Nanoencapsulation des huiles des plantes extraites par CO2 supercritique pour des applications pharmaceutiques

Narimane Lammari

▶ **To cite this version:**

Narimane Lammari. Nanoencapsulation des huiles des plantes extraites par CO2 supercritique pour des applications pharmaceutiques. Sciences pharmaceutiques. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1038 . tel-03638328

HAL Id: tel-03638328

https://theses.hal.science/tel-03638328v1

Submitted on 12 Apr 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N°d'ordre NNT : 2021LYSE1038

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° ED 206
(Ecole Doctorale de Chimie)

Spécialité de doctorat :
Discipline : Génie Pharmaceutique

Soutenue publiquement le 25/02/2021, par :
(Narimane Lammari)

NANOENCAPSULATION DES HUILES DES PLANTES EXTRAITES PAR CO2 SUPERCRITIQUE POUR DES APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES

Devant le jury composé de :

BOURY Frank, Professeur, Université d'Angers, France	Rapporteur
ZEMANE Ahmed, Professeur, Université Oum El Bouaghi, Algérie	Rapporteur
MENIAI Abdeslam Hassen, Professeur, Université Constantine 3, Algérie	Examinateur
FESSI Hatem, Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1, France	Examinateur
GREIGE-GERGES Hélène, Professeure, Université Libanaise, Liban	Examinatrice
SAIDI-BESBES Salima, Professeure, Université Oran 1, Algérie	Examinatrice
BENTAHER Abderrazzak, Directeur de Recherche INSERM, Université Claude Bernard Lyon 1, France	Invité
LOUAER Ouahida, Professeure, Université Constantine 3, Algérie	Directrice de thèse
ELAISSARI Abdelhamid, Directeur de Recherche CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, France	Directeur de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

REMERCIEMENTS

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une convention en cotutelle entre l'Université de Salah Boubnider-Constantine 3 et l'Université de Claude Bernard-Lyon 1. Elle s'est déroulée au sein du Laboratoire de l'Ingénierie et de l'Environnement (LIPE, Constantine) et du Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEPP, Lyon).

Je tiens à témoigner ma profonde gratitude à ma directrice de thèse Madame **Ouahida LOUAER**, Professeure à l'Université de Constantine 3, pour l'honneur qu'elle m'a fait en me confiant ce sujet de thèse, pour ses précieux conseils scientifiques et pour l'aide inestimable qu'elle m'a apportée tout au long de la réalisation de ce travail. Elle a su me donner une grande liberté d'initiative tout en restant toujours présente pour discuter des difficultés que j'ai pu rencontrer. Je voudrais lui exprimer ici ma reconnaissance pour sa grande disponibilité, ses qualités humaines, ses précieux conseils et ses encouragements.

Je tiens à remercier profondément mon directeur de thèse, Monsieur **Abdelhamid ELAISSARI**, Directeur de recherche au CNRS (Lyon), pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche, pour l'intérêt qu'il a apporté à mon travail et pour l'avoir suivi avec attention et rigueur. J'ai été très sensible à sa grande disponibilité en dépit de ses responsabilités multiples, à ses qualités humaines et à la confiance qu'il m'a toujours accordée. Qu'il trouve ici l'expression de mon entière considération et ma profonde gratitude pour son soutien et sa disponibilité.

Mes remerciements s'adressent également à Professeur **Abdeslam Hassen MENIAI**, Doyen de la Faculté de Génie des Procédés- Université de Constantine 3, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour l'intérêt qu'il a porté à cette thèse que pour sa collaboration scientifique infaillible et ses conseils judicieux. Qu'il soit aussi remercié pour sa disponibilité permanente, pour les encouragements qu'il m'a prodigués et pour avoir bien voulu participer à mon jury de thèse.

Je tiens à remercier vivement Monsieur **Hatem FESSI**, Professeur à l'Université de Claude Bernard Lyon 1 (Lyon, France), pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail, pour ses suggestions toujours avisées et avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse.

J'associe à ces remerciements Monsieur **Frank BOURY**, Professeur à l'Institut à l'Université d'Angers (Angers, France) et Monsieur **Ahmed ZERMANE**, Professeur à

l'Université Larbi Benmhidi (Oum El Bouaghi, Algérie), pour avoir pris le temps d'examiner ces travaux en tant que rapporteurs et pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Je tiens également à adresser mes remerciements particuliers à Madame **Hélène GREIGE-GERGES**, Professeure à l'Université Libanaise (Fanar, Liban) et Madame **Salima SAIDI-BESBES**, Professeure à l'Université d'Oran 1 Ahmed Benbella (Oran, Algérie), pour l'honneur qu'elles me font en acceptant d'examiner mes travaux de recherche et de faire partie du jury de ma thèse.

Je tiens aussi à adresser mes vifs remerciements à toutes les personnes qui ont manifesté de l'intérêt pour cette étude et qui ont contribué à sa réalisation. Je pense particulièrement à :

Monsieur **Abderrazzak BENTAHER,** Directeur de recherche INSERM au service de l'inflammation et l'immunité de l'épithélium respiratoire, Hôpital Lyon sud (Lyon), qu'il trouve ici ma respectueuse gratitude pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour son soutien et ses précieux conseils.

Monsieur **Hervé CASABIANCA,** Directeur de recherche CNRS à l'Institut des Sciences Analytiques (Lyon), pour son accueil chaleureux et l'intérêt qu'il a porté au travail et son aide concernant les analyses chromatographiques.

J'exprime ma sincère gratitude à l'égard des permanents de LAGEPP et particulièrement à Madame **Géraldine AGUSTINI**, Responsable de l'analyse et des techniques instrumentales au LAGEPP, pour son assistance durant les analyses infrarouges et microscopiques.

J'adresse mes remerciements également à Monsieur **Chawki BENSOUICI**, Chef de service du Laboratoire de Biochimie au Centre National en Biotechnologie (Constantine), pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, et m'avoir procuré l'appui et l'aide pour accomplir ce travail.

Je profite de l'occasion qui m'est ainsi présentée pour exprimer ma reconnaissance à **Tanguy DEMAUTIS**, thésard à la Faculté de Médecine (Lyon Sud), à **Mehdi LOUAER**, Docteur en Génie Chimique, à la doctorante **Nour Houda ABDEREZZAK**, et à **Ismahane HALOUI,** Maître de Conférence à l'Université de Constantine 3 pour le temps qu'ils m'ont consacré et pour leur coopération.

J’en profite aussi pour remercier les permanents de la Faculté de Génie des Procédés, et particulièrement Professeure **Nawel OUTILI,** pour son aide précieuse, Mme **Hayet AMICHI**, Mme **Fatima Zohra BADAOUI,** Mme **Souheila FAATIT,** Melle **Chahra CHEIKH ZOUAOUI** et Melle **Hanane DAOUD** pour leurs qualités humaines.

Un grand merci à tous les techniciens, thésards et post-docs que j’ai rencontré au cours de ces quatre années et qui ont contribué, de près ou de loin, à la réussite de ce travail.

Narimane

DEDICACES

À Mes chers parents Hassen et Nabila ; aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Je n'arrive jamais à vous rendre tout ce que vous m'avez donné. Ce travail est le fruit des sacrifices que vous avez consentis pour ma formation le long de ces années. Que vous trouvez ici l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

À mon époux Bilal ; je ne saurais exprimer ma profonde reconnaissance pour le soutien continu dont tu as toujours fait preuve. Tu m'as toujours encouragé, incité à faire de mon mieux, ton soutien m'a permis de réaliser le rêve tant attendu. Merci à toi

À ma petite fille Racha ; aucune dédicace ne pourrait exprimer mon amour et mon attachement à toi

À mes chères sœurs (Choubeila et Dounia) ainsi que leurs petites familles pour m'avoir toujours poussée à travailler, pour vos encouragements permanents et votre soutien tout au long de mes années d'étude. Ces quelques lignes, ne sauraient traduire le profond amour que je vous porte.

À ma grande mère maternelle Yamina, je vous dédie cette thèse pour votre attention particulière, votre prière et votre amour inconditionnel.

À ma belle-famille ; je profite de la présente occasion pour vous remercier pour tout le soutien, la sympathie et l'amour que vous m'accordez

À mes tantes et oncles et leurs conjoints

À mes cousins et cousines

À ma très chère amie Hadjira. Pour toutes les épreuves que nous avons endurées, toutes les joies que nous avons partagées. Merci infiniment pour tout ce que tu m'as apporté et pour ce que tu représentes pour moi.

À tous ceux qui j'ai omis involontairement de citer

Narimane

TABLE DES MATIERES

Page

LISTE DES FIGURES …… xi
LISTE DES TABLEAUX ……... xiv
LISTE DES ABREVIATIONS ……... xvi
RESUME ……. xix

INTRODUCTION ……... 1

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES ……... 6
CHAPITRE I
GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES ET VEGETALES ET LEUR EXTRACTION …….. 7
1.1 Introduction ……... 8
1.2 Huiles végétales …… 9
1.2.1 Définition …….. 9
1.2.2 Composition chimique …….. 9
1.3. Huile végétale des noyaux de dattes ……... 13
1.3.1 Généralités sur le palmier dattier ……... 13
1.3.2 Répartition géographique du palmier dattier et production des dattes dans le monde ……... 14
1.3.3 Morphologie du palmier dattier …….. 15
1.3.4 Composition chimique des noyaux de dattes ……. 17
1.3.5 Composition chimique de l'huile des noyaux de dattes …. 19
1.3.6 Utilisation de l'huile des noyaux de dattes ……. 24
1.4 Huiles essentielles ……... 27
1.4.1 Définition ……... 27
1.4.2 Composition chimique ……... 27
1.5 Huile essentielle du costus indien ……... 30
1.5.1 Généralités sur le costus indien …….. 30
1.5.2 Répartition géographique du costus indien …… 31
1.5.3 Morphologie du costus indien …… 32
1.5.4 Composition chimique des racines du costus indien …….. 33
1.5.5 Composition chimique de l'huile de costus indien …… 36
1.5.6 Utilisation de l'huile de costus indien …….. 37
1.6 Extraction des huiles essentielles et végétales …… 40
1.6.1 Généralités …….. 40
1.6.2 Extraction par fluide supercritique ……. 40
1.6.3 Utilisation du CO_2 supercritique pour l'extraction de l'huile des noyaux de dattes et celle du costus …….. 42
1.7 Challenges dans l'utilisation des huiles essentielles et végétales... 43

CHAPITRE II
ENCAPSULATION DES HUILES ESSENTIELLES ET VEGETALES …….. 45
2.1 Introduction …… 46
2.2 Principe de la nanoencapsulation des huiles …….. 46
2.3 Nanoparticules polymères ……. 47
2.3.1 Définition ……..…….. 47
2.3.2 Caractéristiques physicochimiques ……. 47
2.4 Principaux polymères utilisés pour la conception des nanoparticules ……..... 50
2.4.1 Polymères naturels …… 50
2.4.2 Polymères synthétiques ……. 51
2.5 Méthodes de préparation des nanoparticules polymères ……. 54
2.5.1 Emulsion-évaporation du solvant …….. 60
2.5.2 Emulsion-diffusion du solvant …….. 60
2.5.3 Séchage par atomisation …… 60
2.5.4 Nanoprécipitation …….. 61
2.5.5 Gélation ionique ……. 62
2.6 Revue bibliographique sur l'utilisation de la nanoprécipitation pour l'encapsulation des huiles essentielles et végétales ……... 63
2.6.1 Matières premières utilisées …….. 63
2.6.2 Propriétés physicochimiques des nanoparticules polymères préparées par nanoprécipitation ……... 66
2.6.3 Paramètres affectant les propriétés colloïdales des nanoparticules préparées par nanoprécipitation …… 70

PARTIE EXPERIMENTALE …….. 74

CHAPITRE III
MATERIELS ET METHODES ……. 75
Stratégie du travail …….. 76
Partie 1 Extraction et analyse des huiles …… 77
3.1 Préparation des matrices végétales ……. 77
3.2 Pilote d'extraction par CO_2 supercritique …….. 77
3.3 Protocole de l'extraction supercritique ……... 79
3.4 Analyse de l'huile essentielle du costus indien …… 79
3.5 Analyse de l'huile végétale des noyaux de dattes …… 81
Partie 2 Etude paramétrique de la nanoprécipitation ……. 82
3.1 Préparation des nanoparticules vides ……. 82
3.2 Etude de l'effet de différents facteurs opératoires …… 82
3.2.1 Influence de la nature du solvant et du rapport volumique solvant/non-solvant …… 84
3.2.2 Influence de la quantité du polymère ……. 84
3.2.3 Influence de la vitesse d'agitation …….. 84
3.3 Caractérisation des nanoparticules vides …… 84
3.3.1 Diffusion dynamique de la lumière …… 84
3.3.2 Microscopie électronique à balayage ……. 84
Partie 3 Encapsulation des huiles dans des nanoparticules polymères …….. 86

3.1 Protocole de préparation ……. 86
3.2 Caractérisation des nanoparticules ……. 86
3.2.1 Diffusion dynamique de la lumière ……. 86
3.2.2 Microscopie électronique en transmission …….. 86
3.2.3 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourrier ……. 87
3.2.4 Efficacité d'encapsulation …….. 87
3.3 Stabilité colloïdale des nanoparticules ……... 88
3.4 Analyse statistique ……. 88
Partie 4 Etude des activités biologiques …….. 89
3.1 Stratégie du travail …….. 89
3.2 Activité anti-inflammatoire …… 89
3.2.1 Lignées cellulaires et conditions de culture ……... 89
3.2.2 Traitement des plaques …….. 89
3.2.3 Test de cytotoxicité …… 91
3.2.4 Observation microscopique des changements morphologiques cellulaires …… 92
3.2.5 Traitement cellulaire par lipopolysaccharide ……. 93
3.2.6. Etude quantitative des cytokines et des médiateurs inflammatoires ……... 93
3.2.7 Etude quantitative des métalloprotéases …… 94
3.3 Activité antioxydante ……. 96
3.3.1 Méthode de DPPH …… 97
3.3.2 Méthode d'ABTS ……... 98
3.3.3 Méthode de CUPRAC …… 99
3.3.4 Pouvoir réducteur ……..... 100
3.4 Activité enzymatique …….. 101
3.4.1 Activité anti-Alzheimer ……. 102
3.4.2 Activité antidiabétique ……... 103

CHAPITRE IV
RESULTATS ET DISCUSSION ……... 107
4.1 Introduction …… 108
4.2 Résultats de l'analyse des huiles …… 108
4.2.1 Analyse de l'huile des noyaux de dattes …… 108
4.2.2 Analyse de l'huile de costus …….. 110
4.3 Résultats de l'étude paramétrique de la nanoprécipitation ……. 111
4.3.1 Effet du rapport volumique solvant / non solvant et de la nature du solvant organique …… 113
4.3.2 Effet de la concentration en polymère …….. 116
4.3.3 Effet de la vitesse d'agitation …….. 117
4.3.4 Morphologie des nanoparticules vides …… 119
4.4 Caractérisation des nanoparticules chargées en huile des noyaux de dattes …….. 119
4.4.1 Résultats de l'analyse par diffusion dynamique de la lumière……. 119
4.4.2 Résultats de l'analyse par microscopie électronique …… 122

4.4.3 Résultats de l'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ……... 123
4.5 Caractérisation des nanoparticules chargées en huile de costus …. 124
4.5.1 Résultats de l'analyse par diffusion dynamique de la lumière……. 124
4.5.2 Résultats de l'analyse par microscopie électronique …… 127
4.5.3 Résultats de l'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ……... 127
4.6 Etude de stabilité des nanoparticules chargées d'huile ……... 128
4.7 Résultats des activités biologiques …….. 130
4.7.1 Résultats de l'activité anti-inflammatoire …… 130
4.7.2 Résultats de l'activité antioxydante ……. 137
4.7.3 Résultats de l'activité anti-Alzheimer …….. 141
4.7.4 Résultat de l'activité antidiabétique ……. 148

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES ……. 155

BIBLIOGRAPHIE ……... 159

LISTE DES ANNEXES …….. 182
Annexe A : Réactifs, produits chimiques et enzymes utilisés …… 183
Annexe B : Extraction de l'huile de costus …… 186
Annexe C : Conditions opératoires de la lyophilisation …… 189
Annexe D : Analyse des huiles par UV-Visible …… 190
Annexe E : Activité anti-inflammatoire …….. 193
Annexe F : Activité antioxydante …… 200
Annexe G : Activité enzymatique …… 202
Annexe H : Liste des Productions Scientifiques …… 204

Liste des Figures

Figure		Page
1.1	Situation de la médecine traditionnelle dans le monde, selon l'OMS 2003……	8
1.2	Représentation schématique des monoglycérides, diglycérides et triglycérides……	10
1.3	Composition moyenne en acide gras (%) de quelques huiles végétales…	10
1.4	Composants minoritaires des huiles végétales……...	12
1.5	Répartition géographique du palmier dattier …….	14
1.6	Production mondiale des dattes en tonnes (a) et en pourcentage (b) en 2015……	15
1.7	Présentation morphologique du palmier dattier…….	16
1.8	Présentation morphologique d'un noyau de datte……..	16
1.9	Représentation schématique de l'unité isoprène et de la formation des terpènes……..	28
1.10	Exemples de monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes…….	29
1.11	Exemples de phénylpropanoïdes…….....	29
1.12	Structures des indole, isothiocyanate, diallyl sulfide et 3 (Z) -hexène-1-ol…….	30
1.13	Répartition géographique du costus indien……	31
1.14	Présentation morphologique du costus indien…..……...	32
1.15	Diagramme de phases et coordonnées critiques de quelques fluides…….	41
1.16	Schéma simplifié d'une opération d'extraction par CO2 supercritique….	42
2.1	Types de nanoparticules polymères……	47
2.2	Représentation de la double couche électronique …….	48
2.3	Illustration de la structure chimique de quelques polymères naturels et synthétiques……	51
2.4	Mécanisme de la polymérisation radicalaire du méthacrylate de méthyle.	52
2.5	Propriétés des dérivés acryliques (Eudragit®)……	53
2.6	Structure chimique des dérivés acryliques (Eudragit®)……..	53
2.7	Méthodes de préparation de nanoparticules polymères……..	55
2.8	Microscopie électronique à balayage des nanoparticules contenant l'huile essentielle du romrin ……..	66
2.9	Microscopie électronique en transmission des nanoparticules vides (à gauche) et ceux contenant l'huile de citron vert (à droite)…….	66
2.10	Profil de libération de l'huile essentielle du *Zanthoxylum rhoifolium* L. à partir des nanoparticules de poly-ε-caprolactone ……..	68
2.11	Etude de stabilité des nanoparticules contenant l'huile de nigelle stockées pendant un mois à différente températures en termes de taille et du potentiel zêta …….	69
2.12	Effet de la concentration du polymère sur les propriétés colloïdales des nanoparticules polymères de poly-ε-caprolactone …….	71

2.13	Effet de la quantité d'huile sur les propriétés colloïdales des nanoparticules polymères de poly-ε-caprolactone ……	72
2.14	Effet de la quantité du tensioactif sur les propriétés colloïdales des nanoparticules polymères de poly-ε-caprolactone ……	72
2.15	Effet du rapport volumique : acétone / eau sur les propriétés colloïdales des nanoparticules polymères de poly-ε-caprolactone ……	73
3.1	Stratégie du travail expérimental……..……....	76
3.2	Illustration des matières végétales utilisées avant et après prétraitement ..	77
3.3	Schéma du pilote d'extraction par CO_2 supercritique…….	78
3.4	Préparation des nanoparticules de PMMA vides ……	82
3.5	Préparation des nanoparticules de PMMA chargées d'huile……..	86
3.6	Traitement cellulaire des plaques……...	90
3.7	Principe du test de cytotoxicité LDH……	92
3.8	Protocole de la zymographie de gélatine…….....	95
3.9	Mécanisme du piégeage du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)……	97
3.10	Protocole suivi pour l'étude de l'activité antioxydante ''DPPH''……..	98
3.11	Formation et piégeage de l'$ABTS^{\bullet+}$ en présence d'un agent antiradicalaire……..	98
3.12	Protocole suivi pour l'étude de l'activité antioxydante ''ABTS''……..	99
3.13	Principe de la méthode de CUPRAC (Réduction du complexe Cu^{2+}-néocuproïne…….	99
3.14	Protocole suivi pour l'étude de l'activité antioxydante ''CUPRAC''…….	100
3.15	Protocole suivi pour l'étude de l'activité antioxydante ''Pouvoir réducteur''……...	101
3.16	Mécanisme d'action de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase……..	102
3.17	Protocole suivi pour l'étude de l'activité anti-Alzheimer……...	103
3.18	Mécanisme d'action de l'α-amylase et de l'α-glucosidase…….	104
3.19	Schéma de la plaque utilisée pour l'étude de l'activité inhibitrice d'α-amylase……...	105
3.20	Protocole suivi pour l'étude de l'activité anti-glucosidase…….	106
4.1	Aspect de l'huile végétale des noyaux de dattes……....	108
4.2	Aspect de l'huile essentielle du costus. …….	110
4.3	Effet du rapport volumique solvant/non solvant sur le diamètre (a) et le potentiel zêta (b) des nanoparticules ……..	113
4.4	Distribution de taille des nanoparticules à base de PMMA à différents rapports volumiques solvant/non solvant (1/3, 2/5, 1/2, 2/3 et 1/1) pour l'acétone, l'éthanol et le méthanol …….....	115
4.5	Effet de la concentratio en polymère sur le diamètre (a) et le potentiel zêta (b) des nanoparticules…….....	116
4.6	Effet de la vitesse d'agitation sur le diamètre (a) et le potentiel zêta (b) des nanoparticules……...	118
4.7	Images de nanoparticules à base de PMMA préparées avec de l'acétone (a), de l'éthanol (b) et du méthanol (c) par microscopie électronique à balayage……..	119
4.8	Variation de couleur des suspensions de nanoparticules chargées d'huile des noyaux de dattes en fonction de la quantité d'huile incorporée……....	120

4.9 Effet de la quantité d'huile des noyaux de dattes sur la taille (a) et le potentiel ζ (b) des nanoparticules chargées……..……... 121
4.10 Corrélation entre la quantité du polymère (a), la quantité d'huile des noyaux de dattes (b) et le rayon cubique des nanoparticules…….. 122
4.11 Images de microscopie électronique à balayage (a) et de microscopie électronique en transmission (b) de nanoparticules de PMMA chargées d'huile des noyaux de dattes. ……. 123
4.12 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour l'huile des noyaux de dattes, le PMMA et les NP chargées…….. 124
4.13 Variation de couleur des suspensions de nanoparticules chargées d'huile essentielle du costus…… 125
4.14 Effet de la quantité d'huile de costus sur la taille (a) et le potentiel ζ (b) des nanoparticules chargées ……..…….. 126
4.15 Corrélation entre la quantité du polymère (a), la quantité de l'huile de costus (b) et le rayon cubique des nanoparticules……... 126
4.16 Images de microscopie électronique à balayage (a) et de microscopie électronique en transmission (b) des nanoparticules de PMMA chargées de l'huile de costus……. 127
4.17 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour l'huile de costus, le PMMA et les nanoparticules chargées…… 128
4.18 Stabilité des nanoparticules à base de PMMA chargées d'huile en termes de taille et de potentiel ζ……. 129
4.19 Stabilité des nanoparticules à base de PMMA chargées d'huile en termes de pH……... 130
4.20 Effet cytotoxique de l'huile de costus sous sa forme libre et encapsulée... 132
4.21 Observation microscopique de la morphologie cellulaire des A549…….. 133
4.22 Expression de l'ARNm des médiateurs inflammatoires (TNF-α, GM-CSF et l'IL-1β). …….. 134
4.23 Schéma du site actif (α-méthylène-γ-butyrolactone) du costunolide et du dehydrocostus lactone……. 135
4.24 Effet cytotoxique des nanoparticules vides et celles chargées en huile de costus à 25 µg/ml lors de la stimulation des A549 par LPS…… 135
4.25 Zymographie de gélatine pour MMP9 après traitement des cellules A549 avec nanoparticules vides et ceux contenant l'huile de costus à 25 µg/ml... 136
4.26 Analyse densitométrique après traitement des cellules A549 avec les nanoparticules vides et ceux contenant l'huile de costus à 25 µg/ml……. 137
4.27 Résultats de l'étude de l'activité antioxydante sur microplaque…… 139
4.28 Inhibition par l'huile de costus, les nanoparticules et la galantamine de l'acétylcholinestérase (a) et de la butyrylcholinestérase (b)…… 142
4.29 Mécanisme de l'addition de type Michael au fragment α-méthylène-γ-butyrolactone des lactones sesquiterpéniques……. 144
4.30 Inhibition par l'huile des noyaux de dattes, les nanoparticules et la galantamine de l'acétylcholinestérase (a) et de la butyrylcholinestérase (b) 146
4.31 Inhibition par l'huile de costus, les nanoparticules et l'acarbose de l'α-amylase (a) et de l'α-glucosidase (b)…….. 149
4.32 Inhibition par l'huile des noyaux de dattes, les nanoparticules et l'acarbose de l'α-amylase (a) et de l'α-glucosidase (b)……... 152

