămâne până în prezent o problemă care nu este pe deplin 41
rezolvată. Ca atare, prezenta invenție are în vedere utilizarea unei metode combinate de 41
omogenizare cu grad înalt de forfecare (HSH) și la presiune ridicată (HPH), pentru dezvoltarea 43
unor noi sisteme nanotransportor lipidice care conțin cantități semnificative de ingrediente 43
naturale provenite din uleiuri și extracte vegetale, ce prezintă avantajul de a fi o gazdă eficientă 45
pentru ambele categorii de principii active - atât lipofile (extractul de gălbenele), cât și hidrofile 45
(acidul azelaic). Noile sisteme NLCs prezintă o bună biocompatibilitate, activitate antioxidantă 47
semnificativă și un efect antiinflamator amplificat (anumite compoziții manifestând chiar o 47

RO 131955 B1

1 acțiune terapeutică superioară comparativ cu efectul antiinflamator determinat prin utilizarea
unui produs comercial), ceea ce le conferă acestora un potențial aplicativ ridicat în tratamentul
3 afecțiunilor inflamatoare localizate la nivelul pielii.

În literatura brevetelor există doar câteva invenții care abordează obținerea unor
5 nanoparticule lipidice (NPs), cu aplicabilitate în distribuția locală/dermică a substanțelor active.
De exemplu, **EP 2821077 A1** și **EP 3023105 A2** prezintă obținerea de NPs lipidice care
7 încapsulează un factor de creștere și/sau un lipid sau peptid cu acțiune antimicrobiană, cu
aplicabilitate în vindecarea rănilor localizate la nivelul pielii, în particular, sub formă de geluri
9 administrate local. Cele două aplicații se referă la o metodă de preparare a NPs lipidice utilizând
o etapă de ultrasonare, urmată de evaporarea solventului. Tot pentru tratamentul bolilor dermice
11 au fost dezvoltate în **US 2014/0079785 A1** NPs lipidice care co-încapsulează un corticosteroid
și vitamina D. Singura invenție care face referire la obținerea NLCs utilizând metoda combinată
13 de omogenizare cu grad înalt de forfecare și presiune ridicată, cu aplicabilitate în distribuția
locală a unor principii active cu acțiune antioxidantă, este **CN 102283809 A**.

15 Problema tehnică pe care o rezolvă procedeul conform invenției constă în obținerea unor
nanotransportori lipidici pe bază de ulei de măceșe și ulei de negrilică, ce pot fi încărcăți cu
17 două tipuri de principii active vegetale - extract de gălbenele (EGb), și sintetice - acid azelaic
(AAz), ce prezintă o bună biocompatibilitate și un efect antiinflamator amplificat.

19 Procedeul de obținere a NLCs conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin
aceea că va cuprinde:

21 a. formarea unei pre-emulsii lipidice libere și încărcate cu două componente active de
natură vegetală (extract de gălbenele) și sintetică (acid azelaic), obținute prin punerea în
23 contact, sub agitare magnetică, a unei faze lipidice și a unei faze apoase, la o temperatură de
73...75°C, și menținere la temperatură constantă, timp de 20 min;

25 b. supunerea, pre-emulsiei lipidice la un proces inițial de omogenizare cu grad înalt de
forfecare (140000 rpm, timp de 1 min) și, ulterior, la un proces de omogenizare la presiune
27 ridicată (la 500 bar, timp de 196 s);

29 c. obținerea unor dispersii apoase de NLCs liberi și încărcăți cu cele două principii
active, prin răcire ușoară, sub agitare magnetică, la temperatura camerei a emulsiei supuse
celor două tipuri de omogenizări;

31 d. obținerea de NLCs în stare solidă, prin supunerea dispersiilor apoase de
nanotransportori lipidici liberi și încărcăți cu EGb, respectiv, EGb și AAz la un proces de
33 liofilizare, la -55°C, timp de 72 h.

NLCsuri în stare solidă, prin supunerea dispersiilor apoase de nanotransportori lipidici
35 liberi și încărcăți cu EGb, respectiv, EGb și AAz, conform invenției, înlătură dezavantajele de
mai sus prin aceea că aceștia conțin:

37 a. 24% ulei vegetal (ulei de negrilică sau ulei de măceșe);

b. 0,02% amestec caroteni proveniți din EGb;

39 c. 4...8% AAz, procente fiind exprimate în greutate.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

41 - procedeul descris în prezenta propunere constituie o metodă optimă pentru obținerea
unor noi sisteme NLCs care asigură o încărcare a ambelor categorii de principii active, atât
43 naturale (EGb), cât și sintetice (AAz), în același sistem nanotransportor;

- noile sisteme NLCs prezintă particularități structurale unice, favorabile pentru captarea
45 eficientă a EGb și a AAz atât în miezul lipidic hidrofob, cât și în învelișul exterior de surfactanți;

- procedeul de obținere a NLCs pe bază de ulei de măceșe și ulei de negrilică se
47 desfășoară în mediu apos, nu utilizează condiții de proces care să conducă la denaturarea
principiilor active provenite din uleiurile vegetale, și nu afectează integritatea structurală a EGb
49 sau a AAz;

RO 131955 B1

- obținerea nanoparticulelor lipidice se bazează pe folosirea unor materii prime biocompatibile, concentrații minime de surfactanți, și nu implică utilizarea unor substanțe agresive (de exemplu: solvenți organici sau surfactanți ce prezintă efect toxic asupra organismului);
 - comparativ cu nanotransportorii convenționali, sistemele NLCs pe bază de uleiuri vegetale sunt sigure, eficiente și, cel mai important, sunt dotate cu o varietate de efecte terapeutice, de exemplu: activitate antioxidantă, antibacteriană, antiinflamatoare ș.a.;
 - procedeul propus este simplu și eficient, implică etape distincte și ușor de reprodus, asigurând același nivel de control și prin transpunere la scară pilot;
 - metoda de omogenizare combinată - HSH și HPH - poate fi extinsă pentru obținerea unor NLCs ce pot, de asemenea, să fie adaptați pentru co-încapsularea unei game largi de principii active de natură lipofilă, dar și hidrofilă;
 - NLC-urile obținute prin procedeul propus pot fi utilizate sub formă de hidrogeluri, pentru dezvoltarea de formulări farmaceutice cu acțiune antiinflamatoare amplificată, principalele avantaje în utilizarea formulărilor hidrogel pe bază de nanotransportori lipidici fiind corelate cu dimensiunea acestora, stabilitate ridicată și putere de acoperire superioară (datorită suprafeței specifice mari), toate aceste caracteristici favorizând distribuția omogenă a principiilor active la nivelul pielii, și având ca rezultat obținerea unui efect terapeutic net superior, comparativ cu produse comerciale de referință.
- Procedeul conform invenției constă în obținerea unor nanotransportori lipidici pe bază de ulei de măceșe și ulei de negrilică, ce pot fi încărcăți cu două tipuri de principii active vegetale - extract de gălbenele (EGb), și sintetice - acid azelaic (AAz), ce prezintă o bună biocompatibilitate și un efect antiinflamator amplificat:
- a) formarea unei faze lipidice fără conținut de medicament, la o temperatură de 75°C, ce conține un amestec de lipide solide și lichide, respectiv, monostearat de gliceril:palmitat de cetil:ulei vegetal (ulei de negrilică sau ulei de măceșe), într-un raport de greutate de 1,16:1,16:1, respectiv, formarea unei faze lipidice care conține o fracție uleioasă de EGb ce asigură o concentrație de 0,02% amestec caroteni în formulările finale de NLCs în stare solidă, încărcăți cu EGb, respectiv, EGb și AAz;
 - b) formarea unei faze apoase fără conținut de medicament, la o temperatură de 75°C, ce conține un amestec de surfactanți de tip Tween 20:Fosfatidilcolină:Poloxamer 188 într-un raport de greutate de 4,66:1:1, respectiv, formarea unei faze apoase ce conține cantități diferite de principiu activ sintetic, ce asigură o concentrație de 4% și, respectiv, 8% acid azelaic în formulările finale de NLCs în stare solidă, încărcăți cu EGb și AAz;
 - c) formarea unei pre-emulsii lipidice - precursoare de NLCs - prin contactarea sub agitare magnetică a celor două faze, apoasă și lipidică, și menținere la un regim de temperatură constant de 75°C, timp de 20 min;
 - d) obținerea unor dispersii apoase de NLCs liberi și încărcăți cu EGb, respectiv, EGb și AAz, prin supunerea pre-emulsiei lipidice inițial la un proces de omogenizare cu grad înalt de forfecare (la 14000 rpm, timp de 1 min), urmat de un proces de omogenizare la presiune ridicată (la 500 bar, timp de 196 s) și ulterior răcire la temperatura camerei, sub agitare magnetică;
 - e) obținerea de NLCs în stare solidă, liberi și încărcăți, EGb, respectiv, EGb și AAz, prin supunerea dispersiilor apoase de NLCs la o etapă de liofilizare la -55°C, timp de 72 h. NLC-urile pe bază de ulei de negrilică sau ulei de măceșe, încărcate cu EGb, respectiv, amestec de EGb și AAz, conțin:
 - 24% ulei de negrilică/ulei de măceșe în toate cele 8 formulări de NLCs sintetizate (tabel);

RO 131955 B1

1 - 0,02% caroteni proveniți din EGb în NLC-urile încărcate cu EGb, respectiv, EGb și
AAz;

3 - 4% AAz în NLC_UN/UM_EGb_AAz 1, respectiv, 8% AAz în NLC_UN/UM_EGb_AAz
2, procentele fiind exprimate în greutate.

