



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00220

(22) Data de depozit: 29/04/2021

(41) Data publicării cererii:
30/09/2021 BOPI nr. 9/2021

(71) Solicitant:
• AC HELCOR S.R.L., STR. VICTOR BABEȘ
NR. 50, BAIA MARE, MM, RO

(72) Inventatori:
• LĂCĂTUȘU IOANA,
STR.TURNUL CHINDIEI NR.9, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BADEA MARIA NICOLETA, STR. LEREȘTI
NR. 3, BL. A2, SC. 6, AP. 88, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;

• POP ANCA LUCIA,
STR.BANUL ANTONACHE NR.52-60, SC.C,
AP.1, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• IORDACHE TEODORA- ALEXANDRA,
STR.EROILOR, NR.14, BL.103, ET.2, AP.5,
URZICENI, IL, RO;
• POP CORIOLAN, STR. TRAIAN VUIA
NR. 23, BAIA MARE, MM, RO

(54) **PROCEDEU DE ÎNCAPSULARE DUALĂ A DOUĂ CATEGORII
DE PRINCIPII VEGETALE BIOACTIVE ÎN ACELAȘI SISTEM
DE DISTRIBUȚIE NANOSTRUCTURAT**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor sisteme nanotransportor duale cu aplicație în tratamentul afecțiunilor inflamatorii. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de: formare a unei faze lipidice conținând un amestec de monostearat de gliceril:palmitat de cetil:ulei de luminița nopții sau ulei de soia, într-un raport în greutate de 1:1:0,85, adăugarea în faza lipidică a unui extract de yam sălbatic (EYS), standardizat în 95% Diosgenina, care asigură un conținut de 3,3...3,7% principiu bio-activ în sistemul transportor lipidic nanostructurat (NLC) dual, formarea unei faze apoase conținând un amestec de surfactanți de tip Tween20:Fosfatidilcolină:Poloxamer 188 într-un raport în greutate de 1:0,21:0,21, adăugarea în faza apoasă

a unui extract de lemn dulce (ELD) standardizat în 10% Acid glicirizic, care asigură un conținut de 3, 7...13, 2% principiu bio-activ în sistemul NLC dual (NLC-EYS-ELD), omogenizarea pre-emulsiei lipidice și răcire sub agitare, la temperatura camerei, urmată de liofilizare la temperatura de -55°C, timp de 60 h, din care rezultă sisteme nanotransportor duale care asigură o eliberare susținută și constantă a celor două principii active precum și o amplificare a activității antioxidante și a efectului antiinflamator.

Revendicări: 14
Figuri: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, 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).



108

PROCEDEU DE INCAPSULARE DUALA A DOUA CATEGORII DE PRINCIPII VEGETALE BIOACTIVE IN ACELASI SISTEM DE DISTRIBUTIE NANOSTRUCTURAT

I. DESCRIERE

Invenția prezentă se referă la un procedeu de co-incapsulare duala a principiilor bio-active vegetale (extract de yam salbatic si extract de lemn dulce), in sisteme nanotransportor lipidice preparate cu amestecuri de lipide biocompatibile (esteri de glicerol si uleiuri vegetale) si surfactanti ce fac parte din categoria GRAS (Tween 20, fosfatidil colina si poloxamer 188). Procedeu propus in prezenta inventie permite: (i) cuplarea, in acelasi sistem lipidic nanostructurat, a doua categorii de principii active vegetale bioactive, de natura lipofila si hidrofila (extract de yam salbatic – EYS, standardizat in 95% Diosgenina si extract de lemn dulce – ELD, standardizat in 10% Acid glicirizic); (ii) obtinerea unor nanotransportori lipidici pe baza de ulei de luminita noptii si ulei de soia ce prezinta o biocompatibilitate ridicata si lipsa unui efect citotoxic potential; (iii) cresterea biodisponibilitatii DSG si a ELD, dovedita prin teste *in vitro* de digestie; (iv) îmbunătățirea administrării orale a extractelor vegetale, prin asigurarea unei eliberari sustinute si constante a celor doua principii bioactive vegetale (EYS si ELD); (v) amplificarea activitatii antioxidante si a efectului antiinflamator. Rezultatele complexe si efectele biologice multiple demonstrate le confera acestor sisteme lipidice nanotransportor duale un potential aplicativ in tratamentul afectiunilor inflamatorii dar si pentru cresterea calitatii vietii populatiei feminine aflata in perioada menopauzala.

Administrarea orală este calea preferată pentru administrarea unui medicament, datorita convenientei și ușurinței de administrare, deși majoritatea medicamentelor au solubilitate scăzută în apă, instabilitate chimică, absorbție intestinală slabă, dar și metabolizare extinsă. Asadar, exista o serie de factori care **limitează eficienta administrarilor orale**, respectiv rata și gradul de absorbție al medicamentelor, cei mai reprezentativi fiind: stabilitatea și solubilitatea medicamentului în fluidele gastro-intestinale, timpul de ședere in tractul gastro-intestinal, permeabilitatea membranei și metabolismul presistemic. Majoritatea medicamentelor prezintă **probleme de biodisponibilitate** (absorbție intestinala) din cauza funcției de barieră a tractului gastro-intestinal și a metabolismului primar. Deoarece viteza și amploarea absorbției sunt adesea controlate de rata de dizolvare a medicamentului în tractul gastro-intestinal, îmbunătățirea caracteristicilor de dizolvare a medicamentelor insolubile continuă să fie o sarcină majoră pentru oamenii de știință.

Pana in prezent au fost adoptate mai multe strategii pentru **îmbunătățirea comportamentului de dizolvare a medicamentelor insolubile**, care includ: complexare, derivatizarea medicamentelor, creșterea suprafeței de contact (prin micronizare sau nanonizare), uscare prin pulverizare și microincapsulare etc. In diferite cercetari se sugerează că biodisponibilitatea orală a medicamentelor lipofile poate fi îmbunătățită atunci când este administrată concomitent cu o masă bogată în grăsimi. Acest concept a făcut să se dezvolte diferitele formulari de sisteme de distributie coloidale, de natura lipidica, ca mijloc de a îmbunătăți solubilizarea și permeabilitatea medicamentului de-a lungul barierei gastro-intestinale. Dintre diferitele sisteme coloidale de eliberare a medicamentelor, **transportorii lipidici nanostructurati (NLC)** conferă avantaje distincte (ex: biocompatibilitate, eliberare controlata a medicamentului, biodisponibilitate avansata, posibilitatea de producere la scara larga etc.). Nanotransportorii lipidici sunt constituiti din lipide biocompatibile și biodegradabile, fiind ideale pentru medicamentele lipofile și slab

solubile, sporind astfel absorbția lor orală. În plus, datorită transportului limfatic, metabolismul primar este redus, concomitant cu o creștere a biodisponibilității. Un astfel de efect pare să se datoreze drenării nanoparticulelor lipidice direct în circulația sistemică, prin canalul toracic care ocolește circulația portală. 107

Aceste **sisteme lipidice nanostructurate** reprezintă o strategie promițătoare pentru a depăși constrângerile menționate, principalul scop urmărit fiind acela de a îmbunătăți administrarea orală a medicamentelor convenționale (de sinteză) și, potrivit ultimelor cercetări din domeniu, a compușilor bioactivi proveniți din diferite surse vegetale. Marele interes în explorarea compușilor bioactivi din plante în scopuri terapeutice este în continuă creștere și va fi mai stimulat în viitor. Acest lucru se datorează în principal, efectelor secundare ale medicamentelor de sinteză și provocărilor de toxicitate. Utilizarea medicamentelor sintetice a stârnit o îngrijorare mai mare din cauza costului ridicat al acestora, precum și a unui număr considerabil de efecte secundare. Prin urmare, explorarea unei terapii accesibile și ușor disponibile, cu efecte secundare minime, este de o importanță absolută și indispensabilă pentru gestionarea îmbunătățită a unor boli cronice care provoacă invaliditate la nivel mondial, în ciuda progreselor remarcabile realizate în domeniul terapiei de-a lungul anilor. Ca o tendință de creștere, World Health Organisation a raportat faptul că peste 80% din populația mondială se bazează pe medicamente pe bază de plante (fitomedicina) pentru un anumit aspect al nevoilor lor primare de îngrijire a sănătății (*Parama et al., 2020; Rachmawati et al., 2020*).

În ciuda relevanței farmacologice a uleiurilor și a extractelor provenite din diferite surse vegetale, potențialul terapeutic al multor principii active din plante este încă insuficient explorat în domeniul nanotehnologie – sănătate. Având în vedere tendințele actuale la nivel mondial, utilizarea resurselor vegetale pentru furnizarea de principii bioactive care să manifeste multiple efecte terapeutice și efecte secundare diminuate sau chiar inexistente, deschide noi perspective în domeniul biomedical.

În prezenta cercetare inovativă, am fost interesați de dezvoltarea și demonstrarea eficienței terapeutice a unor nanosisteme lipidice pentru protecția, transportul și distribuția de principii bioactive vegetale (lipofile și hidrofile) pe cale orală. Cele două principii vegetale de natură lipofilă și hidrofilă, care vor fi cooptate în același sistem de distribuție lipidic nanostructurat sunt: extractul de yam sălbatic, standardizat în 95% Diosgenina, DSG (principiu vegetal de natură lipofilă) și extractul de lemn dulce, standardizat în 10% Acid glicirizic (principiu vegetal hidrofil). Scopul final este asociat cu creșterea biodisponibilității principiilor active provenite din cele două surse vegetale (Diosgenin și Acid glicirizic), protejarea acestora împotriva degradării tractului gastro-intestinal, creșterea solubilității lor orale (ceea ce permite o creștere a permeabilității intestinale), evitarea metabolismului primar, concomitant cu obținerea unor efecte antiinflamatoare și antioxidante amplificate. Transportorii lipidici nanostructurați (**NLC**) **descrisi în actuala propunere de brevet** sunt obținuți în conformitate cu optimizarea unei metode descrisă anterior, de același grup de autori (**RO 131955, 30.05.2019**).

Diosgenina (DSG, 3β-hidroxi-5-spirosten) este o saponina steroida naturală (Fig. 1), derivată din plante, care se găsește predominant în Yam-ul sălbatic (*Dioscorea villosa*) și în planta terapeutică denumită Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). DSG este cunoscută pentru bioactivitatea sa, pentru proprietățile biocompatibile și netoxice și prin urmare, în ultimii ani s-au efectuat multe studii pentru a explora potențialul acesteia pentru o mare varietate de afecțiuni medicale.

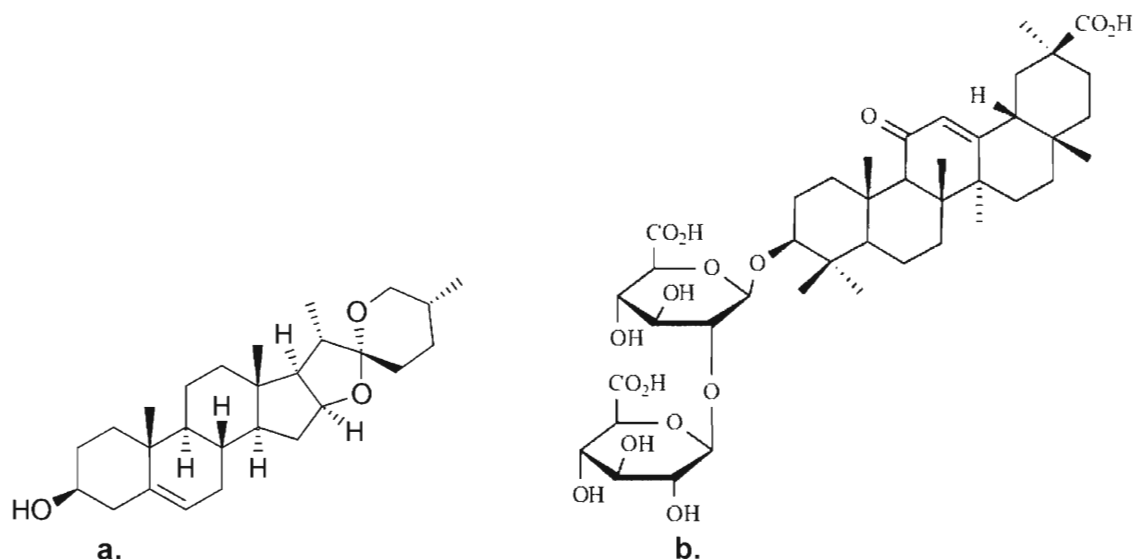


Fig. 1. Principii vegetale bio-active din extractele vegetale: **a.** Diosgenin din extractul de yam salbatic/*Discorea villosa*; **b.** Acid glicirizic din extractul de lemn dulce/*Glycyrrhiza glabra*

DSG prezinta o gamă largă de **activități farmacologice** puse in evidenta in numeroase studii preclinice si clinice. Studiile efectuate au demonstrat că DSG manifesta efecte terapeutice in cazul mai multor tipuri de cancer (incluzând carcinomul mamar, osteosarcomul, carcinomul de colon, leucemia și cancerul de prostată), rol protector în bolile cardiovasculare (cum ar fi tromboza și ateroscleroza), amelioreaza diabetul și hiperlipidemia, regleaza tulburările neurodegenerative, creste proliferarea celulara in modelele de piele umana si manifesta efecte accentuate in reglarea simptomelor menopauzale. Efectele anticancerigen, protector cardiovascular, anti-diabetic, neuroprotector, imunomodulator, estrogenic și de protecție a pielii, demonstrate prin numeroase studii preclinice, sunt datorate unor fenomene precum inducerea apoptozei, suprimarea transformărilor maligne, imbunatatirea functiei anticoagulante si inhibarea agregarii trombocitelor, scăderea stresului oxidativ, prevenirea evenimentelor inflamatorii, promovarea proliferării celulare, reglarea răspunsul imun al celulelor T etc. În plus, DSG îmbunătățește statutul antioxidant și inhibă peroxidarea lipidelor. Este benefică în îmbunătățirea funcției celulelor endoteliale, neurocitelor, celulelor miocardice, celulelor musculare netede vasculare și celulelor epiteliale. Activitatea sa antiinflamatoare se realizeaza prin inhibarea producerii de citokine pro-inflamatorii, enzime și molecule de adeziune.

Aceste studii preclinice si mecanistice realizate pe Diosgenin oferă o bază reala si ampla pentru valorificarea acestui produs natural bio-activ in farmacoterapia diferitelor boli.

In ciuda potentialului terapeutic vast al DSG, **aplicarea clinică a diosgeninei în terapiile mai sus mentionate este limitată** din cauza unor caracteristici nedorite, cum ar fi: profil farmacocinetic slab, solubilitate scăzută, lipofilicitate ridicata, timp de înjumătățire relativ scurt, biodisponibilitate scăzută și instabilitate în diferite condiții fiziologice. Rezultatele farmacocinetice au arătat că biodisponibilitatea absolută a DSG la șobolani este de doar 6-7% (Liu et al., 2017; Okawara et al., 2014). Asadar, terapia orală cu DSG

nu poate fi eficientă din cauza disponibilității scăzute a DSG în circulația sistemică (<7%), care se datorează solubilității sale scăzute și metabolismului primar extins. Din cauza acestor deficiente, proiectarea unui **sistem de distribuție adecvat** pentru DSG reprezintă o problemă majoră.

Pentru a îmbunătăți eficacitatea și biodisponibilitatea diosgeninei s-au întreprins numeroase abordări, inclusiv prepararea nanocristalelor-DSG (Liu et al., 2017), nanoparticule-DSG polimerice, obținute prin funcționalizarea DSG cu acid hialuronic (Quinones et al., 2017), sau prin conjugare cu polimeri hidrofili, de exemplu cu mPEG (Wei et al., 2018; Erdagi et al., 2019). Intensificarea biodisponibilității DSG a fost demonstrată și în cazul nano-DSG, utilizând bistraturi de chitosan sau albumina (Pathak et al., 2018) sau a cristalelor lichide cu complecși de incluziune de tip b-ciclodextrine (Okawara et al., 2014). Legarea compușilor naturali proveniți din diferite surse vegetale cu diferiți polimeri (în general prin legături covalente) oferă oportunități atât legate de dezvoltarea unor noi formulări biocompatibile cu proprietăți mai bune cât și de a spori eficacitatea substanței bioactive distribuite (Erdagi et al., 2013). Polimerii naturali și sintetici au fost asociați cu mai mulți compuși biologic activi pentru a îmbunătăți permeabilitatea celulară, proprietățile mucoadezive, precum și eliberarea controlată și țintită a medicamentului.

Așa cum s-a raportat în literatură, atât complexe DSG-ciclodextrină, nanoparticulele polimerice cu DSG sau nanocristalele cu DSG au prezentat solubilitate apoasă și o biodisponibilitate orală superioară în comparație cu DSG. **Cu toate acestea, aceste metode au o serie de limitări:** consumă mult timp, necesită o cantitate mare de excipienți și au o capacitate redusă de încărcare a medicamentelor. Prin urmare, este necesar să se investigheze un sistem alternativ de distribuție pentru DSG care să-i îmbunătățească biodisponibilitatea orală, oferind în același timp o capacitate mare de încărcare, o bună accesibilitate dar și ușurința de producție.