Liste des Tableaux

Tableau		Page
1.1	Différents composés bioactifs identifiés dans différentes variétés des noyaux de dattes……..	17
1.2	Composition en acide gras de l'huile des noyaux de dattes issues de différentes variétés……..	20
1.3	Composition en constituants minoritaires de l'huile des noyaux de dattes issues de différentes variétés…….	22
1.4	Différentes utilisations de l'huile des noyaux de dattes…….....	24
1.5	Sesquiterpènes isolés des racines du costus indien…..……....	34
1.6	Utilisations médicinales de l'huile des racines du costus indien et de ses constituants ……..……....	37
1.7	Exemples de travaux réalisés à propos de l'utilisation du CO_2 supercritique pour l'extraction de l'huile des noyaux de dattes…….	43
2.1	Stabilité des nanofluides pour différentes valeurs de potentiel zêta……..	49
2.2	Différentes méthodes d'encapsulation d'huiles essentielles et végétales……	56
2.3	Utilisation de la nanoprécipitation pour l'encapsulation des huiles essentielles et végétales dans des nanoparticules……...	64
3.1	Conditions opératoires de l'extraction supercritique de l'huile des noyaux de dattes et celle du costus…….	79
3.2	Conditions opératoires des analyses par chromatographie en phase gazeuse……..	80
3.3	Conditions opératoires des analyses par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ……	80
3.4	Effet de différents paramètres sur la taille des particules et le potentiel ζ des nanoparticules vides à base de PMMA. ……	83
4.1	Composition chimique de l'huile végétale de noyaux de dattes déterminée par chromatographie en phase gazeuse……..	109
4.2	Composition chimique de l'huile essentielle du costus déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse..	111
4.3	Résultats du diamètre et du potentiel zêta pour les différentes formulations synthétisées ……	112
4.4	Résultats du diamètre, du potentiel ζ et d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules chargées en huile des noyaux de dattes ……	120
4.5	Résultats du diamètre et du potentiel ζ des nanoparticules chargées en huile essentielle du costus ……	125
4.6	Résultats des taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules chargées en huile des noyaux de dattes en fonction du temps et de la température ……...	130
4.7	Résultats des tests DPPH, ABTS, CUPRAC et pouvoir réducteur de l'huile des noyaux de dattes, des nanoparticules chargées et des standards ……...	138

4.8 Résultats de la mesure des CI50 et des A0.8 de l'huile des noyaux de dattes, des nanoparticules chargées et des standards pour les différents tests (DPPH, ABTS, CUPRAC et pouvoir réducteur). …… 140
4.9 Résultats de l'activité anticholinestérase de l'huile de costus, des nanoparticules et de la galantamine …….. 143
4.10 Concentrations d'inhibition de 50% des enzymes cholinestérases pour l'huile de costus, les nanoparticules et la galantamine …….. 144
4.11 Résultats de l'activité anticholinestérase de l'huile des noyaux de dattes, des nanoparticules et de la galantamine …… 147
4.12 Concentrations d'inhibition de 50% des enzymes cholinestérases pour l'huile des noyaux de dattes, les nanoparticules et la galantamine …… 147
4.13 Résultats de l'activité antidiabétique de l'huile de costus, des nanoparticules et de l'acarbose ……. 149
4.14 Concentrations d'inhibition de 50% d'α-amylase et d'α-glucosidase pour l'huile de costus, les nanoparticules et l'acarbose …… 150
4.15 Résultats de l'activité antidiabétique de l'huile des noyaux de dattes, des nanoparticules et de l'acarbose ……. 153
4.16 Concentrations d'inhibition de 50% d'α-amylase et d'α-glucosidase pour l'huile des noyaux de dattes, les nanoparticules et l'acarbose ……... 153

Liste des Abréviations

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
HV : Huile Végétale
HE : Huile essentielle
CO2 : Dioxyde de Carbone
UV : Ultra-Violet
ADN : Acide Désoxyribonucléique
CAT : Catalase
SOD : Superoxide Dismutase
GPx : Glutathione Peroxidase
CI_{50} : Concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % des radicaux libres
DDPH : 1,1-Di Phényl-2-Picryl Hydrazyle
PE : Pouvoir Etalement
HCl : Acide hydrochlorique
CL50 : Concentration léthale
TNF-α : Facteur de Nécrose Tumorale
IL : Interleukine
IFN-γ : Interféron-gamma
MPO : Myéloperoxydase
MCP : Protéine Chimioattractive des Monocytes
COX-2 : Cyclooxygénase
iNOS : Oxyde Nitrique Syntase
NF—B : Facteur Nucléair-kappa B
LPS : Lipopolysaccharide
NO : Oxyde Nitrique
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
Pc : Pression Critique
Tc : Température Critique
NP : Nanoparticules Polymères
DLS : *Dynamic Light Scattering*
PCS : Spectroscopie de Corrélation de Photons
d_h : Diamètre hydrodynamique
T : Température
k_B : Constante de Boltzman
η : Viscosité de la phase de diffusion
D_0 : Coefficient de diffusion
ζ : Potentiel zêta
μ_e : Mobilité électrophorétique
c : Constante qui vaut 1 ou 2/3
ε : Constante diélectrique du milieu
r : Rayon des nanoparticules
EE% : Efficacité d'Encapsulation
DL : *Drug loading*

PMMA : Poly (Méthyl Méthacrylate)
HPMC : Hydroxypropyl méthylcellulose
R : Rendement de l'extraction
P_H : Poids de l'huile extraite
P_P : Poids de la plante traitée
CPG : Chromatographe en Phase Gazeuse
FID : Détecteur à Ionisation de Flamme
MS : Spectrométrie de Masse
NaCl : Chlorure de sodium
MEB : Microscopie Electronique à Balayage
SEM : *Scanning Electron Microscopy*
MET : Microscopie Electronique en Transmission
TEM : *Transmission Electron Microscopy*
FTIR : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
NaOH : Hydroxyde de sodium
DMEM/F : *Dulbecco's Modified Eagles Medium-Nutrient Mixture F-1*
FBS : *Fetal Serum Bovine*
DMSO : Diméthyl Sulfoxide
LDH : Lactate Déshydrogénase
ARN : Acide Ribonucléique
qPCR : *Quantitative Polymerase Chain Reaction*
PBS : *Phosphate Buffered Saline*
RT-PCR : *Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction*
ADNc : ADN complémentaire
GM-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages
Ct : *Thershold Cycle*
MMP : Métalloprotéases
BHA : Hydroxyanisole butylé
A : Absorbance
ABTS : 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
CUPRAC : *Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity*
A0.5 : Concentration correspondant à 0.50 d'absorbance
CI50 : Concentration fournissant 50% d'inhibition enzymatique
IKI : Iodure de potassium-Iode
S/NS : Solvant / Non Solvant
Vns : Volume molaire du solvant
δs : Solubilité Hildebrand du solvant
δns : Solubilité Hildebrand du non solvant
R : Constante des gaz
X : Affinité du solvant pour le non solvant
m : Quantité de polymère ou d'huile
Np : Nombre de particules
d : Densité
% : Pourcentage
m : Mètre
g : Gramme
cm : Centimètre

mg	: Milligramme
Kg	: Kilogramme
M	: Molaire
mM	: Millimolaire
ET	: Equivalent témoin
µg	: Microgramme
ml	: Millilitre
µM	: Micromolaire
K	: Kelvin
nm	: Nanomètre
Mv	: Millivolt
KDa	: Kilo Dalton
min	: Minute
°C	: Degré Celsius
µl	: Microlitre
N	: Normal
rpm	: Tour / minute
h	: Heure

RESUME

Le recours aux plantes à des fins médicinales est connu depuis la nuit des temps dans différentes cultures. Au cours de ces dernières années, des efforts ont été consacrés à la pratique de la phytothérapie en tant que médecine alternative ou complémentaire dans le but d'éviter les effets indésirables liés aux médicaments d'origine synthétiques. Parmi la diversité des constituants de plante utilisés en phytothérapie, les huiles essentielles et végétales continuent à être utilisées en première intention. L'utilisation des huiles est souvent confrontée par leur dégradation et leur biodisponibilité réduite dans le corps humain. Par conséquent, des systèmes de la nanoencapsulation sont conçus pour surmonter les contraintes physicochimiques susmentionnés.

L'objectif de cette étude est la nanoencapsulation de l'huile essentielle des racines du costus indien (*Saussurea lappa* CB. Clarke.) et l'huile végétale des noyaux de dattes (*Phoenix dactylifera* L.) extraites par un procédé innovant et respectueux de l'environnement (extraction par dioxyde de carbone supercritique) dans des nanoparticules polymères et l'étude de leurs performances thérapeutiques.

Trois axes ont été abordés dans ce travail. Le premier a porté sur l'extraction des huiles ainsi que leur analyse qualitative et quantitative par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Le deuxième a porté sur l'encapsulation des huiles dans des nanoparticules polymères à base de dérivés de poly (méthyl méthacrylate) (Eudragit® RS100) par la technique de la nanoprécipitation après avoir été optimisée et la caractérisation des nanocapsules obtenues. Le dernier axe a porté sur l'étude de l'activité anti-inflammatoire, anti-Alzheimer, antidiabétique et antioxydante.

Les résultats de l'analyse des huiles ont montré la prédominance de l'acide oléique (47.7%) et du dehydrocostus lactone (55.4%) pour l'huile végétale et essentielle, respectivement. L'Eudragit RS®100 est capable d'encapsuler avec succès les deux types d'huiles dans des particules de taille comprise entre 145 et 217 nm avec un potentiel ζ de +45 à +59mV et une excellente stabilité à différentes températures et pH. De plus, les nanoparticules chargées d'huile des noyaux de dattes ont montré une activité antidiabétique supérieure à celle du médicament standard, une activité anti-Alzheimer modérée et une faible activité antioxydante. Celles chargées d'huile de costus ont révélé des activités anti-inflammatoire, antidiabétique et anti-Alzheimer pertinentes.

A travers cette thèse, nous avons mis en évidence le potentiel prometteur des nanoparticules polymères à améliorer les performances biologiques des huiles naturelles et qu'elles constituent des alternatives intéressantes par rapport aux différents médicaments d'origine synthétique dans la prise en charge de la maladie d'Alzheimer, du diabète et des maladies inflammatoires.

Mots clés : Encapsulation, huile de costus indien, huile des noyaux de dattes, nanoparticules polymères, Eudragit® RS100, nanoprécipitation

ABSTRACT

The use of plants for medicinal purposes has been known since ancient times in different cultures. In recent years, efforts have been devoted to the use of herbal medicine as a form of alternative therapy to avoid the adverse effects related with conventional chemically synthesized drugs. Among the vastness of plant products, essential and vegetable oils deserve peculiar attention. The use of plant oils is always confronted by their susceptibility to degradation and their reduced bioavailability in the human body. Therefore, nanoencapsulation systems (nanocarriers) were designed to overcome the aforementioned physicochemical drawbacks.

The objective of this study was the nanoencapsulation of costus roots essential oil (*Saussurea lappa* CB Clarke). and date palm seeds vegetable oil (*Phoenix dactylifera* L.) extracted by an innovative and an environmentally friendly technique (Supercritical fluid extraction) in polymeric nanoparticles and the investigation of their therapeutic performances.

Three axes were addressed in this work. The first one dealt with the extraction of oils and their qualitative and quantitative analysis by Gas chromatography- mass spectrometry. The second one is addressed to the encapsulation of plant oils in poly (methyl methacrylate) derivative (Eudragit® RS100) based- polymeric nanoparticles using the nanoprecipitation technique after having been optimized and the characterization of the obtained nanocapsules. The last part focused on the study of the anti-inflammatory, anti-Alzheimer, anti-diabetic and antioxidant activities.

The results of the oil analysis showed the predominance of oleic acid (47.7%) and dehydrocostus lactone (55.4%) for vegetable and essential oils, respectively. Eudragit RS®100 is able to successfully encapsulate both types of oils in nanocapsules in the nanoscale range (from 145 to 217nm) with zeta potential between +45 and + 59mV and excellent stability at different temperatures and pH. In addition, the date seeds oil-loaded nanoparticles showed superior anti-diabetic activity than the standard drug, moderate anti-Alzheimer's activity, and low antioxidant activity. While costus oil loaded nanoparticles exerted relevant anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-Alzheimer's activities.

Through this thesis, we have demonstrated the promising potential of polymeric nanoparticles to improve the biological performance of natural oils and found that the studied oils-loaded nanoparticles constitute interesting alternatives of synthetic drugs in the management of Alzheimer, diabetes and inflammatory diseases.

Key words : Encapsulation, costus roots oil, date seed oil, polymeric nanoparticles, Eudragit® RS100, nanoprecipitation

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

La quête de remèdes au sein du règne végétal date de plusieurs millénaires. Actuellement, la médecine connaît un engouement extraordinaire à travers le monde par l'utilisation des plantes aromatiques et médicinales [1]. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), entre 70 et 95 % de la population mondiale contemporaine a eu recours à la médecine traditionnelle pour satisfaire ses besoins en soins de santé primaire [2]. Ce regain d'intérêt repose essentiellement sur la force d'innovation dans le secteur de l'industrie pharmaceutique pour répondre aux besoins d'un marché toujours plus exigeant en termes de coût, d'accessibilité et d'efficacité. En effet, la médecine traditionnelle est plus abordable, plus proche de l'idéologie du patient et reçoit un meilleur accès du public par rapport aux médicaments d'origine synthétique [3]. En outre, l'utilisation abusive et / ou incorrecte des médicaments conventionnels entraîne dans certains cas des effets secondaires nocifs [4]. On estime que 10 à 20% des complications sont dues aux effets secondaires de ces médicaments [5].

Les plantes produisent une grande variété de métabolites secondaires aux vertus bénéfiques pour l'homme ; parmi eux, les huiles essentielles et végétales requièrent une attention particulière [6–9]. Les huiles essentielles (HE) comprennent des composés organiques volatils et peu-volatils déterminant l'arôme, la saveur et le parfum spécifiques des plantes. Elles sont instables à température ambiante. En revanche, les huiles végétales (HV) sont constituées d'esters de glycérol et d'acides gras et sont non volatiles et stables à température ambiante [10,11].

Récemment, les HE et HV ont fait l'objet d'un grand nombre de travaux de recherches et de développement dans plusieurs domaines en raison de leurs activités biologiques. Etant comestibles sous leur forme raffinée ou vierge, les HV jouent un rôle crucial dans la prévention thérapeutique et prophylactique des maladies telles que l'inflammation, le diabète, le cancer et l'athérosclérose [12–15]. Simultanément, les HE connaissent une émergence considérable en raison de leur propriétés antioxydantes, antibactériennes, antifongiques, antivirales, antimutagènes, anti-carcinogènes et anti-inflammatoires. Les bénéfices attendus par la consommation des HE ou de leurs dérivés ont été largement étudiés [16,17]. Parallèlement aux fins médicinales, l'application des HE s'étend à l'industrie agroalimentaire.

Plusieurs rapports ont mis en évidence l'efficacité des HE par rapport aux conservateurs chimiques pour prévenir la croissance d'agents pathogènes et retarder la détérioration des aliments [18,19]. De plus, les HE trouvent de nombreux débouchés dans le secteur agricole où elles remplacent les pesticides synthétiques qui sont plus toxiques ou auxquels les parasites ont montré une résistance [20].

Une grande diversité des procédés a été mise au point et est utilisée dans le domaine de l'extraction solide- liquide de façon à obtenir un rendement en huile maximum tout en garantissant un produit extrait de qualité dans un état chimique très proche de sa structure native [21]. La plupart des procédés d'extraction classiques utilisent des solvants organiques (tels que le méthanol, l'éthanol, l'hexane, l'acétone, etc.) ou l'eau et se réalisent, généralement, à pression atmosphérique [22]. Sous l'impulsion de réduire l'utilisation de solvants organiques toxiques et en vue d'atteindre la meilleure qualité d'extrait, les plus hauts taux de rendement avec un procédé respectant le concept de la chimie verte [23], des technologies innovantes utilisant les fluides supercritiques tel que le CO_2 sont développées.

Au voisinage du point critique, le pouvoir solvant du CO_2 varie largement avec les changements de température et de pression. La séparation de l'huile et du CO_2 est très facile et s'effectue par simple détente. De plus, ses propriétés de transport à l'état supercritique (diffusivité, viscosité …) assurent une pénétration plus profonde dans la matière végétale et donc une extraction efficace et rapide [22]. Dernièrement, l'extraction des HE par CO_2 supercritique a connu un engouement sans précédent vu le grand nombre de travaux publiés [24–29].

Toutefois, l'utilisation des HE est généralement entravée par leur faible solubilité dans l'eau, leur volatilité et leur sensibilité aux conditions environnementales (lumière, chaleur, oxygène) [30]. Hădărugă et al. ont rapporté que les HE sensibles à la chaleur et/ou l'oxydation peuvent être dégradées pendant la formulation, le transport et le stockage au point qu'elles deviennent inefficaces, voire néfastes avec la formation de dérivés toxiques [31]. Plusieurs exemples sont liés à cet aspect, citant la dégradation du safrole en métabolites cancérigènes [32], l'oxydation du pinène en dérivés oxydés nocifs [33], ou la dégradation du linalol ou du caryophyllène en dérivés oxygénés allergisants [34]. Le même comportement se produit avec les HV où l'oxydation peut générer des produits toxiques qui affectent les tissus biologiques. De plus, les acides gras insaturés présents dans les HV augmentent le

risque d'oxydation lipidique qui à son tour entraîne la production de radicaux libres ; des produits d'oxydation primaires tels que les hydro peroxydes lipidiques et des produits d'oxydation secondaires à savoir les hydrocarbures, les époxydes, les cétones et les aldéhydes ; qui ont un impact négatif sur le goût des HV [35,36]. Outre tout cela, la faible solubilité dans l'eau, la faible perméabilité et la faible biodisponibilité des HV dans les fluides et les tissus biologiques constituent d'autres facteurs qui limitent leur utilisation rationnelle [11].

Dans le domaine pharmaceutique, la mise au point de nanovecteurs innovants basés sur le concept de l'encapsulation des substances bioactives est en plein essor. A l'heure actuelle, les nanoparticules polymères (NP) ont suscité un intérêt grandissant par rapport aux autres systèmes d'encapsulation [37,38]. Différents avantages sont mis en avant comme la protection des huiles contre les facteurs environnementaux grâce à la présence d'une membrane polymérique entourant l'huile, une protection contre l'irritation de la peau et des tissus, une amélioration de la biodisponibilité, mais aussi un meilleur confort pour les patients (prises répétitives). Ainsi, les NP apparaissent comme une réponse à de nombreux problèmes posés par les HE et HV de nature lipophile pour améliorer la prise en charge des pathologies [11,39]. Les NP font appel aux polymères naturels et synthétiques. Par ailleurs, les polymères synthétiques sont plus avantageux en termes de pureté et de reproductibilité [40,41]. Parmi la variété des polymères synthétiques, Eudragit ® RS 100, un copolymère d'acrylate d'éthyle, de méthacrylate de méthyle et de méthacrylate de chlorotriméthylammonium éthylique avec 4.5−6.8% de groupes ammonium quaternaire, a été largement utilisé dû au fait qu'il est biocompatible, non toxique, non irritant et fournit une libération contrôlée aux actifs encapsulés [42–45].

Dans le contexte de la formulation des huiles extraites des plantes s'inscrit ce travail de thèse qui a été réalisé au niveau du Laboratoire de l'Ingénierie des Procédés de l'Environnement (Faculté de Génie des Procédés, Université Constantine 3) et du Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (Université Claude Bernard Lyon 1). Il porte principalement sur l'encapsulation des huiles extraites des plantes par CO_2 supercritique dans des nanoparticules polymères pour des fins thérapeutiques. C'est dans cette perspective que nous nous sommes intéressés à étudier deux types d'huile, très connues pour leurs propriétés bioactives, et qui n'ont jamais été encapsulées dans des nanoparticules polymères d'Eudragit

® RS 100. Il s'agit de l'HE du costus, extraite des racines du costus indien (*Saussurea lappa* CB. Clarke) ; et l'HV du palmier dattier, extraite des noyaux de dattes (*Phoenix dactilyfera* L.).

Le travail présenté dans ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres

Le premier chapitre bibliographique est dédié aux généralités sur les huiles essentielles et végétales et leurs compositions y compris leur extraction par fluide supercritique. Nous décrirons ensuite les deux plantes utilisées dans ce travail. L'illustration des problèmes rencontrés lors de l'utilisation des huiles sous leur forme libre constituera la fin de cette partie.

Le deuxième chapitre met en évidence l'intérêt des nanoparticules polymères en tant que vecteur d'huile pour une application thérapeutique. Nous présenterons les concepts fondamentaux de l'encapsulation en développant la technologie de la nanoprécipitation et les différents travaux de la littérature traitant ce procédé d'encapsulation.

Quant à la partie expérimentale, elle comporte quatre sections regroupées dans le chapitre trois. La première section porte sur l'extraction des huiles par CO_2 supercritique et leur analyse par chromatographie. Le second volet consiste en une étude paramétrique de la nanoprécipitation pour identifier et optimiser les différents paramètres influençant les propriétés colloïdales des nanoparticules à base d'Eudragit ® RS 100 telles que la taille des particules et leur charge de surface. La troisième section de cette partie expérimentale sera dédiée à l'encapsulation de l'huile des noyaux de dattes et celle de costus dans les nanoparticules optimisées ainsi que leur caractérisation. Tandis que la dernière partie sera consacrée à l'étude des effets thérapeutiques *in vitro* des huiles sous leurs formes libres et encapsulées.

Dans le chapitre quatre tous les résultats seront présentés avec leur discussion.

Enfin la conclusion générale fera le bilan du travail réalisé avec les perspectives futures.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES ET VEGETALES ET LEUR EXTRACTION

CHAPITRE I
GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES ET VEGETALES ET LEUR EXTRACTION

1.1. Introduction

Les plantes s'imposent dans la nature par leur aspect, leur mystère et leur exubérance. Au fil des siècles, l'homme ne se limitait pas à consommer des plantes, ils s'en servait aussi pour se soigner [5,46]. Les plantes médicinales ont constitué le pilier de la médecine traditionnelle.

La Pharmacopée Française (11ème édition) définit les plantes médicinales comme « *des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Ces plantes médicinales peuvent aussi avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques»*[47]. Pendant la dernière décennie, l'utilisation des plantes a connu un regain d'intérêt dans le monde pour leurs vertus médicinales [48], comme illustré dans la **Figure 1.1.**

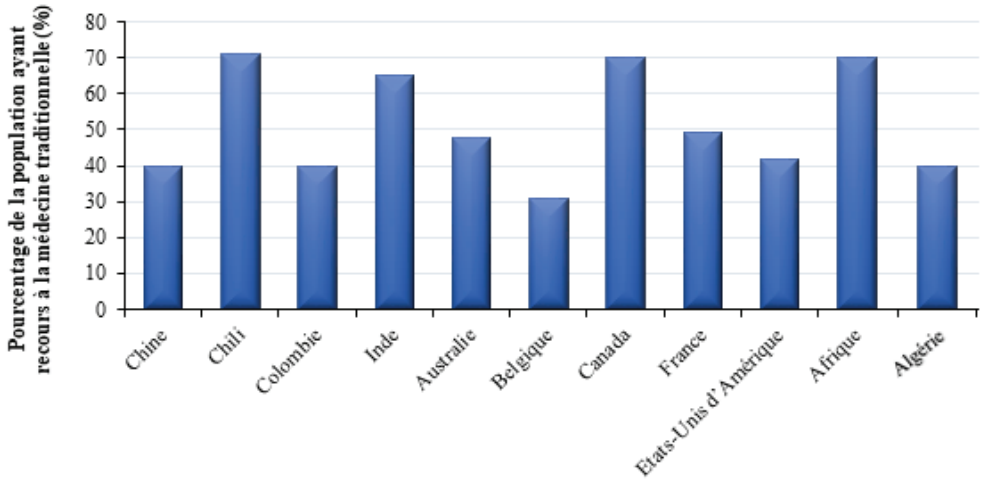


Figure 1.1. Situation de la médecine traditionnelle dans le monde, selon l'OMS 2003.