5 Procedeu conform invenției constă în aceea că se formează inițial o pre-emulsie lipidică
prin contactarea sub agitare magnetică a două faze, o fază lipidică ce conține 9...10% amestec
7 de lipide solide și lichide cu/fără extract de gălbenele, și o fază apoasă ce conține 2,5%
amestec de surfactanți cu/fără acid azelaic, la o temperatură de 75°C; pre-emulsia lipidică
9 obținută este menținută la o temperatură constantă de 75°C, timp de 20 min, este supusă unei
etape de omogenizare cu grad înalt de forfecare la 14000 rpm, timp de 1 min, ulterior unei etape
11 de omogenizare la presiune ridicată la 500 bar, timp de 196 s, după care este lăsată să se
răcească la temperatura camerei, sub agitare magnetică, cu formarea unei dispersii apoase de
13 transportori lipidici nanostructurați (NLCs), iar procesarea dispensei apoase de NLCs printr-un
proces de liofilizare la -55°C, timp de 72 h, conduce la obținerea NLC-urilor în stare solidă.

15 În cazul prezentei invenții au fost obținuți:

17 a. NLCs liberi, fără conținut de EGb și AAz, obținuți prin contactarea celor două faze
apoase și lipidice, și supunerea acestora unor procese de omogenizare conform
procedului descris;

19 b. NLCs ce co-încapsulează EGb, respectiv, amestec de EGb și AAz, obținuți printr-un
procedeu similar cu cel aplicat pentru nanotransportorii fără conținut de principii active.

21 Etapele de obținere a NLCs încărcăți cu EGb, respectiv, amestec de EGb și AAz
constau din:

23 - formarea unei faze lipidice care conține amestec de monostearat de gliceril:palmitat
de cetil:ulei de negrilică sau ulei de măceșe, într-un raport de greutate de 1,16:1,16:1;

25 - adăugarea în fază lipidică a unei fracții uleioase de EGb ce asigură o concentrație de
0,02% amestec caroteni în formulările finale de NLCs în stare solidă, încărcăți cu EGb,
27 respectiv, Egb și AAz;

29 - formarea unei faze apoase ce conține un amestec de surfactanți de tip Tween
20:Fosfatidilcolină:Poloxamer 188 într-un raport de greutate de 4,66:1:1;

31 - adăugarea în faza apoasă a unor cantități diferite de principiu activ sintetic ce asigură
o concentrație de 4% și, respectiv, 8% acid azelaic, în formulările finale de NLCs în stare solidă,
încărcăți cu EGb și AAz.

33 Se dau în continuare patru exemple de realizare a procedului conform invenției, în
legătură cu tabelul și figurile ce reprezintă:

35 *Tabel*

Compoziția NLC-urilor libere și a NLC-urilor încărcate cu EGb, respectiv, EGb și AAz

Formulări de NLCs libere și încărcate cu EGb, respectiv, EGb și AAz	PC (%)	MSG (%)	UN (%)	UM (%)	EGb în UN sau UM* (%)	Aaz (%)
1 NLC_UN (liber)	3,5	3,5	3	-	-	-
2 NLC_UN_EGb	3,5	3,5	1	-	2	-
3 NLC_UN_EGb_AAz 1	3,25	3,25	1	-	2	0,5
4 NLC_UN_EGb_AAz 2	3	3	1	-	2	1

Formulări de NLCs libere și încărcate cu EGb, respectiv, EGb și AAz	PC (%)	MSG (%)	UN (%)	UM (%)	EGb în UN sau UM* (%)	Aaz (%)
5	NLC_UM (liber)	3,5	3,5	-	3	-
6	NLC_UM_EGb	3,5	3,5	-	1	2
7	NLC_UM_EGb_AAz 1	3,25	3,25	-	1	2
8	NLC_UM_EGb_AAz 2	3	3	-	1	2

Notații: EGb = extract uleios de gălbenele în ulei de negrilică sau ulei de măceșe;

AAz = acid azelaic;

MSG = monostearat de glicerol;

PC = palmitat de cetil;

UN = ulei de negrilică;

UM = ulei de măceșe.

*Extractul uleios de gălbenele în UN conține 2,80 mg caroteni în 100 g dispersie apoasă de NLCs; Extractul uleios de gălbenele în UM conține 2,90 mg caroteni în 100 g dispersie apoasă de NLCs.

În continuare sunt prezentate 4 exemple de realizare în legătură cu figurile ce reprezintă:

- fig. 1, diametrele medii și indicii de polidispersitate pentru sistemele NLCs sintetizate;
- fig. 2, imaginile TEM ale NLC_UN/UM_EGb_AAz 2;
- fig. 3, potențialul electrocinetic al dispersiilor de nanotransportori lipidici liberi și încărcăți cu principii active naturale și sintetice;
- fig. 4, analiza DSC a NLCs liberi și încărcăți cu EGb, respectiv, amestec de EGb și Aaz;
- fig. 5, eficiența de încapsulare a carotenilor din EGb (a) și, respectiv, a AAz (b) co-încapsulați în sistemele NLCs;
- fig. 6, determinarea *in vitro* a activității antioxidante;
- fig. 7-a, viabilitatea celulelor L929 cultivate în prezența diferitelor concentrații de Egb_UN, NLC_UN_EGb și NLC_UN_EGb_AAz 2 evaluată prin testul MTT la 24 și 72 h; b. Efectul EGb_UN, NLC_UN_EGb și NLC_UN_EGb_AAz 2 asupra celulelor L929 la concentrațiile indicate, după 72 h de tratament;
- fig. 8 - a, viabilitatea celulelor L929 cultivate în prezența diferitelor concentrații de Egb_UM, NLC_UM_EGb și NLC_UM_EGb_AAz 2 evaluată prin testul MTT la 24 și 72 h; b. Efectul EGb_UM, NLC_UM_EGb și NLC_UM_EGb_AAz 2 asupra celulelor L929 la concentrațiile indicate, după 72 h de tratament;
- fig. 9, dozarea prin metoda ELISA a producției de citokine IL-6, IL-1 β și TNF- α , secretate în mediul de cultură al celulelor macrofage stimulate cu LPS și tratate cu diferite concentrații de EGb_UN, NLC_UN_EGb și NLC_UN_EGb_AAz 2;
- fig. 10, dozarea prin metoda ELISA a producției de citokine IL-6, IL-1 β și TNF- α , secretate în mediul de cultură al celulelor macrofage stimulate cu LPS și tratate cu diferite concentrații de EGb_UM, NLC_UM_EGb și NLC_UM_EGb_AAz 2;
- fig. 11, activitatea antiinflamatoare procentuală pe momente (HG-NLC 1 = Hidrogel pe bază de NLC_UM; HG-NLC 2 = NLC_UM_EGb_AAz 2; HG-NLC 3 = Hidrogel pe bază de NLC_UN; HG-NLC 4 = NLC_UN_EGb_AAz 2).

Exemplul 1

Obținerea de NLC_UN/UM

Se formează o fază lipidică prin topirea la o temperatură de 73...75°C a unui amestec de 10% monostearat de gliceril, palmitat de cetil și ulei vegetal (ulei de negrilică sau ulei de măceșe), într-un raport de greutate de 1,16:1,16:1. Formarea unei faze apoase la o temperatură

RO 131955 B1

1 de 73...75°C se realizează prin utilizarea a 2,5% amestec de surfactanți ce conține Tween
20:Fosfatidilcolină:Poloxamer 188 într-un raport de greutate de 4,66:1:1. Prin contactarea celor
3 două faze lipidice și apoase, sub agitare magnetică și la o temperatură de 73...75°C, se
formează o pre-emulsie lipidică ce se menține la regim de temperatură constantă, timp de
5 20 min. Pre-emulsia rezultată se supune inițial unei etape de omogenizare cu grad înalt de
forfecare, aplicând 14000 rpm timp de 1 min, și, ulterior, unei etape de omogenizare la presiune
7 ridicată la 500 bar, timp de 196 s. Nanodispersia rezultată este lăsată să se răcească la
temperatura camerei, sub agitare magnetică, cu formarea unei dispersii apoase de NLCs.
9 Ulterior dispersia apoasă de NLC este congelată la -20°C, timp de 24 h, și supusă unui proces
de liofilizare la -55°C, timp de 72 h, cu obținerea de nanotransportori liberi de natură solidă.

11 **Exemplul 2**

Obținerea de NLC_UN/UM_EGb

13 Similar exemplului 1, cu deosebirea că se adaugă în faza lipidică o fracție uleioasă de
EGb ce asigură o cantitate de 2,8 mg caroteni (în cazul utilizării unei fracții uleioase de EGb în
15 ulei de negrilică), respectiv, de 2,9 mg caroteni (în cazul utilizării unei fracții uleioase de EGb
în ulei de măceșe) în 100 g dispersie apoasă de NLCs. Topitura lipidică obținută se menține la
17 75°C timp de 2 min, pentru a se asigura o bună dispersare a EGb. Etapele ulterioare corespund
celor descrise în cadrul exemplului 1, cu obținerea în final a NLCs pe bază de ulei de negrilică
19 sau ulei de măceșe în formă solidă, ce încapsulează EGb.