În literatura de specialitate, respectiv în cercetarea brevetelor, **nu au fost găsite studii referitoare la nanoformularea acestui principiu bioactiv vegetal, Diosgenina (DSG), în matrici lipidice nanostructurate (NLC).** În CN1857287 s-a prezentat prepararea unor nanopulberi de DSG pentru tratarea bolilor vasculare cardiace și cerebrale. Pentru preparare s-a folosit un material lipidic (ex: un amestec de unul sau mai multe dintre următoarele lipide: lecitină din soia, cefalină, vitamina E, ulei de soia, acid stearic, alcool stearilic, monostearat de gliceril, tristearat de gliceril), iar procedeul a constat într-o etapă intermediară de obținere a nanoemulsiilor de DSG prin tehnica omogenizării la presiune înaltă, urmata de liofilizare, cu obținerea nanopulberilor de DSG. De asemenea prepararea nanoparticulelor polimerice de DSG, prin conjugarea DSG la PEG, a fost brevetată în CN107137716A.

Extractul de lemn dulce (ELD) este unul dintre cele mai renumite medicamente pe bază de plante din întreaga lume, întâlnit în rădăcinile uscate ale unor specii de gliciriza precum *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., *Glycyrrhiza inflata* Bat. și *Glycyrrhiza glabra* L. Studiile fitochimice au demonstrat că lemnul dulce conține o varietate de compuși chimici, cum ar fi glicozide flavonice, saponine triterpenoide și polizaharide (Wu et al., 2017). Componentele chimice cunoscute ale *Glycyrrhiza glabra* includ: saponine (în principal glicirizină, 13%), flavonoide (1,5%), cumarină, alcaloizi, polizaharide, sitosterol și aminoacizi (Li et al., 2014).

În ultimii 50 de ani, activitatea biologică și terapeutică a extractului de lemn dulce a fost investigată intens în Asia și Europa și s-a confirmat că este netoxică (Selyutina et al., 2019). Lemnul dulce este utilizat pe scară largă în medicina tradițională chineză. Extractul

de lemn dulce este recunoscut în farmacopeea chineză pentru a trata diferite boli, cum ar fi astmul, gastrita, hepatita și toxicoza. Notabil este și faptul că *Glycyrrhiza glabra* poate completa alte medicamente pentru a reduce toxicitatea și a crește eficacitatea (Li et al., 2014).

Acidul glicirizic (GA) numit și glicirizină, este cel mai important ingredient bioactiv din rădăcina de lemn dulce, fiind și principalul glicozid triterpenic din *Glycyrrhiza glabra*. GA constă dintr-o moleculă de acid 18- β -gliciretinic și două molecule de acid glucuronic (acid 18- β -gliciretinic-3-O- β -D-glucuronopiranozil-(1 \rightarrow 2)-beta-D-glucuronid). Din punct de vedere chimic, GA este o moleculă amfifilă: partea hidrofilă este reprezentată de resturile de acid glucuronic, iar partea hidrofobă este restul de acid gliciretic.

GA posedă o gamă largă de **activități farmacologice și biologice** (antivirală, antiinflamatorie, anticanceroasă, hepatoprotectoare etc.), fiind frecvent utilizat pentru tratamentul leziunilor hepatice acute și cronice, hepatitei virale, steatozei hepatice, fibrozei hepatice, hepatomului, miocarditei virale și a altor boli precum psoriazisul sau cancerul de prostată (Li et al., 2014). GA cuplat cu acid gliciretinic și acid 18-beta-gliciretic a fost dezvoltat în China sau Japonia ca medicament antiinflamator, antiviral și antialergic pentru boli hepatice (Li et al., 2014).

GA îmbunătățește efectul terapeutic al altor molecule medicamentoase (Selyutina et al., 2019). Una dintre explicațiile diferitelor tipuri de activitate a GA, indiferent dacă este antivirală, antiinflamatorie, hepatoprotectoare sau anticanceroasă, este activitatea de modificare a membranei. Modificările permeabilității membranei, fluidității, formării porilor și modificărilor potențialului trans-membranar de către GA au fost semnalate în câteva studii recente (Selyutina et al., 2019).

Acidul glicirizic prezintă un grad ridicat de biocompatibilitate, fiind aprobat de SUA Food and Drug Administration (FDA) ca îndulcitor alimentar (Omar și colab., 2012); ca atare, este utilizat de asemenea și în industria alimentară ca îndulcitor natural și agent aromatizant (în băuturi, bomboane, produse de cofetărie etc.).

Biodisponibilitatea acidului glicirizic după administrarea orală este redusă (Li et al., 2014). După ingestia de lemn-dulce, acidul glicirizic este supus proceselor metabolice, fiind hidrolizat la acid gliciretic de către enzimele microflorei intestinale (Ploeger et al., 2001). Se pare că efectele farmacologice ale GA sunt în esență aceleași cu cele ale acidului gliciretinic rezultat (Li et al., 2014).

Referitor la valorificarea extractului de lemn dulce în domeniul nanotehnologiei, aceasta a debutat doar în urma cu câțiva ani. De exemplu, extractul etanolic din rădăcinile *Glycyrrhiza glabra* a fost încorporat în lipozomi și hialurozomi pentru a dezvolta formulări topice pentru protejarea pielii (Castangie et al., 2015). Au fost de asemenea publicate cercetări în care s-au dezvoltat diferite sisteme nanotransportor polimerice (pe baza de chitosan) pentru sporirea activității antiinflamatorii și creșterea solubilității în fluidele biologice (Seema et al., 2018).

În literatura patentelor există doar o invenție (**CN104367483A**) în care este abordată încapsularea ELD în sisteme lipidice nanotransportor. Invenția prezintă prepararea de NLC ce încapsulează extract de lemn dulce, utilizând omogenizarea la presiune ridicată (10MPa). Problema tehnică rezolvată prin invenție: metodă de obținere care asigură o bună stabilitate, etape simple de preparare și o bună repetabilitate. Nanotransportorul lipidic cu extract de lemn dulce este caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele componente (în procente de greutate): 1-5% extract de lemn dulce; 8-16% Emulgator; 15 ~ 25% material lipidic, iar restul este apă deionizată.

Utilizarea uleiurilor vegetale pentru productia de NLC a fost semnalata intr-un numar limitat de brevete, care includ si cercetari inovative ale prezentului grup de autori. De exemplu, in **RO130098, 29.11.2018** au fost dezvoltate sisteme NLC pe baza de ulei din tarate de orez si ulei din samburi de zmeura ce incapsuleaza filtre solare (UV-A si UV-B), cu dezvoltarea de formulari cosmetice cu proprietati antioxidante si fotoprotective. In **RO131547, 27.11.2020** si **RO128703, 30.05.2018**, au fost preparate sisteme lipidice nanotransportor cu proprietati antioxidante si antitumorale, unde matricea lipidica a fost formata din diferite tipuri de lipide solide in asociere cu uleiuri vegetale printre care uleiurile din samburi de struguri si uleiul de amarant. In patententul **US 2012/0128777A1** uleiul de canepa a fost folosit cu scopul obtinerii unor micro- si nanoparticule lipidice care sa conduca la acumularea la nivel dermic a particulelor solide. Alte sisteme de distributie de tip NLCs ce incapsuleaza vitamina C, vitamina A si preparate cu ulei de soia au fost brevetate in **US 2013/0017239 A1**. Compozitia unor nanocapsule lipidice pe baza de ulei de oregano, cu proprietati antibacteriene, antifungice si antiparazitice a fost descrisa in **US 2014/0045692A1**.

NLC-extracte sau ingrediente active de origine vegetala

Desi sunt bine cunoscute beneficiile ambelor entități naturale, uleiuri vegetale și extracte vegetale, există totusi un deficit major în literatura de specialitate cu privire la **asocierea ambelor categorii de principii vegetale, in sistemele lipidice nanotransportor**. Doar un numar restrans de cercetari au fost raportate pentru a înlocui total sau parțial nano-încapsularea medicamentelor sintetice cu fitochimicale, cu scopul de a imbunatati efectele terapeutice sau de a furniza proprietăți biologice suplimentare. Cateva exemple vor fi detaliate in cele ce urmeaza. De exemplu, problema tehnica rezolvată in **CN102871936A** constă în utilizarea combinată a emulsiei multiple (apa/ulei/apa) și a tehnologiei nanoparticulelor lipidice pentru a furniza un nanotransportor lipidic încărcat cu **extract de *Rhodiola rosea***. Pentru prepararea transportorilor nanolipidici s-au folosit procente de greutate ale componentelor de: 0.5-3% extract de *Rhodiola*; 20-30% solvent; 40-50% emulsifiant; 18-35% material lipidic. Uleiul vegetal folosit in nanoformulare a fost ulei de macadamia și ulei de migdale dulci, iar materialul lipidic solid, stearatul de gliceril și monoglicerida acidului lauric, individuale sau in amestec.

Având în vedere diferitele probleme existente în stadiul tehnicii de preparare, inventia **CN105342866A** furnizează o metodă de preparare a transportorilor lipidici nanostructurati cu continut de **extract de ceai verde**. Formularea contine: extract de ceai verde, lipide, emulgator, co-emulsifiant, stabilizator și apă deionizată, procentul de masă al fiecărui component fiind de: 1-10% Extract de ceai verde, 5-30% Lipide, 5-30% Emulsifiant, 1-10% Co-emulgator, 0,5-5% Stabilizator, apă deionizată (restul, pana la 100%). Un exemplu al inventiei cuprinde: transportor lipidic nanostructurat cu extract de ceai verde constând din 1% extract de ceai verde; 26% amestec de trigliceridă caprilica/caprică + monogliceridă acetilată + butil octanol salicilat + butandiol; 17% alcool lauric-23 + stearil eter -21 + hidroxistearat PEG-30 + polisorbit-80; 1% stearat-2-ol; 0,6% butilat hidroxitoluen + EDTA. Asa cum s-a mentionat anterior, in **CN104367483A** extractul de lemn dulce a fost incapsulat in sisteme lipidice nanotransportor, utilizand o metoda de omogenizare la presiune ridicata. Componenta NLC a fost de: 1-5% extract de lemn dulce; 8-16% Emulgator; 15-25% material lipidic, iar restul este apă deionizată.

In **KR20190024397A** inventatorii au dezvoltat **NLC-Curcumin**, capabili să îmbunătățească stabilitatea la căldură a Curcuminei, utilizand o metoda de emulsionare (la temperaturi de 85-95°C) cuplata cu ultrasonarea. Conform invenției, monooleatul de

sorbitan și polisorbitatul sunt folosiți ca emulgatori, iar uleiul de soia și tristearatul de gliceril sunt utilizați pentru formarea miezului lipidic. În varianta optimizată a prezentei invenții, emulgatorul este conținut într-o cantitate de 15 până la 80% în greutate, pe baza greutății totale a lipidei. Pe aceeași linie științifică este încadrată și cercetarea din **CN108309939A**. În acest caz **extractul de Schisandra** a constituit principiul bioactiv încapsulat în NLC, iar metoda de preparare a inclus o emulsionare în topitura (50-90°C), urmată de o ultrasonare (3-20 min). Poloxamer 188 a fost utilizat ca stabilizator iar amestecul de lipide a fost format din monostearat de gliceril și trigliceride cu lant mediu.

În completare la invențiile referitoare la sistemele nanotransportor ce încapsulează extractele vegetale, au fost investigate și patentate un număr în continuă creștere de cercetări în care diferite ingrediente active de origine naturală care se caracterizează prin solubilitate scăzută în apă, degradare chimică și enzimatică ușoară, biodisponibilitate scăzută etc. au fost încapsulate în sisteme de tip transportori lipidici nanostructurați, NLC. Exemple de cercetări brevetate asociate cu încapsularea ingredientelor naturale în sisteme lipidice nanotransportor includ: silibinin-NLC (**AU2015329609A1**), Naringenin-NLC (**CN111228220A**), Gambogenic-NLC (**CN105596323A**), Ferulic acid-NLC (**CN109602706A**), Psoralen-NLC (**CN104013600A**), Silibin-NLC (**CN101632638A**), Quercetin-NLC (**CN104172184A**).

În ceea ce privește **obținerea transportorilor lipidici nanotranstructurați**, aceștia pot fi preparați prin diferite metode, reprezentative fiind: metoda microemulsionării, ultrasonarea, omogenizarea cu grad înalt de forfecare (HSH), difuzia cu solvent și omogenizarea la presiune ridicată (HPH), ultima fiind cea mai utilizată metoda pentru producerea sistemelor NLC. În **CN101658493A** este descrisă prepararea de NLC ce încapsulează Azitromicin, utilizând metoda omogenizării la presiune ridicată, la o temperatură cuprinsă între 60-80°C, 3-5 cicluri de omogenizare și o presiune de 600-800 bar. Componentele NLC în formula optimizată (pe baza procentelor lor în greutate), sunt: azitromicină 0,5%; emulgator 30%; material lipidic 5% iar restul este apă. Emulgatorul este un amestec de stearat de polioxialchil și poloxamer. De preferință, materialul lipidic este selectat dintre următorii compuși: monostearat de gliceril, ulei de ricin, ulei de măsline și triacetat de glicerol. Tot o metoda de omogenizare la presiune a fost patentată și în **CN107349116A** care se referă la încapsularea de ecrane solare UV-A și UV-B în NLC, însă prin aplicarea unei presiuni mai ridicate (600-1200 bar) și a unui număr mai mare de cicluri de omogenizare (5-12 cicluri), la o temperatură de 80°C. Procesul de obținere a inclus și o etapă de omogenizare cu grad înalt de forfecare (1 min. la 8000 rpm). Emulsifiantii utilizați: cel puțin unul dintre emulgatorii A165, Tween 80, Tween 20, lecitină din soia și poloxamer 188. Lipidele solide din compoziția NLC au inclus: palmitat de cetil, ceara de albine, stearate de gliceril și ceara carnauba, iar lipidul lichid a fost reprezentat de un amestec de trigliceride cu lant mediu. O combinație a omogenizării cu grad înalt de forfecare (HSH) și a omogenizării la presiune ridicată (HPH) a fost prezentată în **CN111249185A** pentru încapsularea lidebenonei în transportori nanolipidici. Pentru etapa HSH, viteza de pre-emulsificare a fost de 5000-15000 rpm, iar timpul de preemulsificare este de 3-10 min. Parametri etapei HPH au fost de 300-800 bari, iar numărul de cicluri de 4-8 ori. În ceea ce privește formularea NLC furnizată de invenție, aceasta include: 1 până la 5% din lidebenon; 10-30% ulei de soia hawaiană, 5-15% ceară de palmier, 1-1,5% Tween 80, Poloxamer 188 și lecitină. Procedura de omogenizare la presiune ridicată a fost folosită de asemenea 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 si in **WO 2011116963 A2** pentru sinteza de NLC cu ingrediente active alimentare, cosmetice si farmaceutice.

Invenția **WO2018002853A1** descrie activitatea bactericidă specifică a NLC-urilor fără niciun ingredient activ (NLC liber), obținut din palmitostearat de gliceril (lipidă solid), trigliceridă caprilică/caprică (lipidă lichid) și polisorbitat 60 (agent tensioactiv). NLC-urile au fost produse utilizând tehnica de omogenizare la cald și ultrasonicare, parametri fiind: 12000 rpm, 20s și sonicare, timp de 5 min. 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. Tot metoda microemulsionării este abordată în **EP 2037889 B1** pentru sinteza de NLCs din amestec de gliceroli și acid behenic, utilizând drept surfactanți fosfatidilcolina și taurocolat de sodiu.

Ca o sumarizare a informației prezente în literatura patentelor, se poate afirma că aceasta este foarte vastă, fiind detaliate diferite metode pentru obținerea sistemelor NLC încărcate cu diferite ingrediente active, sintetice sau de proveniență naturală, însă acestea nu includ cercetări prin care să se demonstreze adaptabilitatea nanotransportorilor lipidici pentru co-încapsularea extractelor vegetale de polarități diferite, lipofile și hidrofile. În anumite studii aceste metode prezintă o **serie de dezavantaje** care le poate limita aplicabilitatea la scară largă: necesită un consum mare de surfactanți și emulgatori (de exemplu, în patentele în care se utilizează metoda omogenizării la presiune ridicată/HPH, procentele de emulgatori sunt foarte mari: 8-16% amestec de emulgatori în **CN 104367483A**, 30% emulgator în **CN101658493A**, sau se utilizează un număr mare de cicluri de omogenizare, la presiuni mai ridicate – 5-12 cicluri, la 600-1200 bar în **CN107349116A** sau 4-8 cicluri, la 800 bar în **CN 111249185A**, ceea ce poate conduce la distrugerea proprietăților biologice, dar și la un consum mare de energie). Tehnica ultrasonării prezintă și ea câteva limitări/deficiențe care sunt asociate cu timpul prelungit de ultrasonare (de exemplu 3-20 min. în **CN108309939A**, 5 min. în **WO2018002853A1**), existând chiar riscul impurificării cu metal provenit din sonda. Deși **tehnica microemulsionării** permite obținerea unor nanoparticule lipidice de ordinul zecilor de nm, **prezintă dezavantajul** utilizării unor concentrații mari de surfactanți (în general >15%) 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 și a procentelor ridicate de emulsifianți (ex: în **CN102871936A** metoda implică un necesar de 40-50% emulsifianți și 20-30% solvent; în **CN105342866A** formularea de NLC optimizată conține 5-30% emulsifiant), ceea ce limitează utilizarea acestora în industriile asociate sănătății. 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.

