



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00672

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

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

(71) Solicitant:

- UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU ȘTIINȚE BIOLOGICE (INCDSB), 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

(54) NANOTRANSPORTORI LIPIDICI ÎNCĂRCAȚI CU PRINCIPII ACTIVE VEGETALE ȘI SINTETICE, CE FURNIZEAZĂ UN EFECT ANTIINFLAMATOR AMPLIFICAT

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor nanotransportori lipidici cu efect antiinflamator. Procedeu conform invenției constă în formarea unei pre-emulsii lipidice libere și încărcate cu principii active de tip extract de gălbenele și acid azelaic, omogenizarea la 14000 rpm, timp de 1 min, și apoi la 500 bar, timp de 196 s, și răcirea emulsiei la temperatura camerei, sub agitare magnetică, rezultând dispersii apoase de nanotransportori lipidici liberi și încărcăți cu principiile active

care sunt supuse unei etape de liofilizare la temperatura de -55°C, timp de 72 h, din care rezultă nanotransportori lipidici în stare solidă cu formă sferică, având un diametru de 110...100 nm și o polidispersitate în intervalul 0,11...0,211.

Revendicări: 16

Figuri: 11

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



NANOTRANSPORTORI LIPIDICI INCARCATI CU PRINCIPII ACTIVE VEGETALE SI SINTETICE CE FURNIZEAZA UN EFECT ANTI-INFLAMATOR AMPLIFICAT

I. DESCRIERE

Invenția prezentă se referă la un procedeu de obținere a unor nanotransportori lipidici pe baza de ulei de macese și ulei de negrilica, încarcate cu principii active vegetale și sintetice – extract de galbenele și acid azelaic, ce prezintă o bună biocompatibilitate și un efect anti-inflamator amplificat, ceea ce-i conferă un potențial aplicativ ridicat în tratamentul afecțiunilor inflamatorii localizate la nivelul pielii.

În pofida relevanței farmacologice a uleiurilor și a extractelor provenite din diferite surse 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 tendințele actuale la nivel mondial, utilizarea resurselor vegetale pentru furnizarea de ingrediente active naturale care să manifeste efecte secundare scăzute, precum și multiple efecte terapeutice, deschide noi perspective în domeniul biomedical.

Sistemele coloidale de tip transportori lipidici nanostructurați (NLCs) derivați din 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 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. 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 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. 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 major în literatura de specialitate cu privire la asocierea acestora cu sistemele NLCs.

În **US 20130017239 A1** au fost dezvoltate formulări cosmetice pe baza de SLNs și de 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 patent similar - **US 2012/0128777A1**, uleiul de canepă 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 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 baza de ulei de oregano, cu proprietăți antibacteriene, antifungice și antiparazitice a fost descrisă în **US 2014/0045692A1**.

Referitor la încapsularea extractelor vegetale în sistemele SLNs și NLCs, doar câteva 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 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 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. Goñi, I. Alkorta, Colloids Surf. B., 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. 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 citokinelor pro-inflamatorii 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 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 acela de a îmbunătăți caracteristicile nutraceutice ale antioxidanților naturali [D.F. Cortés-Rojas, C.R.F. Souza, W.P. Oliveira, J. of Food Eng., 2014, 127, 34-42]. În literatura patentelor, o singură invenție furnizează compoziții de nanoparticule funcționale ce conțin *extract de ginkgo biloba* – **US 2008/0254126A1**, preparate utilizând metode umede și uscate de spargere a extractului, care prezintă efecte semnificative în activarea celulelor de la nivelul creierului.

NLCs pot fi preparați prin diferite metode incluzând dispersarea unei faze uleioase ce conține diferite tipuri de lipide solide și lichide într-o fază apoasă formată dintr-un amestec de surfactant și co-surfactanți. Metodele de omogenizare de energie ridicată și formarea unui înveliș protector de surfactanți sunt necesare pentru obținerea dispersiilor de nanoparticule lipidice stabile. În **US 2014/0205722 A1** este descrisă prepararea de NLCs cu dimensiuni medii cuprinse între 50 și 500 nm pentru conservarea avansată a fructelor și legumelor din diferite produse alimentare, un obiectiv specific fiind alocat păstrării prospețimii și a proprietăților nutriționale. Procedura de omogenizare la presiune ridicată (HPH) a fost folosită în **US 2016/0022550 A1** pentru obținerea de nanotransportori lipidici cu grad alimentar utilizați în distribuția orală și parenterală a ingredientelor active lipofile sau amfifile și în **WO 2011116963 A2** pentru sinteza de sisteme de distribuție de tip SLNs și NLCs a ingredientelor active alimentare, cosmetice și farmaceutice. În literatura patentelor sunt furnizate și alte metode de obținere a NLCs utilizând tehnici precum microemulsionarea (**US 2010/0247619 A1**; **US 761 1733**) și difuzia cu solvenți (**CN 103417481**, **US 20110038941 A1**). De exemplu, tehnica microemulsionării a fost brevetată în **WO 2013105101 A1** și **US 7611733 B2** pentru încapsularea unei game destul de largi de medicamente de natură hidrofilă și amfifilă. Pe aceeași linie științifică este încadrată și invenția din **EP 2037889 B1** pentru sinteza de NLCs obținuți prin metoda microemulsionării din amestec de gliceroli și acid behenic, utilizând drept surfactanți fosfatidilcolina și taurocolat de sodiu. Aceste sisteme transportor au fost utilizate pentru distribuția unei cantități semnificative de Riluzol la nivelul sistemului nervos central, cu aplicabilitate în tratamentul sclerozei. Deși tehnica microemulsionării permite obținerea unor nanoparticule lipidice de ordinul zecilor de nm, prezintă dezavantajul utilizării unor concentrații mari de surfactanți care pot ridica probleme majore în ceea ce privește existența unui risc ridicat de toxicitate. În metoda difuziei cu solvenți, emulsiile dezvoltate implică utilizarea solvenților organici care limitează utilizarea acestora pentru aplicabilitate directă în industriile asociate sănătății, din cauza riscului lor toxicologic. Mai mult, aceste ultime două metode sunt dificil de adaptat la scară industrială.

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

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

inflamator determinat prin utilizarea unui produs comercial), ceea ce le conferea acestora un potential aplicativ ridicat in tratamentul afectiunilor inflamatorii localizate la nivelul pielii.

In literatura patentelor exista doar cateva inventii care abordeaza obtinerea unor nanoparticule lipidice (NPs) cu aplicabilitate in distributia locala/dermica a substantelor active. De exemplu, **EP 2821077 A1** si **EP 3023105 A2** prezinta obtinerea de NPs lipidice ce incapsuleaza un factor de crestere si/sau un lipid sau peptid cu actiune antimicrobiana, cu aplicabilitate in vindecarea ranilor localizate la nivelul pielii, in particular sub forma de geluri administrate local. Cele doua aplicatii se refera la o metoda de preparare a NPs lipidice utilizand o etapa de ultrasonare, urmata de evaporarea solventului. Tot pentru tratamentul bolilor dermice au fost dezvoltate in **US 2014/0079785 A1** NPs lipidice ce co-incapsuleaza un corticosteroid si vitamina D. Singura inventie care face referire la obtinerea NLCs utilizand metoda combinata de omogenizare cu grad inalt de forfecare si presiune ridicata, cu aplicabilitate in distributia locala a unor principii active cu actiune antioxidanta este **CN 102283809 A**.

II. Problema tehnică pe care o rezolvă procedeul conform invenției constă în obținerea unor nanotransportori lipidici pe baza de ulei de maceșe și ulei de negrilică, ce pot fi încărcati cu două tipuri de principii active *vegetale – extract de galbenele (EGb)* și *sintetice – acid azelaic (AAz)*, ce prezintă o bună biocompatibilitate și un efect anti-inflamator amplificat. Procedeul de obținere a NLCs conform invenției cuprinde:

- a) formarea unei **faze lipidice** fara continut 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 maceșe), într-un raport de greutate de 1,16 : 1,16 : 1, respectiv formarea unei **faze lipidice** ce contine o fractie uleioasa de EGb ce asigura o concentratie de 0,02% amestec caroteni in formularile finale de NLCs in stare solida încărcati cu EGb, respectiv EGb și AAz;
- b) formarea unei **faze apoase** fara continut de medicament, la o temperatură de 75°C, ce conține un amestec de surfactanți de tip Tween 20 : Fosfatidilcolina : Poloxamer 188 într-un raport de greutate de 4,66 : 1 : 1, respectiv formarea unei faze apoase ce contine cantitati diferite de principiu activ sintetic ce asigura o concentratie de 4% și respectiv 8% acid azelaic in formularile finale de NLCs in stare solida încărcati cu EGb și AAz.
- c) formarea unei **pre-emulsii lipidice** – precursorare 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) obtinerea unor **dispersii apoase de NLCs liberi și încărcati cu EGb, respectiv EGb și AAz**, prin supunerea pre-emulsiei lipidice initial 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 ridicata (la 500 bar, timp de 196 sec) și ulterior răcire la temperatura camerei, sub agitare magnetică;
- e) obținerea de **NLCs in stare solida, liberi și încărcati EGb, respectiv EGb și AAz**, prin supunerea dispersiilor apoase de NLCs la o etapa de liofilizare la -55°C timp de 72h.
NLC-urile pe baza de ulei de negilică sau ulei de maceșe, încărcate cu EGb, respectiv amestec de EGb și AAz, contin:
 - a. 24% ulei de negrilică/ulei de maceșe in toate cele 8 formulari de NLCs sintetizate (tabel 1);
 - b. 0,02% caroteni proveniti din EGb in NLC-urile încărcate cu EGb, respectiv EGb și AAz;
 - c. 4% AAz in NLC_UN/UM_EGb_AAz 1, respectiv 8% AAz in NLC_UN/UM_EGb_AAz 2, procentele fiind exprimate în greutate.