21 **Exemplul 3**

Obținerea de NLC_UN/UM_EGb_AAz 1

23 Similar exemplului 2, cu deosebirea că faza lipidică este constituită din 9,5% amestec
de monostearat de glicerol, palmitat de cetil și ulei vegetal (aflate în același raport de greutate
precum cel descris în exemplul 2), iar în faza apoasă se introduce o cantitate de principiu activ
25 sintetic ce asigură o concentrație de 0,5% acid azelaic în dispersia apoasă de NLCs. Etapele
ulterioare corespund celor descrise anterior, cu obținerea de NLCs în formă solidă ce co-
27 încapsulează EGb și AAz.

29 **Exemplul 4**

Obținerea de NLC_UN/UM_EGb_AAz 2

31 Similar exemplului 3, cu deosebirea că faza lipidică este constituită din 9% amestec de
monostearat de glicerol, palmitat de cetil și ulei vegetal (aflate în același raport de greutate
precum cel descris în exemplul 2), iar în faza apoasă se introduce o cantitate de principiu activ
33 sintetic ce asigură o concentrație de 1% acid azelaic în dispersia apoasă de NLCs. Etapele
ulterioare corespund celor descrise anterior, cu obținerea de NLCs în formă solidă ce co-
35 încapsulează EGb și Aaz.

1. Evaluarea diametrelor medii și a polidispersității

nanotransportorilor lipidici (analiza DLS). Caracterizarea morfologică (analiza TEM)

37 Cele 8 formulări de nanotransportori lipidici preparați cu uleiurile vegetale bogate în acizi
39 grași D-6 (de exemplu: ulei de negrilică - UN, respectiv, ulei de măceșe - UM), liberi sau
încărcați cu extractul vegetal, respectiv, amestec de extract uleios de gălbenele (EGb) și acid
41 azelaic (AAz) au fost obținute pornind de la 2,5% amestec de surfactanți Tween 20:Fosfatidil
colină:Poloxamer și compoziții variabile de fază lipidică (cuprinse între 9 și 10%). Compoziția
43 formulărilor de NLCs este redată în tabel.

45 Diametrele medii evaluate pe baza tehnicii DLS pentru sistemele de NLC încărcate cu
EGb și AAz au variat între 107 și 126 nm, iar indicii de polidispersitate între 0,110 și 0,259
(fig. 1). Nu s-au observat variații semnificative ale dimensiunii NLC preparate cu cele două
47 uleiuri vegetale, valorile diametrelor medii fiind asemănătoare pentru ambele seturi de NLC, o

ușoară creștere a diametrelor fiind semnalată în cazul sistemelor ce co-încapsulează 0,5% AAz și 2% EGb (114 nm). O creștere semnificativă a dimensiunii particulelor a fost determinată pentru sistemele NLC încărcate cu 1% acid azelaic.

Valorile indicelui de polidispersitate $<0,18$, obținute pentru marea majoritate a sistemelor NLC, pun în evidență existența unei populații relativ înguste de nanotransportori lipidici. Un raport optim între gradul de polidispersitate și dimensiunea particulelor a fost obținut pentru NLC cu ulei de negrilică, încărcat cu extract de gălbenele și acid azelaic 1% ($Zave = 110,5 \pm \pm 0,608$ nm și $Pdl = 0,110 \pm 0,015$).

Microscopia electronică de transmisie, realizată pe două probe reprezentative de nanotransportori lipidici încărcăți cu amestec de principii active naturale și sintetice, relevă prezența unor particule sferice cu diametre medii de aproximativ 200 nm (fig. 2).

2. Determinarea stabilității fizice a NLCs liberi și încărcăți cu principii active vegetale și sintetice

Pentru a determina stabilitatea fizică a dispersiilor de NLC libere și încărcate cu extract de gălbenele și/sau acid azelaic, s-au realizat măsurători ale potențialului electrocinetic. Valorile potențialului electrocinetic în cazul celor 12 formulări de NLC au fost cuprinse între -36,8 și -58,7 mV, valori ce indică o stabilitate bună a nanotransportorilor lipidici preparați cu ulei de măceșe și, respectiv, ulei de negrilică (fig. 3).

În cazul ambelor seturi de nanotransportori preparați cu UM sau UN s-a observat că cea mai bună stabilitate o au dispersiile de NLC libere sau încărcate doar cu extract de gălbenele (de exemplu: -53 mV pentru NLC neîncărcate și, respectiv, -45 și -58 mV pentru NLC încărcate cu 2% EGb). La adăugarea acidului azelaic, potențialul zeta crește pentru sistemele de NLC preparate cu cele două uleiuri vegetale. De asemenea, NLC care încapsulează doar acid azelaic au valori ale potențialului zeta ceva mai ridicate, ceea ce indică faptul că extractul de gălbenele participă la modificarea sarcinilor de suprafață, în favoarea unor mai bune repulsii între particulele lipidice. Dintre sistemele NLC sintetizate, s-a constatat că cea mai bună stabilitate s-a determinat în cazul nanotransportorilor preparați cu ulei de măceșe și încărcăți doar cu extract de gălbenele (fig. 3).

3. Modificări structurale apărute după co-încapsularea principiilor active vegetale și sintetice

Una dintre caracteristicile fundamentale ale sistemelor nanotransportor, ce trebuie luată în considerare, este asociată modificărilor miezului lipidic - strâns corelate cu eficiența de încapsulare a componentelor active de interes. Studiul comportării miezului lipidic al NLC-urilor, înainte și după încapsularea celor două categorii de principii active naturale și sintetice, realizat pe baza calorimetriei de scanare diferențială (DSC), a scos în evidență modificări semnificative ale temperaturii, entalpiei și ale alurilor peak-urilor endoterme ale formulărilor NLC-urilor sintetizate (fig. 4). Dacă, în cazul sistemelor NLC-urilor ce încapsulează doar EGb, modificările structurale au fost minore, perturbări evidente ale rețelei lipidice au fost semnalate în cazul sistemelor NLC-urilor care co-încapsulează ambele tipuri de componente active - EGb, respectiv, amestec de EGb și AAz. De exemplu, au fost determinate diferențe de $1,4^{\circ}\text{C}$ și 10 J/g pentru NLC_UN_EGb_AAz 2, și $3,8^{\circ}\text{C}$ și 20 J/g în cazul NLC_UM_EGb_AAz 2, comparativ cu sistemele NLC_UN/UM (fără principii active încapsulate). Creșterea conținutului de acid azelaic de la 0,5% la 1% a produs cele mai evidente modificări ale rețelei lipidice, respectiv, obținerea unor miezuri lipidice mai dezordonate, cu o scădere vizibilă a intensității peak-ului endoterm în special în cazul NLC_UM_EGb_AAz 2 (fig. 4b).

Prezența non-concurentă a celor două principii active hidrofiele și lipofile în același sistem nanotransportor a condus la obținerea unor eficiențe ridicate de încapsulare, $>80\%$, atât pentru extractul vegetal, cât și pentru acidul azelaic (fig. 5). Tipul de ulei vegetal utilizat la sinteza NLCs

1 nu a influențat capacitatea de încapsulare a celor două principii active, valorile EE% fiind
2 similare în cazul AAz, și ușor mai scăzute în cazul EGb încapsulat în sistemele NLC preparate
3 cu ulei de măceșe. De exemplu, eficiența de încapsulare a NLC_EGb_AAz preparate cu UM
4 a fost de $93\% \pm 0,30$ pentru EGb, și $84\% \pm 1,41$ pentru AAz, în timp ce cele preparate cu UN
5 au prezentat eficiențe de încapsulare de $93,3\% \pm 0,98$ pentru EGb, și $83,8\% \pm 0,99$ pentru AAz
6 (fig. 5). O ipoteză care poate fi asociată cu obținerea acestor eficiențe mari de încapsulare este
7 aceea a repartizării preferențiale a celor două componente, faza uleioasă a miezului lipidic al
8 NLC jucând un rol important în captarea EGb, în timp ce AAz prezintă o afinitate mai mare
9 pentru învelișul creat de amestecul de surfactanți. Cu alte cuvinte, lipsa unei competiții directe
10 între AAz - hidrofil și EGb - lipofil este responsabilă de găzduirea remarcabilă a ambelor
11 componente în același sistem nanotransportor de natură lipidică.