Les plantes médicinales nous procurent de nombreuses substances bioactives; parmi lesquelles les huiles essentielles et végétales ont suscité un grand intérêt [6–9]. En plus de leur utilisation médicinale, les huiles trouvent de nouvelles embauches dans plusieurs secteurs, principalement en agroalimentaire, en textile et font aussi l'objet d'une énorme

consommation en parfumerie et en cosmétique où elles sont appréciées pour leurs propriétés organoleptiques. Dans ce chapitre sont présentées :

- ✓ Des généralités sur les huiles essentielles et végétales et leurs compositions chimiques.
- ✓ Une description botanique des deux plantes étudiées « le palmier dattier » et « le costus indien » en spécifiant les composants majoritaires et minoritaires des deux matrices et de leurs huiles.
- ✓ Le principe d'extraction par CO_2 supercritique adopté dans cette étude ainsi que les problèmes qui entravent l'utilisation des huiles.

1.2. Huiles végétales

1.2.1. Définition

Les huiles végétales (HV), également appelées huiles non essentielles ou huiles fixes, sont des matières grasses, non volatiles, onctueuses, épaisses, insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques. Si les huiles essentielles (HE) sont extraites des plantes aromatiques, les HV, proviennent essentiellement de plantes oléagineuses (du latin « oleago » : « qui contient de l'huile ») [49]. Elles sont généralement extraites des graines (soja, sésame, tournesol etc.), ou moins souvent d'autres parties comme le péricarpe de certains fruits (olive, avocat etc.), par simple pressage et / ou procédé d'extraction au solvant [8]. Les HV se différencient des graisses par leur point de fusion. Les graisses sont plus ou moins solides à la température de 15°C, tandis que les huiles sont des corps gras liquides à cette température [50].

1.2.2. Composition chimique

Les HV sont composées d'une grande variété de constituants selon leur origine, leur type de culture et le mode et la période de récolte [51]. Elles sont composées de :

A. Triglycérides

Les triglycérides, autrement nommés triacylglycérols, représentent 95 à 98% du poids total de l'huile [8]. Les triglycérides résultent de l'estérification d'une molécule de trialcool (glycérol) avec trois molécules d'acides gras (R-COOH) (**Fig.1.2**).

Les caractéristiques des HV dépendent de plusieurs paramètres, y compris ; la longueur et le degré d'insaturation de la chaîne carbonée des acides gras et la stéréochimie des doubles liaisons [52]. De plus, les variétés climatiques, agronomiques et culturales

peuvent engendrer une différence dans la composition en acides gras des triglycérides [8] **(Fig.1.3).**

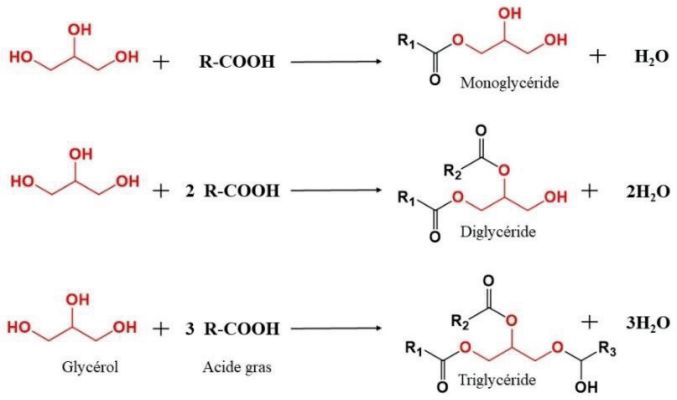


Figure I.2. Représentation schématique des monoglycérides, diglycérides et triglycérides.

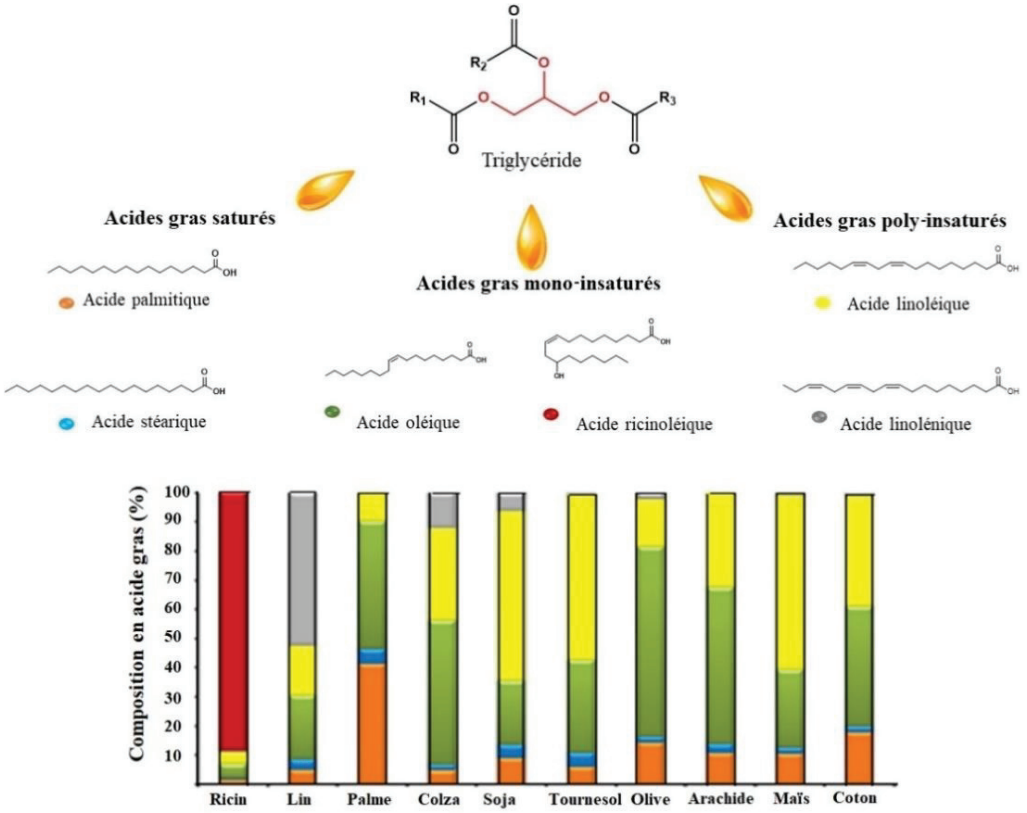


Figure 1.3. Composition moyenne en acide gras (%) de quelques huiles végétales.

B. Composants minoritaires

Outre les triglycérides, les HV contiennent également divers composants minoritaires (moins de 5%) présentant des propriétés biologiques et des valeurs nutritionnelles cruciales [8]. Ces composants comprennent deux groupes les glycérolipides comme les mono- et diglycérides et les phospholipides et les non glycérolipides tels que les tocols, les stérols, les acides gras libres, les pigments, les vitamines, les composés phénoliques, les protéines, l'eau, etc. (**Fig.4)** [53].

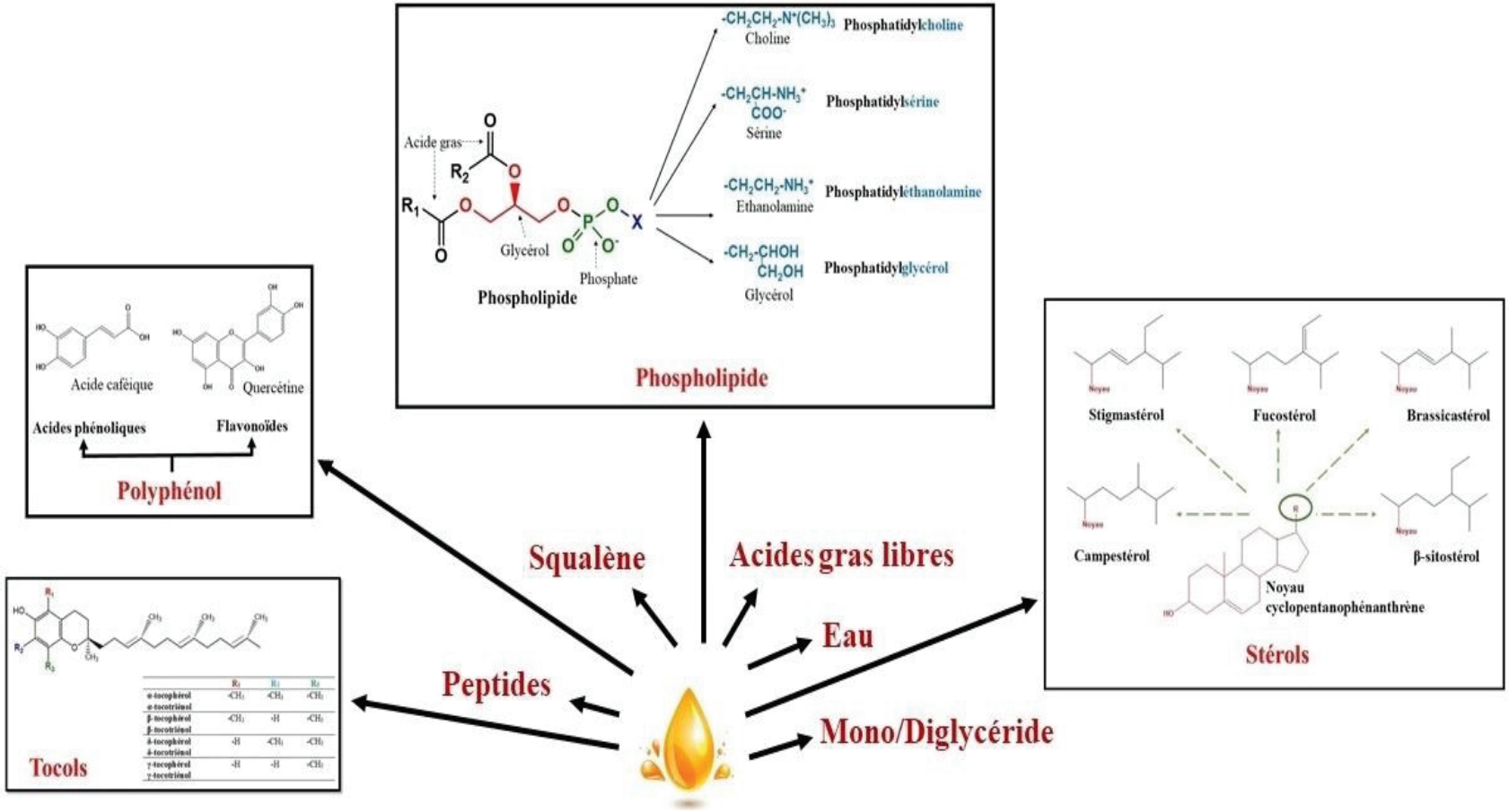


Figure 1.4. Composants minoritaires des huiles végétales.

1.3. Huile végétale des noyaux de dattes

La datte, le fruit du palmier dattier, a toujours été considérée depuis les temps immémoriaux un élément important de l'alimentation tant pour les humains que pour les animaux due à sa valeur nutritive et énergétique inégalable. En plus de sa consommation directe, la datte est utilisée comme matière première en industrie alimentaire (la pâte de dattes [54], la farine de dattes [55], les jus [56], les sirops [57], la confiserie [58], le vinaigre [59], l'alcool [60], etc.). Les bénéfices attendus par la consommation des dattes sont largement documentés [61–64].

Les noyaux de dattes sont des sous-produits (déchets) issus de plusieurs procédés de transformation de dattes. Actuellement, ils sont devenus un problème environnemental majeur pour les zones de production et de transformation. En effet, des tonnes de noyaux de dattes sont quotidiennement jetées comme matière indésirable ou utilisées principalement pour l'alimentation des bovins, des moutons et des chameaux [65]. La littérature fait état de plusieurs travaux consacrés à la recherche de solutions à ce problème et à valoriser ces sous-produits [66–68].

1.3.1. Généralités sur le palmier dattier

Le palmier dattier est connu, depuis des décennies, comme le pilier des écosystèmes oasiens. Il permet de protéger contre le rayonnement solaire et de limiter les dégâts d'ensablement dans ces zones désertiques. Le nom systématique du dattier, *Phoenix dactylifera* L., provient du mot « phoenix » qui indique dattier chez les phéniciens, et « dactylifera » qui dérive du terme « dactulos » signifiant un doigt chez les grecs, allusion faite à la forme du fruit [69]. Le palmier dattier est une plante dioïque, monocotylédone, arborescente, cultivée dans les régions arides et semi-arides et retrouvée entre 10° et 39° d'altitude nord [70]. La classification systématique du palmier dattier est comme suit :

- ✓ **Règne** : Plantae
- ✓ **Division** : Magnoliophyta
- ✓ **Classe** : Liliopsida
- ✓ **Ordre** : Arecales
- ✓ **Famille** : Arecaceae
- ✓ **Genre** : Phoenix
- ✓ **Espèce** : *Phoenix dactylifera* L.

Le genre Phoenix comporte près de douze espèces dont l'espèce *Phoenix dactylifera* constitue le véritable palmier dattier. Les fruits « dattes » font l'objet d'un commerce international important [71].

1.3.2. Répartition géographique du palmier dattier et production des dattes dans le monde

La datte se place au 5e rang des fruits les plus cultivés dans les régions arides et semi-arides, après les agrumes, la mangue, la banane et l'ananas (**Fig.1.5**).

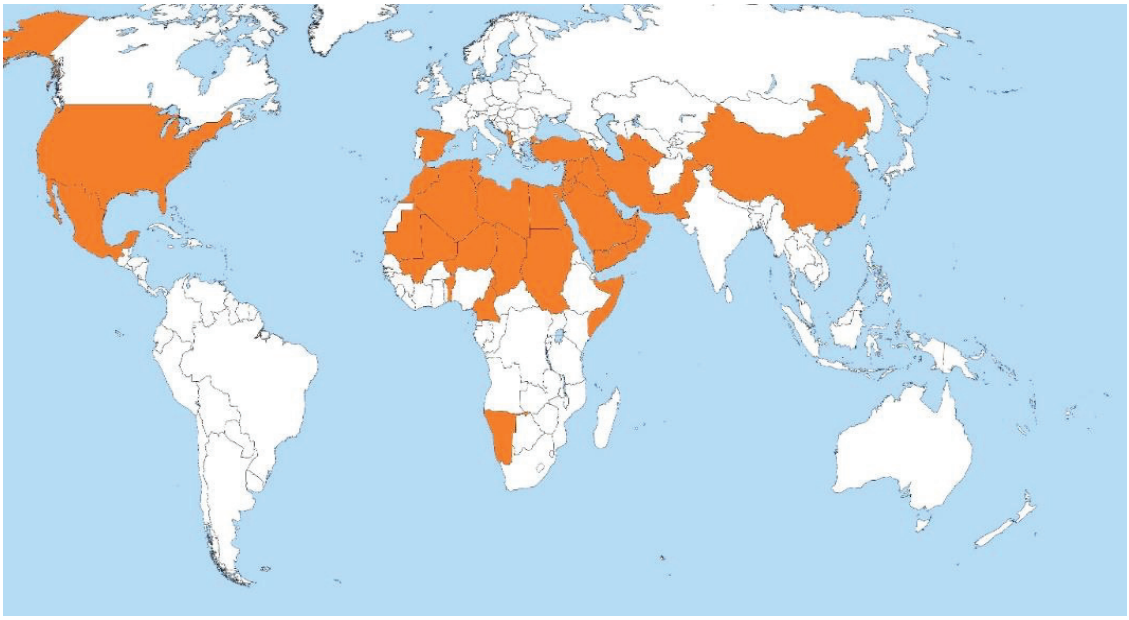
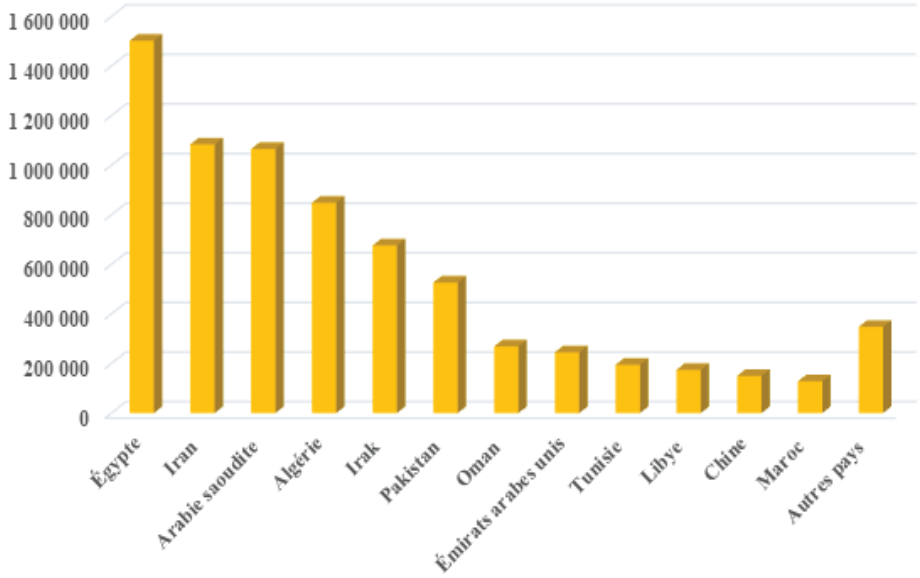


Figure 1.5. Répartition géographique du palmier dattier.

La production mondiale de dattes varie autour de 7 millions de tonnes par année [72]. Concentrée à 90% au Moyen-Orient et en Afrique du Nord. Les principaux pays producteurs sont l'Égypte, l'Iran, l'Arabie saoudite, l'Algérie et le Pakistan (**Fig.1.6**)[73]. Aux Etats-Unis d'Amérique, la culture du palmier n'a débuté que vers les années 1900 avec l'importation des variétés irakiennes. En Europe, l'Espagne est l'unique pays producteur des dattes principalement dans la célèbre palmeraie d'Elche [73].

a.



b.

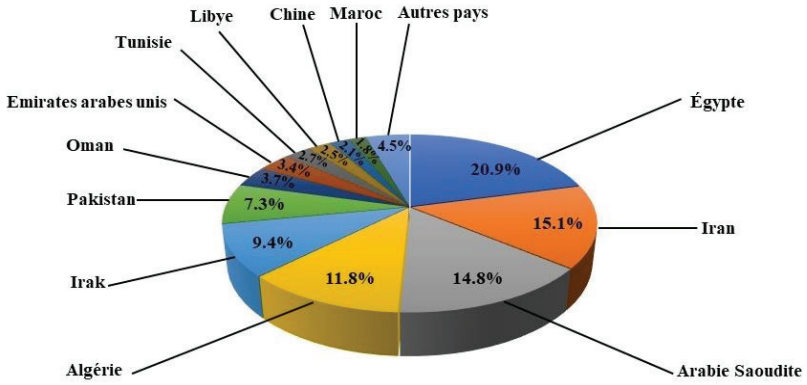


Figure 1.6. Production mondiale des dattes en tonnes **(a)** et en pourcentage **(b)** en 2015.

1.3.3. Morphologie du palmier dattier

Le dattier est généralement un palmier de grande taille d'une hauteur d'environ 20 à 30 m, au tronc cylindrique autrement appelé stipe ou tige, portant une couronne de feuilles (palmes) pennées, finement divisées de 4 à 7 m de longueur. Les fleurs mâles et femelles sont portées par des palmiers différents, d'où la caractéristique de l'espèce dioïque [69]. Les fruits sont appelés dattes et sont groupés en régimes (**Fig.1.7**).

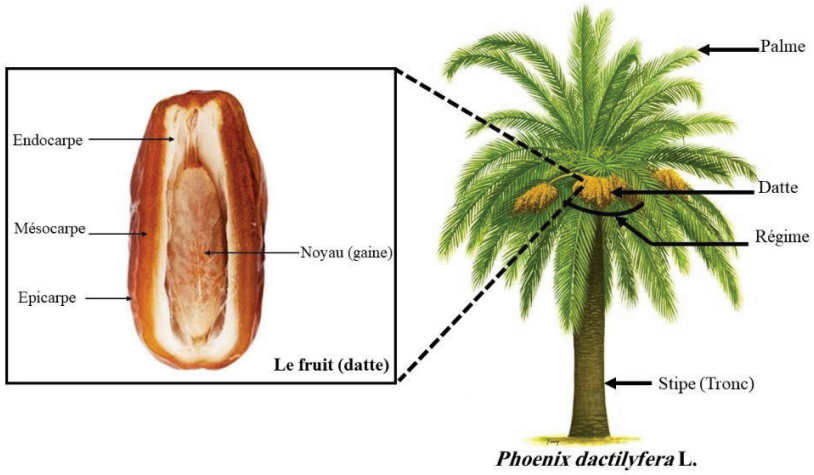


Figure 1.7. Présentation morphologique du palmier dattier.

La datte est une baie généralement de forme allongée, oblongue ou arrondie, d'un poids variable (2 à 8 g) et d'une taille de 2 à 8 cm de longueur selon les variétés. La couleur de la datte dépend des cultivars et du stade de maturation. Elle varie du blanc jaunâtre au noir en passant par les couleurs ambres, rouges et brunes [71]. La baie comporte deux parties :

a. Une partie comestible dite pulpe ou chair, composée d'un *mésocarpe* charnu, de consistance variable selon sa teneur en sucre, protégé par une enveloppe cellulosique fine, appelée *épicarpe*. L'*endocarpe* de teinte plus clair et de texture fibreuse se présente sous la forme d'une membrane très fine entourant le noyau [74] (**Fig.1.7**).
b. Une partie non comestible ayant une consistance dure appelée noyau ou gaine. Le noyau de dattes est de forme allongée représentant 10 à 15% du poids total des dattes [70]. Il est constitué d'un embryon dorsal, d'un sillon ventral et d'un albumen corné d'une consistance dure et protégé par un tégument [69] (**Fig.1.8**).

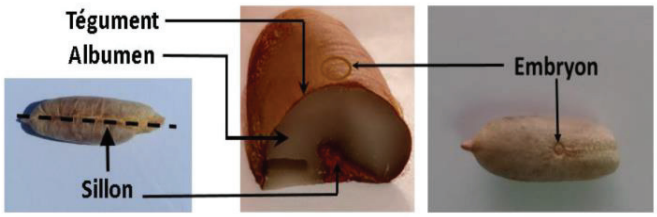


Figure 1.8. Présentation morphologique d'un noyau de datte (El-Khadem et al.)[i].

[i] ELkhadem B, Rekia M. *Valorisation des noyaux de dattes par production de bioénergie dans la région d'Adrar*. Mémoire de Master, Université d'Adrar, 2019; pp.13.

1.3.4. Composition chimique des noyaux de dattes

Les travaux de recherche menés sur la composition des noyaux de différentes variétés de dattes cultivées dans différents pays ont démontré la présence des protéines, des lipides, des carbohydrates, des sucres, des minéraux, des flavonoïdes, des acides phénoliques et de l'eau à différentes concentrations tout dépend de l'origine et la saison de culture (**Tableau 1.1**).

Tableau 1.1. Différents composés identifiés dans différentes variétés des noyaux de dattes.