73

III. Invenția prezintă următoarele avantaje:

- 1) Procedeu descris în prezenta propunere constituie o metodă optimă pentru obținerea unor noi sisteme NLCs ce asigură o încărcare a ambelor categorii de principii active, atât naturale (EGb) cât și sintetice (AAz), în același sistem nanotransportor.
- 2) Noile sisteme NLCs prezintă particularități structurale unice, favorabile pentru captarea eficientă a EGb și a AAz atât în miezul lipidic hidrofob cât și în învelișul exterior de surfactanți.
- 3) Procedeu de obținere a NLCs pe bază de ulei de maces și ulei de negrilică se 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 sau a AAz.
- 4) Obținerea nanoparticulelor lipidice se bazează pe folosirea unor materii prime biocompatibile, concentrații minime de surfactanți și nu implică utilizarea unor substanțe agresive (ex: solvenți organici sau surfactanți ce prezintă efect toxic asupra organismului).
- 5) Comparativ cu nanotransportorii convenționali, sistemele NLCs pe baza de uleiuri vegetale sunt sigure, eficiente și cel mai important, sunt dotate cu o varietate de efecte terapeutice, ex: activitate antioxidantă, antibacteriană, anti-inflamatoare ș.a.
- 6) Procedeu propus este simplu și eficient, implică etape distincte și ușor de reprodus, asigurând același nivel de control și prin transpunere la scară pilot.
- 7) 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.
- 8) NLC-urile obținute prin procedeu propus pot fi utilizate sub formă de hidrogeluri pentru dezvoltarea de formulări farmaceutice cu acțiune anti-inflamatoare 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.

IV. 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 de lipide solide și lichide cu/fără extract de galbenele și o **fază apoasă** ce conține 2,5% amestec de surfactanți cu/fără acid azelaic, la o temperatură de 75°C; **pre-emulsia lipidică** 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 de omogenizare la presiune ridicată la 500 bar, timp de 196 sec, după care este lăsată să se răcească la temperatura camerei, sub agitare magnetică, cu formarea unei dispersii apoase de transportori lipidici nanostructurați (NLCs), iar procesarea dispersiei apoase de NLCs printr-un proces de liofilizare la -55°C timp de 72h, conduce la obținerea NLC-urilor în stare solidă.

În cazul prezentei invenții au fost obținuți:

- 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 procedurii descrise.
- 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.

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

- formarea unei *faze lipidice* ce contine amestec de monostearat de gliceril : palmitat de cetil : ulei de negrilica sau ulei de macese, într-un raport de greutate de 1,16 : 1,16 : 1;
- adăugarea în *faza lipidică* a unei fracții uleioase de EGb ce asigură o concentrație de 0,02% amestec caroteni în formulările finale de NLCs în stare solidă încărcati cu EGb, respectiv EGb și AAz;
- formarea unei *faze apoase* ce contine un amestec de surfactanți de tip Tween 20 : Fosfatidilcolina : Poloxamer 188 într-un raport de greutate de 4,66 : 1 : 1;
- 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 încărcati cu EGb și AAz.

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

Tabel 1 – Compoziția NLC-urilor libere și a NLC-urilor încărcate cu *EGb*, respectiv *EGb* și AAz

Figura 1 – Diametrele medii și indicii de polidispersitate pentru sistemele NLCs sintetizate

Figura 2 – Imaginile TEM ale NLC_UN/UM_EGb_AAz 2

Figura 3 – Potențialul electrocinetic al dispersiilor de nanotransportori lipidici liberi și încărcati cu principii active naturale și sintetice

Figura 4 – Analiza DSC a NLCs liberi și încărcati cu EGb, respectiv amestec de EGb și AAz

Figura 5 – Eficiența de încapsulare a carotenilor din EGb (a) și respectiv a AAz (b) co-încapsulati în sistemele NLCs

Figura 6 – Determinarea *in vitro* a activității antioxidante

Figura 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 de ore; b. Efectul EGb_UN, NLC_UN_EGb și NLC_UN_EGb_AAz 2 asupra celulelor L929 la concentrațiile indicate, după 72h de tratament

Figura 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 de ore; b. Efectul EGb_UM, NLC_UM_EGb și NLC_UM_EGb_AAz 2 asupra celulelor L929 la concentrațiile indicate, după 72h de tratament

Figura 9 – Dozarea prin metoda ELISA a producției de citokine IL-6, IL-1β 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

Figura 10 – Dozarea prin metoda ELISA a producției de citokine IL-6, IL-1β 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

Figura 11 – Activitatea antiinflamatorie procentuală pe momente (HG-NLC 1 = Hidrogel pe baza de NLC_UM; HG-NLC 2 = NLC_UM_EGb_AAz 2; HG-NLC 3 = Hidrogel pe baza 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 negrilica sau ulei de macese) într-un raport de greutate de 1,16 : 1,16 : 1. Formarea unei faze apoase la o temperatură de 73 ... 75°C prin

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

Exemplul 2. Obținerea de NLC_UN/UM_EGb

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 ulei de negrilică), respectiv de 2,9 mg caroteni (în cazul utilizării unei fracții uleioase de EGb în ulei de măceșe) în 100g dispersie apoasă de NLCs. Topitura lipidică obținută se menține la 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 baza de ulei de negrilică sau ulei de măceșe în formă solidă ce încapsulează EGb.

Exemplul 3. Obținerea de NLC_UN/UM_EGb_AAz 1

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 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-încapsulează EGb și AAz.

Exemplul 4. Obținerea de NLC_UN/UM_EGb_AAz 2

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 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-încapsulează EGb și AAz.

1. Evaluarea diametrelor medii și a polidispersității nanotransportorilor lipidici (analiza DLS). Caracterizarea morfologică (analiza TEM)

Cele 8 formulări de nanotransportori lipidici preparați cu uleiurile vegetale bogate în acizi grași ω -6 (ex: ulei de negrilică – UN, respectiv ulei de măceșe – UM), liberi sau încărcați cu extractul vegetal, respectiv amestec de *Extract uleios de galbenele (EGb)* și *acid azelaic (AAz)* au fost obținute pornind de la 2,5% amestec de surfactanți Tween 20 : Fosfatidil colina : Poloxamer și compoziții variabile de fază lipidică (cuprinse între 9 și 10%). Compoziția formulărilor de NLCs este redată în tabelul 1.

Diametrele medii evaluate pe baza tehnicii DLS pentru sistemele de NLC încarcate 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 uleiuri vegetale, valorile diametrelor medii fiind asemănătoare, pentru ambele seturi de NLC, o ușoară creștere a

diametrelor fiind semnalata in cazul sistemelor ce co-incapsuleaza 0,5% AAz si 2% EGb (114 nm). O crestere semnificativa a dimensiunii particulelor a fost determinata pentru sistemele NLC incarcate cu 1% acid azelaic.

Valorile indicelui de polidispersitate < 0.18 obtinute pentru marea majoritate a sistemelor NLC pun in evidenta existenta unei populatii relativ inguste de nanotransportori lipidici. Un raport optim intre gradul de polidispersitate si dimensiunea particulelor a fost obtinut pentru NLC cu ulei de negrilica, incarcat cu extract de galbenele si acid azelaic 1% ($Zave = 110,5 \pm 0,608$ nm si $PdI = 0,110 \pm 0,015$).

Microscopia electronica de transmisie realizata pe doua probe reprezentative de nanotransportori lipidici incarcate cu amestec de principii active naturale si sintetice releva prezenta unor particule sferice cu diametre medii de aprox. 200 nm (Fig. 2).

2. Determinarea stabilitatii fizice a NLCs liberi si incarcate cu principii active vegetale si sintetice

Pentru a determina stabilitatea fizica a dispersiilor de NLC libere si incarcate cu *extract de galbenele* si/sau acid azelaic, s-au realizat masuratori ale potentialului electrocinetic. Valorile potentialului electrocinetic in cazul celor 12 formulari de NLC au fost cuprinse intre -36.8 si -58.7 mV, valori ce indica o stabilitate buna a nanotransportorilor lipidici preparati cu *ulei de macese* si respectiv *ulei de negrilica* (Fig. 3).

In cazul ambelor seturi de nanotransportori preparati cu UM sau UN s-a observat ca cea mai buna stabilitate o au dispersiile de NLC libere sau incarcate doar cu *extract de galbenele* (ex: -53 mV pentru NLC neincarcate si respectiv -45 si -58 mV pentru NLC incarcate cu 2% EGb). La adaugarea acidului azelaic, potentialul zeta creste pentru sistemele de NLC preparate cu cele doua uleiuri vegetale. De asemenea, NLC ce incapsuleaza doar acid azelaic au valori ale potentialului zeta ceva mai ridicate, ceea ce indica faptul ca *extractul de galbenele* participa la modificarea sarcinilor de suprafata, in favoarea unor mai bune repulsii intre particulele lipidice. Dintre sistemele NLC sintetizate, s-a constatat ca cea mai buna stabilitate s-a determinat in cazul nanotransportorilor preparati cu *ulei de macese* si incarcate doar cu *extract de galbenele* (Fig. 3).