12 *4. Determinarea in vitro a activității antioxidante a extractelor* 13 *vegetale și a NLC încărcate cu EGb și AAz*

14 Formulările de NLC - libere și încărcate cu cele două principii active - au fost supuse
15 acțiunii unor radicali liberi oxigenați generați *in situ* într-un sistem de chemiluminescență, cu
16 scopul evaluării *in vitro* a activității antioxidante (AA%). În scop comparativ, diferite soluții de
17 acid azelaic, ulei de măceșe, ulei de negrilică și extract de gălbenele de concentrații
18 corespunzătoare cu cele din sistemele nanotransportor au fost și ele evaluate în vederea
19 determinării abilității lor de a capta radicali liberi generați în sistemul de chemiluminescență.
20 Ambele extracte uleioase provenite din flori de gălbenele (EGb_UN/UM) prezintă o bună
21 activitate antioxidantă, aproximativ 85%, însă co-încapsularea acestora alături de acidul azelaic
22 în sistemele NLCs conduce la apariția unui efect sinergetic, evidențiat prin valorile amplificate
23 ale activității antioxidante (fig. 6). Astfel, pentru sistemele de NLC_UN/UM EGb_AAz 1, ce co-
24 încapsulează 1% EGb și 0,5% AAz, au fost determinate valori ale AA% de $95 \pm 0,54\%$ și,
25 respectiv, de $94,2 \pm 0,36\%$. Creșterea cantității de acid azelaic la 1% a avut ca rezultat
26 atingerea unei valori de $97 \pm 0,48\%$ de a capta radicalii liberi din sistem (fig. 6).

27 *5. Evaluarea in vitro a biocompatibilității extractelor vegetale* 28 *și a NLC încărcate cu EGb și AAz*

29 Pentru a evalua acțiunea citotoxică a formulărilor NLC, fibroblastele de șoarece din linia
30 celulară L929 au fost expuse la diferite concentrații crescute de EGb și, respectiv, de nano-
31 transportori lipidici încărcate cu EGb și AAz, iar viabilitatea lor a fost măsurată prin metoda MTT.

32 Rezultatele obținute au arătat că după 24 h de tratament viabilitatea celulară a fost mai
33 mare de 80% (efect non-citotoxic) în intervalul de concentrații 5...200 $\mu\text{g/ml}$ pentru EGb_UN,
34 și ușor mai mică (76,2%) la concentrația de 400 $\mu\text{g/ml}$ (fig. 7a). În cazul sistemelor nano-
35 transportor, NLC_UN_EGb și NLC UN_EGb_AAz 2, după 24 h, proliferarea celulară a fost mai
36 mare de 80% pe domeniul de concentrații 5...700 $\mu\text{g/ml}$, majoritatea valorilor viabilității celulare
37 fiind net superioare comparativ cu proba martor la concentrații cuprinse între 5 și 400 $\mu\text{g/ml}$.

38 După 72 h de tratament, viabilitatea celulară s-a menținut peste 80% pentru EGb_UN
39 doar în domeniul de concentrații 5...100 $\mu\text{g/ml}$, după care s-a observat un ușor efect citotoxic
40 (viabilitate 71%) la o concentrație de 200 $\mu\text{g/ml}$, culminând cu atingerea unui prag de toxicitate
41 ridicat pentru concentrații de 700 și 1000 $\mu\text{g/ml}$ EGb_UN (de exemplu: viabilitate celulară de 8%
42 și 5%, la 72 h). În schimb, la un tratament al celulelor L929 de 72 h cu NLC_UN_EGb și
43 NLC_UN_EGb_AAz 2, s-a observat o bună viabilitate celulară, cu valori >80% obținute pe un
44 interval de concentrații cuprins între 5 și 400 $\mu\text{g/ml}$ (fig. 7a). Un ușor efect citotoxic a fost
45 semnalat la o concentrație de 700 $\mu\text{g/ml}$, de exemplu: 72,5% viabilitate celulară pentru
NLC_UN_EGb și 70,9% pentru NLC_UN_EGb_AAz 2.

RO 131955 B1

Aceste rezultate scot în evidență efectul benefic al încapsulării EGb asupra proliferării celulare, NLC_UN_EGb și NLC_UN_EGb_AAz 2 prezentând un grad ridicat al biocompatibilității, comparativ cu EGb nativ pe domeniul de concentrații cuprins între 5...700 µg/ml pentru 24 h de tratament și respectiv 5...400 µg/ml pentru 72 h de tratament.

Informații adiționale asupra caracteristicilor structurale ale celulelor L929 au fost confirmate prin microscopia optică. Morfologia celulelor L929 a fost modificată în funcție de tipul și concentrația de EGb_UN, NLC_UN_EGb sau NLC_UN_EGb_AAz (fig. 7b). După 72 h, o concentrație de 400 µg/ml NLC care încapsulează EGb sau amestec de EGb și AAz nu a indus modificări ale morfologiei și densității celulare, celulele prezentând un aspect normal, ușor poligonal, similar cu cel al culturii martor. În schimb, în cazul unei concentrații de 400 µg/ml EGb_UN și, respectiv, 700 µg/ml NLC ce încapsulează EGb, respectiv, EGb și AAz, densitatea celulară începe să scadă, celulele prezentând o morfologie modificată. Se evidențiază celule poligonale, celule stelate cu multiple prelungiri, celule fuziforme cu prelungiri, celule gigant cu unul sau mai mulți nuclei și eventuale resturi celulare (fig. 7b). La concentrații de 700 µg/ml EGb_UN și 1000 µg/ml NLC_UN_EGb sau NLC_UN_EGb_AAz, dezvoltarea normală a culturii celulelor L929 este afectată, acestea prezentând un efect citotoxic asupra celulelor individuale (de exemplu: celulele sunt puternic modificate, majoritatea fiind rotunjite sau fusiforme).

În cazul NLC-urilor preparate cu ulei de măceșe, nu s-a observat apariția unui efect toxic asupra celulelor L929 tratate cu concentrații de până la 400 µg/ml, viabilitatea celulară fiind mai mare de 80% (fig. 8a). Un tratament cu 700 µg/ml NLC pe bază de UM și EGb a condus la apariția unui efect citotoxic. În schimb, co-încapsularea AAz împreună cu EGb a conferit o mai bună viabilitate celulară, astfel că pentru 700 µg/ml NLC a fost determinată o viabilitate de 74,4% (la 72 h), comparativ cu NLC_UM_EGb pentru care viabilitatea celulară a fost de 36,7% (la 72 h).

Acest efect protector al NLC_UM_EGb_AAz asupra celulelor L929 a fost, de asemenea, vizualizat prin microscopia optică (fig. 8b). Sistemele nanotransportor nu au indus modificări importante ale morfologiei și densității celulare în intervalul de concentrații 5...400 µg/ml, acestea fiind asemănătoare cu cele ale martorului de cultură. În schimb, un tratament al celulelor cu 700 µg/ml NLC_UM_EGb, respectiv, NLC_UM_EGb_AAz a indus ușoare modificări ale culturii celulare, evidențiindu-se celule fusiforme în special în cazul NLC_UM_EGb, iar densitatea celulară este mai mică în comparație cu aceea a martorului de cultură. La concentrația de 1000 µg/ml densitatea celulară a fost redusă semnificativ, ambele tipuri de nanotransportori lipidici afectând puternic dezvoltarea normală a culturii, și, implicit, conducând la un efect toxic asupra celulelor individuale (fig. 8b).

6. Atribuirea *in vitro* a efectului antiinflamator a NLC încărcăți cu EGb și AAz

Testarea activității antiinflamatoare s-a realizat pe un model experimental *in vitro*, obținut din celule macrofage stimulate cu LPS și tratate ulterior cu concentrații de 100, 200 și 400 µg/ml EGb_UN, EGb_UM și nanotransportori lipidici încărcăți cu EGb, respectiv, EGb și AAz. Rezultatele obținute au demonstrat faptul că celulele tratate cu probele test au secretat o cantitate mai scăzută de citokine pro-inflamatoare, comparativ cu martorul stimulat cu LPS și netratat, într-o manieră dependentă de doză (fig. 9 și 10).

O analiză comparativă a activității antiinflamatoare a scos în evidență faptul că EGb_UN/UM conduce la o diminuare semnificativă a producției citokinelor pro-inflamatoare IL-6, IL-1β de către macrofagele stimulate cu LPS, doar la o concentrație de 400 µg/ml (fig. 9, 10a, b).

În cazul sistemelor nanotransportor preparate cu ulei de negrilică ce încapsulează EGb sau amestec de EGb și AAz, s-a observat o scădere benefică a producției citokinelor pro-inflamatoare IL-6 și IL-1β (fig. 9a, b), secretate de către macrofage, la toate concentrațiile analizate. Un efect inhibitor amplificat al producției de interleukine IL-6 și IL-1β s-a obținut în

1 cazul tratamentului cu 400 µg/ml NLC_UN_EGb_AAz 2, unde a fost determinată o inhibare de
2 72,2% în cazul IL-6 (comparativ cu 52% pentru EGb-UN, fig. 9a) și, respectiv, de 51,1% pentru
3 IL-1β (comparativ cu 25% inhibare realizată de extractul uleios neîncapsulat, fig. 9b).

4 Pentru sistemele NLC preparate cu ulei de măceșe (fig. 10), s-a constatat o tendință
5 similară de inhibare a citokinelor pro-inflamatoare IL-6, IL-1β, cât și a TNF-α, comparativ cu
6 sistemele NLC preparate cu UN. În comparație cu martorul stimulat cu LPS, cea mai bună acti-
7 vitate antiinflamatoare a fost detectată tot pentru concentrații de 400 µg/ml NLC_UM_EGb_AAz
8 2. De exemplu, efectul inhibitor al NLC manifestat asupra IL-6 a atins o valoare de 74,9%
9 (fig. 10a), în timp ce în cazul IL-1β inhibarea a fost de 33,5% (fig. 10b).