Cultivar	Variété des noyaux de dattes	Contenance	Réf.
	Protéine		
Iran	-Mazafati Bam, Mazafati Jiroft et Kalutah	4.44-5.07[a]	[75]
		5.21-8.62 [a]	[76]
Arabie Saoudite	-Soukari	8.84-14.09 [a]	[77]
	-Barhi, Khulas, Monaif, Rozaiz, Soukari, Soulage et Soughi	3.71-5.47 [a]	[78]
Tunisie	-Deglet Nour et Allig	5.17-5.56[b]	[79]
	-Deglet Nour, Allig, Kentichi, Bejo, Zehdi et Baydh El Hamam	2070-3870[b]	[80]
Maroc	-Boufgous, Bousthammi et Majhoul	4300-6100 [b]	[81]
	-Deglet Noor, Khadrawy, Medjool et Zahidi	4440-5490 [b]	[82]
	-Arechti et Korkobbi	5.3-5.84 [a]	[83]
	Huile		
Arabie Saoudite	-Soukari	8.6-9.8 [a]	[77]
	-Barhi, Khulas, Monaif, Rozaiz, Soukari, Soulage et Soughi	5.05-7.95 [a]	[78]
	Sucre		
Maroc	-Boufgous, Bousthammi et Majhoul	8700-9500 [b]	[81]
	-Deglet Noor, Khadrawy, Medjool et Zahidi	4500-6960 [b]	[82]
Arabie Saoudite	-Barhi, Khulas, Monaif, Rozaiz, Soukari, Soulage, et Soughi	Glu: 313-359 [b]; Fru: 340-393 [b]; Raf: 285-328 [b]; Stach: 335-384 [b]; Suc: 306-354 [b]	[78]
Tunisie	-Arechti, Korkobbi	4.43-5.33 [a]	[83]
	-Lemsi, Amari, Hammouri, Korkobi, Matata, Halwaya, Rochdi, Deglet Nour, Baht, Bouhattam, Eguiwa et Khadhouri	1.21-3.81 [a]	[84]
	-Deglet Nour, Allig, Kentichi, Bejo, Zehdi et Baydh El Hamam	86540-86660 [b]	[80]
	Lipide		
Maroc	-Boufgous, Bousthammi et Majhoul	5700-6900 [b]	[81]
	-Deglet Noor, Khadrawy, Medjool et Zahidi	9320-10190 [b]	[82]
Tunisie	-Deglet Nour et Allig	10.19-12.6 [b]	[79]
	-Lemsi, Amari, Hammouri, Korkobi, Matata, Halwaya, Rochdi, Deglet Nour, Baht, Bouhattam, Eguiwa et Khadhouri	4.88-7.84 [a]	[84]
	-Arechti and Korkobbi	8.93-9.02 [a]	[83]
	-Deglet Nour, Allig, Kentichi, Bejo, Zehdi et Baydh El Hamam	870-3810 [b]	[80]
	Eau		
Iran	-Mazafati Bam, Mazafati Jiroft et Kalutah	1.66-2.33 [a]	[75]
	-Mazafati Bam, Mazafati Jiroft, Kalutah	9.72-16.28 [a]	[76]
	-Soukari	3.58-7.04 [a]	[77]

Arabie Saoudite	-Barhi, Khulas, Monaif, Rozaiz, Soukari, Soulage and Soughi	7.87-9.01 [a]	[78]
Maroc	-Boufgous, Bousthammi, Majhoul	3580-7040 [b]	[81]
	-Deglet Noor, Khadrawy, Medjool, Zahidi	4.9-6.36 [a]	[82]
Tunisie	-Lemsi, Amari, Hammouri, Korkobi, Matata, Halwaya, Rochdi, Deglet Nour, Baht, Bouhattam, Eguiwa, Khadhouri	73.83-82.37 [a]	[84]
	Acide phénolique		
Maroc	-Jihel et Majhoul	Caf: 59.76-92.37 [b] ; Chl: 6.07-11.82 [b] ; Cou: 109.87-141.72 [b] ; Féru: 8.42-14.31 [b] ; Gal: 8.54-12.38 [b] ; Syr: 0.27-0.81 [b] ; Van: 8.92-11.31 [b]	[85]
	-Boufgous, Bousthammi et Majhoul	2690-5340 [b]	[81]
Arabie Saoudite	-Soukari	525.35-595.83 [b]	[77]
Emirates	-Abu Maan, Fard, Khalas, Ajwa, Mabroom, Lulu et Khodari	4.65-7.8 [b]	[76]
Tunisie	-Lemsi, Amari, Hammouri, Korkobi, Matata, Halwaya, Rochdi, Deglet Nour, Baht, Bouhattam, Eguiwa et Khadhouri	5130-9530 [b]	[84]
	-Arechti et Korkobbi	4.21-4.43 [b]	[83]
	-Deglet Nour, Allig et Bejo	Gal: 0.43-0.84 [a], Van: 8.86-20.8: [a] Caf: 0.52-1.72 [a], Syr: 0.8-2.15 [a] Cou :51.93-59.96 [a], Féru: 5.31-17.27 [a] Sin : 3.59-8.13 [a], Cin : 2.9-6.8 [a]	[86]
Iran	-Kabkab, Rabbi, Zahedi et Mazafati	241-280 [b]	[87]
Lybie Maroc Algérie Soudan Pakistan	-Adwi, Taleese et Tasfert -Adwi, Allig, Boufgous et Majhoul -Deglet Nour et Ghars -Barakawi et Gondeila -Dhakki et Dora	Gal: 2.56- 6.91 [c], Syr: 1.28- 4.86 [c], Pro: 0.031-0.089 [c], Caf: 1.18- 3.43 [c]	[88]
	Carbohydrate		
Emirates	-Abu Maan, Fard, Khalas, Ajwa, Mabroom, Lulu et Khodari	2.1-4.8 [a]	[76]
Tunisie	-Deglet Nour et Allig	81-83.1 [b]	[79]
	Minéraux		
Iran	-Mazafati Bam, Mazafati Jiroft et Kalutah	Na : 25- 29.667 [c], K: 0.47-0.6 [c], Ca : 25-29.66 [c], Fe : 42.9-106.66 [c], Zn : 6.23- 153.33 [c], Cu : 25.14- 29.64 [c], P : 0.06-0.08 [c], Mn :4.5-7.9 [c]	[75]
	-Barhi, Khulas, Monaif, Rozaiz, Soukari, Soulage et Soughi	B: 5.2-6.2 [c], Ca: 264-688 [c], Cr: 1.27-2.19 [c], Fe: 24.8-37.7 [c], K: 3285-4212 [c], Mg: 738-893 [c], Mn: 3.37-7.79 [c], Ni: 0.8-1.6 [c], P :2101-3063 [c], Zn : 8.48-14.18 [c]	[78]
Maroc	-Boufgous, Bousthammi et Majhoul	K : 2967.12-4153.30 [c], Na : 108.06-319.42 [c], Mg: 615.30-827.62 [c], Ca : 394.97-626.71 [c], Fe : 27.76-70.30 [c], Cu : 4.83-8.36 [c], Mn : 5.51-10.99 [c], Zn : 8.77-14.79 [c]	[76]

Tunisie	-Deglet Nour et Allig	K: 229-293 [b], Na: 10.25-10.40 [b], Mg: 51.7-58.4 [b], Ca: 28.9-38.8 [b], Fe: 2.21-2.30 [b]	[79]
	-Lemsi, Amari, Hammouri, Korkobi, Matata, Halwaya, Rochdi, Deglet Nour, Baht, Bouhattam, Eguiwa et Khadhouri	Na: 10.61-16.7 [b], P: 68.33-124 [b], K: 201-290 [b]	[84]
	-Arechti et Korkobbi	Na: 43.6-45.8 [b], K: 322-391 [b], Ca: 30.4-47.8 [b], Fe: 5.05-8.40 [b], Cu: 1.52-2.31 [b], Mg: 74.6-93.2 [b], Mn: 0.47-0.85 [b]	[83]
	-Deglet Nour, Allig, Kentichi, Bejo, Zehdi et Baydh El Hamam	K: 70.81-100.53 [b], Na: 3.67-22.14 [b], Ca: 119.54-215.36 [b], P: 58.13-68.18 [b], Zn: 0.48-1.02 [b] Fe: 1.07-2.57 [b]	[80]
	Flavonoïdes		
Maroc	-Jihel et Majhoul	Lutéoline : 9.17-13.24 [b] Quercétine : 23.71-34.06 [b] Rutoside : 71.74-86.32 [b]	[85]
	-Boufgous, Bousthammi et Majhoul	1220-1840 [b]	(27)
Emirates	-Abu Maan, Fard, Khalas, Ajwa, Mabroom, Lulu et Khodari	1.6-4.54 [b]	[76]
Tunisie	-Lemsi, Amari, Hammouri, Korkobi, Matata, Halwaya, Rochdi, Deglet Nour, Baht, Bouhattam, Eguiwa et Khadhouri	1430-3830 [b]	[84]
	-Arechti et Korkobbi	2.92-3.31 [b]	[83]
	-Deglet Nour, Allig et Bejo	Rutoside: 0.4-0.84 [a] Catéchine: 0.64-3.62 [a]	[86]
Lybie Maroc Algérie Soudan Pakistan	-Adwi, Taleese et Tasfert -Adwi, Allig, Boufgous et Majhoul -Deglet Nour et Ghars -Barakawi et Gondeila -Dhakki et Dora	Rutoside: 0.89- 1.23 [c] Catéchine: 2.86- 7.23 [c]	[88]

[a] pourcentage ; [b] mg/100g poids sec ; [c] mg/kg poids sec ; Glu: glucose; Fru: fructose; Raf: raffinose; Stach: stachyose; Suc: sucrose ; Caf: acide caféique; Chl: acide chlorogénique; Cou: acide p-coumarique; Féru : acide férulique ; Gal : acide gallique ; Syr : acide syringique ; Van :acide vanillique ; Pro : acide protocatéchique ; Sin : acide sinapique ; Cin : acide cinnamique ; Na : sodium, K: potassium, Ca : calcium, Fe : Fer, Zn : zinc, Cu : cuivre, P : phosphore, Mn : manganèse ; B: bore ; Cr: chrome ; Mg: magnésium ; Ni: nickel.

En plus de ces constituants, l'huile contenue dans les noyaux de dattes (5-10%) est largement étudiée dans la littérature pour ses effets précieux dans différents domaines [77,78]. Actuellement, de nombreuses études ont mis en valeur le contenu huileux des sous-produits de dattes à travers l'extraction de l'huile et l'étude de sa composition [89–92].

1.3.5. Composition chimique de l'huile des noyaux de dattes

a. Composition en acides gras

La composition en acide gras de l'huile des noyaux de dattes est illustrée dans le **Tableau 1.2**.

Tableau 1.2. Composition en acide gras de l'huile des noyaux de dattes issues de différentes variétés.

	Besbes et al. (2004) [79]	Basuny et al. (2011) [93]	*Akbari et al. (2012)* [94]	*Boukouada et al. (2014)* [95]	*Soliman et al. (2015)* [96]	Dehdivan et al. (2017) [97]	Bouhlali et al. (2017) [81]	Laghouiter et al. (2018) [98]	Nehdi et al. (2018) [92]	*Al-juhaimi et al. (2018)* [88]	Olowokere et al. (2019) [89]	*Tafti et al. (2019)* [75]	*Raza et al. (2019)* [99]
Composition en acides gras saturés (%)													
C8 :0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00-0.25	-	-	0.1-1.2	-
C10 :0	0.07-0.80	0.25	0.47-0.50	0-4.3	-	0.2-0.5	-	-	0.00-0.32	-	11.19	0.2-0.5	0.48-0.55
C12 :0	5.81-17.8	35.31	25.6-30.8	22.1-28.5	8.67-24.17	14-15.8	16.74-20.34	6.63-25.36	-	9.7-24.6	24.37	14-15.8	25.7-30.8
C13 :0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.14-18.67	-	-	-	-
C14 :0	3.12-9.84	0.04	13.3-16.9	10.7-11.4	7.01-15.43	10.6-10.9	10.23-12.28	9.30-19.33	0.86-12.31	5.47-12.8	-	10.6-10.8	6.9-16.7
C16 :0	10.9-15.0	12.58	11.9-13.1	8.7-9.6	4.82-18.09	10.8-11.8	9.82-10.91	9.63-17.59	9.49-38.08	8.6-11.24	-	10.8-11.8	11.9-13.1
C17 :0		-	-	-	-	-	0.01-0.04	0.08-0.86	0.02-0.11	-	-	-	-
C18 :0	3.00-5.67	3.301	1.8-2.3	1.9-3.4	1.22-7.86	-	2.86-3.73	0.77-3.18	2.44-4.72	1.3-4.9	49.40	3-3.4	1.8-2.3
C20 :0	-	0.02	-	0-0.4	0-0.08	-	0.43-0.52	0.10-0.50	0.25-0.49	-	7.69	0.2-0.4	-
C22 :0	-	-	-	-	0-0.15	-	0.21-0.27	-	0.06-0.36	-	5.58	0-0.1	-
C23 :0	-	-	-	-	-	-	0.21-0.27	-	0.00-0.09	-	-	-	-
C24 :0	-	-	-	-	-	-	0.15-0.21	-	0.07-0.19	-	-	-	-
C26 :0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00-0.06	-	-	-	-
Composition en acides gras monoinsaturés (%)													
C14 :1	0.04-0.09	-	-	-	-	0.01-0.07	-	-	-	-	-	-	-
C16 :1	0.11-1.52	-	nd	-	0.2-0.4	0.05-0.09	-	0.09-1.66	0.02-0.07	-	-	0.2-0.4	Nd
C18 :1	41.3-47.7	39.50	31.5-37.6	39.2-46.5	-	48.1-50.5	44.92-48.38	37.83-52.53	45.10-50.76	39.7-48.6	-	48.1-50.5	31.5-37.6
C20 :1	-	-	Nd	-	0.2-0.4	-	-	-	0.17-0.52	-	-	0.2-0.4	Nd
Composition en acides gras polyinsaturés (%)													
C18 :2	12.2-21.0	8.20	4.4-7.0	6.1-6.9	7.7-8.2	-	8.30-9.02	5.71-10.44	7.41-12.79	6.2-19.8	-	7.7-8.2	4.4-6.9
C18 :3	1.68-0.81	0.81	nd	0-0.3	0.4-0.7	-	0.09-0.21	0.1-0.41	0.01-0.25	0.3-2.3	-	0.4-0.7	Nd

C8 :0, acide caprylique ; **C10 :0**, acide caprique ; **C12 :0**, acide laurique ; **C13 :0**, acide tridécylique ; **C14 :0**, acide myristique ; **C16 :0**, acide palmitique ; **C17 :0**, acide margarique ; **C18 :0**, acide stéarique ; **C20 :0**, acide arachidique ; **C22 :0**, acide béhénique ; **C23 :0,** acide tricosylique; **C24 :0**, acide lignocérique **; C26 :0**, acide cérotique ; C14 **:1**, acide myristoléique **; C16 :1**, acide palmitoléique **; C18 :1** , acide oléique ; **C20 :1**, acide gadoléique **; C18 :2**, acide linoléique **; C18 :3**, acide linolénique. nd : non-détecté ; Tiret (-) : non-testé.

Variétés du *Phoenix dactylifera* L. utilisées dans les travaux reportés dans le Tableau: Cultivar Algérien : *Degla-Baïdha* et *Tafezouine* [95] *Ghars, Tafzouine, Azerza, Aoucht, Adela, Dagla, Timjhourt, Bint Qbala* et *Sboe Lossif* [98] *Deglet Nour* et *Ghars* [88]. **Cultivar Tunisien :** *Deglet Nour* et *Allig* [79]. **Cultivar Arabie Saoudite :** *Khalas* [93], *Khalas, Barhy, Kadary, Segae, Succary* et *Sallag* [96] *Barhi, Khalas, Manifi, Rezeiz, Sulaj* et *Sukkari* [92]. **Cultivar Iranien :** *Kabkab, Shekar et Shahabi* [94]Mazafati Bam, Mazafati Jiroft et Kalutah [97] *Mazafati Bam, Mazafati Jiroft* et *Kalutah* [75]. **Cultivar Marocain :** *Bousthammi, Majhoul* et *Boufgous* [81] *; Adwi, Allig, Boufgous, Majhoul* [88]. **Cultivar Libyen :** *Adwi, Taleese* et *Tasfert* [88]. **Cultivar Soudanais :** *Barakawi* et *Gondeila* [88]. **Cultivar Pakistanais :** *Dhakki* et *Dora* [88], *Karblain, Halawi* et *Ajwa* [99]. **Cultivar Nigérien** : *Marmara* [89]

L'analyse des acides gras de différentes variétés de noyaux de dattes a montré la présence de cinq acides gras majoritaires, mais en quantités variables (l'acide oléique, l'acide linoléique, l'acide palmitique, l'acide myristique et l'acide laurique) [75,88,94,95,99]. Certains acides gras sont détectés en quantités faibles, notamment les acides caprylique, caprique, tridécylique, margarique, stéarique, arachidique, béhénique, tricosylique, lignocérique, cérotique, myristoléique, palmitoléique, trans-vaccénique, gadoléique et linolénique. L'huile des noyaux de datte est une source d'acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés.

La composition en acides gras peut changer en fonction de la variété et du stade de maturation, ainsi que de la méthode d'extraction [100]. Différentes études ont rapporté que les acides gras insaturés et saturés majoritaires de l'HV des noyaux de dattes de différents cultivars iranien, algérien, tunisien et saoudien sont respectivement les acides oléique et laurique [94–97]. Olowokere et al. ont rapporté que le composant majoritaire dans la variété nigérienne (Marmara) est l'acide stérique (49.40%) suivi par l'acide laurique (24.37%)[89]. L'étude effectuée par Besbes et al. a révélé que les dattes tunisiennes (variétés Deglet Nour et Allig) sont plus riches en acides gras insaturés que des saturés [79].

Basuny et al. ont comparé le profil des acides gras des noyaux de dattes de la variété khalas avec l'huile commerciale de palmiste [93]. Ils ont constaté des taux élevés en acides oléique et linoléique par rapport à l'huile de palmiste. Les teneurs en acides oléique et linoléique sont de 39.5 et 8.2% pour la variété khalas ; et de 26.25 et 2.57% pour l'huile commerciale, respectivement.

b. Composition en stérols

Les stérols, encore appelés les phytostérols, représentent avec les tocols la plus grande partie insaponifiable des HV. Leur structure moléculaire présente de fortes analogies avec le cholestérol animal [101]. Le taux des phytostérols dans les HV est couramment utilisé pour déterminer la qualité d'huile [102]. La littérature a rapporté que les principaux stérols présents dans l'huile des noyaux de dattes sont le β-sitostérol, le campestérol et le Δ5-avénastérol (**Tableau 1.3**).

Tableau 1.3. Composition en constituants minoritaires de l'huile des noyaux de dattes issues de différentes variétés.

Constituant	Contenance	Composition	Réf.
Stérol	470 – 845[a]	Cholestérol	[98]
	541 - 788 [a]	-	[103]
	8.3-11.7 [a]	Cholestérol	[91]
	336 [a]	β -sitostérol (76%), campestérol (8.89%), Δ5-avenestérol (8.79%), Δ5,24-stigmastadiénol (2.73%), Δ7-avenastérol (1.18%), stigmastérol (1.09%), Δ7-stigmasténol (0.79%), cholestérol (0.42%)	[104]
	300–350 [a]	β -sitostérol (80%), campestérol (10%), Δ5-avenastérol (4.5%), stigmastérol (2.42%), cholestérol (0.96%), Δ5,24-stigmastadiénol (0.41%)	[79]
	38.10 [a]	β -sitostérol (66%), campestérol (22%), stigmasterol (9%), brassicaesterol (3%)	[93]
Tocophérol et Tocotriénol	32 - 74 [a]	α-tocophérol (15.57–74.1%), β+γ tocophérol (25.12–56.01%), δ-tocophérol (0-28.41%)	[98]
	54.65 [a]	α -tocophérol (1.85%), β -tocophérol (1.7%), γ-tocophérol (17.72%), α-tocotriénol (63.28%), γ-tocotriénol (11.84%), δ -tocotriénol (3.60%)	[88]
	0.053–0.143 [a]	α--tocophérol (51.02%), (β+γ)-tocophérol (30.61%), δ-tocophérol (12.24%)	[95]
	1.01–1.86 [a]	α -tocophérol (52.54%), α-tocophéryl acetate (27.68%), γ -tocophérol (19.76%)	[105]
	24.97–42.08 [a]	α -tocophérol (38.8%), γ -tocophérol (5.4%), δ-tocophérol (2.4%)	[79]
	51.54 [a]	α -tocophérol (0.6%), δ-tocophérol (1%), β-tocophérol (0.9%), γ -tocophérol (10.3%), α-tocotriénol (66%), γ-tocotriénol (4.6%)	[104]
	70.75 [a]	α -tocophérol (17.52%), β-tocophérol (2.42%), δ-tocophérol (0.9%), α-tocotriénol (30.19%), γ -tocophérol (23.61%), γ-tocotriénol (19.07%), δ-tocotriénol (5.89%)	[92]
	2.43 [a]	α -tocophérol	[93]
Acides phénoliques	312-347 [a]	-	[91]
	64-127 [a]	-	[95]
	22.03–52.08 [a]	Hydroxytyrosol (10.21%), acide protocatéchique (9.62%), tyrosol (8.10%), acide caféique (4.95%), acide gallique (4.11%), acide p-coumarique (0.26%), oleuropéine (0.18%)	[106]
	79 - 177 [a]	-	[107]
	319 [a]	-	[93]
Caroténoïde	10.4-12.8 [b]	-	[91]
Flavanoïde	0.626 [a]	Rutoside (17%), catéchine (83%)	[88]
	41-52 [a]	-	[91]
Minéraux	48.69 [a]	K (64.7%), Na (10.2%), Mg (0.04%), Ca (25.1%), Fe (0.05%)	[96]
Chlorophylle	0.21-0.25 [b]	-	[91]
	0.10 [b]	-	[104]

(-) : Non-déterminé ; [a] mg/100g d'huile ; [b] mg/kg d'huile.

D'autres stérols mineurs sont aussi présents dans l'huile des noyaux de dattes comme le cholestérol, le stigmastérol, le Δ5,24-stigmastadiénol, le Δ7-avénastérol et le Δ7 stigmasténol [79,93,104].

Les stérols remplissent plusieurs fonctions d'un point de vue biologique, telle que l'activité anticholestérol. Par leur structure comparable au cholestérol, ils réduisent entre autres l'absorption du cholestérol dans les intestins. Tapiero et ses collaborateurs ont montré que les stérols des HV réduisaient le taux du cholestérol total dans le sang, en particulier le « mauvais cholestérol » en inhibant son absorption dans l'intestin [108].

c. Composition en tocophérols et tocotriénols

Les HV contiennent aussi des traces de tocols (tocophérols et tocotriénols), communément appelés vitamine E. Des recherches récentes ont caractérisé les profils de la famille des tocols dans l'extrait des noyaux de dattes (**Tableau 1.3**). Différentes formes de tocols (α-, β-, γ- et δ-tocophérols et α-, β-, γ- et δ-tocotriénols) sont constatées. La prédominance d'un tocol ou d'un autre dépend de l'origine de l'huile. Alpha-tocophérol et α-tocotriénol sont les principaux tocols présents dans la majorité des cultivars testés [88,92,105]. Dans d'autres études réalisées sur d'autres variétés de noyaux de dattes, γ-tocophérol et α-tocotriénol sont trouvés comme tocols majoritaires [88,104]. Les tocols présentent différentes activités biologiques telles que des activités neuroprotectrices, anticancéreuses, cardioprotectrices, immunostimulantes, antidiabétiques, hépatoprotectrices et néphroprotectrices [109].

d. Composition en polyphénols

L'activité antioxydante de l'huile des noyaux de dattes est due principalement à la présence des phénols et des flavonoïdes. La teneur de ces deux constituants dans l'huile des noyaux de dattes est largement examinée **(Tableau 1.3)**. L'étude menée sur la variété tunisienne Kentichi a révélé la présence des flavonoïdes dans les limites 41-52 mg/100g d'huile [91]. De plus, Besbes et al. ont constaté la présence de huit composés phénoliques à des taux compris entre 22.03 et 52.08 mg/100g d'huile dans les variétés tunisienne (Deglet Nour et Allig) [106]. Besbes et al. ont mené une autre étude sur la stabilité des mêmes huiles, les résultats ont montré que la stabilité élevée de l'huile de Deglet Nour est liée au taux élevé en composés phénoliques comparativement à l'huile de Allig [110].

e. Autres composants

Les résultats des travaux antérieurs résumés dans le **Tableau 1.3** montre que l'huile des noyaux de dattes peut contenir d'autres produits minoritaires. L'études menée par Herch et al. sur la variété tunisienne kentichi a révélé la présence des caroténoïdes à raison de 10.4 à 12.8 (mg/kg d'huile) [91]. Une autre étude élaborée par Soliman et al. a montré que les huiles des noyaux de dattes issues de six cultivars saoudiens (Khalas, Barhy, Kadary, Segae, Succary et Sallag) contiennent des minéraux (48.69 mg/100g d'huile) dont le potassium est l'élément majoritaire (64.7%), suivi par le calcium (25.1%) puis le sodium (10.2%)[96].

1.3.6. Utilisation de l'huile des noyaux de dattes

L'huile des noyaux de dattes est largement utilisée dans le domaine agro-alimentaire, médicinal et industriel, comme le montre le **Tableau 1.4**.

Tableau 1.4. Différentes utilisations de l'huile des noyaux de dattes.