3. Modificari structurale aparute dupa co-incapsularea principiilor active vegetale si sintetice

Una dintre caracteristicile fundamentale ale sistemelor nanotransportor ce trebuie sa fie luata in considerare este asociata modificarilor miezului lipidic – strans corelate cu eficienta de incapsulare a componentelor active de interes. Studiul comportarii miezului lipidic al NLC-urilor, inainte si dupa incapsularea celor doua categorii de principii active naturale si sintetice, realizat pe baza calorimetriei de scanare diferentiala (DSC), a scos in evidenta modificari semnificative ale temperaturii, entalpiei si ale alurilor peak-urilor endoterme ale formularilor NLC-urilor sintetizate (Fig. 4). Daca in cazul sistemelor NLC-urilor ce incapsuleaza doar EGb, modificarile structurale au fost minore, perturbari evidente ale retelei lipidice au fost semnalate in cazul sistemelor NLC-urilor care co-incapsuleaza ambele tipuri de componente active – EGb, respectiv amestec de EGb si AAz. De exemplu, au fost determinate diferente de $1,4^{\circ}\text{C}$ si 10 J/g pentru NLC_UN_EGb_AAz 2 si $3,8^{\circ}\text{C}$ si 20 J/g in cazul NLC_UM_EGb_AAz 2, comparativ cu sistemele NLC_UN/UM (fara principii active incapsulate). Cresterea continutului de acid azelaic, de la 0,5% la 1% a produs cele mai

evidente modificari ale rețelei lipidice, respectiv obtinerea unor miezuri lipidice mai dezordonate, cu o scadere vizibila a intensitatii peak-ului endoterm in special in cazul NLC_UM_EGb_AAz 2 (Fig. 4b).

Prezenta non-concurenta a celor doua principii active hidrofile si lipofile in acelasi sistem nanotransportor a condus la obtinerea unor eficiente ridicate de incapsulare, > 80% atat pentru extractul vegetal, cat si pentru acidul azelaic (Fig. 5). Tipul de ulei vegetal utilizat la sinteza NLCs nu a influentat capacitatea de incapsulare a celor doua principii active, valorile EE% fiind similare in cazul AAz, si usor mai scazute in cazul EGb incapsulat in sistemele NLC preparate cu ulei de maces. De exemplu, eficienta de incapsulare a NLC_EGb_AAz preparate cu UM a fost de $93\% \pm 0,30$ pentru EGb si $84\% \pm 1,41$ pentru AAz, in timp ce cele preparate cu UN au prezentat eficiente de incapsulare de $93,3\% \pm 0,98$ pentru EGb si $83,8\% \pm 0,99$ pentru AAz (Fig. 5). O ipoteza care poate fi asociata cu obtinerea acestor eficiente mari de incapsulare este aceea a repartizarii preferentiale a celor doua componente, faza uleioasa a miezului lipidic al NLC jucand un rol important in captarea EGb, in timp ce AAz prezinta o afinitate mai mare pentru invelisul creat de amestecul de surfactanti. Cu alte cuvinte, lipsa unei competitii directe intre AAz – hidrofil si EGb – lipofil este responsabila de gazduirea remarcabila a ambelor componente in acelasi sistem nanotransportor de natura lipidica.

4. Determinarea *in vitro* a activitatii antioxidante a extractelor vegetale si a NLC incarcati cu EGb si AAz

Formularile de NLC - libere și încărcate cu cele doua principii active au fost supuse actiunii unor radicali liberi oxigenati generati *in situ* într-un sistem de chemiluminescenta, cu scopul evaluarii *in vitro* a activitatii antioxidante (AA%). In scop comparativ, diferite solutii de acid azelaic, ulei de maces, ulei de negrilică si extract de gălbenele de concentratii corespunzătoare cu cele din sistemele nanotransportor au fost si ele evaluate in vederea determinarii abilitatii lor de a capta radicali liberi generati in sistemul de chemiluminescenta. Ambele extracte uleioase provenite din flori de galbenele (EGb_UN/UM) prezinta o buna activitate antioxidanta, aprox. 85%, insa co-incapsularea acestora alaturi de acidul azelaic in sistemele NLCs conduce la aparitia unui efect sinergic, evidentiat prin valorile amplificate ale activitatii antioxidante (Fig. 6). Astfel, pentru sistemele de NLC_UN/UM_EGb_AAz 1, ce co-incapsuleaza 1% EGb si 0,5% AAz au fost determinate valori ale AA% de $95 \pm 0,54\%$ si respectiv de $94,2 \pm 0,36\%$. Cresterea cantitatii de acid azelaic la 1% a avut ca rezultat atingerea unei valori de $97 \pm 0,48\%$ de a capta radicalii liberi din sistem (Fig. 6).

5. Evaluarea *in vitro* a biocompatibilitatii extractelor vegetale si a NLC incarcati cu EGb si AAz

Pentru a evalua actiunea citotoxica a formularilor NLC, fibroblastele de soarece din linia celulara L929 au fost expuse la diferite concentratii crescute de EGb si respectiv de nanotransportori lipidici incarcati cu EGb si AAz, iar viabilitatea lor a fost masurata prin metoda MTT.

Rezultatele obtinute au aratat ca dupa **24 de ore** de tratament viabilitatea celulara a fost mai mare de 80% (efect non-citotoxic) in intervalul de concentratii 5-200 $\mu\text{g/mL}$ pentru EGb_UN si usor mai mica (76.2%) la concentratia de 400 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 7a). In cazul sistemelor nanotransportor, NLC_UN_EGb si NLC_UN_EGb_AAz 2, dupa 24 de ore, proliferarea celulara a fost mai mare de

80% pe domeniul de concentratii 5-700 $\mu\text{g/mL}$, majoritatea valorilor viabilitatii celulare fiind net superioare comparativ cu proba martor la concentratiile cuprinse intre 5 si 400 $\mu\text{g/mL}$.

Dupa 72 de ore de tratament, viabilitatea celulara s-a mentinut peste 80% pentru EGb_UN doar in domeniul de concentratii 5-100 $\mu\text{g/mL}$, dupa care s-a observat un usor efect citotoxic (viabilitate 71%) la o concentratie de 200 $\mu\text{g/mL}$, culminand cu atingerea unui prag de toxicitate ridicat pentru concentratii de 700 si 1000 $\mu\text{g/mL}$ EGb_UN (ex: viabilitate celulara de 8% si 5%, la 72h). In schimb, la un tratament al celulelor L929 de 72 de ore cu NLC_UN_EGb si NLC_UN_EGb_AA2, s-a observat o buna viabilitate celulara, cu valori $>80\%$ obtinute pe un interval de concentratii cuprins intre 5 si 400 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 7a). Un usor efect citotoxic a fost semnalat la o concentratie de 700 $\mu\text{g/mL}$, ex: 72.5% viabilitate celulara pentru NLC_UN_EGb si 70.9% pentru NLC_UN_EGb_AA2.

Aceste rezultate scot in evidenta efectul benefic al incapsularii *EGb* asupra proliferarii celulare, NLC_UN_EGb si NLC_UN_EGb_AA2 prezentand un grad ridicat al biocompatibilitatii, comparativ cu EGb nativ pe domeniul de concentratii cuprins intre 5-700 $\mu\text{g/mL}$ pentru 24h de tratament si respectiv 5-400 $\mu\text{g/mL}$ pentru 72h de tratament.

Informatii aditionale asupra caracteristicilor structurale ale celulelor L929 au fost confirmate prin **microscopia optica**. Morfologia celulelor L929 a fost modificata functie de tipul si concentratia de EGb_UN, NLC_UN_EGb sau NLC_UN_EGb_AA2 (Fig. 7b). Dupa 72h, o concentratie de 400 $\mu\text{g/mL}$ NLC ce incapsuleaza EGb sau amestec de EGb si AA2, nu a indus modificari ale morfologiei si densitatii celulare, celulele prezentand un aspect normal, usor poligonal, similar cu cel al culturii martor. In schimb, in cazul unei concentratii de 400 $\mu\text{g/mL}$ EGb_UN si respectiv 700 $\mu\text{g/mL}$ NLC ce incapsuleaza EGb, respectiv EGb si AA2, densitatea celulara incepe sa scada, celulele prezentand o morfologie modificata. Se evidentiaza celule poligonale, celule stelate cu multiple prelungiri, celule fuziforme cu prelungiri, celule gigant cu unul sau mai multi nuclei si eventuale resturi celulare (Fig. 7b). La concentratii de 700 $\mu\text{g/mL}$ EGb_UN si 1000 $\mu\text{g/mL}$ NLC_UN_EGb sau NLC_UN_EGb_AA2, dezvoltarea normala a culturii celulelor L929 este afectata, acestea prezentand un efect citotoxic asupra celulelor individuale (ex: celulele sunt puternic modificate, majoritatea fiind rotunjite sau fusiforme).

In cazul NLC-urilor preparate cu ulei de macese, nu s-a observat aparitia unui efect toxic asupra celulelor L929 tratate cu concentratii de pana la 400 $\mu\text{g/mL}$, viabilitatea celulara fiind mai mare de 80% (Fig. 8a). Un tratament cu 700 $\mu\text{g/mL}$ NLC pe baza de UM si EGb a condus la aparitia unui efect citotoxic. In schimb, co-incapsularea AA2 impreuna cu EGb a conferit o mai buna viabilitate celulara, astfel ca pentru 700 $\mu\text{g/mL}$ NLC a fost determinata o viabilitate de 74,4% (la 72h), comparativ cu NLC_UM_EGb pentru care viabilitatea celulara a fost de 36.7% (la 72h).