10 La dozarea producției de interleukină TNF-α secretată în mediul de cultură de către
11 macrofagele stimulate cu LPS și tratate cu nanotransportori lipidici încărcăți cu EGb și/sau
12 EGb_AAz s-au obținut rezultate similare la toate concentrațiile analizate (fig. 9 și 10 c), valorile
13 obținute fiind însă mai mici decât cele ale martorului stimulat cu LPS și netratat.

14 În concluzie, cuantificarea celor 3 interleukine, analizate prin metoda ELISA, a
15 demonstrat faptul că nanotransportorii lipidici dezvoltăți în cercetare prezintă o bună activitate
16 antiinflamatoare, cel mai bun rezultat obținându-se în cazul unui tratament cu 400 µg/ml
17 NLC_UN/UM ce co-încapsulează ambele principii active - EGb și AAz.

18 *7. Studiul in vivo al efectului antiinflamator manifestat de hidrogelurile 19 pe bază de NLC încărcăți cu EGb și Aaz*

20 Pentru decelarea *in vivo* a efectului antiinflamator manifestat de cele două sisteme
21 nanotransportor ce co-încapsulează EGb și AAz, preparate cu UN și, respectiv, UM, s-a utilizat
22 metoda de evidențiere a efectului de inhibiție a edemului produs la nivelul labei posterioare de
23 șobolan, după injectarea unui produs flogistic (1% soluție de carrageenan). Efectul
24 antiinflamator a fost măsurat prin metoda pletismometriei computerizate. Pentru evidențierea
25 efectului antiinflamator, noile sisteme nanotransportor au fost formulate în hidrogeluri ușor de
26 aplicat la nivelul labei posterioare de șobolan. Acțiunea de testare s-a realizat comparativ cu
27 un produs comercial - Skinoren gel. (Market-HG).

28 Acțiunea de diminuare a inflamației acute a labei de șobolan, provocate de agentul
29 flogistic utilizat în studiul experimental, s-a manifestat diferit în funcție de compoziția NLC-urilor
30 testate, și de momentul măsurării (timpul trecut de la provocarea edemului experimental), în
31 prezența celor 4 categorii de HG pe bază de NLC și, respectiv, a gelului comercial (fig. 11).

32 Astfel, la 90 min de la injectarea agentului flogistic s-a detectat o activitate
33 antiinflamatoare moderată pentru produsul de referință Skinoren gel, și foarte slabă pentru HG-
34 NLC 4 (hidrogel pe bază de NLC_UN_EGb_AAz 2).

35 După 180 min, s-a determinat o activitate antiinflamatoare crescută pentru produsul de
36 referință Skinoren gel, o activitate antiinflamatoare moderată pentru HG-NLC 2 (hidrogel pe
37 bază de NLC-UM-EGb-AAz-2), inferioară produsului de referință, și o acțiune antiinflamatoare
38 amplificată, superioară comparativ cu cea a Market-HG, pentru HG-NLC 4 (HG pe bază NLC-
39 UN-EGb-AAz-2).

40 După 240 min de la injectarea agentului flogistic, s-a constatat o menținere a activității
41 antiinflamatoare pentru produsul de referință Skinoren gel, creșterea activității antiinflamatoare
42 pentru HG-NLC 2, și scăderea ușoară a activității antiinflamatoare pentru HG-NLC 4, dar la un
43 nivel comparabil cu produsul de referință.

RO 131955 B1

Revendicări

1. Procedeu de obținere a unor nanotransportori lipidici pe bază de ulei de măceșe și ulei de negrilică, încărcăți cu principii active vegetale și sintetice, **caracterizat prin aceea că** va cuprinde:
 - a. formarea unei pre-emulsii lipidice libere și încărcate cu două componente active de natură vegetală (extract de gălbenele) și sintetică (acid azelaic), obținute prin punerea în contact, sub agitare magnetică, a unei faze lipidice și a unei faze apoase, la o temperatură de 73...75°C, și menținere la temperatură constantă, timp de 20 min;
 - b. supunerea pre-emulsiei lipidice la un proces inițial de omogenizare cu grad înalt de forfecare (140000 rpm, timp de 1 min), și, ulterior, la un proces de omogenizare la presiune ridicată (la 500 bar, timp de 196 s);
 - c. obținerea unor dispersii apoase de NLCs liberi și încărcăți cu cele două principii active, prin răcire ușoară, sub agitare magnetică, la temperatura camerei, a emulsiei supuse celor două tipuri de omogenizări;
 - d. obținerea de NLCs în stare solidă, prin supunerea dispersiilor apoase de nanotransportori lipidici liberi și încărcăți cu EGb, respectiv, EGb și AAz, la un proces de liofilizare, la -55°C, timp de 72 h.
2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** faza lipidică este formată la o temperatură de 73...75°C, dintr-un amestec de lipide solide și lichide, respectiv, monostearat de gliceril:palmitat de cetil:ulei de negrilică sau ulei de măceșe, într-un raport de greutate de 1,16:1,16:1.
3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** faza apoasă este formată la o temperatură de 73...75°C, dintr-un amestec de surfactanți ce conține Tween 20:Fosfatidilcolină:Poloxamer 188 într-un raport de greutate = 4,66:1:1.
4. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** pre-emulsia lipidică va conține 9...10% amestec lipidic și 2,5% amestec de surfactanți.
5. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** în faza lipidică se adaugă o fracție uleioasă de EGb ce asigură o cantitate de 2,8...2,9 mg caroteni (în 100 g dispersie apoasă de NLCs).
6. Procedeu conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** în faza apoasă se adaugă o cantitate de 0,5...1 g acid azelaic (în 100 g dispersie apoasă de NLCs).
7. NLCs în stare solidă, încărcăți cu EGb, respectiv, amestec de EGb și AAz, obținuți prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6, **caracterizați prin aceea că** aceștia conțin:
 - a. 24% ulei vegetal (ulei de negrilică sau ulei de măceșe);
 - b. 0,02% amestec caroteni proveniți din EGb;
 - c. 4...8% AAz, procente fiind exprimate în greutate.
8. NLCs conform revendicării 7, obținuți prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6, **caracterizați prin aceea că** sunt de formă sferică și au un diametru mediu cuprins între 110 și 200 nm.
9. NLCs conform revendicării 7, obținuți prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6, **caracterizați prin aceea că** prezintă o polidispersitate ce variază în intervalul 0,157...0,211 în cazul obținerii de NLCs liberi, și în intervalul 0,11...0,172 în cazul obținerii de NLCs încărcate cu EGb, respectiv, EGb și AAz.
10. NLCs conform revendicării 7, obținuți prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6, **caracterizați prin aceea că** prezintă valori ale potențialului electrocinetic ce variază în intervalul -42,1...-53 mV, în cazul utilizării uleiului de negrilică, și în intervalul -43,6...-58,7 mV, în cazul utilizării uleiului de măceșe.

RO 131955 B1

1 11. NLCs conform revendicării 7, obținuți prin procedeul definit în revendicările de la 1 la
6, **caracterizați prin aceea că** prezintă valori ale eficienței de încapsulare a AAz cuprinse între
3 83,9 și 84,0%, și valori ale eficienței de încapsulare a carotenilor din EGb cuprinse între 92,3
și 94,0%.

5 12. NLCs conform revendicării 7, obținuți prin procedeul definit în revendicările de la 1 la
6, **caracterizați prin aceea că** prezintă o bună capacitate de a capta radicalii liberi formați în
7 sistemul generator de chemiluminescență, cu o activitate antioxidantă cuprinsă între 89,3 și
97,0% pentru NLC-urile preparate cu UN, libere și încărcate cu EGb/EGb și AAz, respectiv, între
9 85,8 și 95,4 pentru NLC-urile preparate cu UM, libere și încărcate cu EGb/EGb și AAz.

11 13. NLCs conform revendicării 7, obținuți prin procedeul definit în revendicările de la 1
la 6, **caracterizați prin aceea că** aceștia prezintă o bună biocompatibilitate la un tratament al
celulelor L929 de 72 h cu NLC JJN/UM_EGb și NLC_UN/UM_EGb_AAz 2, și s-a observat o
13 viabilitate celulară >80% pe un interval de concentrații cuprins între 5 și 400 μg/ml.

15 14. NLCs conform revendicării 7, obținuți prin procedeul definit în revendicările de la 1 la
6, **caracterizați prin aceea că** un tratament cu 400 μg/ml NLC_UN_EGb_AAz 2 conduce la
17 apariția unui efect inhibitor amplificat al producției de interleukine IL-6 și IL-1β, de exemplu: o
inhibare de 72,2% în cazul IL-6 și, respectiv, de 51,1% pentru IL-1β.

19 15. NLCs conform revendicării 7, obținuți prin procedeul definit în revendicările de la 1 la
6, **caracterizați prin aceea că** un tratament cu 400 μg/ml NLC_UM_EGb_AAz 2 conduce la
21 apariția unui efect inhibitor amplificat al producției de interleukine IL-6 și IL-1β, de exemplu:
efectul inhibitor asupra IL-6 a atins o valoare de 74,9%, în timp ce, în cazul IL-1β, inhibarea a
fost de 33,5%.