Inventia propusa acopera ambele metodologii, **procedurale si aplicative**, respectiv:

- I. Procedeu de obtinere a unor **sisteme lipidice nanotransportor** capabile sa fie *gazde ideale* pentru doua categorii de principii vegetale care cuprind clase de compusi bioactivi din sfere diferite din punct de vedere chimic/structural (ex: saponina steroida si glicozid triterpenic), si sa *asigure repartizari preferentiale* in matricea sistemului nanotransportor (functie de afinitatea fata de miezul lipidic sau invelisul de surfactanti);
- II. **Strategie cu un potential terapeutic promițător** prin realizarea unei combinații sinergice a mai multor principii bioactive de origine naturala, atat din punct de vedere al inlocuirii dozelor ridicate de medicamente conventionale (de sinteza) cu substante bio-actieve din surse vegetale, cat și pentru dezvoltarea unor formulari orale avansate pentru imbunatatirea starii de sanatate a populatiei feminine aflate in perioada menopauzala.

In literatura patentelor, singura cercetare care abordeaza **incarcarea simultana a doua principii active naturale** (Epigallocatechin-3-gallate si Piperin) este prezentata in inventia **KR20170041407A**. Invenția se refera la prepararea NLC utilizand monostearat de glicerol, acid oleic, lecitina si Tween 80. Pentru preparare s-a folosit o omogenizare primară, la 2800 până la 3200 rpm timp de 3-10 min., urmata de ultrasonare (până la 7 min., în condiții de timp de lucru de la 3-5s si timp de odihna de 1-3 s) si o omogenizarea secundară (la o presiune de 550-650 MPa).

Referitor la abilitatea sistemelor nanostructurate lipidice de a incapsula si **substante de natura hidrofila**, in ciuda afinitatii lor pentru compusi lipofili, aceasta a fost semnalata in literatura patentelor intr-o singura inventie, **US2020222507A1**, in care este prezentata incapsularea cu success a unei proteine de natura hidrofila, respective Exenatida (un derivat al Insulinei) in sisteme de tip NLC. Cooptarea simultana a **doua principii active (hidrofile si lipofile)**, unul de origine vegetala si unul de provenienta sintetica a fost pentru prima data brevetata in patentele **RO131547/27.11.2020** (co-incapsularea unui medicament antitumoral/sintetic – Pemetrexed de sodiu impreuna cu un antioxidant natural – Hesperidin in sisteme NLC preparate cu squalene si ulei de amaranth) si **RO 131955/30.05.2019**; in ultima inventie un amestec de principii active vegetale (extract de galbenele, cu continut ridicat de carotenoizi) este captat impreuna cu un medicament sintetic – acid azelaic in sisteme lipidice nanotransportor preparate cu ulei de maces si ulei de negrilica.

Ca atare, **prezenta inventie are in vedere utilizarea unei metode combinate de omogenizare cu grad inalt de forfecare (HSH) si la presiune ridicata (HPH) pentru dezvoltarea unor sisteme lipidice nanotransportor** ce contin cantitati semnificative de ingrediente naturale provenite din uleiuri si extracte vegetale, ce prezinta avantajul de a fi o gazda eficienta pentru ambele categorii de principii active – atat lipofile (Diosgenina din extractul de yam salbatic) cat si hidrofile (extractul de lemn dulce). Nanotransportorii lipidici dezvoltati prezinta o buna biocompatibilitate, activitate antioxidanta semnificativa si un efect anti-inflamator amplificat, ceea ce le confera acestora un potential aplicativ ridicat in tratamentul afectiunilor inflamatorii.

II. Prezenta inventie rezolva problemele tehnice mentionate anterior, prin obtinerea unor sisteme de nanotransportori lipidici pe baza de ulei de luminita noptii si ulei de soia, ce prezinta principalul avantaj al co-incapsularii a doua tipuri de principii active de origine

vegetala – *Extract de yam salbatic (EYS, Dioscorea villosa)*, standardizat intr-o saponina sterioda lipofila (95% *Diosgenina*) si *extract de lemn dulce (ELD, Glycyrrhiza glabra L)*, standardizat intr-un glicozid triterpenic hidrofil (10% *Acid glicirizic*). Procedeu de obținere a sistemelor nanotransportor, conform invenției cuprinde:

- a) formarea unei **faze lipidice** fara continut de extract vegetal (EYS), la o temperatură de 73 ... 75°C, ce conține un amestec de lipide solide și lichide, respectiv monostearat de gliceril : palmitat de cetil : ulei vegetal (ulei de soia sau ulei de luminita noptii), într-un raport de greutate de 1 : 1 : 0.85, respectiv formarea unei **faze lipidice** cu continut de extract vegetal/EYS, ce asigura o concentratie de 3.8% EYS in formularile solide de NLC-individuale (incarcate cu principiul bio-activ vegetal lipofil – EYS), respectiv intre 3.3% ... 3.7% EYS, in sistemele de NLC-duale (ce contin EYS si ELD), dupa etapa de liofilizare;
- b) formarea unei **faze apoase** fara continut de extract vegetal (ELD), la o temperatură de 73 ... 75°C, ce conține un amestec de surfactanți de tip Tween 20 : Fosfatidilcolina : Poloxamer 188 într-un raport de greutate de 1 : 0.21 : 0.21, respectiv formarea unei faze apoase cu continut de extract vegetal hidrofil/ELD, ce asigura o concentratie de 10.7 ... 13.8% ELD in formularile de NLC-individuale (incarcate cu principiul vegetal hidrofil – ELD), respectiv intre 3.7 ... 13.2% ELD, in sistemele de NLC-duale (ce contin EYS si ELD), dupa etapa de liofilizare;
- c) formarea unei **pre-emulsii lipidice** prin contactarea sub agitare energica a celor doua faze, apoasă și lipidică, și menținere la un regim de temperatură de 73 ... 75°C timp de 20 min;
- d) obtinerea unor dispersii apoase de sisteme nanotransportor ce contin principii active individuale (EYS sau ELD) respectiv ce co-incapsuleaza principii bio-active duale (NLC-EYS-ELD), prin supunerea pre-emulsiei lipidice initial la un proces de omogenizare cu grad înalt de forfecare (la 12000 rpm, timp de 1 min), urmat de un proces de omogenizare la presiune ridicata (la 500 bar, timp de 196 sec) si ulterior răcire ușoară la temperatura camerei, sub agitare magnetica;
- e) obținerea de formulari solide de **nanotransportori lipidici incarcati cu un singur extract vegetal (EYS sau ELD), respectiv NLC-duale, ce co-incapsuleaza EYS si ELD**, dupa o etapa de liofilizare a dispersiilor apoase de nanotransportori lipidici la -55°C timp de 60 h.

Formularile solide de NLC incarcate cu un singur extract vegetal (EYS sau ELD), respectiv de NLC-duale (ce co-incapsuleaza EYS si ELD), contin:

- a. 3.8% EYS in formularile solide de NLC-individuale (NLC-EYS) respectiv inte 3.3 ... 3.7% EYS in sistemele de NLC-duale (NLC-EYS-ELD);
- b. 10.7 ... 13.8% ELD in formularile solide de NLC-individuale (NLC-ELD) respectiv inte 3.7 ... 13.2% ELD in formularile de NLC-duale (NLC-EYS-ELD).

III. Invenția prezintă următoarele avantaje:

- 1) Procedeu descris in prezenta propunere de brevet constituie o metoda eficienta si reproductibila pentru obținerea unor sisteme nanotransportor ce prezinta abilitatea de a fi gazda ideala pentru doua extracte vegetale bio-active, cu polaritati diferite, lipofile si hidrofile.
- 2) Nanotransportorii lipidici preparati cu ULN si US prezinta particularitati structurale unice, favorabile pentru cooptarea eficienta atat a principiului vegetal lipofil (EYS, standardizat

la 95% Diosgenin) cat si a amestecului vegetal hidrofil (ELD, standardizat la 10% acid glicirizic), atat in miezul lipidic hidrofob cat si in invelisul exterior format de surfactanti.

- 3) Utilizarea celor doua uleiuri vegetale (ULN si US) in procedeul de obtinere a NLC poate asigura un rol dublu:
 - a. participă la formarea unor miezuri lipidice in care sunt prezente diferite nanocompartimente folosite drept "gazde ideale" pentru captarea unor concentrații semnificative de principiu vegetal bioactiv, de natură hidrofobă (ex: DSG din EYS);
 - b. vine cu proprietăți biologice specifice (ex: antioxidante si antiinflamatoare), prin virtutea compozitiei lor bogate in acizi grasi polinesaturati, ceea ce imprima un important potențial terapeutic de natura să îmbunătățească sănătatea populatiei feminine aflate in perioada menopauzala.
- 4) Procedeul de obtinere se desfășoară în mediu apos, nu utilizează condiții de proces care să conducă la denaturarea celor doua principii bio-active vegetale (EYS si ELD), astfel integritatea structurală a EYS si ELD nu este afectata si implicit efectele biologice ale celor doua principii bioactive se mentin la valori optime, chiar amplificate, dupa procedeul de incapsulare in NLC.
- 5) Procedeul de obtinere se bazeaza pe folosirea unor materii prime biocompatibile, concentrații minime de surfactanti și nu implica utilizarea unor substanțe agresive (ex: solvenți organici sau surfactanți ce pot manifesta un potential efect toxic asupra organismului).
- 6) Procedeul propus este simplu și eficient, implică etape preparative distincte și ușor de reprodus, ce pot fi asigurate și la o transpunere de la scara de laborator, la scară pilot.
- 7) Metoda de omogenizare la presiune ridicata propusa in prezenta cerere de brevet poate fi extinsa pentru obținerea unor sisteme nanotransportor lipidice ce pot deasemenea sa fie adaptate pentru co-incapsularea unei game largi de principii bioactive de origine vegetala, atat de natura lipofila cat si hidrofila.
- 8) Prin procedeul propus se obtin nanotransportori lipidici cu continut variabil de principii active de origine vegetala care prezinta proprietati antioxidante si anti-inflamatoare amplificate (demonstrate prin metode specifice de testare *in vitro*), ce pot fi conditionate/formulate ulterior sub formă de capsule gelatinoase pentru dezvoltarea de suplimente alimentare ce manifesta multiple beneficii asupra sanatatii.

IV. Procedeul conform invenției constă în aceea că se formează inițial o pre-emulsie lipidică prin contactarea sub agitare magnetică a două faze, o **faza lipidică** ce conține 10% amestec de lipide solide (MSG, PC) si uleiuri vegetale (ULN, US), cu sau fara extract vegetal lipofil (EYS) și o **fază apoasă** ce contine 2,5% amestec de surfactanți cu/fara extract vegetal hidrofil (ELD), la o temperatură de 73 ... 75°C; **pre-emulsia lipidica** obtinuta este menținută la o temperatură de 73 ... 75°C, timp de 20 min, este supusă unei etape de omogenizare cu grad înalt de forfecare la 12000 rpm, timp de 1 min, 70 ... 72 °C, ulterior unei etape de omogenizare la presiune ridicata la 500 bar, timp de 196 sec, dupa care este lăsată să se racească la temperatura camerei, sub agitare magnetica, etapa care conduce la solidicarea nanotransportorilor lipidici dispersati in apa, iar prin liofilizare la -55°C timp de 60h, se obtin formularile solide de NLC-libere si incarcate cu principii active individuale (EYS sau ELD) sau principii active duale, lipofile si hidrofile (EYS si ELD).

Sumarizand, prin aceasta inventie au fost obtinuti:

- a. **NLC liberi** (NLC-ULN/US), fără conținut de extracte vegetale, obținuți prin contactarea celor două faze apoase și lipidice, și supunerea acestora unor procese de omogenizare conform procedurii descrise.
- b. **NLC încarcați cu unul sau mai multe principii active vegetale** (NLC-EYS, NLC-ELD, NLC-EYS-ELD), capabili să încapsuleze și să distribuie, atât extracte vegetale lipofile (EYD) cât și extracte vegetale hidrofili (ELD), respectiv ambele categorii de extracte, lipofile și hidrofili (EYS și ELD), obținuți printr-un procedeu similar cu cel aplicat pentru NLC-liberi.

Etapele de obținere a NLC încarcați cu EYS/ELD, respectiv amestec de EYS și ELD constau din:

- formarea unei *faze lipidice* ce conține amestec de monostearat de gliceril : palmitat de cetil : ulei de lumină noaptea sau ulei de soia, într-un raport de greutate de 1 : 1 : 0.85;
- adăugarea în *faza lipidică* a unor cantități variabile de extract de natură lipofilă (EYS) ce asigură un conținut de 3.8% EYS în formulările solide de NLC-individuale (NLC-EYS), respectiv de 3.3 ... 3.7% EYS în sistemele de NLC-duale (NLC-EYS-ELD);
- formarea unei *faze apoase* ce conține un amestec de surfactanți de tip Tween 20 : Fosfatidilcolina : Poloxamer 188 într-un raport de greutate de 1 : 0.21 : 0.21;
- adăugarea în *faza apoasă* a unor cantități diferite de extract vegetal de natură hidrofilă (ELD), care conduce în final la un conținut de 10.7 ... 13.8% ELD în formulările solide de NLC-individuale (NLC-ELD), respectiv între 3.7 ... 13.2% ELD în sistemele de NLC-duale (NLC-EYS-ELD).

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

Tabel 1. Compoziția formulărilor nanotransportor libere, a NLC încărcate cu extract de yam sălbatic (EYD) sau extract de lemn dulce (ELD) și a NLC ce co-încapsulează ambele tipuri de principii active vegetale (EYD și ELD)

Figura 1. Principii vegetale bio-actives din extractele vegetale: **a.** Diosgenin din extractul de yam sălbatic/*Discorea villosa*; **b.** Acid glicirizic din extractul de lemn dulce/*Glycyrrhiza glabra*

Figura 2. Variația dimensiunii și a indicelui de polidispersitate (Pdl) în funcție de concentrația și tipul de principiu vegetal încapsulat (extract de yam sălbatic/EYS și extract de lemn dulce/ELD)

Figura 3. Imaginile TEM ale: **a.** NLC-ULN-EYS-ELD și **b.** NLC-ULN-EYS-ELD

Figura 4. Variația potențialului zeta în funcție de concentrația de principiu activ încapsulat (EYD și ELD) și de tipul de ulei vegetal utilizat la prepararea NLC

Figura 5. Curbele DSC ale nanotransportorilor lipidici ce încapsulează diferitele principii active (EYS, ELD și EYS + ELD), preparați cu **US**, comparativ cu NLC fără principiu activ/NLC-US

Figura 6. Curbele DSC ale nanotransportorilor lipidici ce încapsulează diferitele principii active (EYS, ELD și EYS + ELD), preparați cu **ULN**, comparativ cu NLC fără principiu activ/NLC-ULN

Figura 7. Valorile eficienței de încapsulare (EE) ale DSG (din extractul de yam sălbatic, EYS) și ale acidului glicirizic (din extractul de lemn dulce, ELD) încapsulate în NLC-ULN/US

Figura 8. Variația capacității de inhibiție a radicalului ABTS^{•+} de către sistemele NLC încărcate cu un singur principiu activ vegetal (EYS sau ELD) *versus* NLC care co-incapsulează două principii bioactive vegetale (EYS și ELD)

Figura 9. Determinarea *in vitro* a activității antioxidante a NLC liberi și încărcati cu concentrații variabile de extract de lemn dulce și extract de yam salbatic, comparativ cu extractele native și uleiurile vegetale

Figura 10. Profilul de eliberare a DSG (din extractul de yam salbatic) și a acidului glicirizic (din extractul de lemn dulce), în cazul sistemelor nanotransportor individuale, de tip NLC-EYS și NLC-ELD

Figura 11. Profilul de eliberare a DSG (din extractul de yam salbatic) și a acidului glicirizic (din extractul de lemn dulce), în cazul sistemului nanotransportor dual preparat cu ULN (NLC-ULN-EYS-ELD)

Figura 12. Profilul de eliberare a DSG (din extractul de yam salbatic) și a acidului glicirizic (din extractul de lemn dulce), în cazul sistemului nanotransportor dual preparat cu US (NLC-US-EYS-ELD)

Figura 13. Efectul sistemelor *NLC-individuale* și *duale*, NLC-US/ULN-EYS, NLC-EYS-ELD, asupra viabilității celulelor normale HUVEC timp de 24h (A) și respectiv 48h (B)

Figura 14. Acțiunea citotoxică vs. proliferativă indusă de sistemele NLC-ULN/US libere și încărcate, NLC-ULN/US-EYS, NLC-ULN/US-EYS-ELD asupra celulelor normale HUVEC

Figura 15. Evaluarea prin tehnica ELISA a efectului tratamentelor cu sisteme nanotransportor de tip NLC-EYS și NLC-EYS-ELD asupra eliberării citokinelor TNF- α și IL-6, de către celulele normale HUVEC

Exemplul 1. Obținerea de sisteme nanotransportor cu două categorii de uleiuri vegetale, ulei de lumină nocturnă și ulei de soia (NLC-ULN și NLC-US)

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 soia sau ulei de lumină) într-un raport de greutate de 1 : 1 : 0.85. 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 1 : 0.21 : 0.21. Formarea unei pre-emulsii lipidice, prin contactarea celor două faze lipidice și apoase, la o temperatură de 73 ... 75°C, 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 12000 rpm timp de 1 minut, la o temperatură de 70 ... 72 °C și ulterior unei etape de omogenizare la presiune ridicată la 500 bar, timp de 196 sec, la o temperatură de 70 ... 72 °C. Nanodispersia caldă rezultată este lăsată să se răcească la temperatura camerei, timp de 15 ... 20 min., în vederea solidificării nanotransportorilor lipidici în masa apoasă. Ulterior dispersia apoasă de nanotransportori lipidici este congelată la -20°C timp de 24h și supusă unui proces de liofilizare la -55°C timp de 60h, cu obținerea formulărilor solide de NLC-liberi (NLC-ULN, respectiv NLC-US).