Acest efect protector al NLC_UM_EGb_AA2 asupra celulelor L929 a fost deasemenea vizualizat prin microscopia optica (Fig. 8b). Sistemele nanotransportor nu au indus modificari importante ale morfologiei si densitatii celulare in intervalul de concentratii 5 - 400 $\mu\text{g/mL}$, acestea fiind asemanatoare cu cele ale martorului de cultura. In schimb, un tratament al celulelor cu 700 $\mu\text{g/mL}$ NLC_UM_EGb, respectiv NLC_UM_EGb_AA2 a indus usoare modificari ale culturii celulare, evidentiindu-se celule fusiforme in special in cazul NLC_UM_EGb, iar densitatea celulara este mai mica comparativ cu aceea a martorului de cultura. La concentratia de 1000 $\mu\text{g/mL}$ densitatea celulara a fost redusa semnificativ, ambele tipuri de nanotransportori lipidici afectand puternic dezvoltarea normala a culturii, si implicit conducand la un efect toxic asupra celulelor individuale (Fig. 8b).

6. Atribuirea *in vitro* a efectului anti-inflamator a NLC incarcati cu EGb si AAz

Testarea activitatii anti-inflamatoare s-a realizat pe un model experimental *in vitro* obtinut din celulele macrofage stimulate cu LPS si tratate ulterior cu concentratii de 100, 200 si 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EGb_UN, EGb_UM si nanotransportori lipidici incarcati cu EGb, respectiv EGb si AAz. Rezultatele obtinute au demonstrat faptul ca celulele tratate cu probele test au secretat o cantitate mai scazuta de citokine pro-inflamatorii comparativ cu martorul stimulat cu LPS si netratat, intr-o maniera dependenta de doza (Fig. 9 si 10).

O analiza comparativa a activitatii anti-inflamatorii a scos in evidenta faptul ca **EGb_UN/UM** conduce la o diminuare semnificativa a productiei citokinelor pro-inflamatorii IL-6, IL-1 β de catre macrofagele stimulate cu LPS, doar la o concentratie de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 9, 10 a, b).

In cazul sistemelor nanotransportor preparate cu **ulei de negrilica** ce incapsuleaza EGb sau amestec de EGb si AAz, s-a observat o scadere benefica a productiei citokinelor pro-inflamatorii IL-6 si IL-1 β (Fig. 9 a, b) secretate de catre macrofage, la toate concentratiile analizate. Un efect inhibitor amplificat al productiei de interleukine IL-6 si IL-1 β s-a obtinut in cazul tratamentului cu 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NLC_UN_EGb_AAz 2, unde a fost determinata o inhibare de 72,2% in cazul IL-6 (comparativ cu 52% pentru EGb-UN, Fig. 9a) si respectiv de 51,1% pentru IL-1 β (comparativ cu 25% inhibare realizata de extractul uleios neincapsulat, Fig. 9b).

Pentru sistemele NLC preparate cu **ulei de macese** (Fig. 10), s-a constatat o tendinta similara de inhibare a citokinelor pro-inflamatorii IL-6, IL-1 β cat si a TNF- α , comparativ cu sistemele NLC preparate cu UN. In comparatie cu martorul stimulat cu LPS, cea mai buna activitate anti-inflamatoare a fost detectata tot pentru concentratii de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NLC_UM_EGb_AAz 2. De exemplu, efectul inhibitor al NLC manifestat asupra IL-6 a atins o valoare de 74,9% (Fig. 10a), in timp ce in cazul IL-1 β , inhibarea a fost de 33,5% (Fig. 10b).

La dozarea productiei de interleukina TNF- α secretata in mediul de cultura de catre macrofagele stimulate cu LPS si tratate cu nanotransportori lipidici incarcati cu EGb si/sau EGb_AAz, s-au obtinut rezultate similare, la toate concentratiile analizate (Fig. 9 si 10 c), valorile obtinute fiind insa mai mici decat cele ale martorului stimulat cu LPS si netratat.

In concluzie, cuantificarea celor 3 interleukine, analizate prin metoda ELISA, a demonstrat faptul ca nanotransportorii lipidici dezvoltati in cercetare prezinta o buna activitate anti-inflamatorie, cel mai bun rezultat obtinandu-se in cazul unui tratament cu 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NLC_UN/UM ce co-incapsuleaza ambele principii active - EGb si AAz.

7. *Studiul in vivo al efectului anti-inflamator manifestat de hidrogelurile pe baza de NLC incarcate cu EGb si AAz*

Pentru decelarea *in vivo* a efectului anti-inflamator manifestat de cele doua sisteme nanotransportor ce co-incapsuleaza EGb si AAz, preparate cu UN si respectiv UM, s-a utilizat metoda de evidentiare a efectului de inhibiție a edemului produs la nivelul labei posterioare de șobolan după injectarea unui produs flogistic (1% soluție de carrageenan). Efectul anti-inflamator a fost măsurat prin **metoda pletismometriei computerizate**. Pentru evidentiarea efectului anti-inflamator, noile sisteme nanotransportor au fost formulate in hidrogeluri, usor de aplicat la nivelul labei posterioare de șobolan. Actiunea de testare s-a realizat comparativ cu un produs comercial – Skinoren gel. (Market-HG)

Acțiunea de diminuare a inflamației acute a labei de șobolan, provocate de agentul flogistic utilizat în studiul experimental, s-a manifestat diferit în funcție de compoziția NLC-urilor testate si de momentul masurarii (timpul trecut de la provocarea edemului experimental), in prezenta celor 4 categorii de HG pe baza de NLC si respectiv a gelului comercial (Fig. 11).

Astfel, la **90 minute** de la injectarea agentului flogistic s-a detectat o activitate anti-inflamatorie moderata pentru produsul de referință Skinoren gel și foarte slabă pentru **HG-NLC 4** (hidrogel pe baza de NLC_UN_EGb_AAz 2).

Dupa **180 minute**, s-a determinat o activitate antiinflamatorie crescută pentru produsul de referință Skinoren gel, o activitate antiinflamatorie moderată pentru **HG-NLC 2** (hidrogel pe baza de NLC-UM-EGb-AAz-2), inferioara produsului de referință și o acțiune antiinflamatorie amplificata, superioara comparativ cu cea a Market-HG, pentru **HG-NLC 4** (HG pe baza NLC-UN-EGb-AAz-2).

Dupa **240 minute** de la injectarea agentului flogistic, s-a constatat o menținere a activității antiinflamatorii pentru produsul de referință Skinoren gel, creșterea activității antiinflamatorii pentru **HG-NLC 2** și scăderea ușoară activității antiinflamatorii pentru **HG-NLC 4**, dar la un nivel comparabil cu produsul de referință.

REVENDICĂRI

1. Procedeu de obținere a unor nanotransportori lipidici pe baza de ulei de maceșe și ulei de negrilică, încarcate cu principii active vegetale și sintetice, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde:
 - d. formarea unei pre-emulsii lipidice libere și încărcate cu două componente active de natură vegetală (extract de galbenele) și sintetică (acid azelaic), obținute prin contactarea, 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;
 - e. supunerea pre-emulsiei lipidice la un proces inițial de omogenizare cu grad înalt de forfecare (14 000 rpm, timp de 1 min) și ulterior la un proces de omogenizare la presiune ridicată (la 500 bar, timp de 196 sec);
 - f. obținerea unor dispersii apoase de NLCs liberi și încărcate cu cele două principii active, prin răcire ușoară, sub agitare magnetică, la temperatura camerei a emulsiei supuse celor două tipuri de omogenizări;
 - g. obținerea de NLCs în stare solidă prin supunerea dispersiilor apoase de nanotransportori lipidici liberi și încărcate cu EGb, respectiv EGb și AAz la un proces de liofilizare, la -55°C timp de 72h.
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 maceșe, 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 : Fosfatidilcolina : Poloxamer 188 într-un raport de greutate = 4,66 : 1 : 1.
4. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că**, pre-emulsia lipidică 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 ... 2,9mg caroteni (în 100g dispersie apoasă de NLCs).
6. Procedeu conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că**, în faza apoasă se adaugă o cantitate de 0,5 ... 1g acid azelaic (în 100g dispersie apoasă de NLCs).
7. NLCs în stare solidă încarcate cu EGb, respectiv amestec de EGb și AAz, obținuți prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6, **caracterizați prin aceea că aceștia** contin:
 - a. 24% ulei vegetal (ulei de negrilică sau ulei de maceșe);
 - 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 între $0,157 \div 0,211$ în cazul obținerii de NLCs liberi și între $0,11 \div 0,172$ în cazul obținerii de NLCs încărcate cu EGb, respectiv EGb și AAz.