23 16. NLCs obținuți prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6, **caracterizați prin**
aceea că sub formă de hidrogeluri manifestă o activitate antiinflamatoare *in vivo* moderată
25 pentru HG-NLC 2, în cazul hidrogelului pe bază de NLC-UM-EGb-AAz-2, respectiv, o acțiune
antiinflamatoare amplificată pentru HG-NLC 4, în cazul hidrogelului pe bază de NLC-UN-EGb-
27 AAz-2.

(51) Int.Cl.

A61K 47/44 (2006.01);

A61K 9/10 (2006.01);

B82Y 40/00 (2011.01)

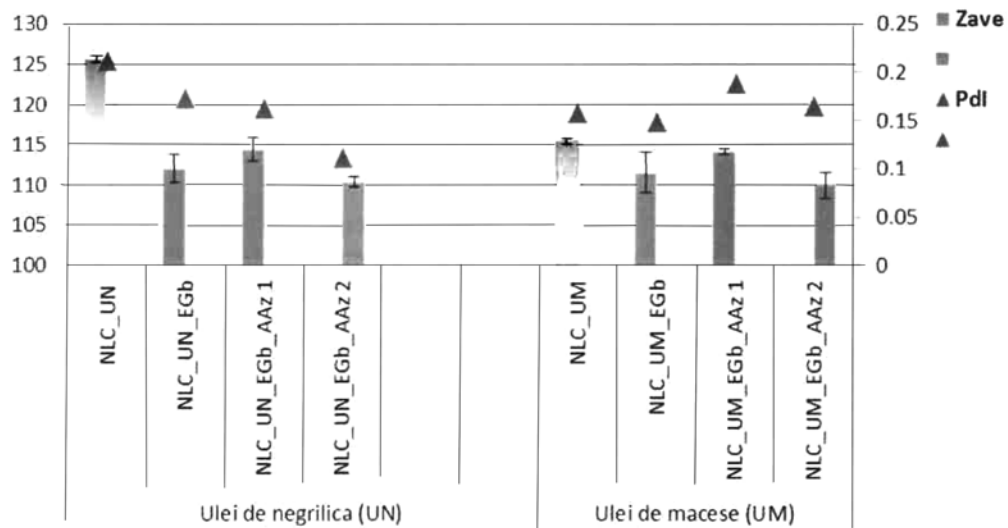


Fig. 1

(51) Int.Cl.

A61K 47/44 (2006.01);

A61K 9/10 (2006.01);

B82Y 40/00 (2011.01)

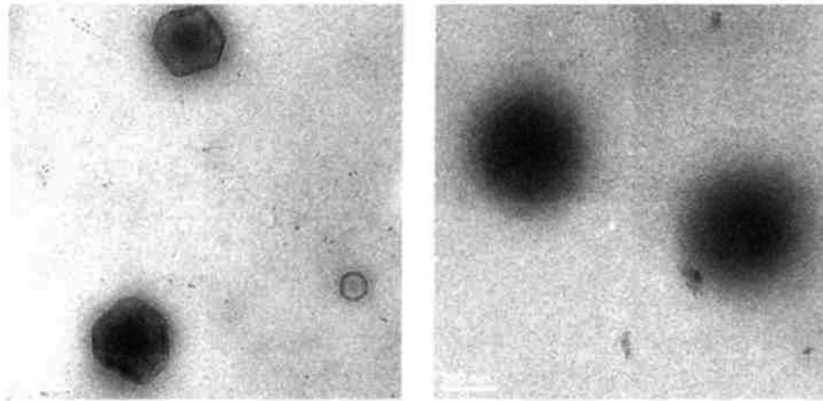


Fig. 2

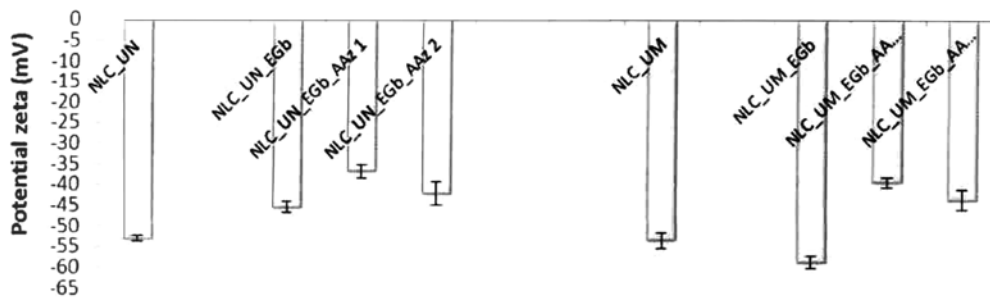


Fig. 3

(51) Int.Cl.

A61K 47/44 (2006.01);

A61K 9/10 (2006.01);

B82Y 40/00 (2011.01)

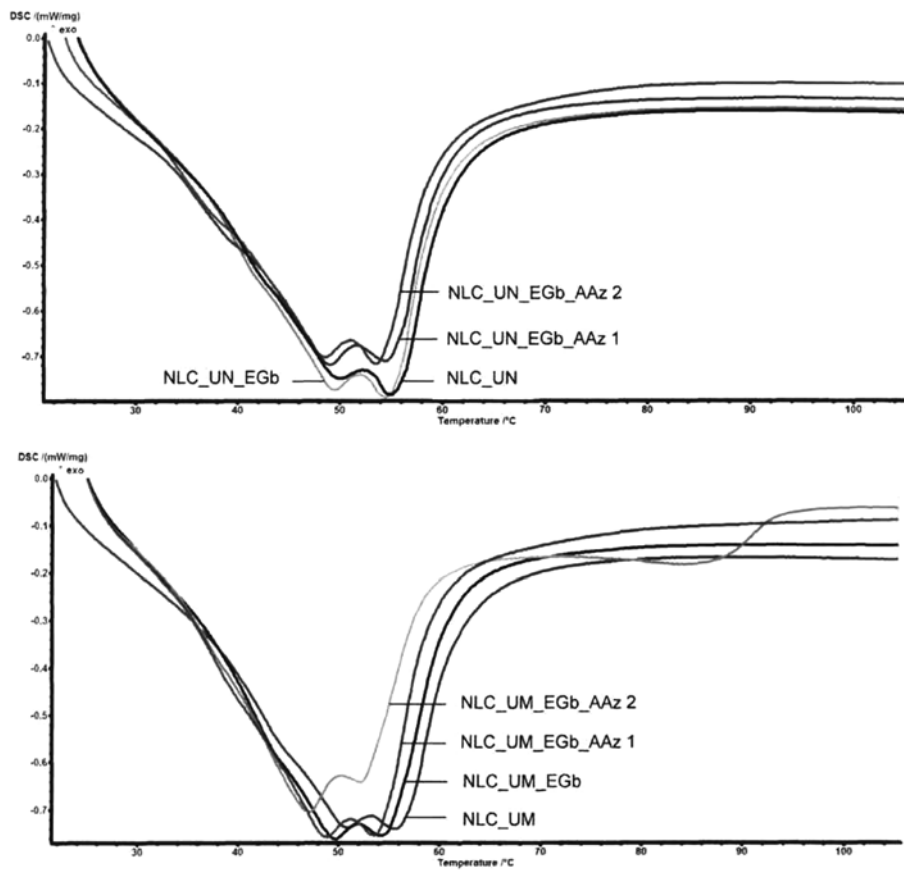


Fig. 4

(51) Int.Cl.

A61K 47/44 (2006.01);

A61K 9/10 (2006.01);

B82Y 40/00 (2011.01)

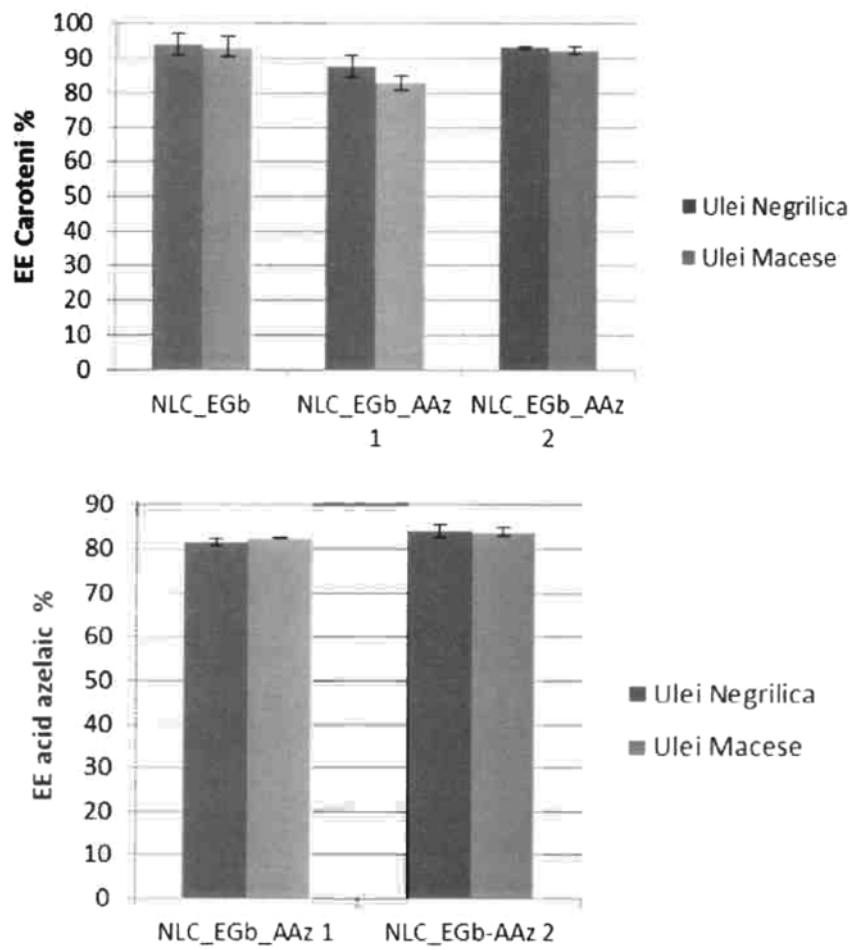


Fig. 5

(51) Int.Cl.