Variété	Région	Activité/Utilisation	Caractéristique	Réf.
		Utilisation culinaire		
Tunisienne				
Deglet-Nour	Degach	Huile de friture	Temps d'induction de l'oxydation très élevé.	[111]
Allig		Huile de cuisson	Stable à la chaleur pour une longue durée.	
Saoudienne				
Khalas	Al-Hasa	Production de la mayonnaise	Acceptabilité (goût, odeur, couleur et texture).	[93]
Algérienne				
Kentichi	ns	Production de la margarine	Acceptabilité (couleur, texture et brillance)	[112]
		Utilisation médicinale		
Tunisienne				
Deglet nour	Degach	Chimiopréventive	Augmentation de l'activité des enzymes antioxydants endogènes : CAT, SOD et GPx	[113]
		Photoprotectrice	Diminution de l'expression de la protéine p53	[114]
			Diminution de peroxydation lipidique des spermatozoïdes	[115]
Algérienne				
Kentichi	ns	Antioxydante Antibactérienne	Crème : PH=6.33 ; PE=14.78cm^2	[66]
Deglet-Nour	Ouargla	Antioxydante	CI_{50} (DPPH)= 210 [a]	[95]
Ghars	Ouargla	Antioxydante	CI_{50} (DPPH)= 140 [a]	[95]
	Ghardaia		CI_{50} (DPPH)= 46.97 [a]	[98]
Degla-Baïdha	Ouargla	Antioxydante	CI_{50} (DPPH)= 170 [a]	[95]
Tamdjouhert	Ouargla	Antioxydante	CI_{50} (DPPH)= 290 [a]	[95]
	Ghardaia		CI_{50} (DPPH)= 47.97 [a]	[98]
Tafezouine	Ouargla	Antioxydante	CI_{50} (DPPH)= 330 [a]	[95]
	Ghardaia		CI_{50} (DPPH)= 59.21 [a]	[98]

Azerza	Ghardaia	Antioxydante	CI_{50} (DPPH)= 77.58 [a]	[98]
Aoucht	Ghardaia	Antioxydante	CI_{50} (DPPH)= 53.95 [a]	[98]
Adela	Ghardaia	Antioxydante	CI_{50} (DPPH)= 64.10 [a]	[98]
Bint Qbala	Ghardaia	Antioxydante	CI_{50} (DPPH)= 56.82 [a]	[98]
Sboe Lossif	Ghardaia	Antioxydante	CI_{50}(DPPH)= 46.42 [a]	[98]
Utilisation industrielle				
Emiratie				
Khalas	ns	Production du biodiesel	Biodiesel conforme aux normes	[116]
Pakistanaise				
Zahidi	ns	Production du biodiesel	Biodiesel conforme aux normes	[117]
Basra	ns			
Khazravi	ns			
Irakienne				
ns	ns	Synthèse du poly (3-hydroxybutyrate)	Structure moléculaire et propriétés thermiques similaires au poly (3-hydroxybutyrate) standard.	[118]
Algérienne				
Deglet Nour	Tolga	Anticorrosive	Diminution de la dégradation de l'acier.	[119]
Kentichi				

[a] mg/ml ; DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle ; CI_{50} : Concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % des radicaux libres; SOD : superoxide dismutase ; CAT : catalase ; GPx : glutathione peroxidase ; PE : Pouvoir d'étalement ; ns : non spécifié.

a. Utilisation en agro-alimentaire

L'huile des noyaux de dattes présente une composition chimique et des caractéristiques physico-chimiques précieuses pour son utilisation culinaire (huile de friture, de cuisson ou d'assaisonnement, voire même alternative à l'oléine de palme) [92]. Ceci est lié à la présence de nombreux antioxydants naturels (composés phénoliques, tocols, etc.) qui la rendent très stable face aux rancissements oxydatifs [104] et aux traitements thermiques [111]. En effet, Besbes et al. ont remarqué que les huiles extraites de Deglet Nour et Allig peuvent être utilisées comme huile de friture et de cuisson due à leur résistance à la chaleur et leur grande stabilité à l'oxydation [111]. De plus, l'huile des noyaux de dattes peut être utilisée pour la production de la margarine en raison de la présence de caroténoïdes qui confèrent une couleur jaunâtre du beure sans ajout de colorants synthétiques [104]. Basuny et Al-Marzooq ont préparé une mayonnaise à base d'huile des noyaux de dattes saoudienne (khalas) et ont trouvé qu'elle était supérieure en termes de caractéristiques sensorielles par rapport à la mayonnaise commerciale préparée à base d'huile de maïs [93].

b. Utilisation en médecine

Suite à son large spectre d'absorbance des rayons UV, l'huile des noyaux de dattes peut protéger la peau contre les rayons UV-A et UV-B, qui sont responsables de la plupart des dommages cellulaires ainsi que des altérations causées par le stress oxydatif [110]. Dammak et al. ont étudié l'effet protecteur de l'huile des noyaux de dattes contre le stress oxydatif causé par le peroxyde d'hydrogène sur des kératinocytes épidermiques humaines normales [113]. Les résultats ont montré que l'huile est pourvue d'un effet chimioprotecteur par inhibition de la peroxydation lipidique induite par le peroxyde d'hydrogène. Dans une autre étude menée par ces mêmes auteurs, l'HV des noyaux de dattes présente des effets photoprotecteurs significatifs par inhibition des dommages d'ADN suite à l'irradiation UV-B des peaux humaines saines [114].

L'huile des noyaux de dattes est apte à être incorporer dans les crèmes cosmétiques. Actuellement, Lecheb et Benamara ont formulé et caractérisé une bio-crème contenant l'HV des noyaux de dattes et ont noté un bon étalement de la crème avec une viscosité et un comportement rhéologique similaires à ceux des crèmes commerciales [66].

Le contenu en antioxydants naturels et l'activité antioxydante diffèrent selon le cultivar. Boukouada et al. ont mené l'étude de l'activité antioxydante de cinq variétés algériennes en utilisant la méthode de DDPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle) basée sur la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH$^{\bullet}$. Les résultats ont révélé une différence significative entre les différentes variétés testées et ceci a été attribuée à la teneur en acides phénoliques [95]. Laghouiter et al. ont lié l'activité antioxydante puissante de la variété Sboe Lossif à son taux élevé en α-tocophérol (0.74mg/g d'huile) [98].

L'activité de l'huile des noyaux de dattes contre les espèces réactives de l'oxygène responsables des dommages oxydatifs cellulaires ne se limite pas aux soins de la peau. En effet, une étude menée par Ben Abdallah et al. a révélé que le niveau de la peroxydation lipidique des spermatozoïdes ajoutés avec de l'huile des noyaux de dattes diminue et que la capacité du sperme à féconder l'ovocyte augmente [115]. Dans une autre étude, il est constaté que l'utilisation de l'huile des noyaux de dattes augmente la motilité, la viabilité et le nombre de spermatozoïdes chez la souris [120].

Dans l'ensemble, l'huile des noyaux de dattes peut être considérée comme un produit diététique prometteur avec des effets antioxydants avérés à être incorporer dans les produits cosmétiques et / ou diététiques.

c. Utilisation en industrie

L'huile des noyaux de dattes est extrêmement prometteuse, non seulement dans la production de produits alimentaires fonctionnels et pharmaceutiques, mais aussi en tant qu'une ressource renouvelable. Différents travaux ont été mené sur la transformation de l'HV des noyaux de dattes en biodiesel [116,121]. Azeem et et. ont attribué ce fait à la faible teneur de l'huile en acides gras libres [117]. L'huile des noyaux de dattes est récemment explorée comme matière première pour la synthèse du poly (3-hydroxybutyrate), un polyester biodégradable qui peut remplacer les plastiques contaminants [118].

Une autre application de l'huile des noyaux de dattes est exploitée par Ouadi et al., il s'agit de l'activité anticorrosive [119]. Dans cette étude, le processus de la corrosion est inhibé par l'application de l'HV sur la surface de l'acier traité par une solution d'HCl (1M).

1.4. Huiles essentielles

1.4.1. Définition

Les HE, connues également sous le nom d'essences, d'huiles volatiles ou de parfums, etc., sont des liquides aromatiques, odorants, peu ou pas miscibles à l'eau, incolores ou jaunâtres, inflammables et qui s'altèrent facilement à l'air [122]. Les HE se forment dans un grand nombre de plantes aromatiques comme produits du métabolisme secondaire [123]. Elles sont liquides à température ordinaire avec un toucher non onctueux et non gras contrairement aux HV. Elles sont connues par leur odeur plus ou moins remarquable, suave, piquante ou désagréable [122].

1.4.2. Composition chimique

Les HE constituent un mélange complexe et variable de constituants appartenant exclusivement à deux groupes distincts : les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes.

A. Terpènes

Les terpènes sont les composés les plus abondants dans les HE [124]. Ils sont classés en deux catégories principales : les hydrocarbures terpéniques et les dérivés oxygénés [10].

a. Hydrocarbures terpéniques

Les hydrocarbures terpéniques de formule chimique $(C_5H_8)_n$ sont des dérivés de l'isoprène (C_5H_8); reliés tête à queue d'une façon linéaire ou cyclique [124] (**Fig.1.9**). En fonction du nombre d'unités isoprène, différents terpènes peuvent être trouvés dans les HE [125]:

- ✓ n = 2 : les monoterpènes ($C_{10}H_{16}$)
- ✓ n = 3 : les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$)
- ✓ n = 4 : les diterpènes ($C_{20}H_{32}$)
- ✓ n = 5 : les sesterpènes ($C_{25}H_{40}$)
- ✓ n = 6 : les triterpènes ($C_{30}H_{48}$)
- ✓ n = 8 : les tétraterpènes ($C_{40}H_{64}$)
- ✓ n > 8 : les polyterpènes

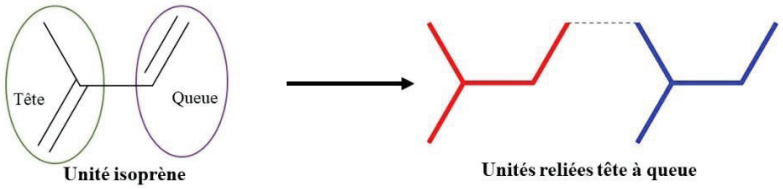


Figure 1.9. Représentation schématique de l'unité isoprène et de la formation des terpènes.

b. Terpénoïdes

Les terpénoïdes sont formés par ajout d'une fonction spécifique sur le squelette hydrocarboné d'un terpène. Le suffixe « oïd » signifie « dérivé de » ou « similaire », par conséquent « terpénoïde » désigne toutes les molécules ayant une structure de type terpène [10]. Différentes fonctions peuvent être greffées sur le terpène (**Fig.1.10**) :

- ✓ Groupement -OH => terpénols ou alcools terpéniques ;
- ✓ Groupement =O => terpénones ou cétones terpéniques ;
- ✓ Groupement -CHO => terpénals ou aldéhydes terpéniques ;
- ✓ Groupement -COO- => esters terpéniques, etc.

A ces différentes dénominations, le préfixe mono-, sesqui- ou di- sont ajoutés, afin de préciser la nature du terpène d'origine. Ainsi, une fonction aldéhyde greffée sur un monoterpène donne une molécule que l'on nommera monoterpénal, ou aldéhyde monoterpénique.

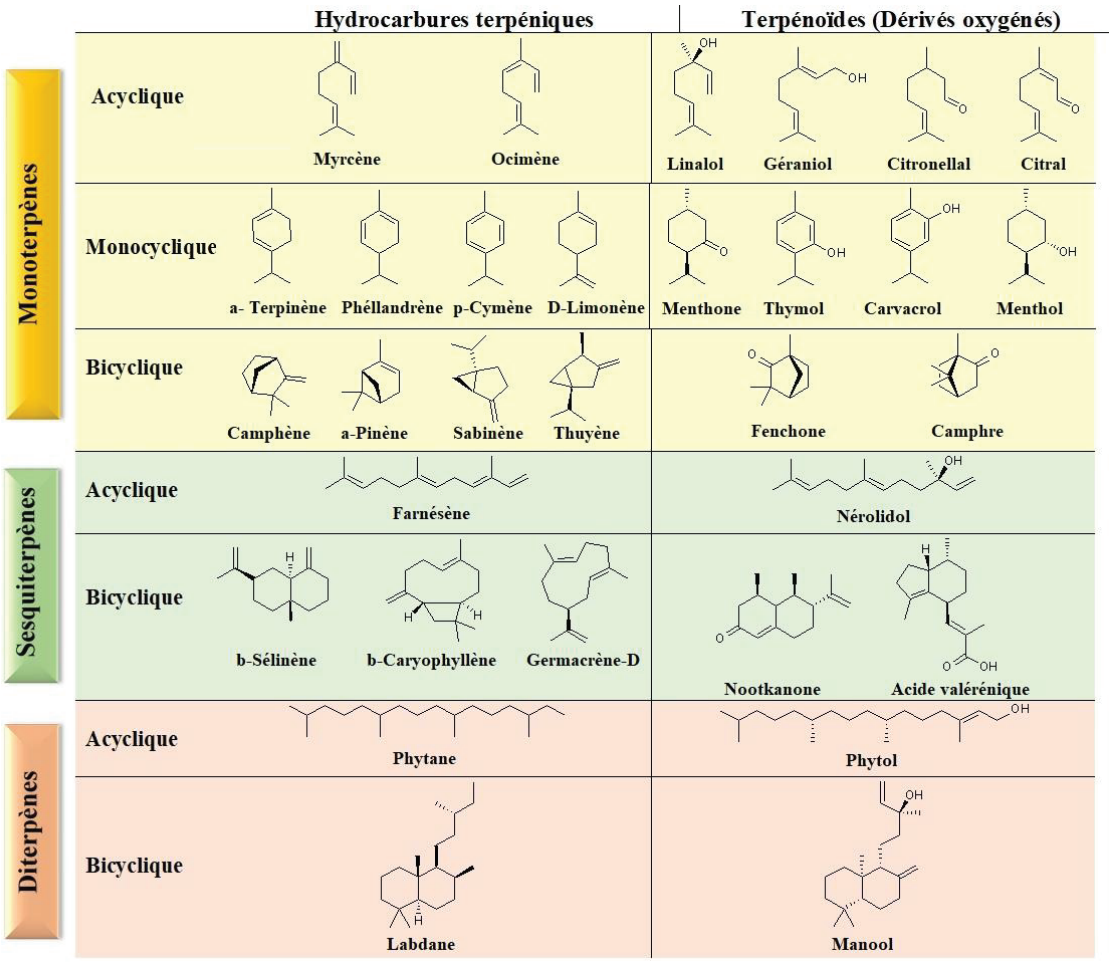


Figure 1.10. Exemples de monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes.

B. Phénylpropanoïdes

Les phénylpropanoïdes, composés aromatiques dérivées du phénylpropane, sont très fréquemment rencontrés dans les HE. Leur nom est dérivé du groupe phényl et de la queue propène [125] (**Fig.1.11**). Les phénylpropanoïdes donnent une saveur et une odeur spécifiques à la plante lorsqu'ils sont présents [10]. La vanilline, l'eugénol, l'anéthol, l'estragole et le cinnamaldéhyde sont des exemples de ce groupe de constituants.

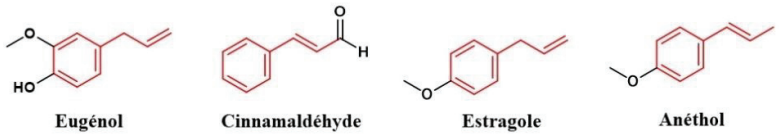


Figure 1.11. Exemples de phénylpropanoïdes.

C. Autres composés

Les essences peuvent contenir des composés soufrés et azotés comme les isothiocyanates, l'indole et le diallyl disulfide (**Fig.1.12**), issus de la dégradation des lactones, des terpènes et des glycosides [125]. Ils peuvent contenir aussi des traces de composés à chaîne droite, ne contenant aucune ramification latérale ; ils vont du n-heptane aux composés avec 35 atomes de carbone. L'alcool de feuille (3 (Z) -hexène-1-ol) représente un exemple de cette classe [125] (**Fig.1.12**).

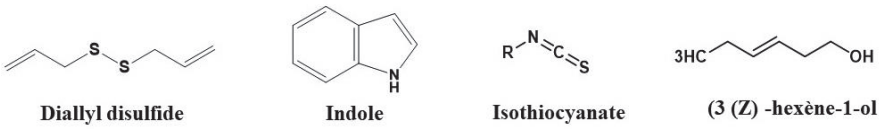


Figure 1.12. Structures des indole, isothiocyanate, diallyl sulfide et 3 (Z) -hexène-1-ol.

1.5. Huile essentielle du costus indien

1.5.1. Généralités sur le costus indien

Le costus indien est une plante de chardon originaire de l'Inde ayant le nom systématique de *Saussurea lappa* C.B. Clarke, appartenant à la famille des Asteraceae qui comprend environ 1000 genres, principalement répartis en Asie et en Europe. Saussurea DC., en tant que plus grand sous-genre de cette famille, comprend plus de 300 espèces réparties dans le monde, dont 61 espèces sont présentes en Inde [126]. Le costus est l'une des espèces les plus connues de ce genre, bien utilisé il y a environ 2500 ans en médecine traditionnelle indienne et chinoise [127]. Le costus est également connu sous plusieurs noms vernaculaires y compris *costus* en anglais et français ; *yun mu xiang* en chinois, *Kust* ou *qust* en arabe [126]. L'huile de costus est reconnue depuis des temps immémoriaux comme traitement efficace de la lèpre, c'est pourquoi le nom du « Kushta » qui indique lèpre en sanskrit, une ancienne langue védique indienne, lui a été donné [128]. Les racines sèches de cette plante sont largement utilisées pour le traitement de différentes maladies telles que la fièvre, la bronchite, l'ulcère, la polyarthrite rhumatoïde, la fièvre typhoïde et les maladies chroniques de la peau [129,130].

La classification systématique de la plante est comme suit :

- ✓ **Règne** : Plantae
- ✓ **Division** : Magnoliophyta

- ✓ **Classe** : Magnoliopsida
- ✓ **Ordre** : Asterales
- ✓ **Famille** : Asterales
- ✓ **Genre** : Saussurea
- ✓ **Espèce** : *Saussurea lappa* C.B. Clarke

Plusieurs autres dénominations scientifiques sont accordées à cette plante : *Saussurea costus* Falc., *Aucklandia lappa* Decne., *Aucklandia costus* Falc., *Aplotaxis lappa* Decne., et *Aplotaxis auricula* DC.

1.5.2. Répartition géographique du costus indien

Le costus indien se trouve généralement à une altitude de 2500 à 3000 m en Inde ; y compris le Cachemire , le Jammu , l' Himalaya , les Ghâts occidentaux , l'Himachal Pradesh, l'Uttaranchal et la vallée Kishenganga (**Fig.1.13**) [131].

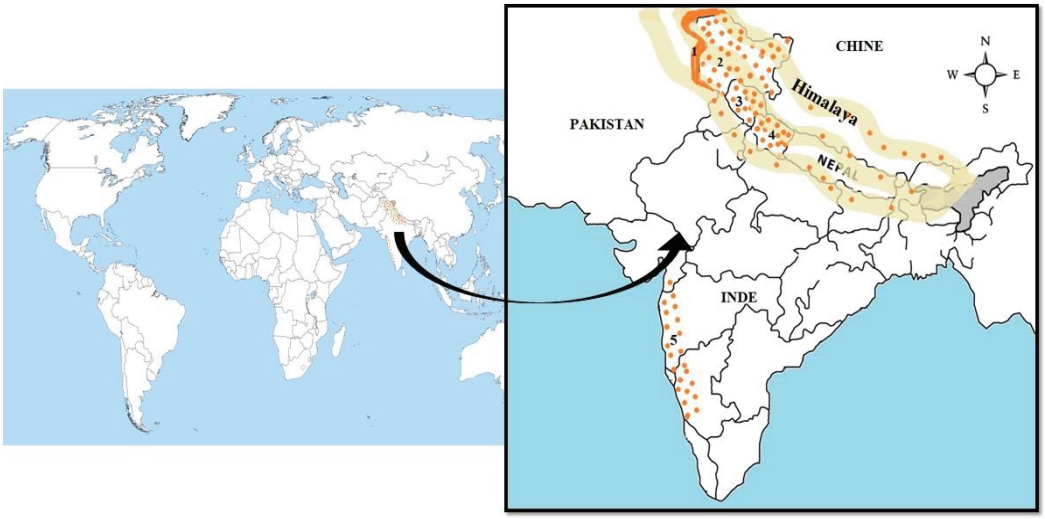


Figure 1.13. Répartition géographique du costus indien : **(1)** La vallée Kishenganga ; **(2)** Cachemire et Jammu ; **(3)** Himachal Pradesh; **(4)** Uttaranchal et **(5)** Les Ghâts occidentaux. Les traits en beige : Himalaya ; La couleur orange : Distribution du costus.

Kaur et al. ont rapporté que cette plante peut se trouver aussi en Chine, Corée et Pakistan [132]. *Saussurea lappa* est la seule espèce appartenant à l'Annexe I de « *la convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction* » qui est largement commercialisée au niveau international à des fins médicinales. Le costus utilisé seul ou en association avec d'autres ingrédients actifs est

formulé en médicaments qui sont déjà disponibles sur le marché. Semwal et al. en ont rapporté récemment une liste de ces produits [133].

1.5.3. Morphologie du costus indien

Plante herbacée, vivace ayant une tige dressée et fibreuse qui peut atteindre 1 à 2 m de hauteur [129]. Les racines sont robustes de 60 cm de longueur. Elles sont récoltées en Septembre-Octobre lorsqu'elles atteignent une croissance maximale. Les racines séchées présentent un goût légèrement amer, une odeur caractéristique et une couleur grisâtre à marron foncé. Elles sont épaisses, dures, striées, fusiformes à cylindriques de 7 à 15 cm de long et 1.5 cm d'épaisseur avec un centre effondré [129,132]. Les feuilles sont irrégulièrement dentées, grandes à la base de la tige (plusieurs dizaines de cm) et plus petites en haut. Les fleurs violettes à noires forment un capitule de 3 à 5 cm de diamètre [133]. Les fruits sont des akènes recourbés (3 mm de long) et surmontés d'un pappus (voir **Fig.1.14**) [132,134].

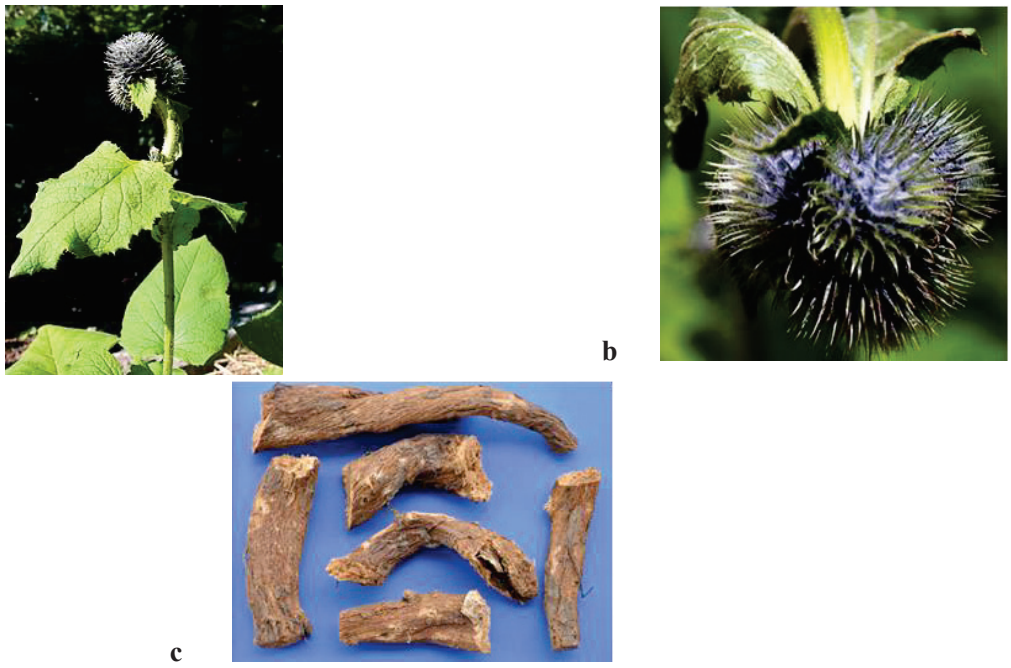


Figure 1.14. Présentation morphologique du costus indien : **(a)** Partie aérienne de la plante (Jani et al.)[i]; **(b)** Fleurs (Liu et al.)[ii]; **(c)** Racines.

[i] Jani DP, Jani KD. Analytical profile of Kushtha (Saussuria lappa) extensively used medicinal plant in Ayurveda system of medicine. *J Ayurveda Integr Med Sci* 2017; 2: 63–67.
[ii] Liu ZL, He Q, Chu SS, et al. Essential oil composition and larvicidal activity of Saussurea lappa roots against the mosquito Aedes albopictus (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 2012; 110: 2125–2130.