10. NLCs conform revendicării 7 obținuti prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6 **caracterizati prin aceea că** prezintă valori ale potențialului electrocinetic ce variază între -42,1 ÷ 53 mV, în cazul utilizării uleiului de negrilica și între -43,6 ÷ -58,7 mV în cazul utilizării uleiului de maces.
11. NLCs conform revendicării 7 obținuti prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6 **caracterizati prin aceea că** prezintă valori ale eficienței de incapsulare a *AAz* cuprinse între 83,9 și 84,0% și valori ale eficienței de incapsulare a carotenilor din *EGB* cuprinse între 92,3 și 94,0%.
12. NLCs conform revendicării 7 obținuti prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6, **caracterizati prin aceea că** prezintă o bună capacitate de a capta radicalii liberi formați în 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 85,8 și 95,4 pentru NLC-urile preparate cu UM, libere și încărcate cu EGb/EGb și AAz.
13. NLCs conform revendicării 7 obținuti prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6, **caracterizati prin aceea că** prezintă o bună biocompatibilitate, la un tratament al celulelor L929 de 72 de ore cu NLC_UN/UM_EGb și NLC_UN/UM_EGb_AAz 2, s-a observat o viabilitate celulară >80% pe un interval de concentrații cuprins între 5 și 400 μ g/mL.
14. NLCs conform revendicării 7 obținuti prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6, **caracterizati prin aceea că** un tratament cu 400 μ g/mL NLC_UN_EGb_AAz 2 conduce la apariția unui efect inhibitor amplificat al producției de interleukine IL-6 și IL-1 β , ex: o inhibare de 72,2% în cazul IL-6 și respectiv de 51,1% pentru IL-1 β .
15. NLCs conform revendicării 7 obținuti prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6, **caracterizati prin aceea că** un tratament cu 400 μ g/mL NLC_UM_EGb_AAz 2 conduce la apariția unui efect inhibitor amplificat al producției de interleukine IL-6 și IL-1 β , ex: efectul inhibitor asupra IL-6 a atins o valoare de 74,9%, în timp ce în cazul IL-1 β , inhibarea a fost de 33,5%.
16. Hidrogeluri pe baza de nanotransportori lipidici obținuti prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6, **caracterizate prin aceea că**, manifestă o activitate anti-inflamatoare *in vivo* moderată pentru HG-NLC 2 (hidrogel pe baza de NLC-UM-EGb-AAz-2), respectiv o acțiune anti-inflamatorie amplificată, superioară comparativ cu cea a produsului de referință (Skinoren gel), pentru HG-NLC 4 (HG pe baza NLC-UN-EGb-AAz-2).

Tabel 1. Compozitia dispersiilor apoase de NLCs libere si incarcate cu *EGB*, respectiv *EGB* si *AAz*

Formulari de NLCs libere si incarcate cu <i>EGB</i> , respectiv <i>EGB</i> si <i>AAz</i>		PC (%)	MSG (%)	UN (%)	UM (%)	<i>EGB</i> in UN sau UM* (%)	<i>AAz</i> (%)
1	NLC_UN (liber)	3,5	3,5	3	-	-	-
2	NLC_UN_ <i>EGB</i>	3,5	3,5	1	-	2	-
3	NLC_UN_ <i>EGB</i> <i>AAz</i> 1	3,25	3,25	1	-	2	0,5
4	NLC_UN_ <i>EGB</i> <i>AAz</i> 2	3	3	1	-	2	1
5	NLC_UM (liber)	3,5	3,5	-	3	-	-
6	NLC_UM_ <i>EGB</i>	3,5	3,5	-	1	2	-
7	NLC_UM_ <i>EGB</i> <i>AAz</i> 1	3,25	3,25	-	1	2	0,5
8	NLC_UM_ <i>EGB</i> <i>AAz</i> 2	3	3	-	1	2	1

Notatii: *EGB* = extract uleios de galbenele in ulei de negrilica sau ulei de macese; *AAz* = acid azelaic; MSG = monostearat de glicerol; PC = palmitat de cetil; UN = ulei de negrilica; UM = ulei de macese.

*Extractul uleios de galbenele in UN contine 2,80 mg caroteni in 100g dispersie apoasa de NLCs; Extractul uleios de galbenele in UM contine 2,90 mg caroteni in 100g dispersie apoasa de NLCs.

Figuri

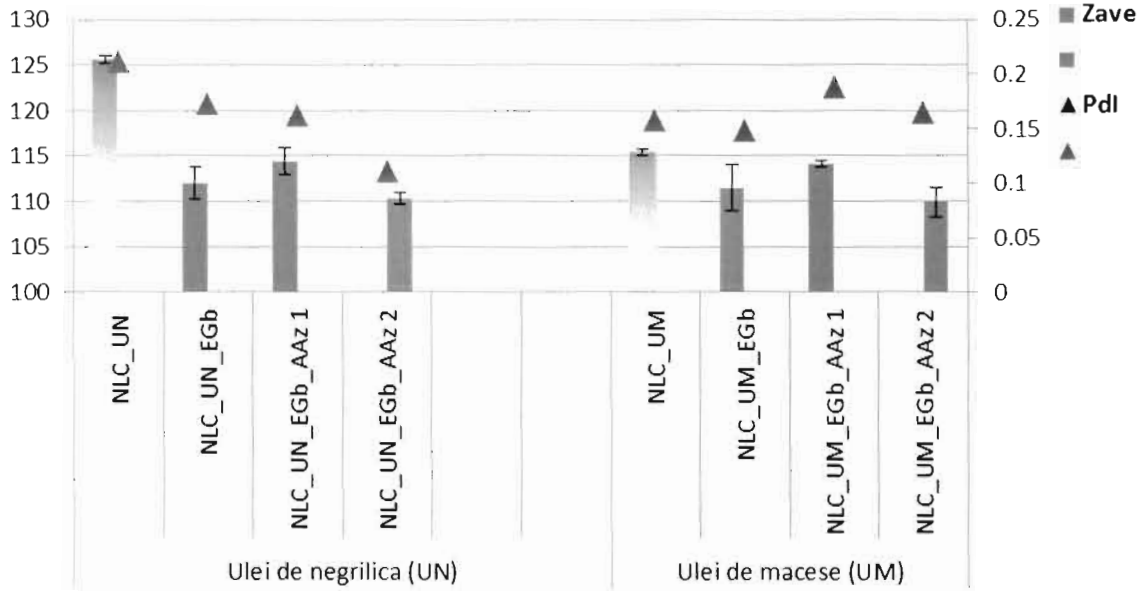


Fig. 1. Diametrele medii si indicii de polidispersitate pentru sistemele NLCs sintetizate

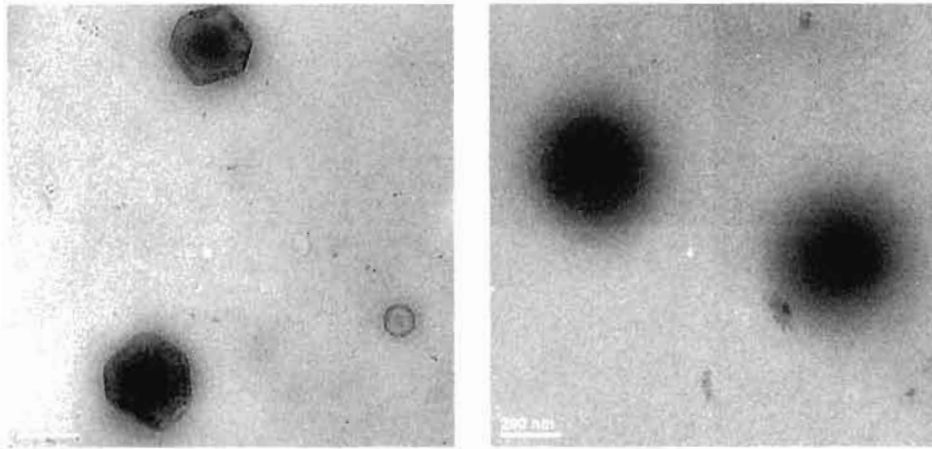


Fig. 2. Imaginile TEM ale NLC_UN/UM_EGb_AAz 2

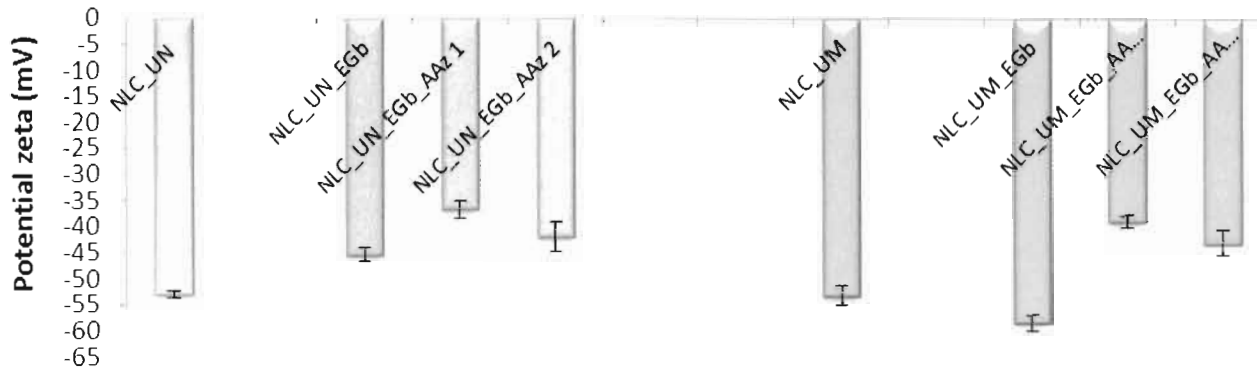


Fig. 3. Potentialul electrocinetic al dispersiilor de nanotransportori lipidici liberi si incarcati cu principii active naturale si sintetice