A61K 47/44 (2006.01);

A61K 9/10 (2006.01);

B82Y 40/00 (2011.01)

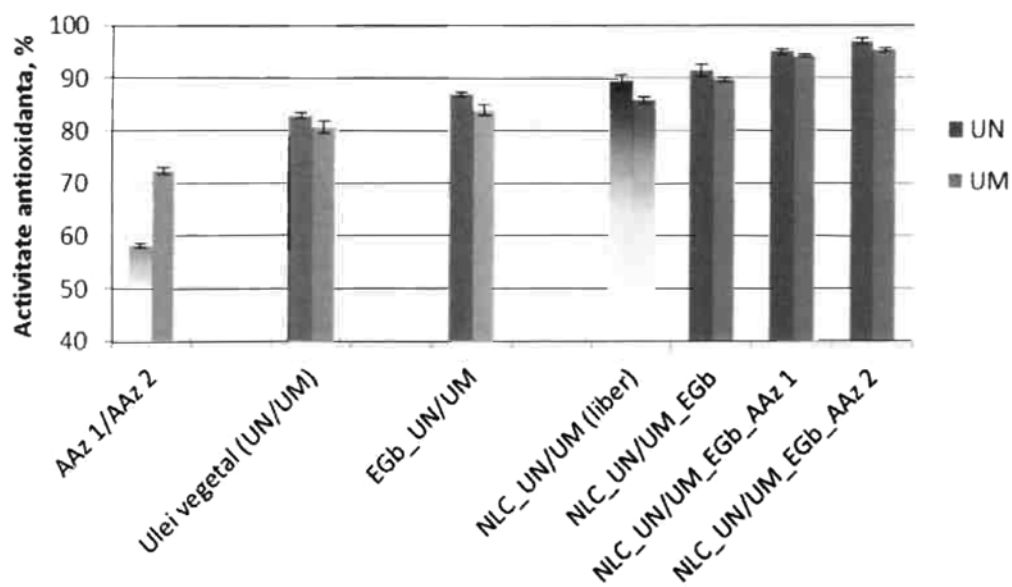


Fig. 6

(51) Int.Cl.

A61K 47/44 (2006.01);

A61K 9/10 (2006.01);

B82Y 40/00 (2011.01)

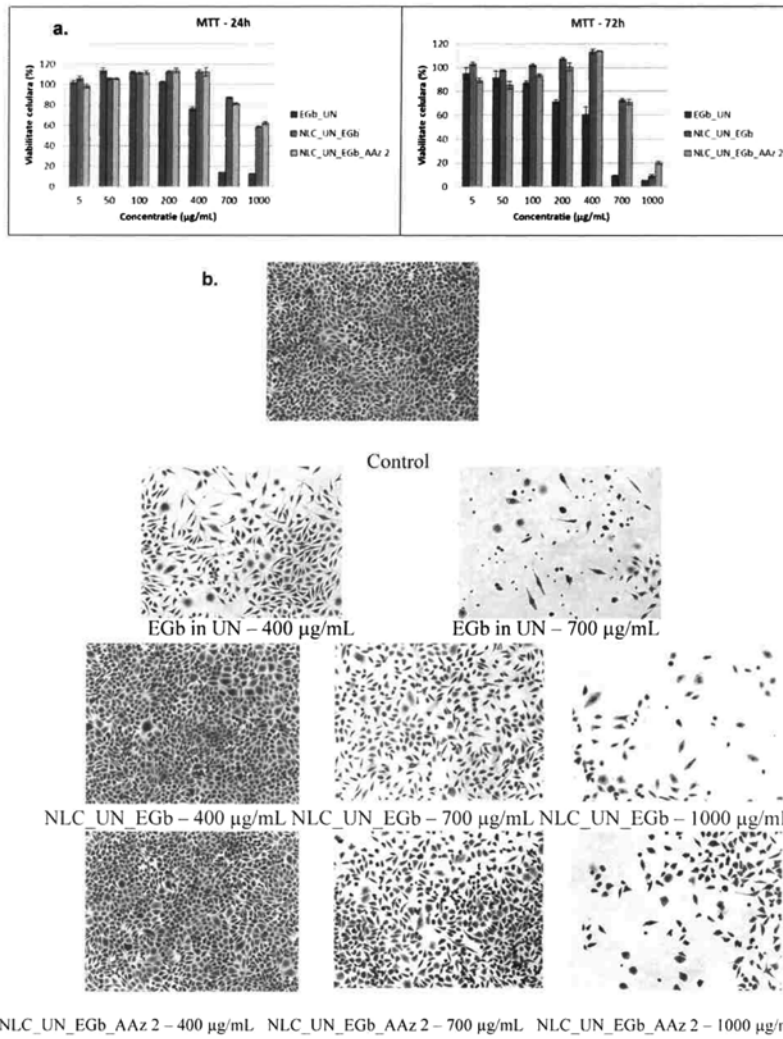


Fig. 7

(51) Int.Cl.

A61K 47/44 (2006.01);

A61K 9/10 (2006.01);

B82Y 40/00 (2011.01)

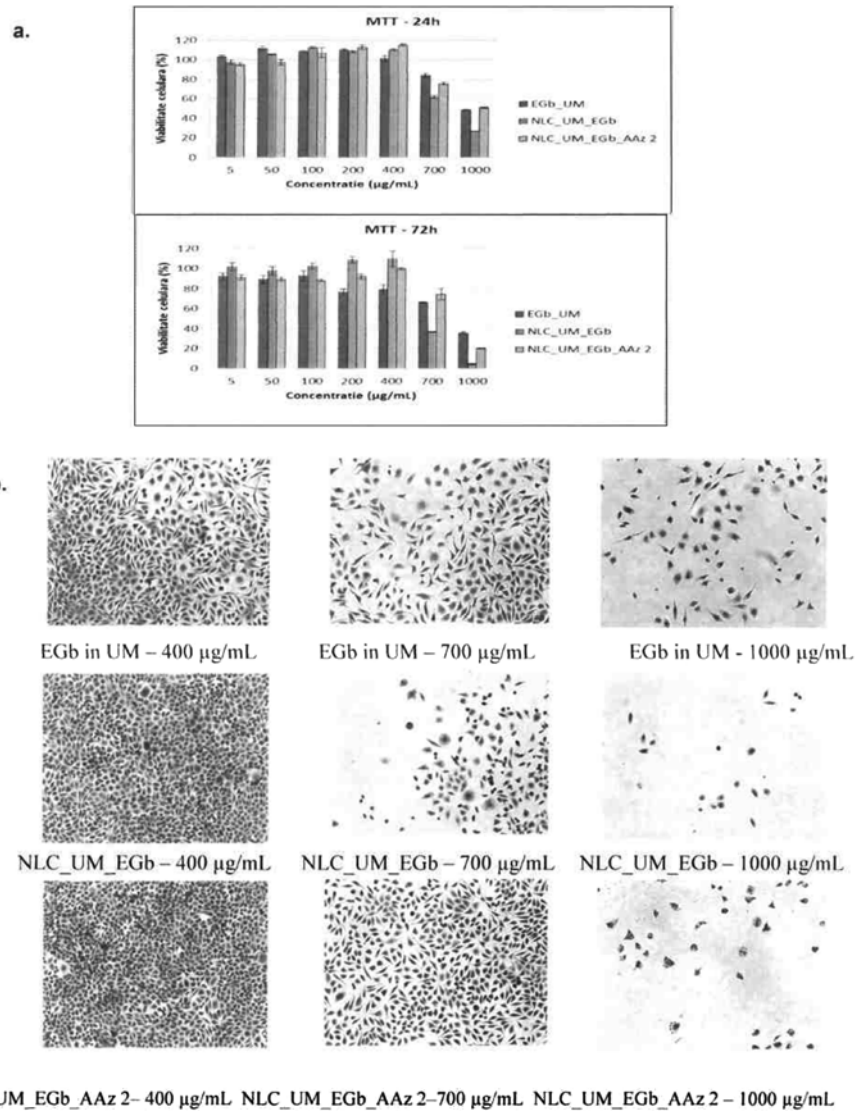


Fig. 8

(51) Int.Cl.