1.5.4. Composition chimique des racines du costus indien

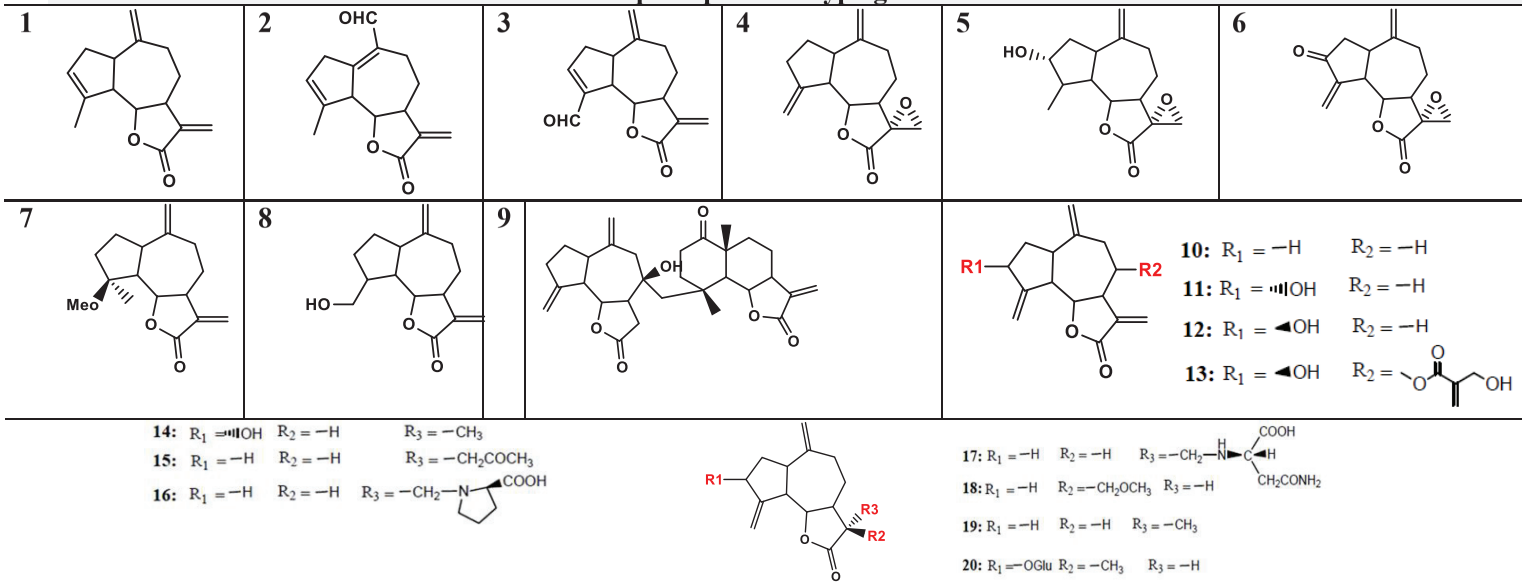
À partir des racines du costus, un large éventail de constituants biologiquement actifs sont isolés. Les sesquiterpènes sont les principaux constituants actifs isolés et ils sont classés en trois groupes sur la base de leur squelette carbocyclique :

- ✓ Guaïane
- ✓ Eudesmane
- ✓ Germacrène

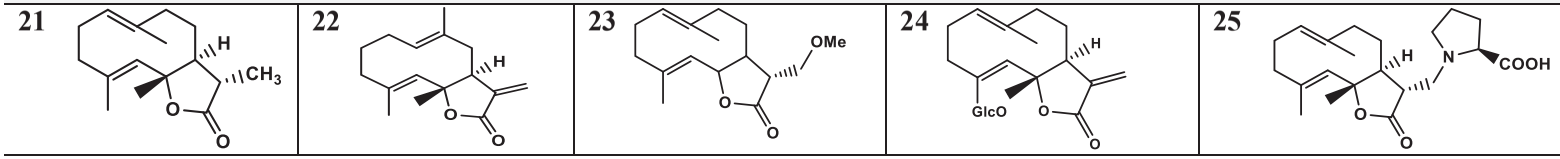
Ces groupes sont biosynthétisés séquentiellement et, en raison de l'instabilité du germacrène, la moitié des sesquiterpènes se présente sous forme de guaïane et 40% sous forme d'eudesmane et germacrène [130] (voir **Tableau 1.5**). D'autres constituants peuvent se présenter dans les racines du costus comme les flavonoïdes, les monoterpènes, les phytostérols [130], les triterpènes [137], les polyphénols [138], les alcaloïdes et les anthraquinones [139].

Tableau 1.5. Sesquiterpènes isolés des racines du costus indien.

Sesquiterpènes de type guaïane

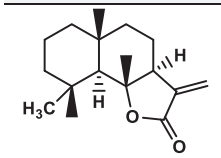
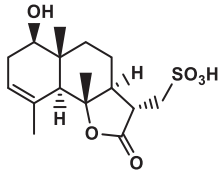
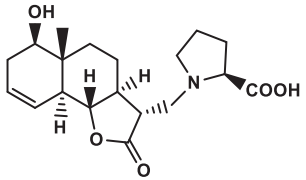
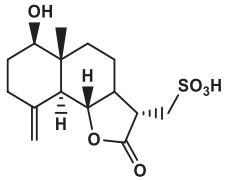
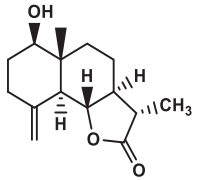
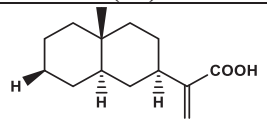
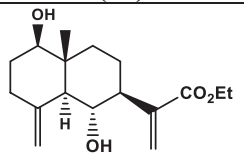
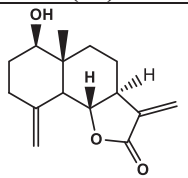
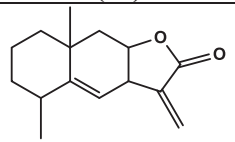
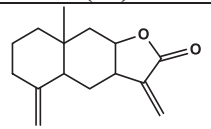
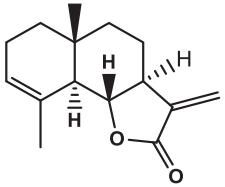
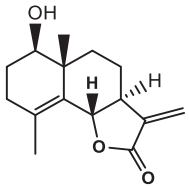
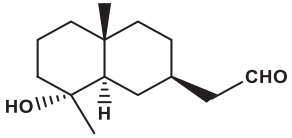
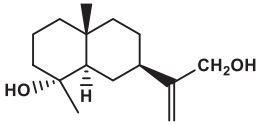
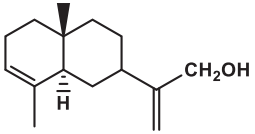
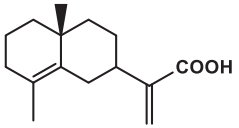
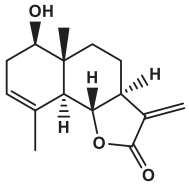
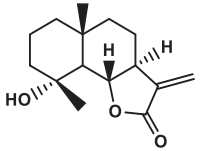
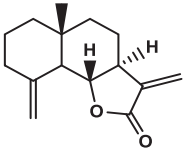
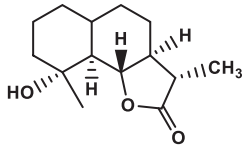


Sesquiterpènes de type germacrène



1 : Isodehydrocostus lactone; **2:** Saussurealdéhyde; **3 :** Isodehydrocostuslactone-15-aldehyde ; **4 :**11,13-Epoxydehydrocostus lactone ; **5 :**11,13-Epoxyisozaluzanin C ; **6 :**11, 13-Epoxy-3-ketodehyrocostus lactone ; **7 :** 4β-Methoxy-dehydrocostus lactone ; **8 :**15-Hydroxydehydrocostus lactone ; **9 :** Lappadilactone ; **10 :** Dehydrocostus lactone ; **11 :** Isozaluzanine ; **12 :** Zaluzanine C ; **13 :** 11β, 13-Dihydro-3-epizaluzanin C ; **14 :** Cynaropicrine ; **15 :** Lappalone ; **16 :** Saussureamine B ; **17 :** Saussureamine C ; **18 :** 12- Methoxy-dihydrodehyrocostus lactone ; **19 :** Mokko lactone ; **20 :** 11,13 Dihydroglucoaluzanine C ; **21 :** Dihydrocostunolide ; **22 :** Costunolide ; **23 :** 12-Methoxy dihydrocostunolide ; **24 :** Costunolide 15-o-β-d-glucopyranoside ; **25:** Saussureamine A.

Tableau 1.5. (Suite)

Sesquiterpènes de type eudesmane				
				
(26)	**(27)**	**(28)**	**(29)**	**(30)**
				
(31)	**(32)**	**(33)**	**(34)**	**(35)**
				
(36)	**(37)**	**(38)**	**(39)**	**(40)**
				
(41)	**(42)**	**(43)**	**(44)**	**(45)**

26 : Saussureal ; **27 :** 13-Sulfodihydrosantamarine ; **28 :** Saussureamine D ; **29 :** 13-Sulfodihydroreyosin ; **30 :** 11β, 13-Dihydroreyosine ; **31 :** réynosine ; **32 :** acide β-costique ; **33 :** α-cyclocostunolide ; **34 :** alantolactone ; **35 :** Isoalantolactone ; **36 :** β-cyclocostunolide; **37 :** Magnolialide ; **38 :** 4β-hydroxyeudesm-11-en-12-al ; **39 :** 4α-Hydroxy-4β-Méthyldihydrocostol ; **40 :** α-Costol ; **41 :** acide isocostique ; **42 :** Santamarine ; **43 :** Arbusculine A; **44 :** 1β, 6α- Dihydroxycostic acid ethyl ester ; **45 :** Colartine.

1.5.5. Composition chimique de l'huile de costus indien

L'HE du costus est largement utilisée en médecine traditionnelle chinoise et indienne en tant que médicament unique ou en association avec d'autres substances naturelles bioactives [126]. Il est reporté que l'huile de costus peut être obtenue par différentes méthodes d'extraction avec un rendement de 0.8 à 6% [129]. L'étude de la composition chimique de l'huile est largement étudiée dans la littérature. Différents mono- et sesquiterpènes sont trouvés dans l'HE citant : Pinène, phéllandrène, D-limonène, 1,8-cinéol, terpinène, linalool, terpinéol, trans-cinnamaldéhyde, safrole, α-copaène, aromadendrène, myrcène, thuyène, β-élémène, dihydro-α-ionone, β-caryophyllène , géranyl acétone, curcumène, sélinène, trans-β-ionone, α-élémol, nérolidol, caryophyllène oxide, eudesmol, camphène, bergamotène, 8-cédrèn-13-ol, β-costol, dehydrocostus lactone et costunolide [129,136,139–141], etc. Liu et al. ont mené une étude phytochimique sur l'HE du costus de la région Hebei-Chine et les résultats ont révélé une teneur plus élevée en sesquiterpénoïdes (79.80%) par rapport aux monoterpénoïdes (13.25%). Les principaux composants sont le dehydrocostus lactone (46.75%), le costunolide (9.26%), le 8-cédrèn-13-ol (5.06%) et l'α-curcumène (4.33%) [136]. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par d'autres études. Choudhary et al. ont constaté que le dehydrocostus lactone et le costunolide sont les composants majoritaires de l'huile [142]. L'analyse menée par Chen et al. a montré que les HE du costus indien récolté de sept provinces différentes contiennent toutes ces deux principaux constituants mais à des teneurs différentes variant entre 16.30 et 25.36% pour le dehydrocostus lactone et de 4.28 à 8.32% pour le costunolide [143].

Dans une autre étude, le (7Z,10Z,13Z)-7,10,13-hexadecatriénal et le dehydrocostus lactone sont majoritaires dans les huiles extraites des racines du costus provenant de la Chine et de la Corée [140]. Parallèlement, Abdelwahab et al. ont noté la dominance du costunolide et β-élémène (7.18 %) dans l'huile provenant du Jazan-Arabie Saoudite [144]. Toutes ses variations dans la composition chimique de l'essence de costus indien sont liées à la période de la récolte, aux facteurs climatiques et saisonniers ainsi qu'à la durée de stockage de la plante. En effet, Benedetto et al. ont montré que la période de récolte influe énormément sur la composition chimique de l'huile de costus. La concentration la plus élevée en dehydrocostus lactone est trouvée chez les plantes âgées de trois ans et cueillies en Avril et en Décembre [145].

1.5.6. Utilisation de l'huile de costus indien

Des remèdes à base de l'huile de costus ou de ses dérivés sesquiterpéniques sont utilisés en médecine de par le monde. Vu sa richesse en terpènes, flavonoïdes et en lactones sesquiterpéniques, cette huile exerce une multitude d'activités biologiques, comme mentionné dans le ci-dessous **Tableau 1.6.**

Tableau 1.6. Utilisations médicinales de l'huile des racines du costus indien et de ses constituants.

Effet	Forme utilisée	Caractéristique	Réf.
Antimicrobien	Huile	Inhibition de la croissance des *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococus aureus* et *Bacillus subtilis*.	[144]
	Costunolide	Inhibition de la croissance des *Trichophyton mentagrophytes, T. simii, T. rubrum* 296*, T. rubrum* 57*, Epidermophyton floccosum, Scopulariopsis sp, Aspergillus niger, Curvulari lunata* et *Magnaporthe grisea*	[146]
	Flavonoïdes	Inhibition de la croissance des *Aspergillus niger, Aspergillus Ochraceus, Aspergillus versicolor, Aspergillus flavus, Penicilium, ochrochloron, Penicillium funiculosum, Trichoderma viride, Cladosporium cladosporioides* et *Alternaria alternate.*	[147]
Larvicide *(Aedes albopictus)*	Huile	CL50= 12.41 µg/ml	[136]
	Dehydrocostus lactone	CL50= 2.34 µg/ml	
	Costunolide	CL50= 3.26 µg/ml	
Anti-inflammatoire	Costuolide	Inhibition de TNF-α, IL-1β, IL-6, MCP-1, COX2, iNOS et NF—B	[148–150]
	Dehydrocostus lactone	Inhibition de TNF-α, IL-1β, IL-17, IL-6, IL-23, IFN-γ, MPO, MCP-1, SOD, COX-2, iNOS	[151,152]
	Santamarine	Inhibition des iNOS et COX-2	[153]
	Saussureamines A et B	Inhibition de la production du NO et l'activation du NF-κB	[154]
Antitumorale	Dehydrocostus lactone	Apoptose des lignées cellulaires HeLa (CL50=12µM)	[155]
	Costunolide	Apoptose des lignées cellulaires MDA-MB-231	[156]
	Cynaropicrine	Apoptose des lignées cellulaires Colo-205 et MCF-7	[157]
	β-cyclocostunolide Dihydro costunolide	Apoptose des lignées cellulaires U937, Eol-1 et Jurkat T	[158]
Anti-hépatite	Dehydrocostus lactone	Suppression de l'expression de l'antigène de surface de l'hépatite B	[159]
	Costunolide		

Hypolipémiant	Huile	Réduction du taux du cholestérol et des triglycérides dans le sang	[138]
Anticoagulant	Huile	Inhibition de la coagulation plaquettaire induite par l'adénosine diphosphate	[160]
Antidiabétique	Huile	Baisse de la glycémie sanguine	[161]
Sédatif	Huile	Soulagement des douleurs durant l'accouchement	[132]

CL50 : Concentration létale ; TNF-α : Facteur de nécrose tumorale ; IL : Interleukine ; MCP-1 : Monocytes de type 1 ; NF—B : Facteur nucléaire-kappa B ; IFN-γ : Interféron-gamma ; MPO : Myéloperoxydase ; SOD : Superoxide dismutase COX-2 : Cyclooxygénase, iNOS : Oxyde nitrique syntase.

a. Activité anti-inflammatoire

C'est l'activité la mieux décrite pour l'extrait de costus, utilisé seul ou en association avec d'autres médicaments, dans le traitement de l'œsophagite, la gastrite, l'ulcère gastroduodénal, le rhumatisme articulaire aigu et la polyarthrite rhumatoïde. L'activité anti-inflammatoire de l'huile de costus s'exprime principalement par l'effet inhibiteur des cytokines pro-inflammatoires par ses dérivés sesquiterpéniques. Il est prouvé que le dehydrocostus lactone inhibe l'expression de plusieurs cytokines comme le facteur de nécrose tumorale (TNF-α), l'interleukine (IL-1β, IL-17, IL-6, IL-23), l'interféron-gamma (IFN-γ), la myéloperoxydase (MPO), la protéine chimioattractive des monocytes de type 1 (MCP-1), la superoxide dismutase (SOD), la cyclooxygénase (COX-2) et l'oxyde nitrique syntase (iNOS) [151,152]. Simultanément, le costunolide inhibe l'expression du TNF-α, IL-1β, IL-6, MCP-1, COX2, iNOS et NF—B (facteur nucléaire-kappa B) [148–150]. Choodej et al. ont constaté des concentrations d'inhibition de 50% des facteurs égales à 2.05 et 2.06 µM, pour dehydrocostus lactone et costunolide, respectivement [151]. La santamarine est un autre sesquiterpène lactone qui possède un effet anti-inflammatoire par son activité inhibitrice de cytokines (iNOS et COX-2) chez des macrophages humaines (RAW264) stimulées par les lipopolysaccharides (LPS) [153]. De plus, Matsuda et al. ont trouvé que les saussureamines A et B inhibent la production d'oxyde nitrique (NO) et l'activation du NF-κB chez les macrophages péritonéales de souris stimulées par des lipopolysaccharides (LPS) [154].

b. Activité antimicrobienne

L'huile de costus est traditionnellement utilisée pour traiter les maladies de la cavité buccale, telles que la mauvaise haleine, la carie dentaire et la parodontite [162], ce qui suggère son utilisation dans le traitement des maladies infectieuses causées par des bactéries, des champignons, des virus et des parasites. Il est rapporté que l'essence de costus est très efficace contre différents agents pathogènes résistants. Abdelwahab et al. ont utilisé la

méthode des disques pour exploiter l'effet antibactérien de l'huile et les résultats ont révélé l'inhibition de la croissance des *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococus aureus* et *Bacillus subtilis* [144]. Cette activité est liée à la présence des sesquiterpènes lactones connus par leur propriétés antibactériennes et antifongiques [163]. Le costunolide a montré une activité antifongique significative contre *Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton simii, Trichophyton rubrum* 296*, Trichophyton rubrum* 57*, Epidermophyton floccosum, Scopulariopsis sp, Aspergillus niger, Curvulari lunata* et *Magnaporthe grisea* avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de 66.5, 62, 31.25, 62.5,125, 250, 250, 125 et 250 µg/ml, respectivement [146]. Dans une autre étude, il a été conclu que le dehydrocostus lactone et le costunolide présentent une activité antimycobactérienne synergique contre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [164].

c. Activité antitumorale

Différents sesquiterpènes lactones provenant du costus indien ont montré un effet anticancéreux prometteur, en particulier le dehydrocostus lactone [155], le costunolide [156], le cynaropicrine [157], le β-cyclocostunolide et le dihydro costunolide [158].

d. Activité hépatoprotectrice

En plus des activités citées ci-dessus, quelques sesquiterpènes lactones isolés de l'HE du costus sont doués d'une activité hépatoprotectrice. Le costunolide et le dehydrocostus lactone ont montré un effet suppresseur important de l'expression de l'antigène de surface de l'hépatite B chez la lignée cellulaire Hep 3B [159].

e. Activité larvicide

Ces dernières années, l'utilisation des insecticides naturels, d'origine végétale, respectueux de l'environnement a suscité l'intérêt de plusieurs chercheurs. Dans ce concept, Liu et al. ont conduit une étude qui a pour but de déterminer l'activité larvicide de l'HE du costus indien et de ses constituants isolés contre les larves du moustique *Aedes albopictus* [136]. Le dehydrocostus lactone et le costunolide ont présenté une activité larvicide plus forte par rapport à l'huile avec des concentrations létales (CL50) de 2.34 et 3.26 µg/ml, respectivement.

f. Autres activités

Il est rapporté que l'essence de costus inhibe la coagulation plaquettaire induite par l'adénosine diphosphate [160], diminue la glycémie sanguine [161] et soulage les douleurs durant l'accouchement sans aucun effet indésirable sur la mère ou sur le fœtus [132]. En dehors des fins médicinales, l'huile de costus est utilisée en parfumerie et en cosmétique pour la préparation des parfums. Elle a une odeur caractéristique très forte et se marie bien avec le vétiver, le patchouli, la rose, la violette et le bois de santal utilisés dans la préparation des huiles pour cheveux [165].

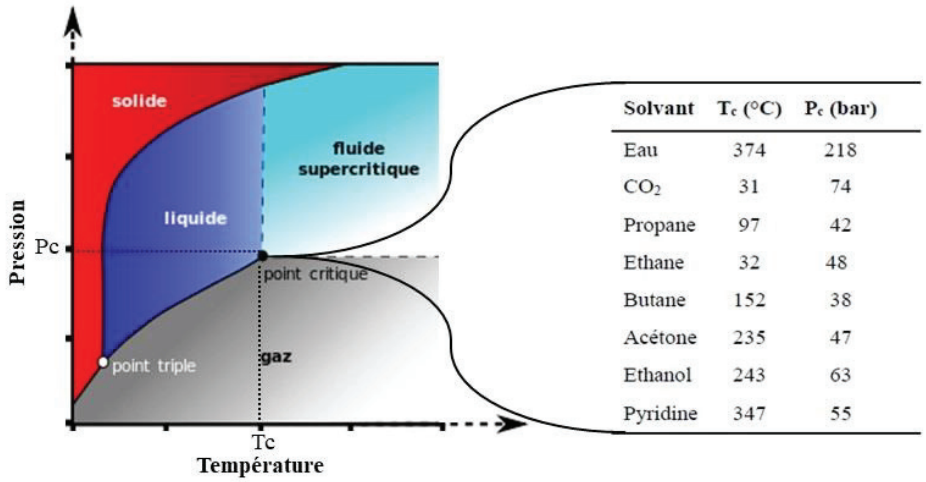
1.6. Extraction des huiles essentielles et végétales

1.6.1. Généralités

L'extraction végétale est une opération très fréquente dans de nombreux procédés de fabrication dans les différentes industries agro-alimentaire, pharmaceutique, cosmétique et de la parfumerie. Elle sert à isoler une substance d'intérêt thérapeutique contenue initialement dans une plante. Différentes méthodes sont développées pour l'extraction des HE et HV comme l'hydrodistillation, l'entrainement à la vapeur, l'expression à froid, l'extraction par solvant organique, etc. Ces techniques traditionnelles requièrent d'importantes adaptations afin de minimiser les risques pour la santé et l'environnement. Au cours de cette dernière décennie, la recherche de procédés et de produits alternatifs plus respectueux de l'homme et de son environnement occupe une place fondamentale en recherche et en développement [166]. Des méthodes d'extraction innovantes sont abordées et développées beaucoup plus écologiques, utilisant des solvants moins toxiques et permettant d'obtenir des extraits de haute qualité. Parmi ces méthodes, l'extraction par fluide supercritique requiert une importance particulière.

1.6.2. Extraction par fluide supercritique

Un fluide est en état supercritique lorsqu'il est porté dans des conditions opératoires de température et de pression supérieures à sa pression (Pc) et température (Tc) critiques, comme représenté dans la **Figure 1.15**.



Solvant	T_c (°C)	P_c (bar)
Eau	374	218
CO_2	31	74
Propane	97	42
Ethane	32	48
Butane	152	38
Acétone	235	47
Ethanol	243	63
Pyridine	347	55

Figure 1.15. Diagramme de phases et coordonnées critiques de quelques fluides.

Un fluide supercritique présente des propriétés physico chimiques intermédiaires entre celles de l'état gazeux et liquide. En particulier, il possède une viscosité faible comme celle des gaz, un coefficient de diffusivité intermédiaire entre celui des gaz et des liquides, et une masse volumique élevée comme celle des liquides [166]. Le dioxyde de carbone (CO_2) est le fluide le plus utilisé. Il est peu coûteux, non toxique, non inflammable et chimiquement inerte. Son état gazeux à la pression atmosphérique permet de le séparer spontanément de l'extrait sans présence éventuelle de résidus de solvants [167]. En outre, le CO_2 possède un bon pouvoir solvant pour l'extraction de composés apolaires tels que les molécules hydrophobes (huiles, alcanes) et peut dissoudre certaines molécules faiblement polaires et volatiles telles que les cétones, les alcools, les esters et les aldéhydes [168]. De plus, sa température et sa pression critiques facilement accessibles sont compatibles avec une large gamme de composés naturels comme les huiles des plantes sans crainte de dégradation thermique [167].