Exemplul 2. Obținerea unor sisteme nanotransportor ce încapsulează un extract vegetal de natură lipofilă (NLC-EYS)

Similar exemplului 1, cu deosebirea că se adaugă în *topitura lipidică* o cantitate de extract vegetal bioactiv ce asigură o concentrație de 0.5% extract de yam salbatic (EYS) în formularea de dispersie apoasă (raportat la 100g dispersie apoasă), preparate cu ULN/US. Topitura lipidică obținută se menține la 73 ... 75°C timp de 5 min. pentru a se asigura o incorporare uniformă a EYS. Etapele ulterioare corespund celor descrise în cadrul

exemplului 1, cu obținerea în final a unor sisteme solide de NLC pe baza de ulei de lămină noaptea sau ulei de soia ce încapsulează 3.8% EYS.

Exemplul 3. Obținerea de sisteme nanotransportor ce încapsulează un extract vegetal de natură hidrofila (NLC-ELD)

Similar exemplului 2, cu deosebirea că în *faza apoasă* se introduce o cantitate variabilă de principii vegetale bioactive ce asigură o concentrație de 0.5 ... 2% extract de lemn dulce (ELD) în cele 100g dispersie apoasă de NLC. Etapele ulterioare corespund celor descrise anterior, cu obținerea formulărilor solide de NLC-ELD (după liofilizare) ce poate încapsula și distribui cantități variabile de ELD, cuprinse între 10.7 ... 13.8% ELD.

Exemplul 4. Obținerea unor sisteme nanotransportor duale, ce co-încapsulează două tipuri de extract vegetale, lipofile și hidrofile (NLC-EYS-ELD)

Similar exemplului 3, cu deosebirea că în *topitura lipidică* se introduce o cantitate de extract vegetal lipofil ce asigură o concentrație de 0.5% EYS în formulările de dispersie apoasă, preparate cu ulei de lămină noaptea sau cu ulei de soia, iar în *faza apoasă* se introduce o cantitate de extract vegetal hidrofил ce asigură o concentrație de 0.5 ... 2% ELD în formulările apoase de NLC. Etapele ulterioare corespund celor descrise anterior, cu obținerea în final a unor nanotransportori lipidici duali, ce co-încapsulează cantități variabile de principii bioactive vegetale (EYS și ELD), cuprinse între 3.3 ... 3.7% EYS și între 3.7 ... 13.2% ELD în formulările solide de NLC-EYS-ELD (după liofilizare)

1. Determinarea dimensiunii sistemelor nanotransportor individuale (NLC-ELD/EYS) și duale (NLC-ELD-EYS). Evaluarea diametrelor medii și a polidispersității prin tehnică DLS și caracterizare morfologică (analiză TEM)

O primă etapă preliminară în caracterizarea sistemelor nanotransportor preparate conform procedurii detaliate anterior a fost reprezentată de determinarea comparativă a diametrelor medii a tuturor sistemelor NLC, care prezintă un singur extract vegetal încorporat, *NLC-individuale* (NLC-EYS, NLC-ELD) și a celor care co-încapsulează ambele principii vegetale, hidrofile și lipofile, *NLC-duale* (NLC-EYS-ELD). Codul sistemelor NLC preparate cu cele două uleiuri vegetale – ULN/US în amestec cu lipidele solide selectate – MSG și PC precum și compoziția fiecărei formulări de NLC dezvoltate în prezenta cercetare, sunt redate în Tabelul 1.

Tabel 1. Compoziția formulărilor nanotransportor libere, a NLC încărcate cu extract de yam sălbatic (EYS) sau extract de lemn dulce (ELD) și a NLC ce co-încapsulează ambele tipuri de principii active vegetale (EYS și ELD)

gh

Nr. crt.	Cod sistem lipidic nanotransportor	Lipide solide si uleiuri vegetale (g)				EYS (g)	ELD (g)
		MSG	PC	ULN	US		
1	NLC-ULN	3.5	3.5	3.0	-	-	-
2	NLC-ULN-0.5% EYS	3.5	3.5	3.0	-	0.5	-
3	NLC-ULN-1.5% ELD	3.5	3.5	3.0	-	-	1.5
4	NLC-ULN-0.5% EYS-0.5% ELD	3.5	3.5	3.0	-	0.5	0.5
5	NLC-ULN-0.5 % EYS-1% ELD	3.5	3.5	3.0	-	0.5	1
6	NLC-ULN-0.5% EYS-1.5% ELD	3.5	3.5	3.0	-	0.5	1.5
7	NLC-ULN-0.5% EYS-2% ELD	3.5	3.5	3.0	-	0.5	2
8	NLC-US	3.5	3.5	-	3.0	-	-
9	NLC-US-0.5% EYS	3.5	3.5	-	3.0	0.5	-
10	NLC-US-1.5% ELD	3.5	3.5	-	3.0	-	1.5
11	NLC-US-0.5% EYS-0.5% ELD	3.5	3.5	-	3.0	0.5	0.5
12	NLC-US-0.5% EYS-1% ELD	3.5	3.5	-	3.0	0.5	1
13	NLC-US-0.5% EYS-1.5% ELD	3.5	3.5	-	3.0	0.5	1.5
14	NLC-US-0.5% EYS-2% ELD	3.5	3.5	-	3.0	0.5	2

Conform analizei dimensionale, bazate pe aplicarea metodei de împrăștiere dinamică a luminii (DLS), nanotransportorii lipidici obtinuti au prezentat dimensiuni < 200 nm, cu o distribuție relativ îngustă a populației particulelor lipidice și indici de polidispersitate cuprinși între 0.17 și 0.37 (Fig. 2). NLC-urile sintetizate cu ULN au prezentat o medie a diametrelor de 136.7 ± 1.8 nm, iar prin co-încapsularea celor două principii active, dimensiunea a variat într-un domeniu destul de larg, între 120 și 190 nm (Fig. 4). Rezultate interesante s-au semnalat la creșterea cantității de extract de lemn dulce încapsulat: creșterea conținutului de ELD de la 0.5% la 2% a condus la obținerea unor nanotransportori cu diametre medii semnificativ mai mici (ex: pentru NLC-ULN-0.5% EYS-0.5% ELD, $Z_{ave} = 188.4 \pm 0.764$ versus 122 ± 0.7905 nm, pentru NLC-ULN-0.5% EYS-2% ELD). Acest aspect poate fi corelat cu rolul de surfactant al acidului glicirizic și al celorlate componente din extractul de lemn dulce, care completează proprietățile superficiale ale Tween 20 și ale fosfatidilcolinei. În completare, obținerea unor indici de polidispersitate < 0.2 (ex: $PDI = 0.183 \pm 0.008$ pentru NLC-0.5% EYS-1.5% ELD preparat cu ULN și respectiv 0.225 ± 0.029 , pentru același sistem, însă preparat cu US) întăresc observația obținerii unor sisteme relativ monodisperse, cu o distribuție îngustă de dimensiune.

O analiză comparativă a celor două categorii de NLC preparate cu US respectiv ULN, arată diferențe nesemnificative între acestea, ambele uleiuri vegetale fiind pretabile pentru obținerea unor nanotransportori care să prezinte caracteristici optime de co-încapsulare a amestecurilor vegetale selectate în cercetare.

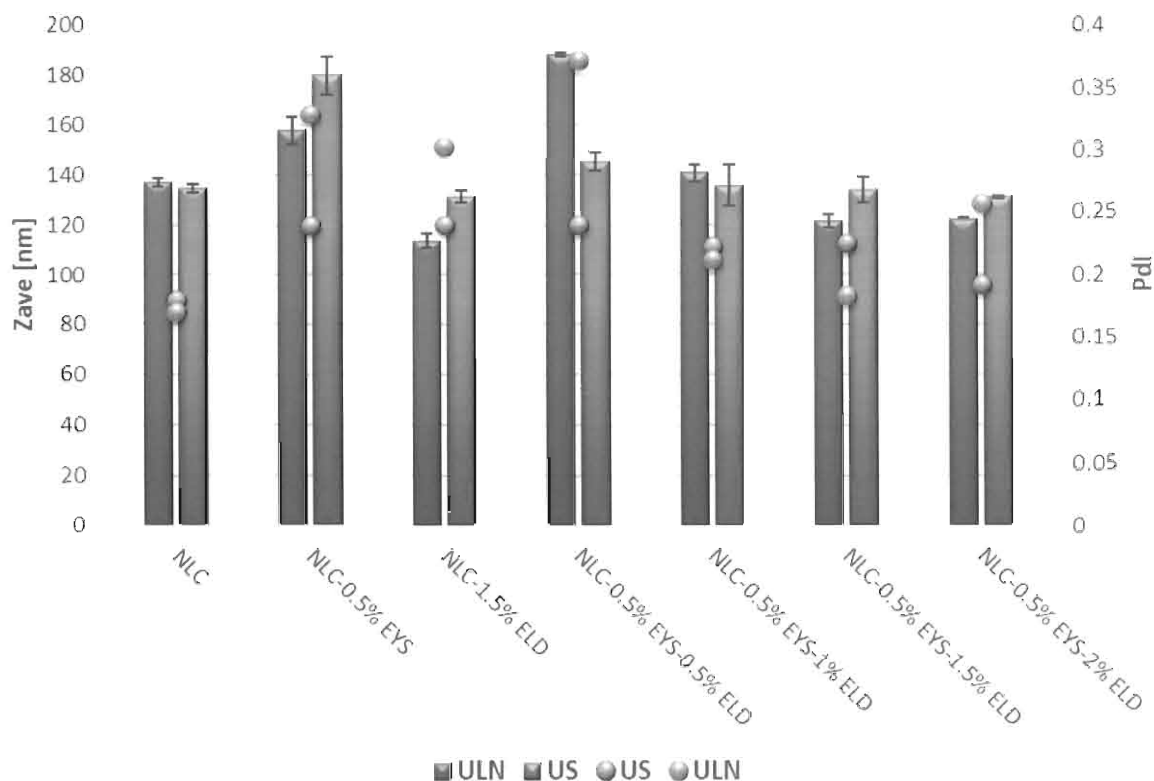
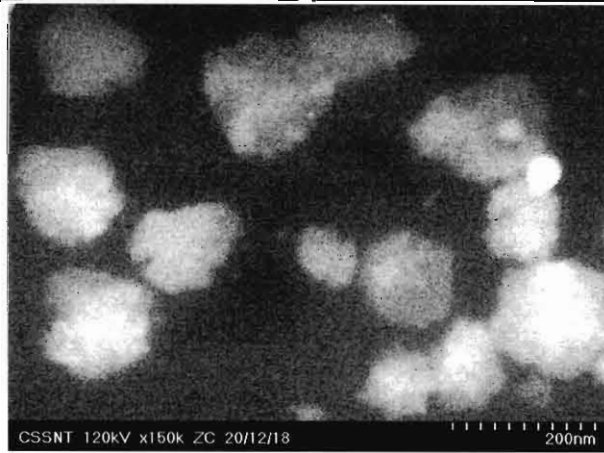


Fig. 2. Variația dimensiunii și a indicelui de polidispersitate (Pdl) în funcție de concentrația și tipul de principiu vegetal încapsulat (extract de yam salbatic/EYS și extract de lemn dulce/ELD)

În completarea analizei DLS, confirmări ulterioare ale diametrelor nanosferelor lipidice încărcate cu EYS și ELD, precum și aspecte legate de morfologia și structura acestora, au fost oferite de microscopia electronică de transmisie (TEM). Prin vizualizarea sistemelor NLC în micrografiile cu contrast de fază ZC (Fig. 3), s-au observat diferite aspecte morfologice, funcție de tipul de ulei vegetal folosit la prepararea nanotransportorilor lipidici. De exemplu, dacă în cazul nanotransportorilor preparați cu US/NLC-US-EYS-ELD s-a observat prezența unor nanoparticule sferice cu diametre care variază de la 50 până la 180 nm (Fig. 3a) și nu au fost decelate alte forme structurale interne, în cazul NLC-ULN ce co-încapsulează EYS și ELD au putut fi ușor observate incluziuni nanosferice de dimensiuni foarte mici, < 5 nm (Fig. 3b). Aceste incluziuni de tipul nanoparticuli uniform dispersate în miezul lipidic, vizualizate cu ajutorul micrografiei cu contrast de fază ZC, pot fi atribuite existenței principiilor active vegetale captate în diferitele nanocompartimente create de uleiul vegetal – US/ULN sau în imperfecțiunile generate de lanțurile hidrocarbonate ale acizilor grași din amestecul lipidic solid.

92

a. Imagini TEM ale NLC-US-EYS-ELD



b. Imagini TEM a NLC-ULN-EYS-ELD

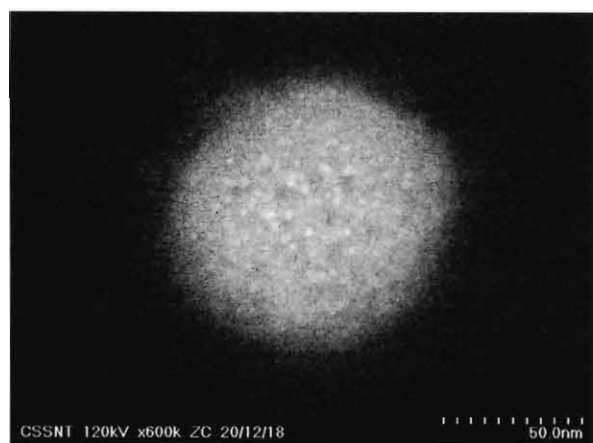




Fig. 3. Imaginile TEM ale: a. NLC-ULN-EYS-ELD si b. NLC-ULN-EYS-ELD

2. Atribuirea stabilitatii fizice a NLC liberi si a celor incarcati cu principii active vegetale

Evaluarea stabilității fizice a NLC s-a determinat prin măsurarea potențialului electrocinetic, pe baza mobilitatii electroforetice. Determinarea potentialului electrocinetic a scos în evidență obtinerea unor sisteme NLC ce prezinta o buna stabilitate fizica, cu valori cuprinse între -39 mV și -56 mV pentru NLC preparate cu ulei de luminita noptii si de -35mV și -48 mV pentru NLC preparate cu ulei de soia (Fig. 4). Valorile puternic electronegative ale potențialului electrocinetic demonstreaza existența unor fenomene de repulsie între particulele lipidice aflate în suspensie apoasă, favorabile pentru prevenirea agregării nanotransportorilor lipidici ce co-incapsulează cele două principii active vegetale – EYS si ELD.

Observatia de interes care se desprinde in urma evaluarii valorilor potentialului zeta se refera la stabilitate mai buna/superioara a nanotransportorilor preparati cu ULN, comparativ cu cei preparati cu US (Fig. 4). Deasemenea, este notabila si modificarea semnificativa a valorilor potentialului electrocinetic, care are loc pe masura ce concentratia de ELD creste: $\xi = -46 \pm 0.586$ mV (pentru 0.5% ELD in NLC preparat cu ULN) *versus* -39 ± 3.18 mV (pentru 1.5% ELD in NLC preparat cu ULN). Aceeasi tendinta a fost determinata si in cazul NLC-US (ex: -48.7 ± 1.14 mV *versus* -35 ± 2.3 mV). Aceste rezultate conduc la concluzia ca stabilitatea fizica a NLC preparate este influentata de % de extract hidrofili incapsulat, care cel mai probabil ramane la exteriorul miezului lipidic/in invelisul de surfactanti si participa activ la modificarea si redistribuirea sarcinilor de suprafata.

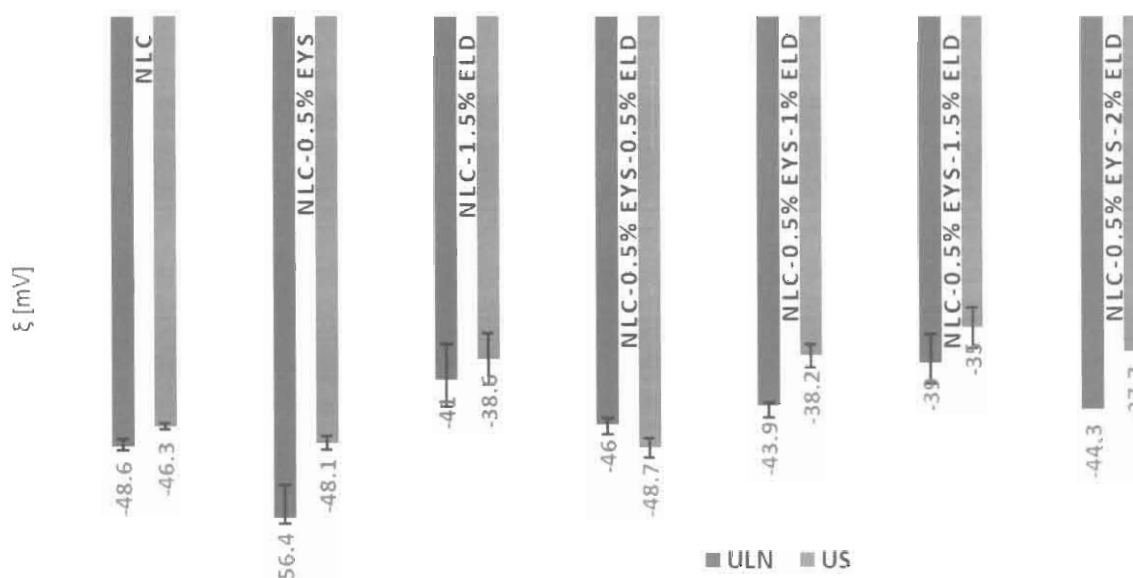


Fig. 4. Variația potențialului zeta în funcție de concentrația de principiu activ încapsulat (EYS și ELD) și de tipul de ulei vegetal utilizat la prepararea NLC

3. Evaluarea modificărilor structurale a transportorilor lipidici, după încapsularea și co-încapsularea de principii active vegetale

Dezvoltarea formulărilor de tip nanotransportori lipidici vizează în primul rând obținerea unor variații relativ mici în dimensiunea particulelor și a valorilor potențialului electrocinetic, dar și o stare cristalină sau amorfă a miezului lipidic adecvată pentru eliberarea controlată/sustenută a celor două principii active (DSG și acid glicerizic) prezente în concentrații variabile în cele 2 extracte vegetale – EYS și ELD, cooptate împreună în același sistem lipidic nanotransportor. Prin urmare, este esențial să se demonstreze starea solidă a NLC preparate și să se compare cu amestecul de lipide pure utilizate pentru construirea matricei interne a nanotransportorului.