6/

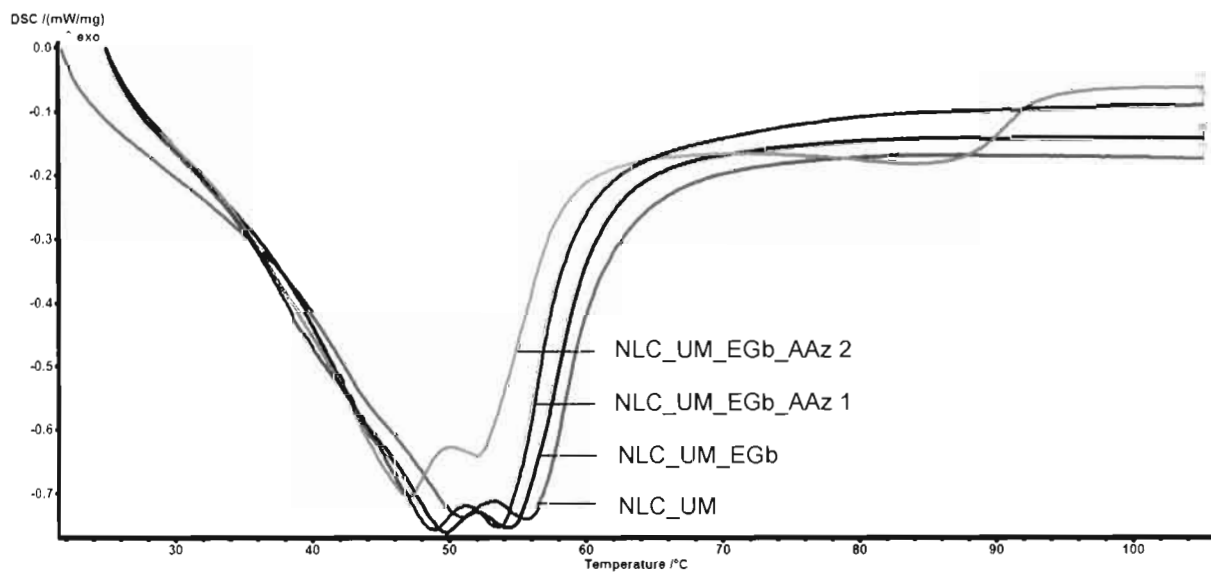
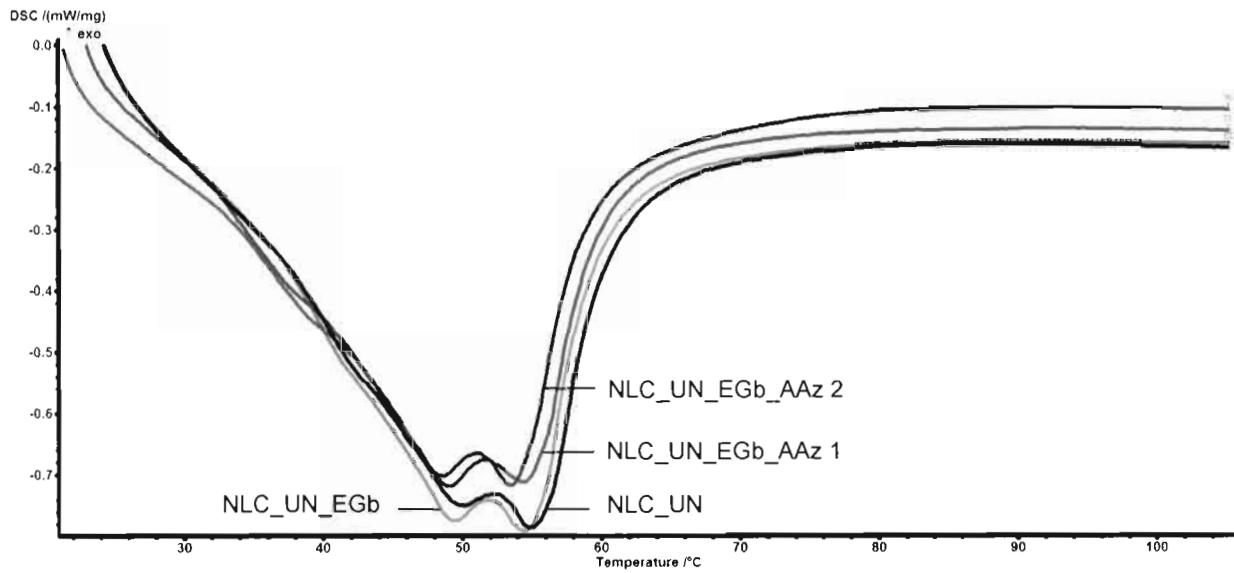


Fig. 4. Analiza DSC a NLCs liberi si ncarcati cu Egb, respectiv amestec de EGb si AAz

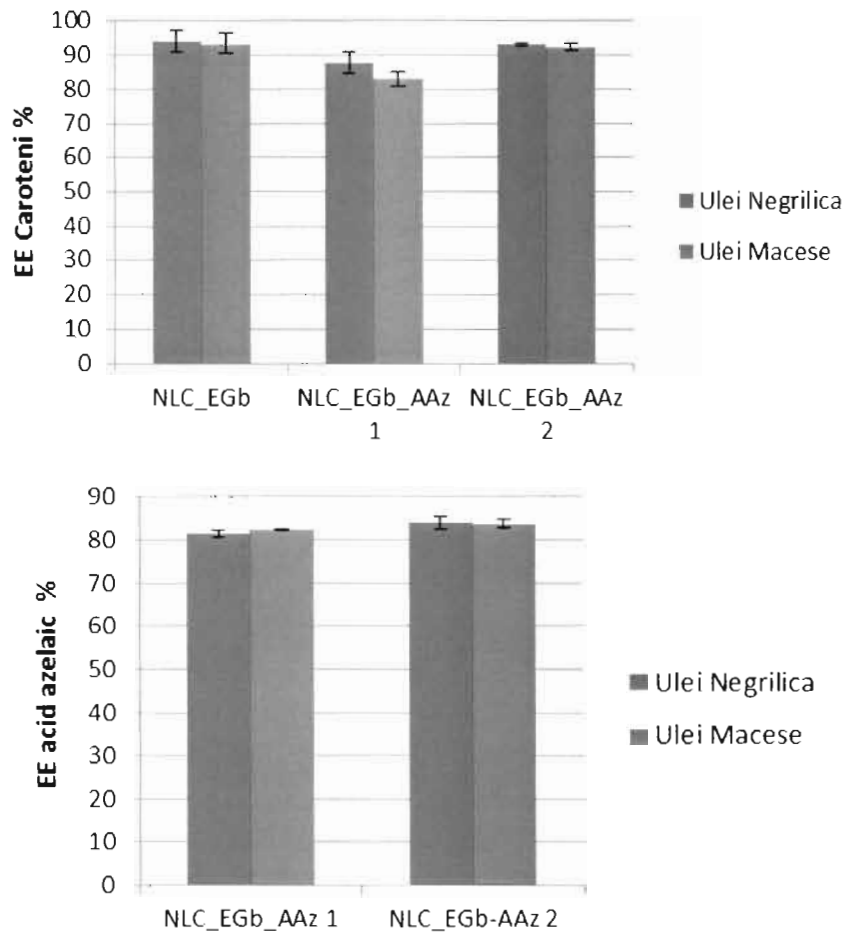


Fig. 5. Eficienta de incapsulare a carotenilor din EGb (a) si respectiv a AAz (b) co-incapsulati in sistemele NLCs

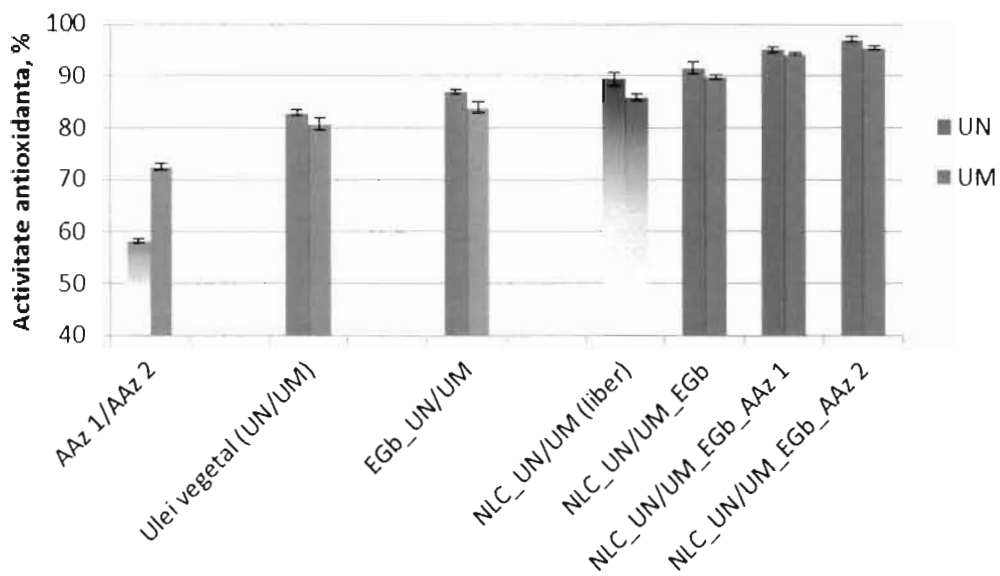
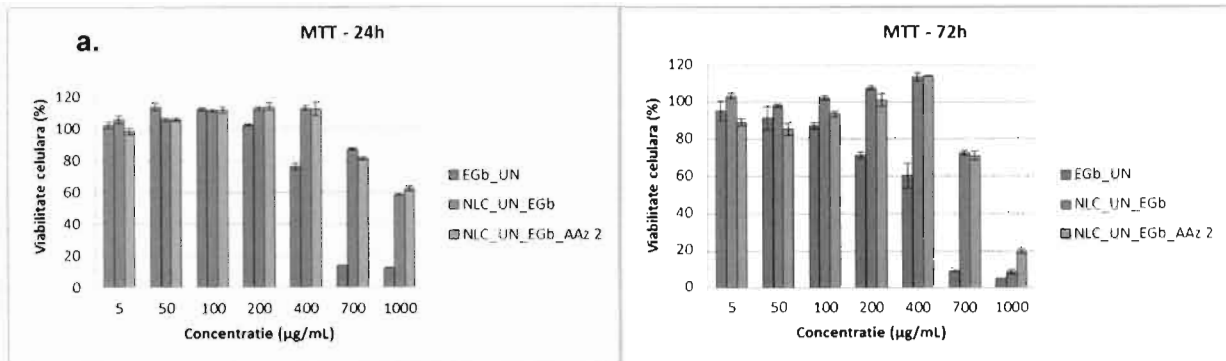
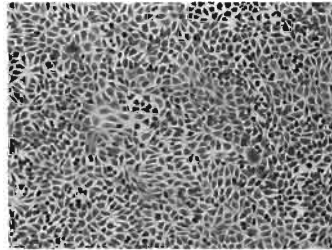