Le cycle de l'extraction par fluide supercritique comporte trois zones (**Fig.1.16**) :

a. La zone de l'extraction où le fluide, en état supercritique, se trouve en contact avec la matrice végétale,
b. La zone de séparation où l'on récupère l'extrait par une simple détente, provoquant ainsi une séparation des solutés et du CO_2,
c. La zone de recyclage où le fluide est condensé pour être remis en état supercritique et entamer un nouveau cycle.

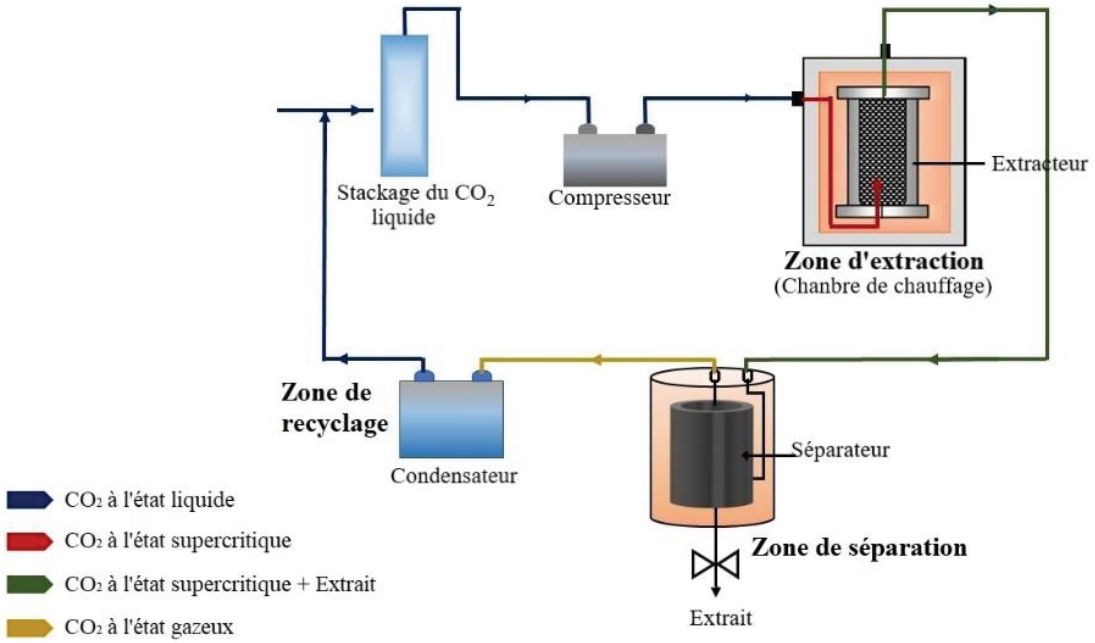


Figure 1.16. Schéma simplifié d'une opération d'extraction par CO_2 supercritique.

Les avantages de l'extraction par CO_2 supercritique sont :

- ✓ Minimisation voire élimination des solvants chimiques,
- ✓ Diffusivité facile dans la matrice végétale,
- ✓ Pouvoir solvant élevé,
- ✓ Convenable pour les substances thermolabiles,
- ✓ Facilité de récupération et purification des extraits par dépressurisation,
- ✓ Extrapolation simple [168].

1.6.3. Utilisation du CO_2 supercritique pour l'extraction de l'huile des noyaux de dattes et celle du costus

Le procédé de l'extraction par CO_2 supercritique a été largement utilisé pour l'extraction des HE et HV. Concernant l'huile des noyaux de dattes, les travaux présentés dans le **Tableau 1.7** traitent l'effet des conditions opératoires sur le rendement et la composition chimique de l'huile extraite.

Pour le costus, ce procédé n'a jamais été utilisé. La plupart des travaux réalisés ont procédé à l'extraction de l'huile par solvants organiques.

Tableau 1.7. Exemples de travaux réalisés à propos de l'utilisation du CO_2 supercritique pour l'extraction de l'huile des noyaux de dattes.

Variété	Pays	Pression (bar)	Température (K)	Rendement (%)	Composant majoritaire	Réf.
Mabroum	Malaisie	200	313	8.1	Acide oléique	[169]
Ghars	Algérie	250	333	14.3	Acide oléique	[170]
Mariami	Malaisie	414	343	3.0	Acide élaïdique	[171]
Mariami	Malaisie	552	323	3.3	Acide oléique	[172]

1.7. Challenges dans l'utilisation des huiles essentielles et végétales

La stabilité des HE ou HV au moment de leur utilisation ou durant leur stockage est un facteur important pour préserver leurs valeurs thérapeutiques. Généralement, l'utilisation est entravée par leur susceptibilité d'oxydation [102]. Il est rapporté que les caractéristiques organoleptiques des huiles sont très sensibles à l'oxydation. Dans certains cas extrêmes, l'oxydation des HE ou HV peut générer des dérivés toxiques néfastes pour les tissus biologiques [31–33,35,36]. Il est constaté que les monoterpènes (mono et bicycliques), les alcools monoterpéniques, les amino-acides soufrés et les oxydes sesquiterpéniques sont thermolabiles et sensibles à l'oxydation, limitant ainsi l'utilisation de l'huile de costus [173]. En outre, la stabilité de l'huile des noyaux de dattes contre l'oxydation dépend en particulier de sa teneur et sa composition en acides gras insaturés. Ainsi, l'huile la moins insaturée est la plus stable à l'oxydation. Cette stabilité dépend aussi de sa teneur en tocophérols. D'autres facteurs comme la chaleur et la lumière peuvent favoriser les réactions d'oxydation des huiles végétales, augmentant ainsi la vitesse d'auto-oxydation [102].

Au-delà de la sensibilité aux conditions environnementales (lumière, chaleur et oxygène), l'huile de costus peut être à l'origine de réactions allergiques cutanées potentielles (i.e. dermites de contact) si elle est appliquée directement sur la peau sans dilution. Une étude menée par Cheminat et ses collaborateurs a montré que l'élimination des sesquiterpènes lactones (costunolide et dehydrocostus lactone) de l'huile de costus par complexation avec l'aminoéthyl-polystyrène prévient les réactions allergiques chez les cobayes [174]. Cependant, cette solution ne semble pas prometteuse puisque la plupart des activités biologiques de l'huile de costus sont liées à la présence de ces deux constituants. Outre tout

cela, la faible la perméabilité et la biodisponibilité réduite des HE et HV dans les fluides et les tissus biologiques constituent d'autres facteurs limitant leur utilisation [11].

De nouveaux procédés sont développés pour surmonter ces limitations, parmi eux la nanoencapsulation a connu un intérêt croissant. Plus de détails à propos de cette technologie vont être abordés dans le chapitre suivant.

CHAPITRE II

ENCAPSULATION DES HUILES ESSENTIELLES ET VEGETALES

CHAPITRE II

ENCAPSULATION DES HUILES ESSENTIELLES ET VEGETALES

2.1. Introduction

Les technologies de la nanoencapsulation sont devenues incontournables dans de très nombreux secteurs (agroalimentaire, cosmétique, électronique, construction, textile, biomédical, etc.) depuis plusieurs années pour les avantages qu'elles peuvent procurer [175,176]. Elles permettent la préparation de différents nanotransporteurs individualisés constitués d'un matériau enrobant contenant une matière active. Dans cette optique, la nanoencapsulation a pu résoudre les problèmes qui confrontent l'utilisation des HE et HV [11,177].

Ce chapitre met l'accent sur un type particulier de nanotransporteurs, les nanoparticules polymères (NP). Nous allons décrire dans une première partie leur propriétés colloïdales ainsi que les principaux polymères utilisés pour leur conception. Ensuite, nous présenterons les procédés de synthèse les plus utilisés puis dans une dernière partie nous exploiterons particulièrement la méthode de la nanoprécipitation et les résultats obtenus dans différents travaux en termes de propriétés physicochimiques des NP chargées d'huile, des excipients utilisés ainsi que des facteurs influençant cette technique.

2.2. Principe de la nanoencapsulation des huiles

La nanoencapsulation consiste ainsi à associer une molécule bioactive (huile) à un nanotransporteur (hôte) dans le but de la protéger du milieu extérieur, d'assurer son transport au sein de l'organisme et garantir sa libération contrôlée à une cellule ou un tissu spécifique [178].

L'engouement pour la nanoencapsulation des huiles vient des nouvelles caractéristiques qu'elle confère, notamment :

- ✓ La protection des huiles des facteurs environnementaux tels que le pH, l'oxygène, la lumière, etc.
- ✓ La protection contre l'évaporation et la photo-dégradation.
- ✓ L'efficacité améliorée.
- ✓ La toxicité réduite.
- ✓ La réduction des effets secondaires.

- ✓ L'accroissement du confort des malades [39,123,178].

2.3. Nanoparticules polymères

2.3.1. Définition

Les nanoparticules polymères sont des particules colloïdales solides ayant des diamètres compris entre 10 et 1000 nm [179]. Selon la nature et la structure des polymères et leur mode de formulation, il existe deux types de nanoparticules polymères présentant différentes morphologies ; des nanocapsules composées d'une membrane polymère renfermant un cœur liquide et des nanosphères composées d'un cœur matriciel de polymère (**Figure 2.1**). Les premières sont de type vésiculaire ; alors que les deuxièmes sont de type matriciel [180].

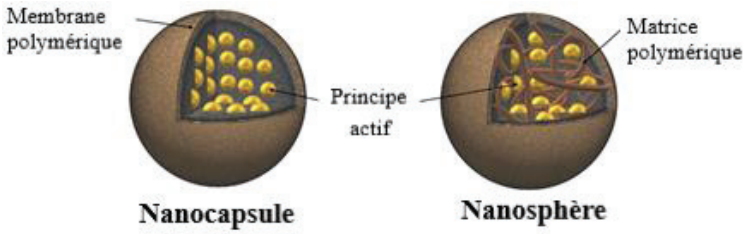


Figure 2.1. Types de nanoparticules polymères (Lammari et al.)[i].

2.3.2. Caractéristiques physicochimiques

La taille des particules, la charge de surface et l'efficacité d'encapsulation sont les principaux paramètres à déterminer pour caractériser les NP.

A. Taille

La diffusion dynamique de la lumière (en anglais, *dynamic light scattering* ou DLS) est autrement appelée la spectroscopie de corrélation de photons (PCS). Elle permet de déterminer le diamètre hydrodynamique de particules, pour des tailles comprises entre 1 nm à 1 µm. Le principe de cette technique porte sur le mouvement brownien des particules en suspension après avoir été irradiées par un laser. L'intensité de la lumière diffusée par les particules est dépendante de leur taille et de leur vitesse. Plus la taille des particules est importante, mieux est la diffusion des rayons lumineux, plus le mouvement Brownien est lent.

[i] Lammari N, Froiio F, Louaer M, et al. Poly (ethyl acrylate-co-methyl methacrylate-co-trimethylammoniethyl methacrylate chloride) (Eudragit RS 100) nanocapsules as nanovector carriers for Phoenix dactylifera L. seeds oil: a versatile antidiabetic agent. *Biomacromolecules* 2020.
DOI: https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255.

L'équation de Stokes-Einstein permet de calculer le diamètre hydrodynamique (d_h) des particules en tenant compte du coefficient de diffusion translationnel (D_0) estimé via la sommation de la lumière diffusée par les particules (eq 2.1) [182] :

$$d_h = \frac{K_B T}{3\pi\eta D_0} \qquad (2.1)$$

Où :

d_h : Diamètre hydrodynamique

T : Température

k_B : Constante de Boltzman ($1.3805 . 10^{-23} J.K^{-1}$)

η : Viscosité de la phase de dispersion

D_0 : Coefficient de diffusion

Cette technique permet ainsi d'obtenir une estimation de la distribution de taille par l'indice de polydispersité de la suspension [182].

B. Charge de surface

La charge de surface d'une particule est caractérisée par le potentiel zêta (ζ). Lorsqu'une particule chargée est en suspension, il se forme une double couche électrique entre la surface chargée et les ions du milieu environnant. Le potentiel ζ est mesuré à la surface de la double couche électrique (nommée plan de cisaillement ou plan de glissement) (**Fig. 2.2**) [183].

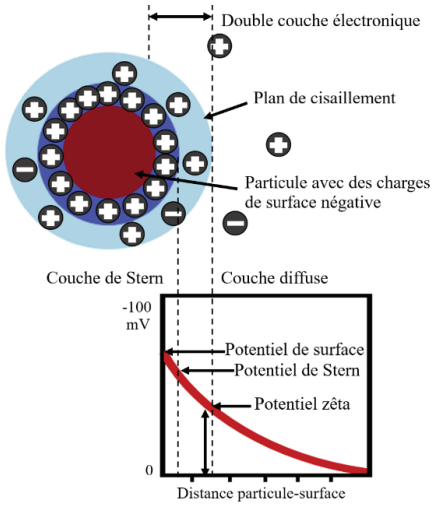


Figure 2.2. Représentation de la double couche électronique.

Le potentiel ζ permet de prédire la stabilité à long terme des NP (**Tableau 2.1**). Si les particules ont un potentiel de charge faible en valeur absolue, les forces de répulsion sont

dans ce cas faibles pour vaincre les forces d'attraction de Van der Waals, ce qui conduit à la floculation ou à la coagulation des particules [184].

Tableau 2.1. Stabilité des dispersions pour différentes valeurs de potentiel zêta (Arulprakasajothi et al.)[i].

Potentiel zêta (mV)	Stabilité du colloïde
0 à ±5	Coagulation ou floculation rapide
±10 à ±30	Stabilité faible
±30 à ±40	Stabilité modérée
±40 à ±60	Stabilité bonne
Plus de ±61	Stabilité excellente

Le potentiel ζ se mesure par électrophorèse à l'aide d'un Zetasizer NanoZS. Un voltage est appliqué entre deux électrodes et les NP vont se déplacer suivant leur charge vers l'électrode de charge opposée. Plus la particule est chargée, plus le déplacement est rapide. La détermination de la vitesse des ions, autrement dite mobilité électrophorétique, sert à calculer le potentiel par l'équation de Helmholtz-Smoluchowski (eq 2.2) :

$$\zeta = \frac{\eta \mu e}{\varepsilon} c \qquad (2.2)$$

Où :

ζ : Potentiel zêta

η : Viscosité du milieu

μ_e : Mobilité électrophorétique

c : Constante qui vaut 1 ou 2/3

ε : Constante diélectrique du milieu

La constante c est définie selon le rayon de la NP (r) et l'épaisseur de la double couche de diffusion k :

$$\begin{cases} \text{si } kr < 0.1, c = 2/3 \\ \text{si } \quad kr > 100, c = 1 \end{cases}$$

[i] Arulprakasajothi M, Elangovan K, Chandrasekhar U, et al. Performance study of conical strip inserts in tube heat exchanger using water based titanium oxide nanofluid. *Therm Sci* 2018; 22: 477–485.

C. Efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'une particule à encapsuler un principe actif est évaluée par deux paramètres ; l'efficacité d'encapsulation (EE%) et le taux de charge (DL, *Drug loading*). L'EE% est définie comme étant la quantité de la substance active présente dans les NP par rapport à la quantité initiale introduite dans la formulation (eq 2.3).

$$EE\% = \frac{\text{Quantité du principe actif ou d'huile dans les particules}}{\text{Quantité initiale du principe actif ou d'huile}} \times 100 \qquad (2.3)$$

Le DL correspond à la masse de la substance active encapsulée par rapport à la masse de nanoparticules (eq 2.4) [183].

$$DL = \frac{\text{Masse du principe actif ou d'huile dans les particules}}{\text{Masse de nanoparticules préparées}} \times 100 \qquad (2.4)$$

Ces deux paramètres dépendent du procédé de formulation. Différentes méthodes d'analyse sont utilisées pour les déterminer telles que la spectroscopie ultraviolet-visible, la chromatographie en phase liquide, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse [183], etc.

2.4. Principaux polymères utilisés pour la conception des nanoparticules

Un polymère est une macromolécule formée par la répétition de nombreuses sous-unités qui dérivent d'un ou de plusieurs monomères. Les polymères utilisés pour la conception des NP peuvent être d'origine naturelle ou synthétique [185]. Ils doivent être biocompatibles, non immunogènes, non toxiques et non cancérigènes. Ils peuvent être biodégradables c'est-à-dire ils se dégradent dans l'organisme et leurs produits de dégradation sont bien tolérés. Dans la cas contraire, ils s'éliminent de l'organisme sans avoir subir de dégradations [186]. En tenant compte de la très grande variété des polymères utilisables, nous ne mentionnerons ici que les principaux.

2.4.1. Polymères naturels

Les polymères naturels sont principalement les polysaccharides tels que l'alginate, le chitosane, le dextrane et les dérivés de la cellulose et les protéines comme l'albumine et la gélatine. La **Figure 2.3.A** illustre quelques types de polymères naturels. Les polysaccharides sont largement utilisés pour la conception de la paroi des NP. Ils sont biocompatibles et la plupart sont biodégradables. Leurs produits de dégradation sont facilement éliminés, voire

assimilés par l'organisme vu qu'ils sont constitués de sous-unités saccharidiques (type glucose, galactose, etc.). Leur utilisation est limitée par la faible reproductibilité en termes de structures, de masses molaires et de composition chimique [186].

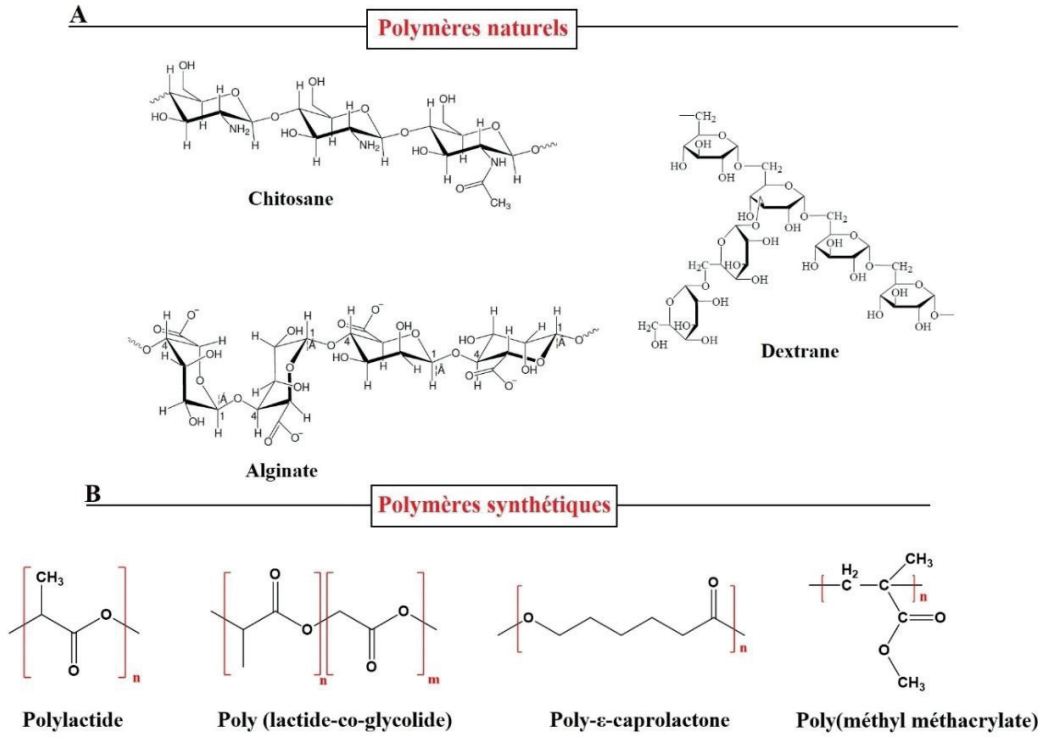


Figure 2.3. Illustration de la structure chimique de quelques polymères naturels et synthétiques.

2.4.2. Polymères synthétiques

Les polymères synthétiques sont plus utilisés comparativement aux polymères naturels. Ils sont caractérisés par :

- ✓ Des propriétés mécaniques, viscoélastiques ou tensioactives mieux contrôlables ;
- ✓ Une composition chimique largement modulable grâce à la très grande variété des monomères ;
- ✓ Un contrôle complet de la taille et des masses molaires en utilisant des méthodes de synthèse macromoléculaires appropriées,
- ✓ Une pureté remarquable [40,41,186].

Les principaux polymères synthétiques utilisés pour la conception des NP sont les suivants :

A. Les polyesters aliphatiques

Le polylatide, le poly (lactide–co–glycolide) et le poly-ε-caprolactone sont les principaux polyesters aliphatiques fréquemment utilisés pour la vectorisation des principes actifs hydrophobes (**Fig.2.3.B**) ; et sont connus pour leur biocompatibilité et leur biodégradabilité [187].

B. Les dérivés du type méthacrylate (Eudragit®)

Un autre type de polymères synthétiques utilisés pour la vectorisation des principes actifs est le poly (méthyl méthacrylate) (PMMA) (**Fig.2.3.B**). Il est synthétisé par polymérisation radicalaire du méthacrylate de méthyle (**Fig.2.4**) amorcée par amorçage chimique (peroxodisulfate d'ammonium ou de potassium) ou par irradiation UV [186].

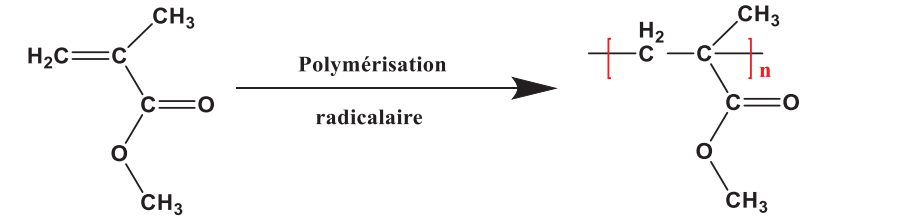


Figure 2.4. Mécanisme de la polymérisation radicalaire du méthacrylate de méthyle.

Les dérivés du PMMA sont plus connus sous leur dénomination commerciale d'Eudragit®. Ils sont simplement utilisés pour l'enrobage des formes pharmaceutiques conventionnelles comme les comprimés. Les premiers polymères de PMMA développés étaient gastro-résistants. Par la suite, la gamme de produits d'Eudragit® est élargie en introduisant sur le marché des dérivés poly (aminoalkyl) méthacrylate pour la libération prolongée. Les polymères de PMMA sont classés en deux grandes classes : (*i*) les PMMA solubles dans les fluides digestifs comme l'Eudragit® E, L et S ayant des groupements acides ou alcalins permettant une libération pH-dépendante du principe actif ; (*ii*) les PMMA insolubles, à savoir l'Eudragit® RL et RS ayant des groupes neutres permettant une libération contrôlée du principe actif indépendamment du pH (**Fig.2.5**) [188]. Les Eudragit® RS et RL sont des copolymères de méthyle de méthacrylate et d'éthyle d'acrylate, avec une faible teneur en acide d'ester méthacrylique, et possédant des groupes ammonium quaternaire (**Fig.2.6**) [185]. La différence entre ces deux polymères réside sur la proportion des différents composés. La proportion en éthylacrylate, méthylméthacrylate et triméthylammonio-

éthylméthacrylate de l'Eudragit® RL et RS est : 1/2/0.2 et 1/2/0.1, respectivement [189]. Les polymères d'Eudragit® sont biocompatibles. Plusieurs études *in vivo* ont prouvées que les Eudragit® ne provoquent pas de toxicité ou d'irritation des cellules ou des tissus. De ce fait, ils sont acceptés par les autorités de santé dans les principaux pays en Europe, aux Etats unis d'Amérique et au Japon comme des polymères pharmaceutiques [190].