Studiul comparativ DSC al NLC-urilor încărcate cu diferitele principii active selectate în cercetare s-a efectuat în paralel cu sistemele nanotransportor libere (fără principiu activ încapsulat, NLC-US/ULN) și cu cele două amestecuri fizice de lipide (PC + MSG + US/ULN). Studiul celor două amestecuri fizice oferă informații despre influența uleiului asupra comportamentului de topire și schimbarea cristalinității, precum și despre incluziunea uleiului în lipidele solide. Punctele de topire ale lipidelor prezente în cele două amestecuri fizice au apărut ca vârfuri endoterme la aprox. 48°C, 55°C și respectiv 62°C. Potrivit literaturii, MSG are un p.t. cuprins între 57-65°C, iar PC se topește la 55-56°C. Dezvoltarea celor 3 vârfuri endoterme în amestecurile fizice cumulate cu modificările ușor sesizabile ale p.t. (în lipidele pure), sugerează complexitatea matricei lipidice precum și influența acizilor grași nesaturați din compoziția celor două uleiuri vegetale, US/ULN. Aceste vârfuri endoterme din amestecurile fizice au fost regăsite în lipidele aduse la scala

nanometrica (in formularile de NLC), sub forma unui domeniu mai larg de topire, cuprins între 42 și 60°C. Lărgirea vârfului este cauzată de o structură mai complexă, mai dezordonată și mai distorsionată a rețelei. Aplatizarea degradării temperaturii de debut poate de asemenea indica faptul că se atinge o solubilitate maximă a principiilor active lipofile (EYS) în amestecul de lipide. Este cunoscut faptul că principiile active de natura lipofila au o solubilitate apreciabilă în lipidele topite.

Endotermele minore apărute la temperaturi mai scăzute (39-43°C) pot fi datorate topirii domeniilor ulei vegetal (și/sau co-surfactant), urmate de endotermele majore corespunzătoare topirii lipidelor majoritare din amestec.

Topirea lipidelor din NLC a avut loc la o temperatură ușor mai scăzută comparativ cu lipidele pure, datorită dimensiunilor mai mici ale particulelor. Rezultate similare ale scăderii punctului de topire al lipidelor datorită micșorării dimensiunilor, după aducerea la scala nanometrica, sunt larg raportate în literatura de specialitate (Kumar et al., 2015). Acest lucru poate fi explicat conform termodinamicii clasice, în care este de așteptat ca punctul de topire al soluției solide să scadă datorită entropiei crescute a amestecului (Kumar et al., 2020). De asemenea, raportul mai mare dintre suprafața specifică și volumul particulelor cu o dimensiune mai mică, comparativ cu materialul brut (fenomen descris de efectul Gibbs – Thompson), are ca rezultat o scădere a punctului de topire.

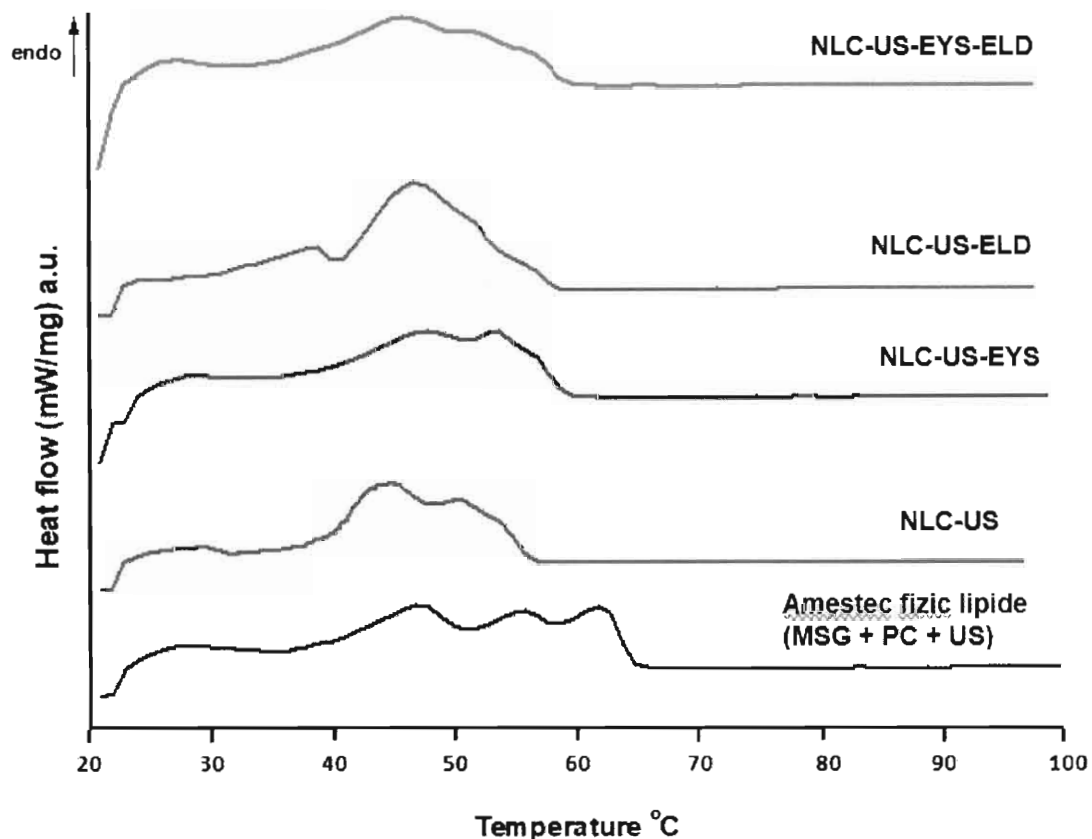


Fig. 5. Curbele DSC ale nanotransportorilor lipidici ce încapsulează diferitele principii active (EYS, ELD și EYS + ELD), preparați cu **US**, comparativ cu NLC fără principiu activ/NLC-US

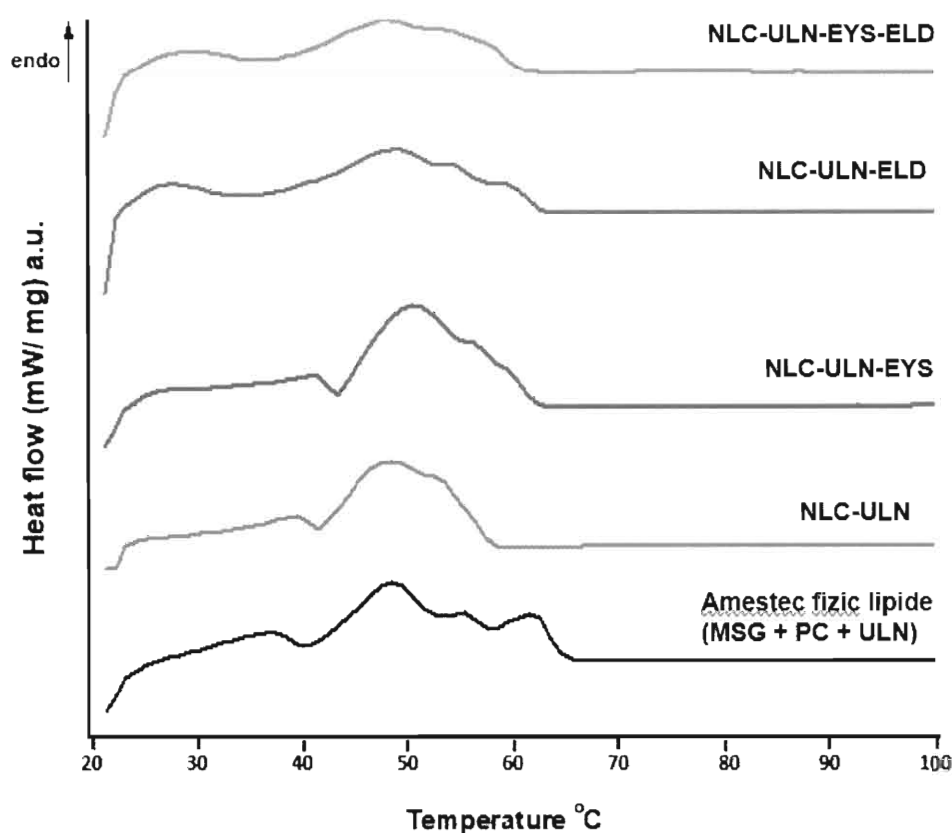


Fig. 6. Curbele DSC ale nanotransportorilor lipidici ce incapsuleaza diferitele principii active (EYS, ELD si EYS + ELD), preparati cu **ULN**, comparativ cu NLC fara principiu activ/NLC-ULN

In ambele categorii de nanotransportori preparati cu ULN si US, incarcati cu EYS si EYS + ELD, se observa o largire evidenta a domeniului de topire comparativ cu NLC-US/ULN (liberi), ceea ce sugereaza o perturbare evidenta a rețelei formata de amestecul de lipide, ca urmare a acomodarii principiilor active de origine vegetala. Nu acelasi lucru se observa pentru NLC-US/ULN ce incapsuleaza doar ELD, unde s-a evidentiat o alura endoterma usor mai acutita, fapt ce confirma o prezenta mai mare a ELD hidrofil in invelisul de surfactanti, si implicit o perturbare nesemnificativa a miezului lipidic (Fig. 5 si 6). Cea mai accentuata aplatizare a endotermelor DSC a fost inregistrata in cazul sistemelor duale care co-incapsuleaza ambele principii active – EYS si ELD.

4. Determinarea eficienței de incapsulare a principiilor active individuale, dar si a celor duale captate in sistemele nanotransportor pe baza de US, respectiv ULN

Rezultatele cantitative obtinute in urma analizei de cromatografie de lichide la presiune ridicata (HPLC), au pus in evidenta abilitatea remarcabila a NLC-US/ULN de a capta ambele categorii de principii active ce prezinta polaritati diferite, respectiv afinitati preferentiale pentru miezul lipidic lipofil (cazul extractului de yam salbatic, standardizat la

95% DSG) sau pentru invelisul realizat de amestecul de surfactant si co-surfactanti (cazul extractului de lemn dulce, standardizat la 10% acid glicirizic). Caracterul puternic hidrofil al **extractului de lemn dulce** nu a constituit un impediment pentru captarea cu randamente apropiate maxime de incapsulare ale principalului component din ELD, respectiv ale acidului glicirizic (ex: $96.5\% \pm 0.57$ ELD si $95.8\% \pm 0.54$ ELD, pentru sistemele NLC preparate cu ULN, respectiv NLC-US ce au incapsulat o cantitate initiala de 2% extract de lemn dulce). In schimb, in cazul probelor duale, care co-incapsuleaza ELD si EYS in acelasi sistem nanotransportor, pe masura ce cantitatea de ELD teoretica incapsulata a crescut de la 0.5 la 2%, eficienta de incapsulare a suferit usoare scaderi (Fig. 7), insa acestea au ramas intr-un domeniu destul de ridicat, EE variind de la 87.6% la 85.4% pentru sistemele nanotransportor preparate cu ulei de luminata noptii. Un comportament similar a fost decelabil si pentru cele 3 sisteme de NLC preparate cu ulei de soia, EE fiind cuprins in acest caz intre 83 si 89.5%.

In ceea ce priveste **extractul de yam salbatic**, se poate remarca afinitatea mai ridicata a acestuia pentru amestecul lipidic format de cele doua lipide solide cu **uleiul de luminata noptii**, comparativ cu amestecul ce contine uleiul de soia (ex: $EE_{NLC-ULN-EYD} = 89.5\% \pm 2.55$ versus $EE_{NLC-US-EYD} = 85.7\% \pm 3.38$). O explicatie potentiala in acest caz poate fi atribuita solubilitatii mai bune a DSG (din EYS) in ULN care prezinta un profil lipidic bogat in acizi grasi nesaturati, cei mai abundenti fiind acidul linoleic (~74%), acidul γ -linolenic (9%) si acidul oleic (7%) (*Montserrat-de la Paz et al., 2014*). De regulă, solubilitatea unui ingredient activ/medicament este mai slaba in lipide solide, decat în uleiuri și aceasta s-ar atribui in principal prezentei lanțului hidrocarbonat lung din grăsimile solide. Datorită diferențelor structurale între lipidele solide si cele lichide, moleculele lipidice nu pot fi aranjate într-o structură cristalină perfectă in timpul solidificarii. Astfel, uniformitatea structurii cristaline în matricea lipidică a NLC este întreruptă. Ca atare, prezenta imperfectiunilor in structura cristalina este direct responsabila de valorile ridicate precum si de imbunatatirea eficientei de incapsulare.

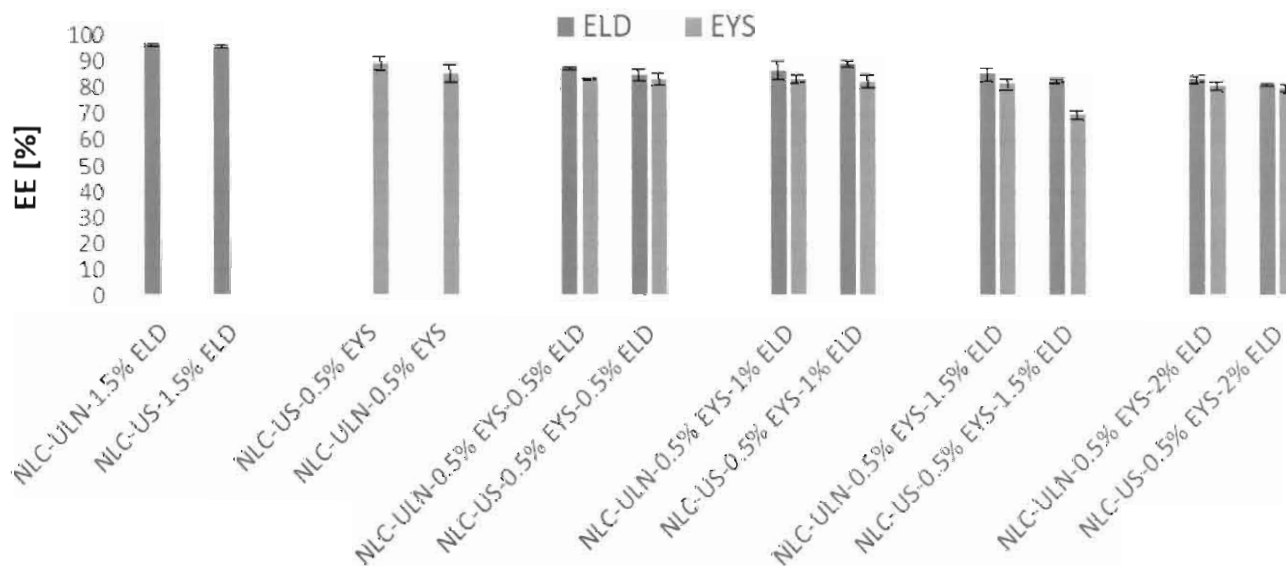


Fig. 7. Valorile eficientei de incapsulare (EE) ale DSG (din extractul de yam salbatic, EYS) si ale acidului glicirizic (din extractul de lemn dulce, ELD) incapsulate in NLC-ULN/US

Referitor la **sistemele nanotransportor duale**, care au cooptat cantitati variabile de ELD si constante de EYS, s-a constatat o usoara diminuare a eficientei de incapsulare, insa aceasta modificare poate fi considerata nesemnificativa, avand in vedere valorile destul de mari ale eficientelor de incapsulare determinate, cuprinse intre 80.9 si 84% **EYS**, respectiv intre 83.6 si 87.6% **ELD** (pentru sistemele preparate cu ULN, NLC-ULN-EYS-ELD). Si sistemele NLC preparate cu US (cu o singura exceptie, pentru NLC ce au incapsulat o cantitate initiala de 1.5% ELD si 0.5% EYS) au prezentat o buna capacitate de a capta ambele categorii de principii vegetale, hidrofile si lipofile (EE% determinate pentru EYS au variant intre 80 si 83.5% **EYS**, iar pentru ELD intre 81.2 si 89.5% **ELD**).