A61K 47/44 (2006.01);

A61K 9/10 (2006.01);

B82Y 40/00 (2011.01)

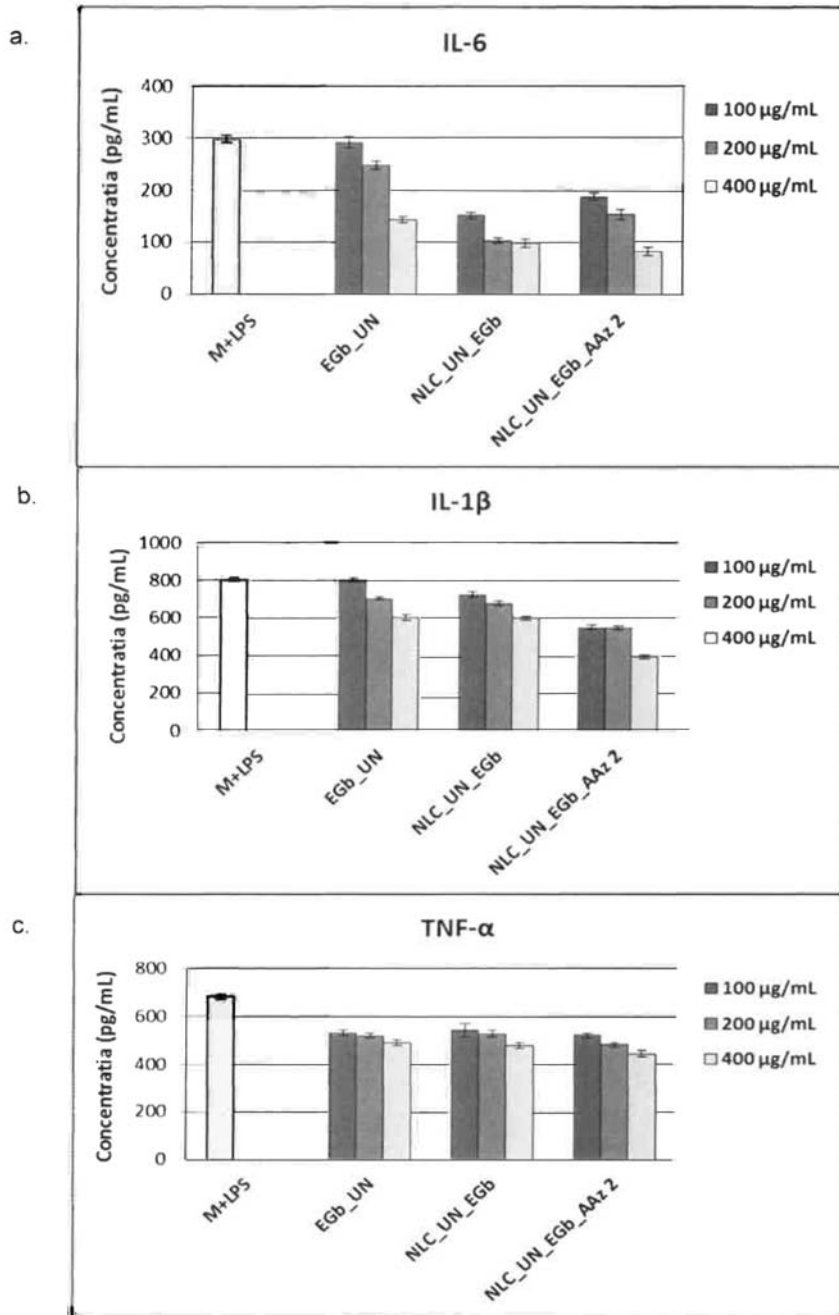


Fig. 9

(51) Int.Cl.

A61K 47/44 (2006.01);

A61K 9/10 (2006.01);

B82Y 40/00 (2011.01)

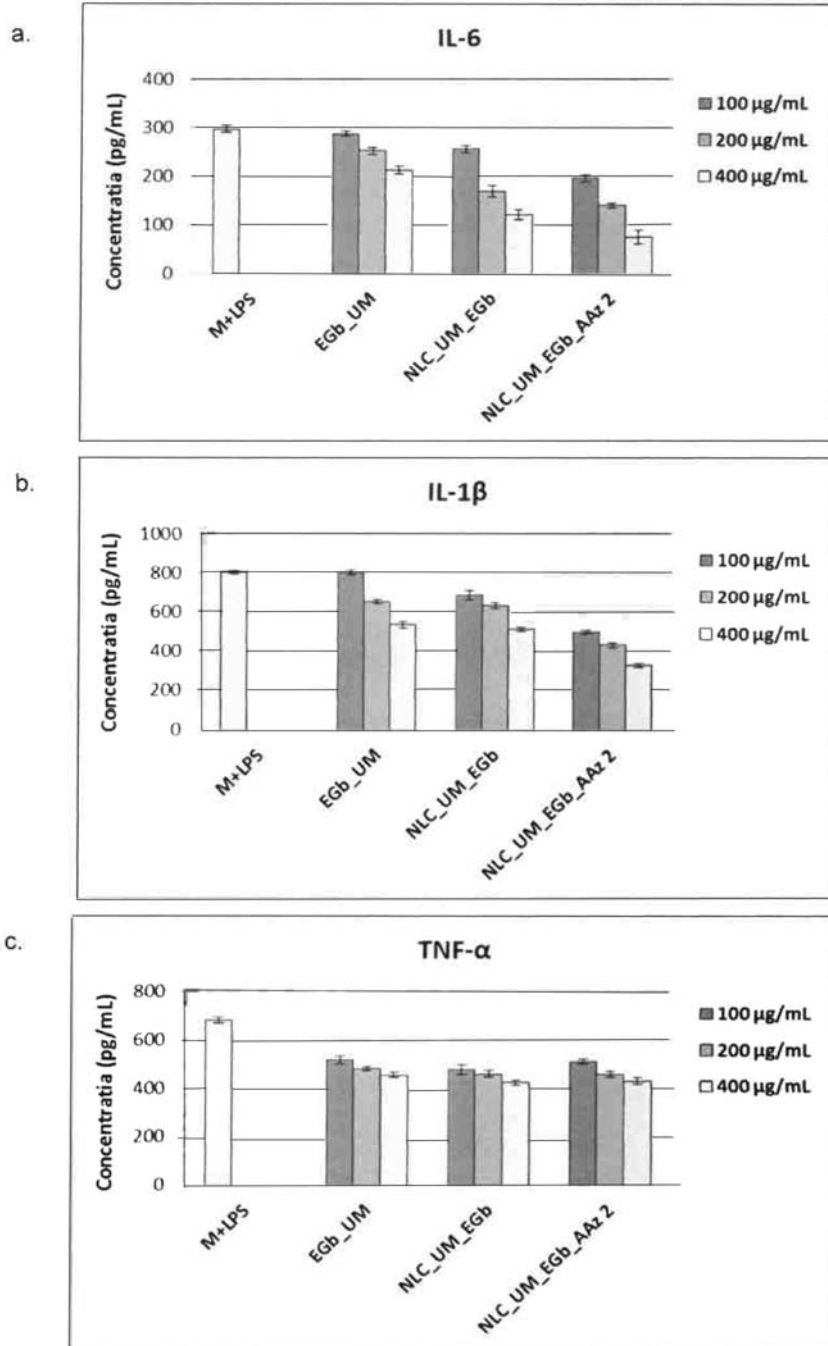


Fig. 10

(51) Int.Cl.

A61K 47/44 (2006.01);

A61K 9/10 (2006.01);

B82Y 40/00 (2011.01)

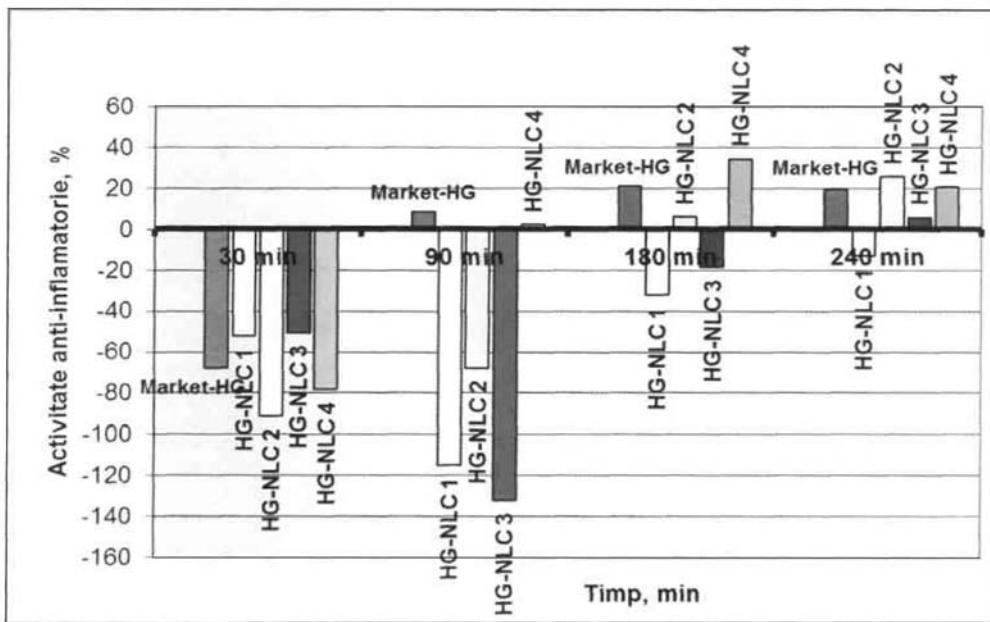


Fig. 11



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 193/2019