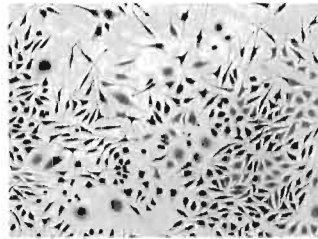
Fig. 6. Determinarea *in vitro* a activitatii antioxidante



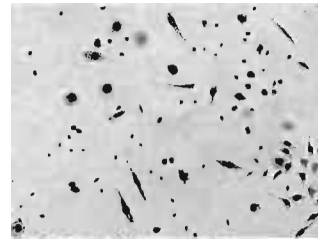
b.



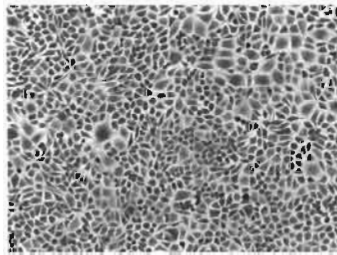
Control



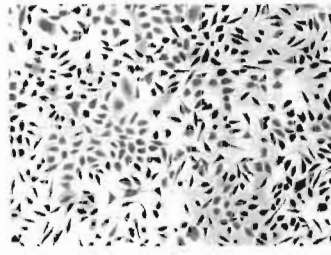
EGb in UN – 400 µg/mL



EGb in UN – 700 µg/mL



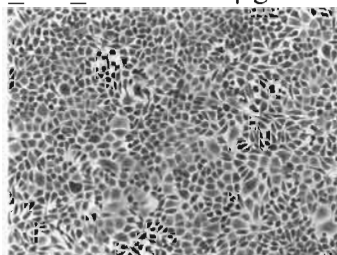
NLC_UN_EGb – 400 µg/mL



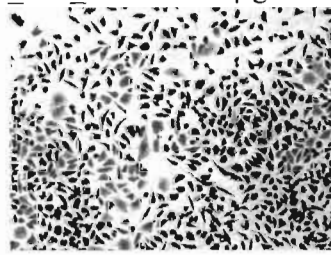
NLC_UN_EGb – 700 µg/mL



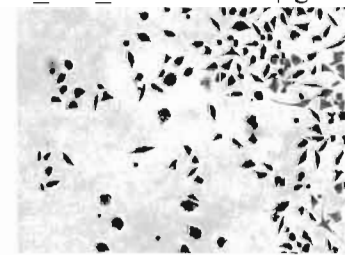
NLC_UN_EGb – 1000 µg/mL



NLC_UN_EGb_AAz 2 – 400 µg/mL



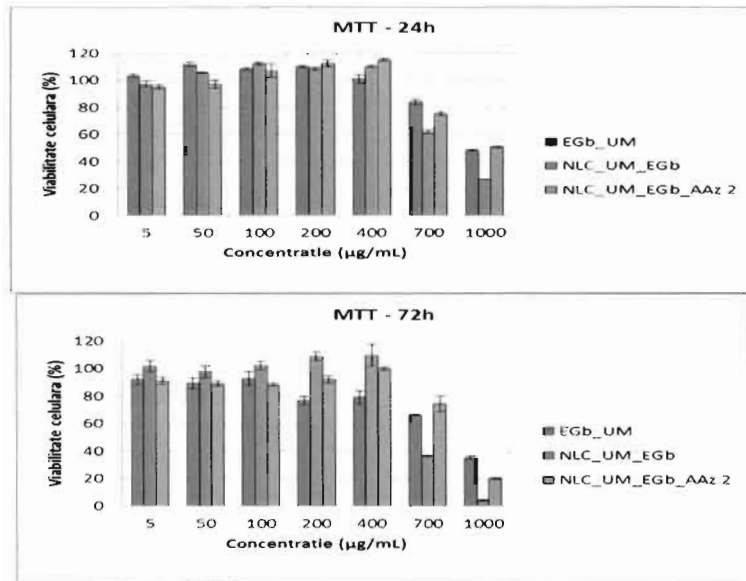
NLC_UN_EGb_AAz 2 – 700 µg/mL



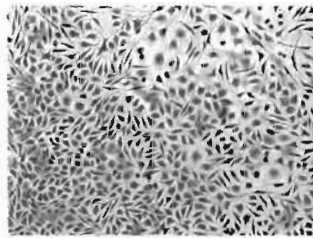
NLC_UN_EGb_AAz 2 – 1000 µg/mL

Fig. 7 a. Viabilitatea celulelor L929 cultivate in prezenta diferitelor concentratii de EGb_UN, NLC_UN_EGb si NLC_UN_EGb_AAz 2 evaluata prin testul MTT la 24 si 72 de ore; **b.** Efectul EGb_UN, NLC_UN_EGb si NLC_UN_EGb_AAz 2 asupra celulelor L929 la concentratiile indicate, dupa 72h de tratament (coloratie Hematoxilina-Eozina, 10X)

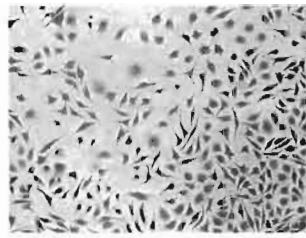
a.



b.



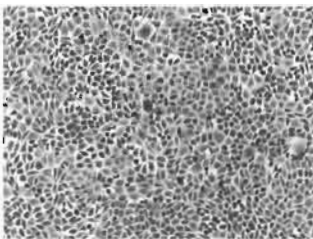
EGb in UM – 400 µg/mL



EGb in UM – 700 µg/mL



EGb in UM - 1000 µg/mL



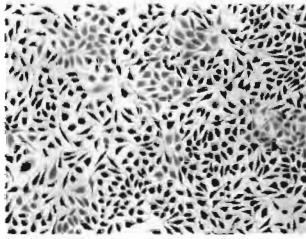
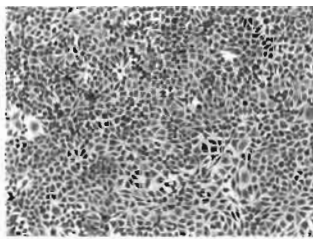
NLC_UM_EGb – 400 µg/mL



NLC_UM_EGb – 700 µg/mL



NLC_UM_EGb – 1000 µg/mL



NLC_UM_EGb_AA2 – 400 µg/mL NLC_UM_EGb_AA2 – 700 µg/mL NLC_UM_EGb_AA2 – 1000 µg/mL

Fig. 8 a. Viabilitatea celulelor L929 cultivate in prezenta diferitelor concentratii de EGb_UM, NLC_UM_EGb si NLC_UM_EGb_AA2 evaluata prin testul MTT la 24 si 72 de ore; **b.** Efectul EGb_UM, NLC_UM_EGb si NLC_UM_EGb_AA2 asupra celulelor L929 la concentratiile indicate, dupa 72h de tratament (coloratie Hematoxilina-Eozina, 10X)