5. Determinarea *in vitro* a activitatii antioxidante a NLC ce co-incapsuleaza diferite principii active vegetale

Pentru screening-ul activității antioxidante a NLC-extract lipofil (extract de yam salbatic)-extract hidrofil (extract de lemn dulce), s-a utilizat metoda TEAC, aplicabilă atât în cazul antioxidantilor de natura lipofila cât și hidrofila. Prin aplicarea acestei metode se determina capacitatea antioxidantilor de a elimina cationul radical stabil ABTS^{•+} format in urma reacției dintre ABTS și persulfatul de potasiu. In figura 8 este prezentata capacitatea de inhibare a radicalului ABTS^{•+} de către solutiile de NLC libere și încărcate cu extracte vegetale individuale sau aflate in amestec (ELD si EYS), prin comparare cu activitatea de eliminare a ABTS^{•+} manifestata de solutiile native de uleiuri vegetale (US/ULN) si extracte vegetale (ELD, EYS). O evaluare a comportamentului sistemelor nano *versus* solutiile de aceeasi concentratie de principii active vegetale arata o dependenta a activitatii antioxidante de cantitatea de extract de lemn dulce și deasemenea o influențată a tipului de ulei vegetal utilizat la sinteza nanotransportorilor lipidici. Astfel, s-a constatat o relatie de proportionalitate directa intre %ELD incapsulat si capacitatea de inhibare a ABTS^{•+}: pentru formularile de nanotransportori lipidici ce încapsuleaza 1.5% ELD si 2% ELD a fost identificata o capacitate de captare a radicalului ABTS^{•+} cuprinsa intre 60.2 și 64.2% (pentru sistemele NLC preparate cu ULN) și intre 52.7-60.0% pentru sistemele NLC preparate cu US.

Activitatea antioxidantă nativă a **extractului de lemn dulce** (14.5 ÷ 36.5%) poate fi explicată pe baza compoziției chimice complexe a acestuia. Extractul de lemn dulce are în compoziție în afară de acid glicirizic (prezent în ELD in cantitate de 10%), flavonoide și izoflavonoide, cumarine și alți peste 40 de constituenți fenolici (*Zhou și colab, 2019*). Deși acidul glicirizic prezintă proprietăți antiradicalice extrem de slabe, în domeniu de concentratie 0.1-100 μM (*Beskina și colab, 2004*), prezența flavonelor și a celorlaltor compuși fenolici din *Glycyrrhiza glabra L* sunt responsabile de aparitia proprietăților antioxidante; mai mult, incapsularea ELD în NLC a determinat o amplificare a capacitatii antioxidante, datorită efectului de nanodimensiune.

Un aspect notabil se refera la o capacitate destul de scazuta a **DSG din extractul de yam salbatic** de a anihila radicalii de viata lunga. Extractul nativ/EYS prezintă o capacitate scazuta de captare a radicalului ABTS^{•+} (~8.2%), iar prin încapsulare în sistemul nanotransportor pe bază de ulei de luminița nopții capacitatea crește usor, insa se mentine la valori modeste, de ~13,4%; această capacitate moderata poate fi atribuita si concentrației de EYS incapsulat, de 77 μg/mL (corespunzătoare 0.5% EYS).

Evaluarea comparativa a % de inhibare a ABTS^{•+} in cazul celor doua sisteme individuale si duale NLC-1.5% ELD (62.5%) si NLC-0.5% EYS-1.5% ELD (54%) poate sugera o «ingradire» a reactiei compusilor antioxidanti din ELD cu radicalii liberi, respectiv

o scadere a abilitatii de a transfera (prin ruperea homolitică a legăturii O-H) un atom de hidrogen (din structurile polifenolice prezente in ELD), radicalilor liberi de tip ABTS prezenti in sistem.

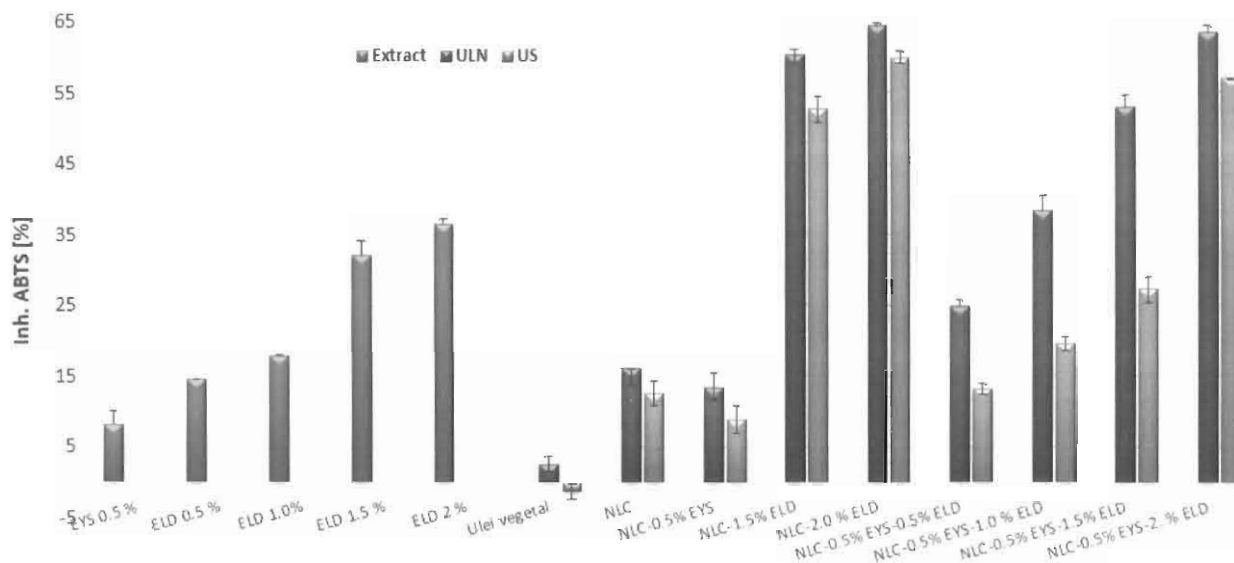


Fig. 8. Variația capacității de inhibiție a radicalului ABTS^{•+} de către sistemele NLC incarcate cu un singur principiu activ vegetal (EYS sau ELD) *versus* NLC care co-incapsuleaza doua principii bioactive vegetale (EYS si ELD)

In ciuda proprietatilor modeste ale EYS, rezultate foarte bune au fost obtinute in **cazul sistemelor duale** care au cooptat concentratii mari de ELD (1.5% si 2%) si 0.5% EYS. Cuplarea celor doua principii bio-actice in acelasi sistem lipidic nanotransportor și aducerea la scara nanometrica, a condus in mod evident la o amplificare a acestei proprietati. Amplificarea evidenta s-a produs in cazul NLC preparat cu ULN care ce co-incapsuleaza 0.5% EYS si 2% ELD, pentru care s-a determinat o capacitate de inhibare a radicalului ABTS^{•+} de 63.4% (Fig. 8). Acest comportament poate fi explicat prin avantajele pe care le prezintă acizii grasi omega din componenta uleiului de lumnita noptii, cuplate cu cele ale extractului de lemn dulce si nu in ultimul rand prin captarea ambelor principii active de origine vegetala in acelasi sistem nanotransportor.

Pentru testarea *in vitro* a capacității de captare a **radicalilor de viață scurtă ai oxigenului**, de catre antioxidantii prezenti in sistemele NLC, in completare la metoda TEAC s-a folosit analiza chemiluminescentei, utilizată pentru evaluarea în special a capacitatii de stingere a speciilor reactive de oxigen (ROS) derivate din peroxid de hidrogen. Astfel, au fost analizate diferite solutii etanolice de ulei vegetal (ULN/US), solutii de extract de lemn dulce (ELD) și extract de yam salbatic (EYS), in aceeasi concentratie prezenta în NLC-urile ce incapsuleaza ELD sau EYS, respectiv in cele duale (NLC-EYS-ELD). In scop comparativ au fost evaluate si sistemele de NLC-ULN/US libere, in ideea de a urmări influența celor doua uleiuri asupra eficientei de a capta radicalii liberi oxigenati.

O prima referinta importanta care reiese din compararea rezultatelor asupra sistemelor evaluate in cercetare este faptul ca, atat extractul de yam salbatic cat si

extractul de lemn dulce prezinta eficienta impotriva radicalilor liberi oxigenati generati in sistemul de chemiluminescenta, comparativ cu situatia prezentata anterior (al radicalilor de viata lunga, ABTS^{•+}).

Desi incapsularea doar a extractului de yam salbatic in NLC-ULN/US nu produce un efect antioxidant semnificativ, NLC-urile in care a fost incapsulat 0.5% EYS (respectiv 3.85% EYS in formularile liofilizate) prezintă o capacitate de captare a radicalilor ROS cuprinsă între 54.7 si 56.3%, totusi asocierea EYS cu ELD conduce la rezultate net superioare (Fig. 9). Diferente evidente ale procentelor de captare a radicalilor liberi au fost inregistrate intre NLC-US/ULN liberi si NLC-EYS (57 ÷ 59%) *versus* NLC-ELD si NLC-EYS-ELD (91 ÷ 96%, cu o singura exceptie, semnalata doar in cazul NLC ce co-incapsuleaza cantitati minime de 0.5% ELD si 0.5% EYS). In acest caz, tipul de ulei vegetal nu a influentat abilitatea NLC de a capta radicalii ROS. Această activitate antioxidantă amplificată, manifestata asupra ROS din sistemul chemiluminescent, poate fi asociata cu:

- efectul sinergic produs de structurile complexe ale principalilor compusi bioactivi din cele doua extracte, ELD si EYS, dar si de compozitia bogata in acizii grași a uleiurilor vegetale;
- efectul de nanodimensiune obținut prin cooptarea ambelor extracte lipofile si hidrofiele în acelasi sistem de distributie, nanostructuri care conduc la generarea/crearea mai multor centri de reacție pentru captarea radicalilor liberi.

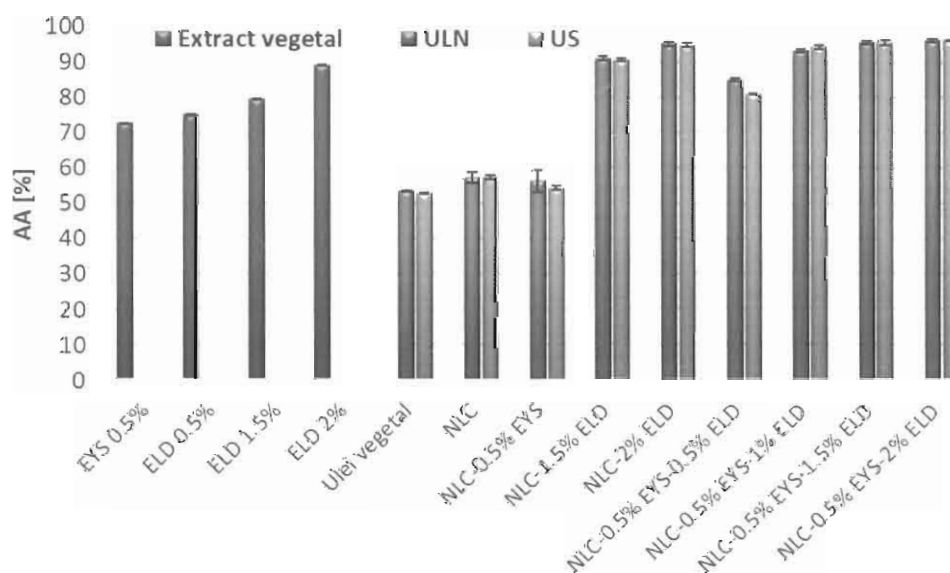


Fig. 9. Determinarea *in vitro* a activitatii antioxidante a NLC liberi si incarcati cu concentratii variabile de extract de lemn dulce și extract de yam salbatic, comparativ cu extractele native si uleiurile vegetale (metoda chemiluminescentei)

6. Teste *in vitro* de evaluare a eliberării controlate a EYS si ELD din sistemele lipidice nanotransportor

Dispersiile apoase de NLC-individual ce încapsulează EYS sau ELD, respectiv sistemele NLC-duale au fost supuse studiilor *in vitro* de eliberare, utilizand metoda sacilor de dializa (folosind un mediu extern/receptor de tipul etanol:apa = 70:30, la temperatura controlată de 37°C). Metoda a implicat recoltarea din mediul receptor, la anumite intervale de timp (cuprinse între 1 și 24h) a 1 mL de probă și respectiv completarea cu același volum de amestec receptor. Cantitatea eliberată de acid glicirizic (din ELD) și DSG (din EYS) a fost determinată cantitativ prin metoda cromatografică, HPLC.

În cazul sistemelor NLC-individuale, eliberarea **extractului de lemn dulce (ELD)** din cele două tipuri de nanotransportori lipidici (preparați cu ulei de lumină noapții și ulei de soia) este identică (Fig. 10), nefiind influențată de tipul de ulei vegetal (US sau ULN). Așa cum poate fi observat în fig. 10, în prima oră a studiului de eliberare s-a determinat ~19% acid glicirizic pentru ambele sisteme NLC-ULN/US-2% ELD, iar o eliberare totală a ELD produs după 5h (Fig. 10). O potențială explicație pentru acest comportament poate fi asociată cu repartizarea preferențială a acidului glicirizic (din ELD) la suprafața NLC unde, datorită caracterului său puternic hidrofil formează legături salbe (legături de hidrogen) cu surfactanții ce învelesc miezul lipidic.

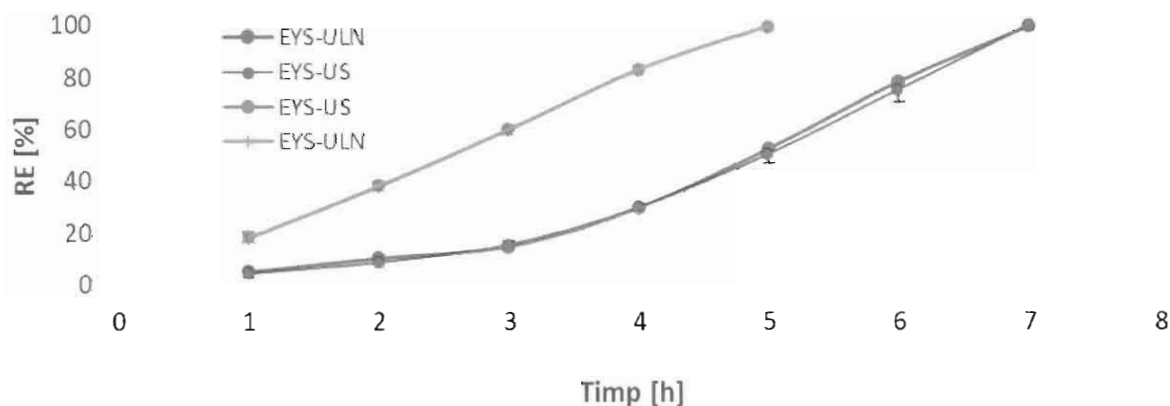


Fig. 10. Profilul de eliberare a DSG (din extractul de yam salbatic) și a acidului glicirizic (din extractul de lemn dulce), în cazul sistemelor nanotransportor individuale, de tip NLC-EYS și NLC-ELD

Așa cum era de așteptat, un comportament de eliberare diferit l-a manifestat **extractul de yam salbatic** (standardizat la 95% DSG) încapsulat în sistemele nanotransportor preparate cu ULN/US. Deși mediul receptor a favorizat eliberarea într-un timp relativ rapid a ambelor componente bioactive, totuși în cazul EYS s-a decelat o comportare ușor diferită, în sensul că în primele 5h ale studiului de eliberare, EYS a fost eliberat în proporție de 50%, comparativ cu 100% ELD (detectat pentru sistemele NLC-US/ULN-ELD). În prima oră s-a constatat o eliberare de 4.3% EYS pentru sistemul NLC-US-EYS și de 5.2% în cazul sistemului NLC-ULN-EYS, ambele fiind încărcate cu o cantitate inițială de 0.5% EYS. Eliberarea mai lentă a EYS din NLC-ULN/US este direct influențată de captarea EYS în nanocompartimentele din miezul nanosferelor lipidice (așa cum a putut fi vizualizat din micrografiile TEM). Iesirea din aceste nanoparticuli și parcurgerea rețelelor complexe formate de lanțurile hidrocarbonate din structura lipidelor,

a făcut ca rata de dizolvare în acest caz să fie semnificativ diminuată și implicit DSG să manifeste o eliberare mai lentă. De asemenea, caracter lipofil al DSG din EYS și solubilitatea scăzută în mediul receptor reprezintă de asemenea factori determinați în comportamentul eliberării sale din NLC.

Așa cum era de așteptat, un comportament de eliberare diferit l-a manifestat **extractul de yam salbatic** (standardizat la 95% DSG) încapsulat în sistemele nanotransportor preparate cu ULN/US. Deși mediul receptor a favorizat eliberarea într-un timp relativ rapid a ambelor componente bioactive, totuși în cazul EYS s-a decelat o comportare ușor diferită, în sensul că în primele 5h ale studiului de eliberare, EYS a fost eliberat în proporție de 50%, comparativ cu 100% ELD (detectat pentru sistemele NLC-US/ULN-ELD). În prima oră s-a constatat o eliberare de 4.3% EYS pentru sistemul NLC-US-EYS și de 5.2% în cazul sistemului NLC-ULN-EYS, ambele fiind încărcate cu o cantitate inițială de 0.5% EYS. Eliberarea mai lentă a EYS din NLC-ULN/US este direct influențată de captarea EYS în nanocompartimentele din miezul nanosferelor lipidice (așa cum a putut fi vizualizat din micrografiile TEM). Iesirea din aceste nanopicături și parcurgerea rețelelor complexe formate de lanțurile hidrocarbonate din structura lipidelor, a făcut ca rata de dizolvare în acest caz să fie semnificativ diminuată și implicit DSG să manifeste o eliberare mai lentă. De asemenea, caracter lipofil al DSG din EYS și solubilitatea scăzută în mediul receptor reprezintă de asemenea factori determinați în comportamentul eliberării sale din NLC.

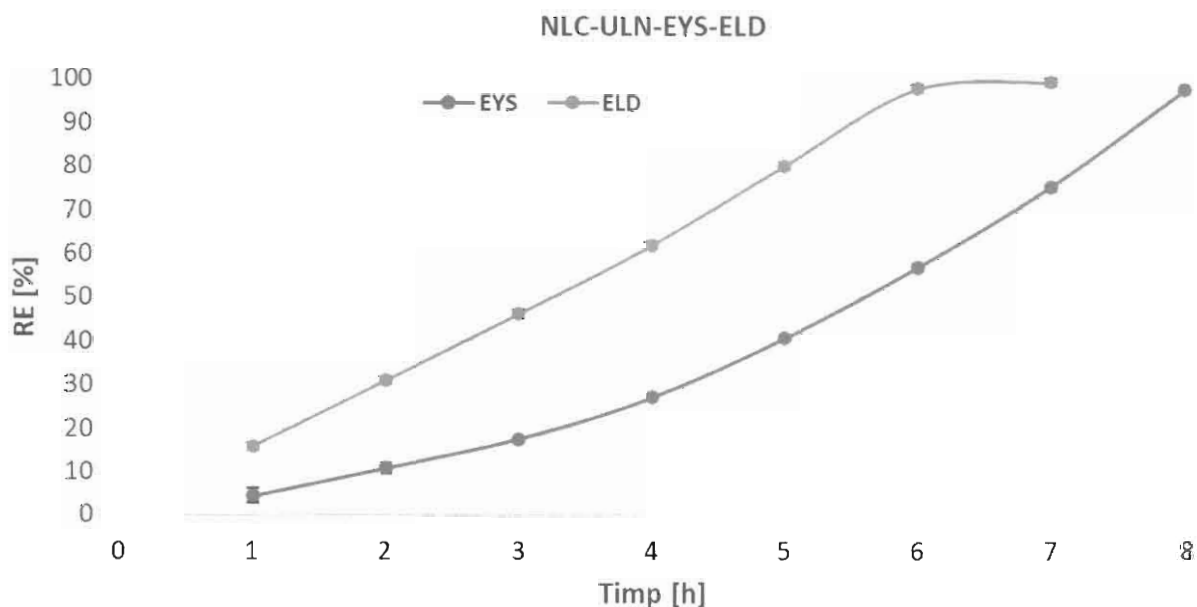


Fig. 11. Profilul de eliberare a DSG (din extractul de yam salbatic) și a acidului glicirizic (din extractul de lemn dulce), în cazul sistemului nanotransportor dual preparat cu ULN (NLC-ULN-EYS-ELD)

Este demn de remarcat faptul ca, in cazul **sistemelor NLC-duale** se constată o eliberare mai lentă a ambilor componente bioactivi lipofili și hidrofilii, mai accentuata in cazul extractului hidrofil/ELD, comparativ cu sistemele NLC incarcate doar cu unul dintre cele doua extracte vegetale. De exemplu, sistemele nanotransportor individuale au eliberat ~ 81% ELD dupa 4h de experimente, in timp ce din NLC-duale s-a eliberat 39% ELD (in NLC-US-EYS-ELD, Fig. 12), respectiv 61% (in NLC-ULN-EYS-ELD, Fig. 11).

Alura eliberarii componentei lipofile este similara in cazul ambelor sisteme preparate cu ULN/US, dupa 4h de eliberare fiind determinate cantitati relativ egale de DSG in mediul receptor, de ~30% DSG. Aceasta uniformizare de eliberare a DSG poate fi atribuita miezului lipidic format din lipidele solide cu cele 2 uleiuri vegetale. In schimb, eliberarea ELD din sistemele NLC fost intarziata semnificativ in cazul NLC-US (Fig. 11) comparativ cu NLC-ULN (Fig. 12).

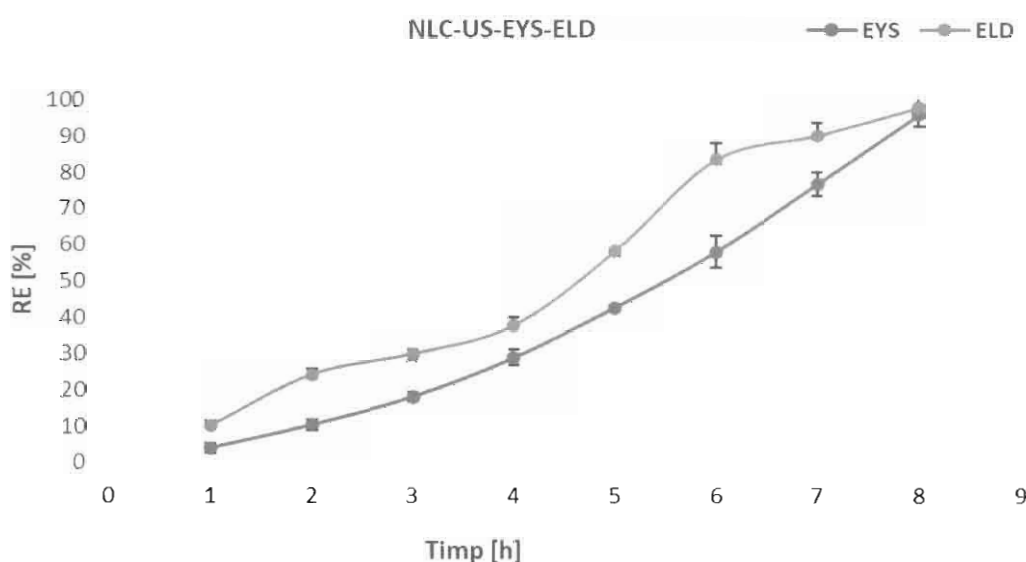


Fig. 12. Profilul de eliberare a DSG (din extractul de yam salbatic) și a acidului glicirizic (din extractul de lemn dulce), în cazul sistemului nanotransportor dual preparat cu US (NLC-US-EYS-ELD)

7. Evaluarea *in vitro* a profilului toxicologic

Evaluarea caracterului citotoxic al sistemelor NLC s-a realizat int-o prima etapa prin metoda colorimetrica cu MTS. Aceasta metoda spectrofotometrica este frecvent utilizata pentru determinarea numarului celulelor viabile in teste de proliferare sau citotoxicitate. Pentru fiecare tip celular exista o relatie lineara intre numarul de celule si absorbanta, ceea ce permite determinarea cu exactitate a proliferarii celulare. Pentru evaluarea caracterului citotoxic/proliferativ al sistemelor nanotransportor studiate, culturile de celule normale HUVEC au fost tratate cu concentratii scalare de NLC (intre 200 si 3.125 $\mu\text{g/ml}$) si incubate in continuare la 37°C si 5% CO₂, in atmosfera umeda, timp de 24h.

Rezultatele studiului de citotoxicitate arata ca viabilitatea celulelor endoteliale HUVEC este influentata de concentratiile sistemelor de NLC, aceasta fiind semnificativ afectata atunci cand celulele sunt supuse concentratiilor mai mari de 100 $\mu\text{g/ml}$ NLC (Fig. 13). Pentru celelalte concentratii, cuprinse intre 3.125 si 50 mg/mL , viabilitatea celulara determinata s-a mentinut la valori $>65\%$ (cu cateva exceptii), ceea ce indica o citotoxicitate foarte scazuta (aflata in limita metodei), indusa de tratamentul cu sistemele NLC-US/ULN-EYS-ELD, timp de 24h (Fig. 13A). Conform rezultatelor obtinute, cele mai eficiente sisteme nanotransportor sunt sistemele *NLC-duale* preparate cu ulei de soia, pentru care in urma unui tratament cu 50 $\mu\text{g/ml}$ valoarea viabilitatii celulare a fost de 81.9% pentru NLC-US-EYS-ELD. In cazul sistemelor preparate cu ULN, un tratament cu concentratii de 50 mg/ml a condus la o viabilitate a celulelor HUVEC usor mai moderata (79.7% pentru NLC-ULN-EYS-ELD).

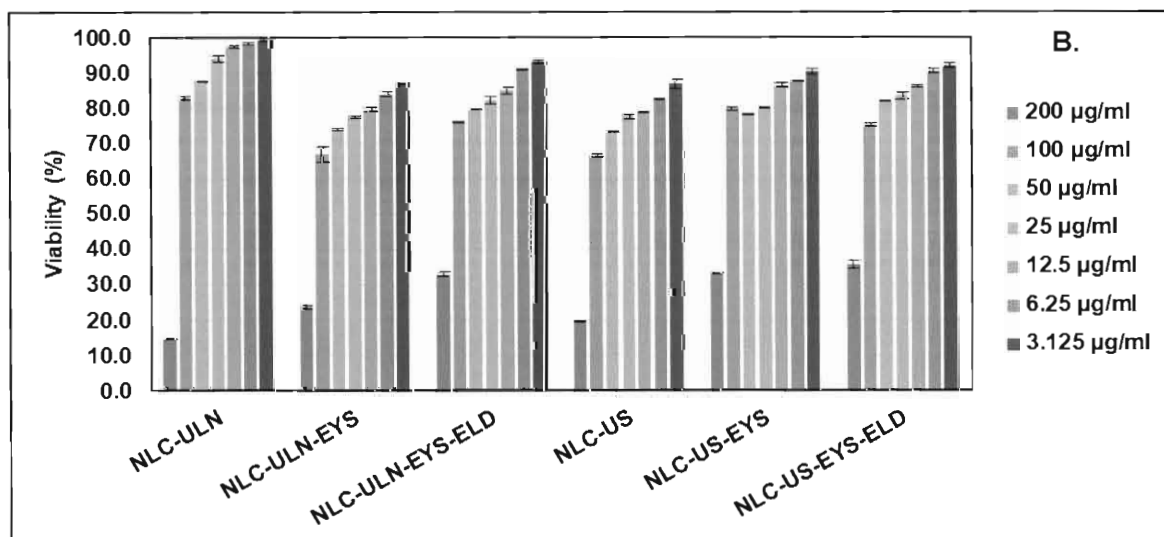
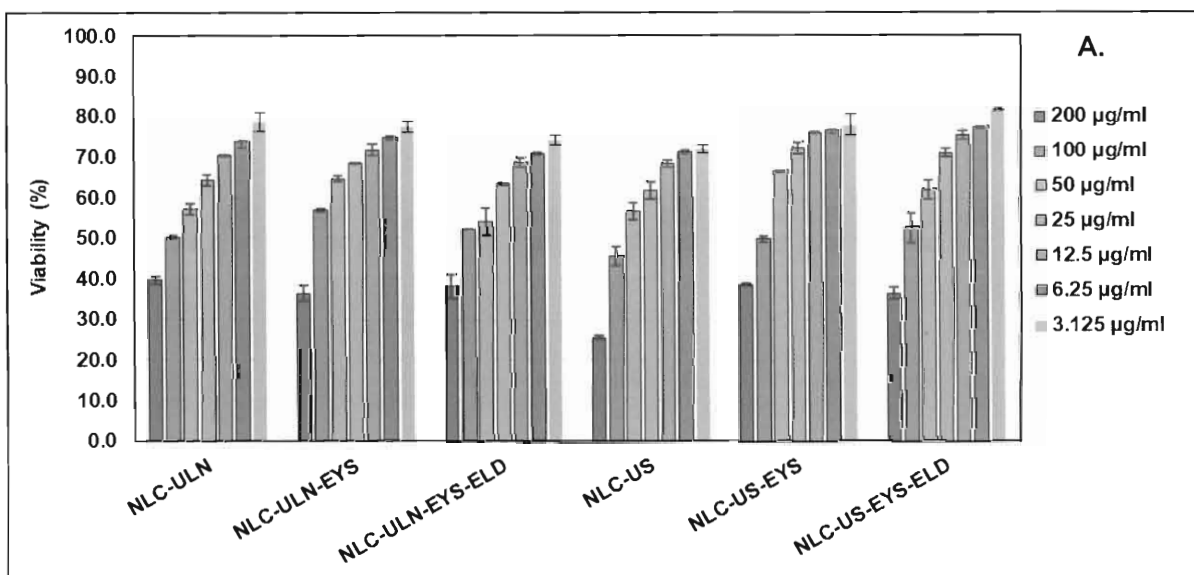


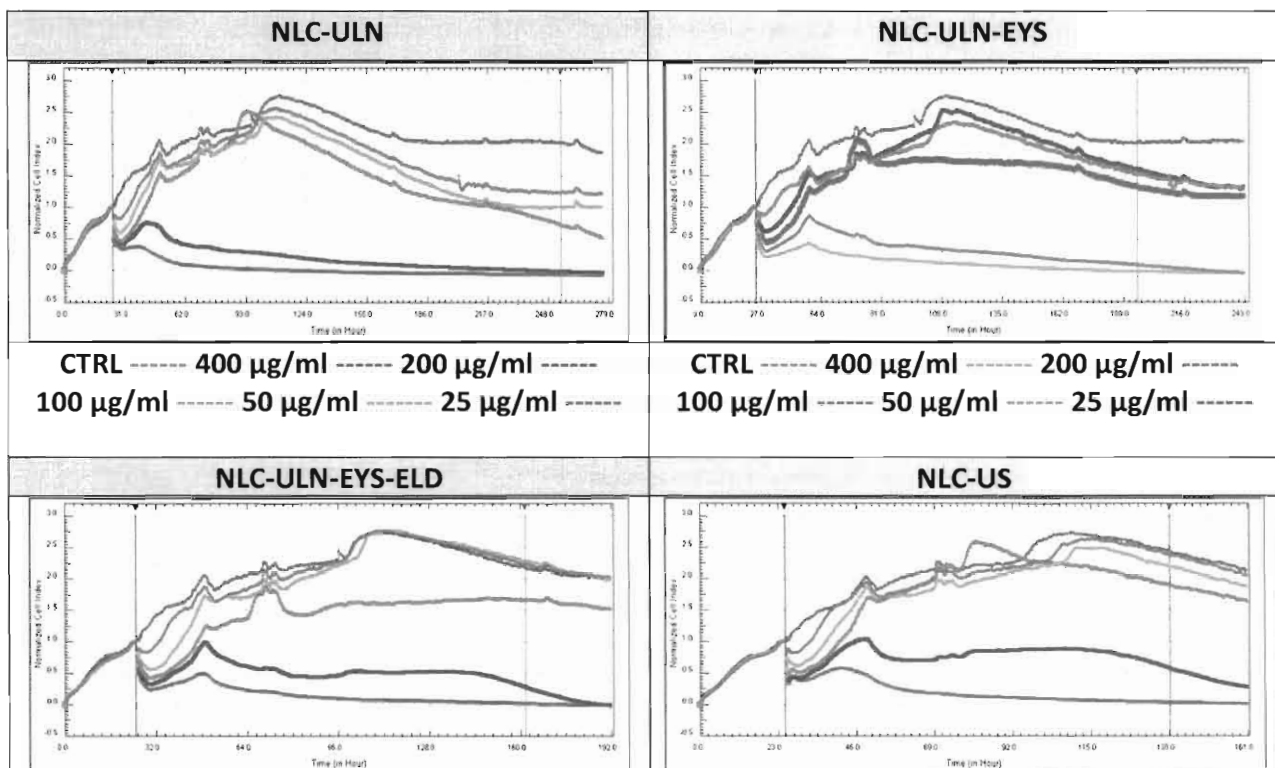
Fig. 13. Efectul sistemelor *NLC-individuale* si *duale*, NLC-US/ULN-EYS, NLC-EYS-ELD, asupra viabilitatii celulelor normale HUVEC timp de 24h (A) si respectiv 48h (B)

Un tratament prelungit asupra celulelor endoteliale HUVEC, realizat pe o perioada de 48h, a condus la o contrabalansare a viabilitatii celulare comparativ cu rezultatele obtinute dupa 24h de tratament (Fig. 13 A si B). Astfel, la un tratament de 48h, s-a constatat aparitia unor fenomene de refacere/proliferare celulara, in acest caz determinandu-se valori ale viabilitatii celulelor endoteliale >85%, in domeniul de concentratii 50-25 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 13B).