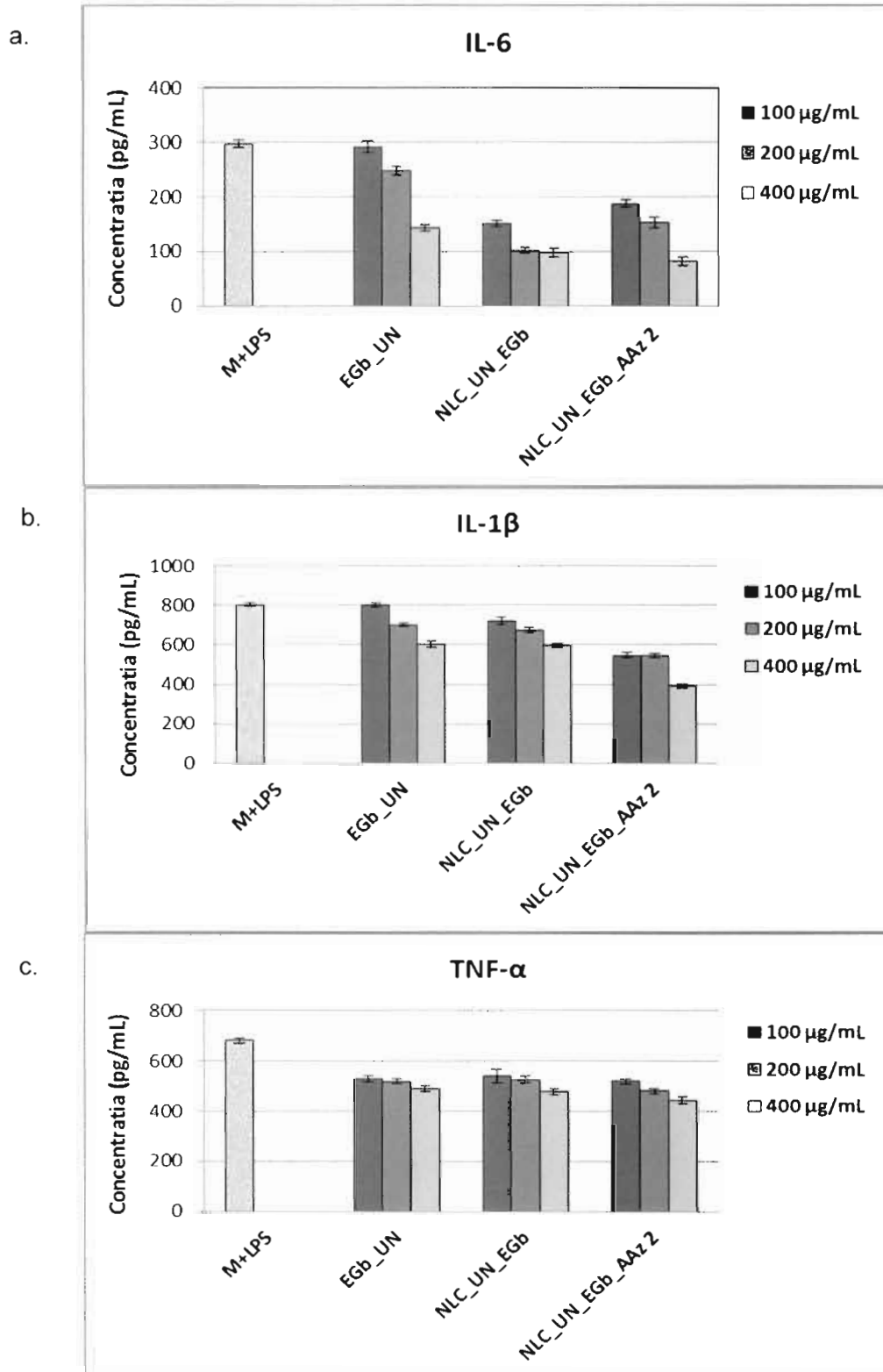


Fig. 9. Dozarea prin metoda ELISA a productiei de citokine IL-6, IL-1β si TNF-α, secretate in mediul de cultura al celulelor macrofage stimulate cu LPS si tratate cu diferite concentratii de EGb_UN, NLC_UN_EGb si NLC_UN_EGb_AA2 2

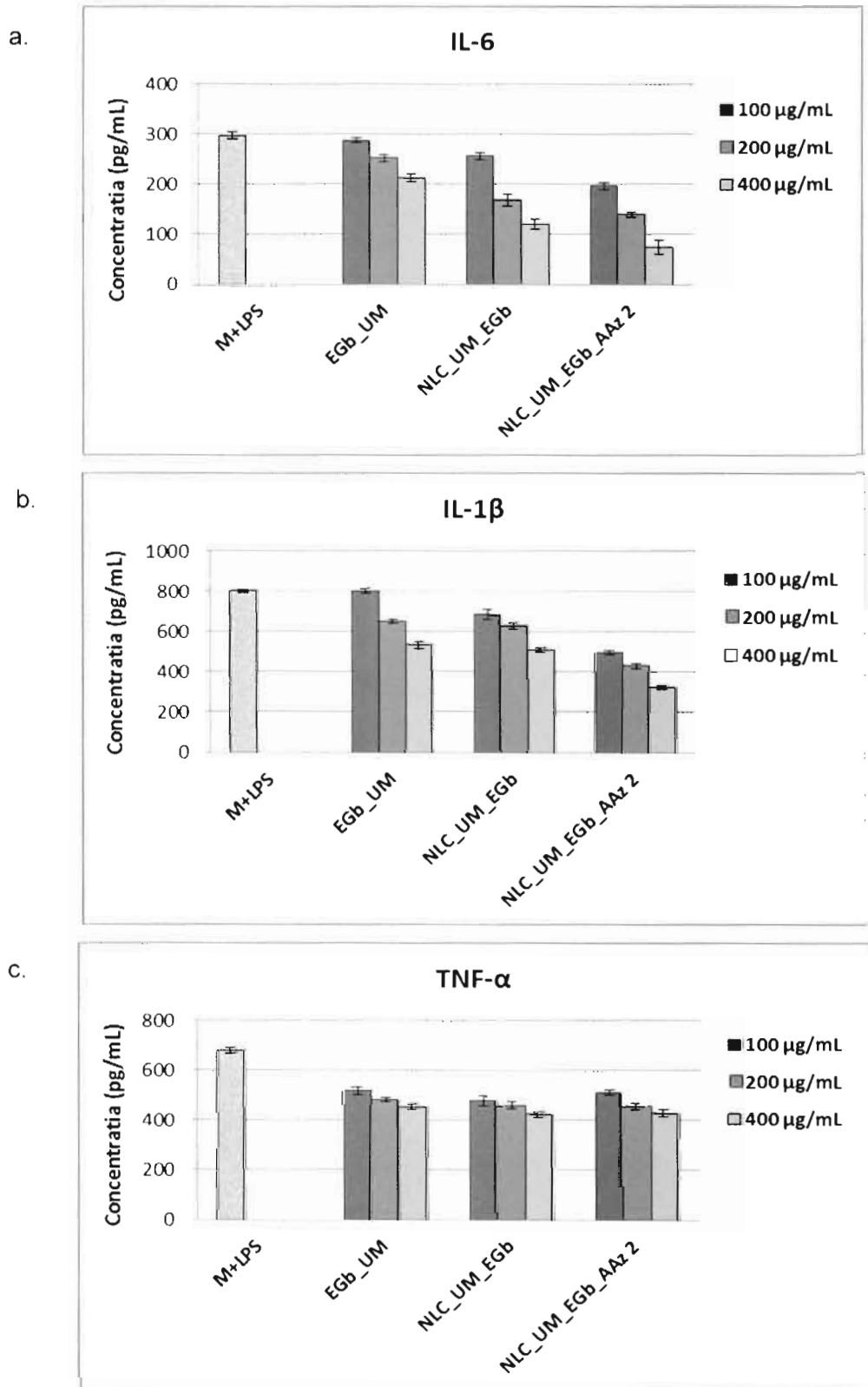


Fig. 10. Dozarea prin metoda ELISA a productiei de citokine IL-6, IL-1 β si TNF- α , secretate in mediul de cultura al celulelor macrofage stimulate cu LPS si tratate cu diferite concentratii de EGb_UM, NLC_UM_EGb si NLC_UM_EGb_AA2 2

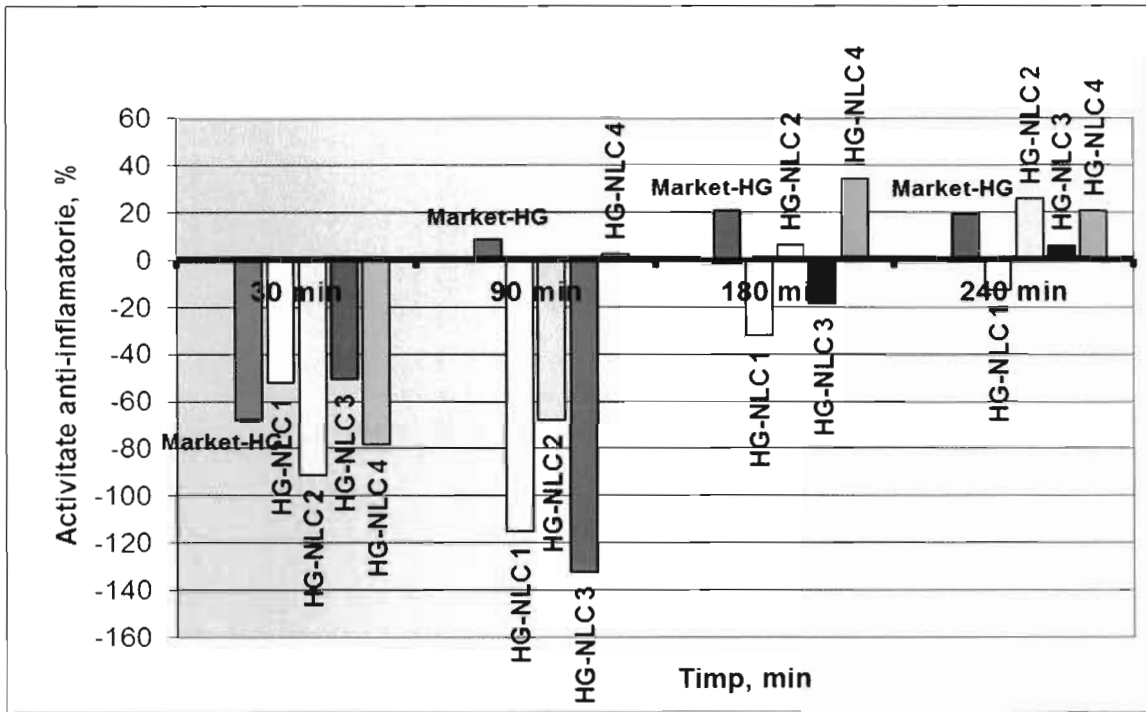


Fig. 11. Activitatea antiinflamatorie procentuală pe momente
(HG-NLC 1 = Hidrogel pe baza de NLC_UM; HG-NLC 2 = NLC_UM_EGb_AAz 2;
HG-NLC 3 = Hidrogel pe baza de NLC_UN; HG-NLC 4 = NLC_UN_EGb_AAz 2)