Evaluarea citotoxicitatii vs. proliferarea celulelor normale HUVEC prin analiza celulara in timp real

In scopul compararii in timp real a capacitatii proliferative vs. citotoxice a sistemelor NLC-libere si incarcate cu cele doua principii active vegetale (EYS si ELD) asupra celulelor HUVEC, s-a efectuat testul RTCA. Aceasta analiza permite masurarea in orice moment a indexului celular, precum si indicarea pentru orice timp de tratament a concentratiei compusilor care determina o viabilitate/citotoxicitate de 50% (IC50). Rezultatele obtinute prin RTCA pe celulele endoteliale HUVEC confirma datele obtinute prin tehnica colorimetrica MTS. In urma evaluarii citotoxicitatii celulelor endoteliale HUVEC, tratate cu concentratii diferite de NLC, de la 400 $\mu\text{g/ml}$ pana la 25 $\mu\text{g/ml}$, se poate observa o siguranta de utilizare a NLC la concentratii cuprinse intre 25 si 100 $\mu\text{g/ml}$, asociata unor viabilitati celulare crescute (comparabile cu cele ale matorului celular netratat/control, reprezentat prin curba rosie, Fig. 14)

In schimb, la concentratii mari, de 400 si 200 $\mu\text{g/ml}$, viabilitatea celulara scade semnificativ, indicand aparitia la aceste concentratii a unui efect citotoxic manifestat de sistemele NLC. Interesant de notat este faptul ca prin cresterea timpilor de tratament, cu cateva exceptii, se ajunge la valori comparabile cu cele ale celulelor netratate, ceea ce indica o lipsa a efectelor citotoxice, pe acel domeniu de concentratie (Fig. 14).



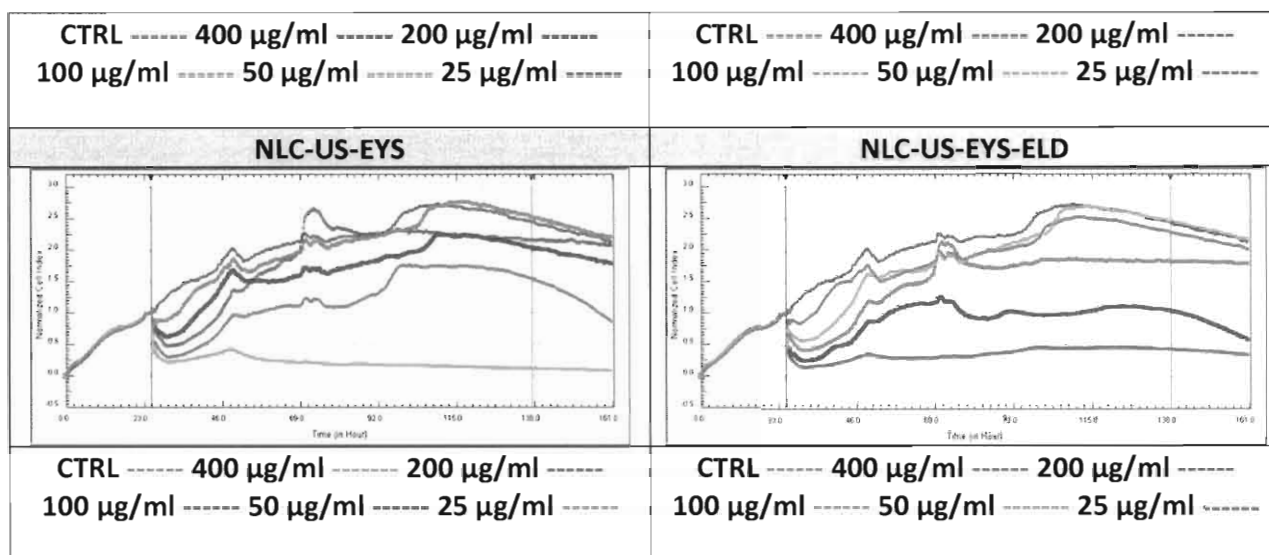


Fig. 14. Actiunea citotoxică vs. proliferativă indusă de sistemele NLC-ULN/US libere și încărcate, NLC-ULN/US-EYS, NLC-ULN/US-EYS-ELD asupra celulelor normale HUVEC

Ca urmare a rezultatelor obținute prin analizele MTS și RTCA, pentru testele de evaluare *in vitro* a activității anti-inflamatoare s-au ales concentrațiile de 50 și 100 µg/ml NLC.

8. Atribuirea *in vitro* a proprietăților anti-inflamatorii

Rezultatele *in vitro* obținute în urma analizei ELISA, care evaluează expresia citokinelor pro-inflamatorii TNF- α și IL-6, după tratarea celulelor normale HUVEC cu sistemele NLC-libere și cu conținut de EYS, respectiv amestec de EYS și ELD, a evidențiat apariția unui efect puternic antiinflamator, efect care a fost dependent atât de doză de NLC aplicată, cât și de tipul de ulei vegetal folosit la prepararea nanotransportatorilor lipidici. Prin tratarea celulelor HUVEC cu sistemele NLC, producția de citokine pro-inflamatorii TNF- α și IL-6 a fost semnificativ inhibată (Fig. 15).

Din punct de vedere al dozei aplicate la tratamentul celulelor endoteliale, s-a constatat faptul că tratamentele cu 200 µg/ml NLC au dus la o scădere a nivelurilor markerilor inflamatori TNF- α și IL-6, respectiv la un grad de inhibare mai scăzut, comparativ cu doza de 50 µg/ml, unde a fost înregistrată o creștere semnificativă a % de inhibare a ambelor categorii de citokine proinflamatorii eliberate în urma tratamentului. Aceasta contracarare mai eficientă a dozei mai mici de NLC, respectiv de 50 µg/ml, comparativ cu tratamentul cu o concentrație mai mare, 200 µg/ml, poate fi corelată și explicată pe baza rezultatelor anterioare ale analizelor MTS și RTCA care au demonstrat o scădere a viabilității celulare la concentrații de 200 µg/ml. Acest efect conduce implicit la denaturarea și moartea unor celule, care au ca rezultat direct o scădere a % de inhibare a citokinelor TNF- α și IL-6.

Prin compararea efectului anti-inflamator al NLC asupra eliberării citokinei TNF- α *versus* nivelul interleukinei 6 (IL-6), s-a detectat o diferență semnificativă între procente de IL-6 și TNF- α , mult mai eficientă fiind inhibarea eliberării TNF- α (valori de peste 70%) în cazul NLC încărcate cu principii vegetale. Aceste rezultate pot fi asociate și cu acțiunea

agentului oxidant (H_2O_2) aplicat asupra celulelor HUVEC. Actiunea H_2O_2 a determinat o eliberare mai mare de TNF-alpha fata de celulele netratate, in comparatie cu IL-6.

Trebuie remarcat faptul ca sistemele nanotransportor libere, NLC-US/ULN pentru care s-a analizat actiunea antiinflamatoare in scop comparativ, au prezentat ele insele o buna abilitate de a inhiba eliberarea citokinelor pro-inflamatorii. Astfel, la concentratii de 50 $\mu g/ml$, % de inhibare a IL-6 a fost >50% pentru ambele categorii de NLC, iar in cazul inhibarii citokinei TNF-a, aceasta inhibare a depasit 85% (Fig. 15). Aceste rezultate sugeraza impactul evident al uleiului de luminata noptii (ULN) si al uleiului de soia (US) asupra actiunii antiinflamatoare detectate.

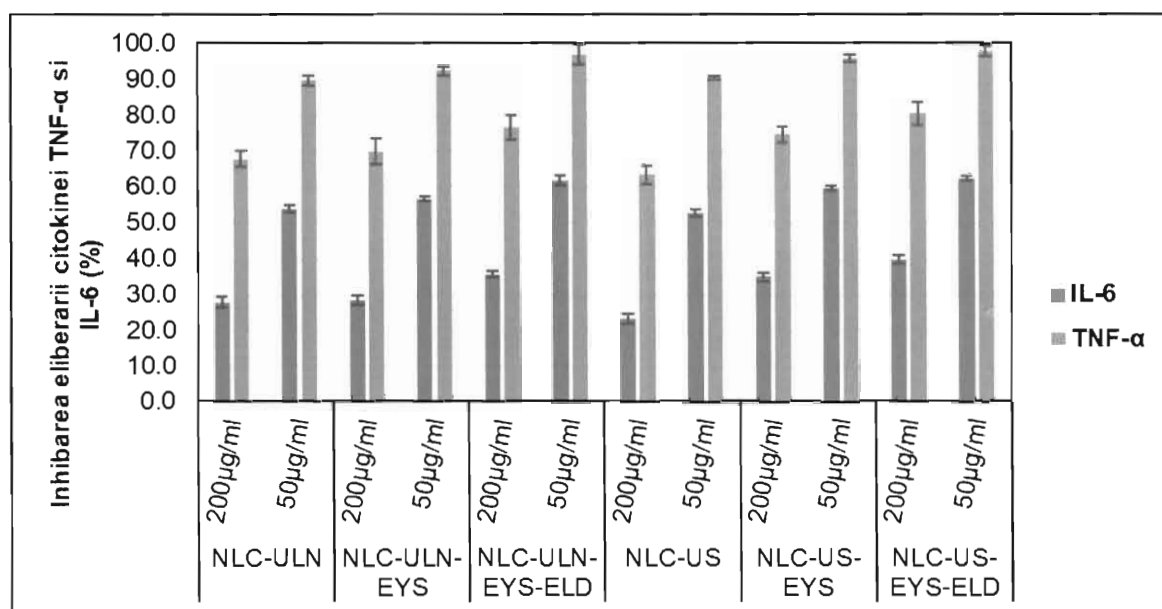


Fig. 15. Evaluarea prin tehnica ELISA a efectului tratamentelor cu sisteme nanotransportor de tip NLC-EYS si NLC-EYS-ELD asupra eliberarii citokinelor TNF- α si IL-6, de catre celulele normale HUVEC

O privire comparativa a NLC-ULN libere *versus* NLC-ULN-EYS-ELD arata o amplificare usoara a actiunii antiinflamatoare in cazul ultimului sistem nanotransportor (ex: pentru NLC-ULN s-a detectat o inhibare a IL-6 de 53.9% *versus* 62% in cazul NLC-ULN-EYS-ELD). In cazul TNF- α s-a determinat un grad de inhibare mai pronuntat al NLC, de 89.8% pentru NLC-ULN *versus* 96.9% pentru NLC-ULN-EYS-ELD (Fig. 15).

NLC preparate cu US au asigurat o inhibare comparabila a IL-6 si TNF- α : pentru NLC-US s-a detectat o inhibare a IL-6 de 52.8% *versus* 62.5% in NLC-US-EYS-ELD. Pentru inhibarea TNF- α procentul de inhibare a fost de 90.6% (NLC-US) *versus* 97.9% (NLC-US-EYS-ELD, Fig. 15).

REVENDICĂRI

1. Procedeu de obținere a unor nanotransportori lipidici pe baza de ulei de lumină noctivă și ulei de soia, care prezintă avantajul de a co-incapsula și distribui simultan două categorii de principii active vegetale, lipofile și hidrofile, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde:
 - a. formarea unei pre-emulsii lipidice libere și încărcate cu amestecuri de principii active vegetale (EYS sau ELD, respectiv EYS și ELD) 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;
 - b. supunerea pre-emulsiei lipidice la un proces inițial de omogenizare cu grad înalt de forfecare (12 000 rpm, timp de 1 min, la o temperatură de 70 ... 72 °C) și ulterior la un proces de omogenizare la presiune ridicată (la 500 bar, timp de 196 sec, temperatura de 70 ... 72 °C);
 - c. obținerea unor dispersii apoase de NLC liberi și încărcăți cu cele două categorii de principii bio-active vegetale, prin răcire ușoară a nanoemulsiilor, sub agitare magnetică, la temperatura camerei;
 - d. obținerea de formulări solide de NLC prin supunerea dispersiilor apoase de nanotransportori lipidici liberi și încărcăți cu EYS/ELD, respectiv EYS și ELD la un proces de liofilizare, la -55°C timp de 60h.
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 lumină noctivă sau ulei de soia, într-un raport de 1 : 1 : 0.85.
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 de 1 : 0.21 : 0.21.
4. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că**, în faza lipidică se adaugă o cantitate de 0.5g extract lipofil de yam salbatic (în 100g dispersie apoasă de NLCs).
5. Procedeu conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că**, în faza apoasă se adaugă o cantitate de 0,5 ... 2g extract hidrofil de lemn dulce (în 100g dispersie apoasă de NLC).
6. Procedeu conform revendicărilor 2 și 3, **caracterizat prin aceea că**, pre-emulsia lipidică conține 10% amestec de lipide solide și uleiuri vegetale și 2,5% amestec de surfactanți.
7. NLC în stare solidă, încărcat cu EYS sau ELD, respectiv amestec de EYS și ELD, obținuți prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6, **caracterizați prin aceea că aceștia** conțin:
 - a. 10.7 ... 13.8% ELD în formulările de NLC-individuale (NLC-ELD), procente fiind exprimate în greutate.
 - b. 3.8% EYS în formulările de NLC-individuale (NLC-EYS), procente fiind exprimate în greutate.
 - c. 3.3 ... 3.7% EYS și 3.7 ... 13.2% ELD în formulările de NLC-duale (NLC-EYS-ELD), procente fiind exprimate în greutate.

8. NLC conform revendicării 7 obținuti prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6 **caracterizati prin aceea că** sunt de formă sferică și au diametre medii cuprinse între 50 și 200 nm.
9. NLC 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 $-38.6 \div -56.4$ mV, determinate pentru NLC-individuale (NLC-EYS/ELD) și între $-35 \div -48,7$ mV, determinate pentru NLC-duale (NLC-EYS-ELD).
10. NLC conform revendicării 7 obținuti prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6 **caracterizati prin aceea că** prezintă valori ale eficienței de incapsulare cuprinse între $95.8 \div 96.5\%$ ELD și între $85.8 \div 89.5\%$ EYS, pentru cazul sistemelor NLC-individuale (NLC-EYS/ELD), respectiv cuprinse între $83 \div 89.5\%$ ELD și între $70 \div 83.9\%$ EYS, pentru cazul sistemelor NLC-duale (NLC-EYS-ELD).
11. NLC conform revendicării 7 obținuti prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6, **caracterizati prin aceea că** manifesta o activitate puternică de a capta radicalii de viața scurtă ai oxigenului (ROS), generați într-un sistem de chemiluminescență, cu valori cuprinse între $81 \div 95\%$ de a capta ROS pentru NLC-duali preparați cu US, respectiv de $84 \div 96\%$ de a capta ROS pentru NLC-duali preparați cu ULN.
12. NLC conform revendicării 7 obținuti prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6 **caracterizati prin aceea că** prezintă o capacitate ridicată de inhibare a radicalilor cationici de viața lungă (ABTS^{•+}) de către sistemele NLC încărcate cu cele două principii bioactive vegetale (EYS și ELD), care ating procente de 65%.
13. NLC conform revendicării 7 obținuti prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6, **caracterizati prin aceea că** aceștia nu prezintă un efect citotoxic la un tratament al celulelor endoteliale HUVEC, pe un interval de concentrații cuprins între 50 și 3.125 μg/ml, viabilitatea celulară fiind >80%.
14. NLC conform revendicării 7 obținuti prin procedeul definit în revendicările de la 1 la 6, **caracterizati prin aceea că** un tratament cu 50 μg/mL NLC conduce la apariția unui efect anti-inflamator (pentru NLC preparate cu US % de inhibare a citokinelor pro-inflamatorii, IL-6 și TNF-α, a fost de: 62.5% pentru citokina IL-6 și de 97.9% pentru citokina TNF-α).

DESENE

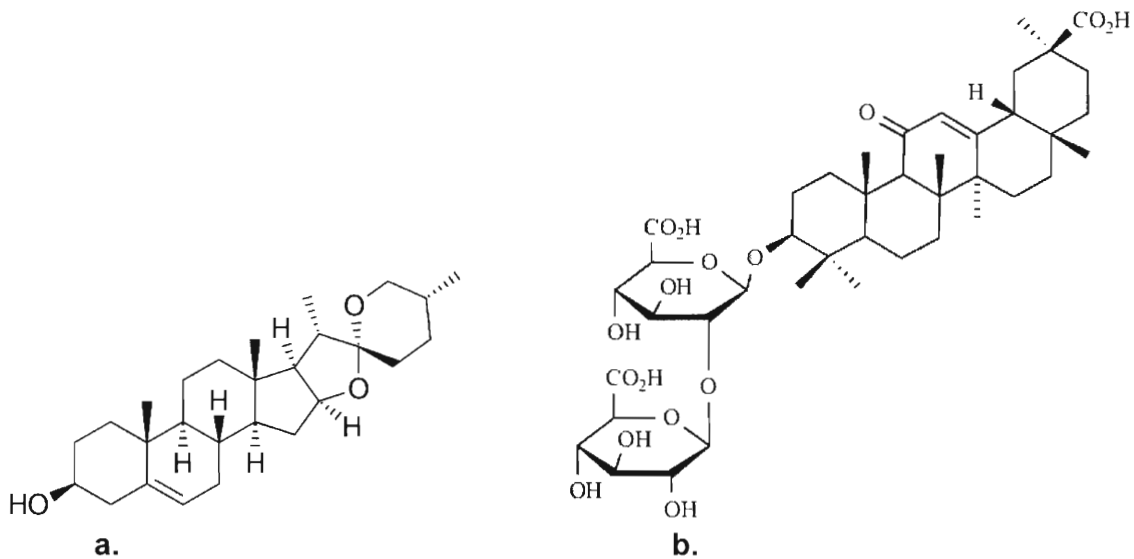


Fig. 1. Principii vegetale bio-active din extractele vegetale: **a.** Diosgenin din extractul de yam salbatic/*Discorea villosa*; **b.** Acid glicirizic din extractul de lemn dulce/*Glycyrrhiza glabra*