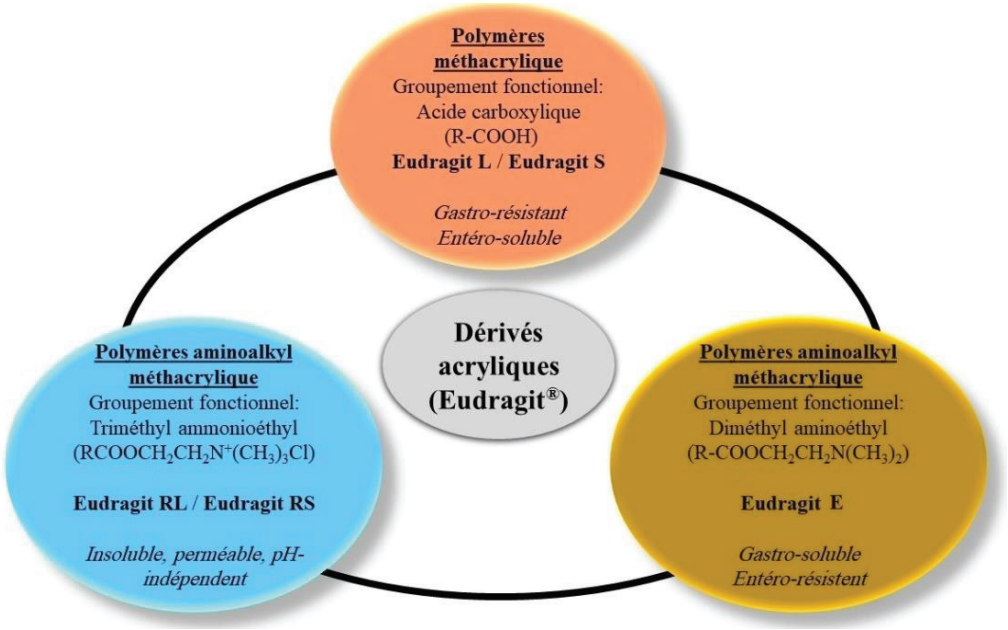


Figure 2.5. Propriétés des dérivés acryliques (Eudragit®).

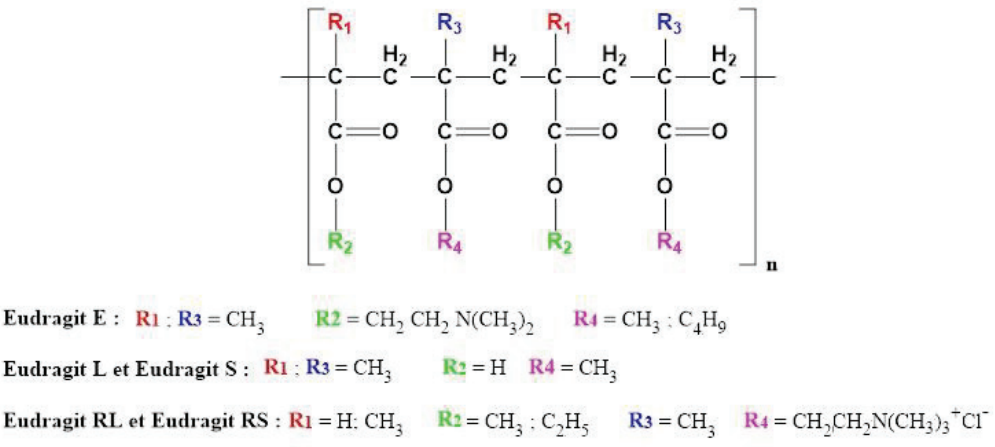


Figure 2.6. Structure chimique des dérivés acryliques (Eudragit®) (Date et al.)[i].

[i] Date AA, Jain A, Khachane P, et al. Organic solvent-free approach to single step fabrication of Eudragit nanoparticles using Labrasol. *Pharmazie* 2010; 65: 733–736.

2.5. Méthodes de préparation des nanoparticules polymères

De très nombreux procédés sont proposés pour préparer les NP, parmi lesquels les méthodes utilisant des polymères préformés sont plus utilisées. Cela est lié au fait que ces derniers possèdent des caractéristiques physicochimiques bien définies, et que le processus est simple et rapide et ne nécessite pas une étape d'élimination des monomères résiduels et des réactifs (catalyseur, amorceur, etc.) lors de la polymérisation. De plus, ils sont compatibles avec les principes actifs et ne provoquent aucune réaction pendant la préparation des NP [186].

Le principe des méthodes utilisant des polymères préformés (**Fig.2.7**) consiste à précipiter un polymère préalablement dissous dans un solvant organique, formant ainsi des NP solides. Ces méthodes sont largement utilisées pour encapsuler les HE et HV, comme illustré dans le **Tableau 2.2.**

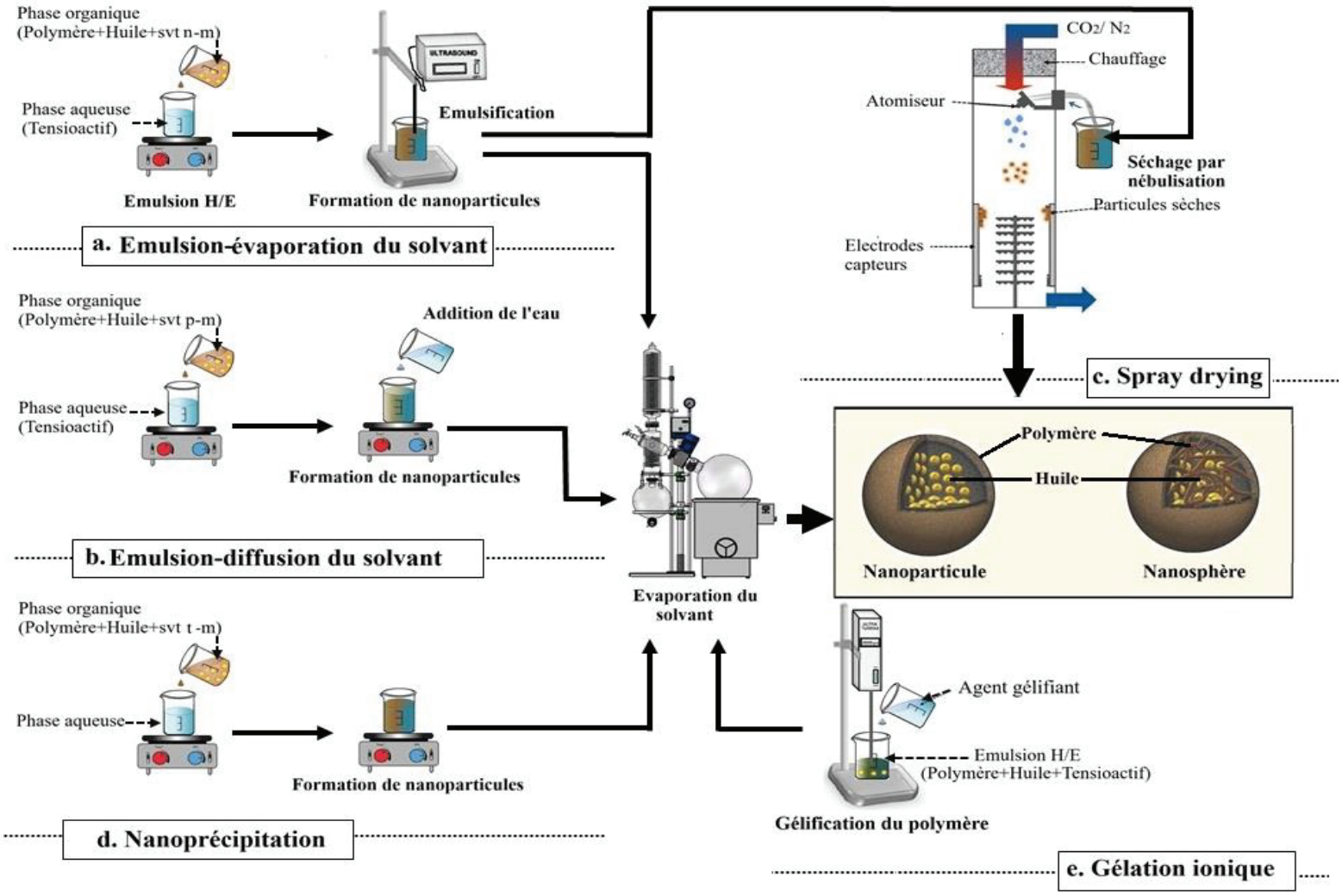


Figure 2.7. Méthodes de préparation de nanoparticules polymères.

Svt n-m : Solvant non-miscible avec l'eau ; svt p-m : Solvant partiellement miscible avec l'eau ; svt t-m : Solvant totalement miscible avec l'eau.

Tableau 2.2. Différentes méthodes d'encapsulation des huiles essentielles et végétales

Huile encapsulée	Plante	Polymère utilisé	Propriété physicochimiques			Réf.
			d_h (nm)	ζ (mV)	EE (%)	
Nanoprécipitation						
Palmarosa	*Cymbopogon martini* L.	Poly-ε-caprolactone	282	-27.2	99.5	[192]
Géraniol	/	Poly-ε-caprolactone	289	-26.6	99.9	[192]
Thym	*Thymus vulgaris*	Eudragit-L 100-55	154	-4.11	52.8	[193]
	Thymus serpyllum L.	Chitosan	/	/	68	[194]
		Chitosan	117-226	+27	/	[195]
	Thymus leptobotrys	Eudragit -RS 100	144	+80.9	/	[196]
	Thymus satureoides	Eudragit -RS 100	132	81.6	/	[196]
Bergamote	*Citrus bergamia* Risso.	Eudragit RS100	57- 208	+39 to +74	28-84	[43]
Orange douce	*Citrus sinensis* L.	Eudragit RS100	57- 208	+39 to +74	56-96	[43]
Romarin	*Rosmarinus officinalis* L.	Eudragit EPO	200	/	59	[197]
		Poly-ε-caprolactone	145	-11.0	78.2	[198]
		Poly-ε-caprolactone	220	-19.9	99	[199]
Lavande	*Lavandula dentate* L.	Eudragit EPO	200	/	41	[197]
		Poly (éthylène oxide)-b- Polylactide	10-75	/	70-75	[200]
Menthe poivrée	*Mentha piperita* L.	Acétate de cellulose	180	-38	/	[201]
Cinnamon	*Cinnamomum cassia* persl.	Acétate de cellulose	150	-40	/	[201]
Citronelle	*Cymbopogon citratus* DC.	Acétate de cellulose	200	-36	/	[201]
		Polylactide	300	-6	/	[202]
Citron vert	*Citrus aurantiifolia* Christm.	Chitosane	/	+10	/	[203]
		Chitosane	250	+10	/	[195]
Poivre noir	*Shinus mole* L.	Chitosane	754	+9.1	/	[204]
Zanthoxylum rhoifolium	*Zanthoxylum rhoifolium* L.	Poly-ε-caprolactone	500	-20	96	[205]
Pelargonium graveolens	*Pelargonium graveolens* L'Hér.	Eudragit RS100	113	+80.6	/	[196]
Eugenia Caryophyllata	*Eugenia Caryophyllata* C.	Eudragit RS 100	131	+80.7	/	[196]
Carvacrol	/	Poly(3-hydroxybutyrate)	146	-26	21	[206]
		Poly (lactide–co–glycolide)	210	/	26	[207]
Carvone	/	Poly (lactide–co–glycolide)	126	/	/	[208]
Anethole	/	Poly (lactide–co–glycolide)	158	/	/	[208]
Rose musquée		Eudragit RS100	158	+9.8	/	[209]

Tableau 2.2. (Suite)

Nanoprécipitation						
Ricin	*Ricinus communis* L.	1,2,4-Triazoline-3,5-dione	260-150	/	/	[210]
Olive	*Olea europaea* L.	1,2,4-Triazoline-3,5-dione	185	-30	/	[210]
Pépins de courge	*Cucurbita maxima* L.	1,2,4-Triazoline-3,5-dione	172	-35	/	[210]
Tournesol	*Helianthus annuus* L.	1,2,4-Triazoline-3,5-dione	178	-33	/	[210]
Noisette	*Corylus avellane* L.	1,2,4-Triazoline-3,5-dione	175	-35	/	[210]
Son de riz	*Oryza sativa* L.	Poly-ε-caprolactone	200	-9	/	[211]
Pignons de pin	*Pinus siberica* L.	Eudragit L 100-55 / Eudragit L100 / Eudragit S100	236-296	/	85-91	[212]
Acide gras libre			260-319	/	83-99	
Babassu	*Attalea speciose* L.	Poly (lactide–co–glycolide)	209	−15.8	/	[213]
Emulsion-évaporation de solvent						
Clou de girofle	*Syzygium aromaticum* L.	Poly (lactide–co–glycolide)	238	−40.3	93.9	[214]
Eugénol	/	Poly (lactide–co–glycolide)	179	/	98	[215]
Trans-cinnamaldéhyde	/	Poly (lactide–co–glycolide)	174		92	[215]
Grains de Chia	*Salvia hispanica* L.	Mucilage des grains de chia	205	-11.6	82.8	[216]
Grains de café	*Coffea arabica* L.	Polylactide	263	/	112.7	[217]
		Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)	271		94.5	[217]
Emulsion-diffusion de solvent						
Romarin	*Rosmarinus officinalis* L.	Poly-ε-caprolactone	150	-7.06	81.5	[218]
Citron	*Citrus aurantiifolia* Christm	Poly-ε-caprolactone	141.83	-4.82	92.3	[218]
Lippia sidoides	*Lippia sidoides* Cham.	Poly-ε-caprolactone	173.6	/	70.6	[219]
Citronelle	*Cymbopogon citratus* DC.	Poly (lactide–co–glycolide)	277	−16	73	[220]
		Poly (lactide–co–glycolide)	217	-20.5	/	[221]
Eugénol	/	Poly-ε-caprolactone	320		100	[222]
Gélation ionique						
Clou de girofle	*Syzygium aromaticum* L.	Chitosane	268.47	+22.45	/	[223]
Poivre noir	*Schinus mole* L.	Chitosane	517	+40.2	26.6	[224]
Cannelle	*Cinnamomum verum* L.	Chitosane	80–100	-11.2 to -22.4	47.7 - 55.6	[225]
		Chitosane	215	/	/	[226]
Cardamome	*Elettaria cardamomum* L.	Chitosane	50–100	>+50	>90	[227]
Summer savory	*Summer savory* L.	Chitosane	135- 237	-9.7 to -21.1	35.1 – 40.7	[228]

Tableau 2.2. (Suite)

Gélation ionique						
Carum copticum	*Carum copticum* L.	Chitosane	/	/	36.2	[229]
Curcuma	*Curcuma longa* L.	Alginate + Chitosane	<300	/	71	[230]
Citronelle	*Cymbopogon citratus* DC.	Alginate + Chitosane	<300	/	86.9	[230]
Jasmin	*Jasminum polyanthum* L.	Gélatine + Gomme arabique		/	/	[231]
Basilic	*Bcimum basilicum* L.	Gélatine	392 $.10^3$	/	95.4	[232]
Pimenta dioica	*Pimenta dioica* L.	Chitosane + k-carrageenan	/	/	/	[233]
Eugénol	/	Chitosane	80–100	+16.2 to +33.5	1.1–20.2	[234]
Origan	*Origanum vulgare* L.	Chitosane	40 - 80	/	/	[235]
Grains de pavot	*Papaver rhoeas* L.	Gélatine + Gomme arabique	<5000	/	76.8	[236]
Vanille	*Vanilla pompona* L.	Chitosane + Gomme arabique	7500	/	94.2	[237]
Olive	*Olea europaea* L	Gélatine + Sodium alginate	/	/	/	[238]
Microalgue	/	Gélatine + Gomme arabique	≈30 $.10^3$	/	/	[239]
Menthe poivrée	*Mentha piperita* L.	Gélatine + Gomme arabique	/	/	/	[240]
Séchage par atomisation						
Nigelle	*Nigella staiva* L.	Caséinate de sodium + maltodextrine DE10	18.5.10^3	/	95.4	[241]
Eucalyptus	*Eucalyptus staigeriana* L.	Gomme de cajou	27.70- 432.6	+24.5 to +10.4	24.9 - 26.8	[242]
Lippia sidoides	*Lippia sidoides* L.	Alginate + Gomme de cajou	223 to 399	−30 to −36	50	[243]
		Chitosane + Gomme de cajou	335–558	/	70	[244]
		Chitosane	25	–17.3	77.8	[245]
Origan	Oregano EO	Inuline	3000 - 4500	/	/	[246]
		Amidon de riz	3000 – 4500	/	/	[247]
		Gélatine + sucrose	3000 – 4500	/	/	[247]
Amande	*Prunus dulcis* L.	Amidon du taro	1600–31.1.10^3	/	37.5	[248]
Pivoine	*Paeonia lactiflora* L.	Protéine de lactosérum + sirop de maïs + Lécithine	/	/	93.6	[249]
Grains de Chia	*Salvia hispanica* L.	Caséinate de sodium + maltodextrine + protéine de chia + mucilage de chia	/	/	53.4- 96.2	[250]
Tournesol	*Helianthus annuus* L.	Maltodextrine + HPMC	/	/	79.4	[251]
Noyer du Queensland	*Macadamia integrifolia* L.	Caséinate de sodium + maltodextrine	9750	/	88.7	[252]

Tableau 2.2. (Suite)

Séchage par atomisation						
Kénaf	*Hibiscus cannabinus* L.	β-cyclodextrine + Gomme arabique	(25–37).10^3	/	90.0- 95.3	[253]
		β-cyclodextrine + Caséinate de sodium	(25–37).10^3	/	90.0- 95.3	[253]
		β-cyclodextrine + Gomme arabique + Caséinate de sodium	(25–37).10^3	/	90.0- 95.3	[253]
		Maltodextrine + Protéine de soja	4000-10.10^3	/	≈ 60	[254]
		Protéine de lactosérum + gomme mesquite	(13–28).10^3	/	70	[255]
		Protéine de lactosérum + gomme mesquite	(13–28).10^3	/	70	[255]
Noix	*Juglans regia* L.	Poudre de lait écrémé + Tween 80	/	/	/	[256]
		Poudre de lait écrémé + maltodextrine	/	/	/	[256]
Lin	*Linum usitatissimum* L.	Maltodextrine + Gomme arabique	600 -26.10^3		62.3- 95.7	[257]
		Gomme arabique	/	/	≈ 90	[258]
		Gomme arabique + Maltodextrine	/	/	≈ 90	[258]
		Gomme arabique + Maltodextrine + Protéine de lactosérum	/	/	≈ 90	[258]
		Maltodextrine +methylcellulose	/	/	≈ 90	[258]
		Gomme arabique	/	/	54.9 – 90.7	[259]
		Gomme arabique + Maltodextrine	/	/	54.9 – 90.7	[259]
Noyer du Queensland	*Macadamia integrifolia* L.	Caséinate de sodium +maltodextrine	9750	/	88.75	[252]
Grains de café	*Coffea arabica* L.	Gomme arabique	4000-11.10^3	/	10-30	[260]
		Gomme arabique	7880-13.10^3	/	48-88	[261]

HPMC: Hydroxypropyl méthylcellulose.

2.5.1. Emulsion-évaporation du solvant

Cette technique développée et brevetée par Vanderhoff et al. [262] consiste à préparer une émulsion huile dans l'eau puis à éliminer le solvant organique par évaporation ce qui conduit à la précipitation du polymère et la formation des NP. Dans un premier temps, l'huile à encapsuler est dissoute dans une solution organique non miscible à l'eau, constituée de polymère et de solvant organique (dichlorométhane, chloroforme, ou acétate d'éthyle). Ce mélange est ensuite émulsifié dans une phase aqueuse contenant un stabilisant (généralement le poly alcool vinylique) par homogénéisation ou ultrasonication pour former une émulsion stable. Après cela, le solvant organique est évaporé soit par agitation magnétique continue à température ambiante soit sous pression réduite conduisant à la formation de nanoparticules (**Fig.2.7.a**) [263,264]. Elle est bien adaptée aux principes actifs lipophiles mais moins utilisée pour encapsuler les huiles extraites des plantes par rapport aux autres méthodes **(Tableau 2.2)**. Tout ceci est peut-être dû aux énergies importantes mises en jeu et à la possibilité de la coalescence possible des gouttelettes lors de l'évaporation du solvant.

2.5.2. Emulsion-diffusion du solvant

Cette technique brevetée par Quintanar et al. est basée sur des phénomènes de diffusion de solvant pour provoquer la précipitation d'un polymère [265]. Dans cette méthode, le polymère et l'huile doivent être dissous dans une phase organique qui est partiellement miscible à la phase aqueuse contenant un tensioactif sous forte agitation, provoquant une saturation mutuelle rapide des deux phases. Par la suite, l'addition d'eau au système provoque la précipitation du polymère et la formation de NP par diffusion du solvant vers la phase aqueuse externe (**Fig.2.7.b**)[266]. Le solvant est enfin éliminé par évaporation ou filtration. Les avantages de l'émulsion-diffusion du solvant sont la reproductibilité même à l'échelle industrielle et les taux élevés d'encapsulation des molécules lipophiles. Cependant, l'instabilité éventuelle des principes actifs dans la phase aqueuse saturée durant l'émulsification et les grands volumes d'eau à éliminer constituent les principaux inconvénients qui limitent l'utilisation de cette technique [267].

2.5.3. Séchage par atomisation

Le séchage par atomisation ou spray drying est couramment utilisé pour l'encapsulation de molécules sensibles à la chaleur, telles que les huiles, les enzymes et les arômes en raison du court temps de contact entre l'air chaud et la matière première,

généralement, l'évaporation se produit entre 15 à 30 secondes et a lieu à la surface des particules ; ainsi, les matériaux n'atteignent jamais la température d'entrée du gaz de séchage [268]. Les HV sont également encapsulées par cette technique (**Tableau 2.2**). Le spray drying consiste à atomiser une émulsion contenant l'huile à encapsuler avec le polymère en fines gouttelettes dans un courant d'air chaud et sec qui évapore le solvant instantanément en raison de l'énorme surface entre les gouttelettes et le gaz de séchage et forme par la suite des particules solides après précipitation du polymère [269] (**Fig.2.7.c**). Les particules obtenues à la fin sont des nanocapsules contenant la phase huileuse à l'intérieur. Le séchage par nébulisation classique n'est pas adapté à la production des NP parce qu'elles sont trop petites pour être récupérées à la fin du procédé dans le cyclone. Par conséquent, des nouveaux types d'appareils sont conçus pour faciliter la collecte des NP comme le Büchi Nano Spray Dryer, qui capte les particules par un collecteur électrostatique [269].

Actuellement, le spray drying est largement utilisé dans les industries nutraceutiques et agro-alimentaires en raison de ses avantages, notamment la facilité de mise à l'échelle, la simplicité, les faibles coûts de production et la capacité à produire des particules faciles à transporter et à stocker. D'après les différents travaux illustrés dans le **Tableau 2.2**, les inconvénients de ce procédé résident dans la granulométrie élevée des particules ; ainsi qu'aux faibles rendements d'encapsulation des huiles.

2.5.4. Nanoprécipitation

La technique de la nanoprécipitation, autrement appelée « déplacement du solvant », a été décrite pour la première fois par Fessi et al. [270]. Elle requiert l'utilisation de trois ingrédients : un polymère, un solvant et un non-solvant du polymère. Le solvant doit être totalement miscible avec le non-solvant. L'acétone, en raison de son faible point d'ébullition, est très fréquemment recommandé [271]. Cette technique est largement utilisée pour l'encapsulation des HE ou HV, comme illustré dans le **Tableau 2.2**. Elle consiste à dissoudre l'huile dans une solution organique de polymère qui sera ensuite injectée, sous agitation modérée, dans une phase aqueuse, dans laquelle le polymère et l'huile ne sont pas solubles (**Fig.2.7.d**). Les NP se forment instantanément après diffusion du solvant vers la phase aqueuse. Cette formation de particules est traduite par le fait que le polymère quitte les gouttelettes et se dépose à l'interface grâce à son insolubilité à la fois dans l'huile et dans la phase externe (mélange eau-solvant). Par la suite, le solvant organique sera éliminé par

évaporation sous pression réduite [181]. L'ajout des agents tensioactifs n'est pas indispensable mais permet généralement de diminuer la taille et la polydispersité des NP obtenues et assurer la stabilité à long terme de la suspension colloïdale.

La nanoprécipitation est très simple à mettre en œuvre, rapide, économique et hautement reproductible. Elle permet l'incorporation d'une grande quantité d'huile avec un excellent rendement dans des NP de taille bien définie et de distribution de taille homogène. De plus, elle ne nécessite pas d'énergie de production élevée. Le principal inconvénient de cette méthode est l'utilisation de solvants organiques qui peuvent être toxiques pour la santé ce qui nécessite une étape de purification des NP à la fin du procédé [272].

2.5.5. Gélation ionique

Afin d'éviter l'utilisation de solvants organiques toxiques ou des énergies élevées, Calco et al. ont proposé une nouvelle approche appelée gélation ionique ou coacervation [273]. Dans cette méthode, des agrégats nanométriques se forment via l'interaction électrostatique à partir des solutions de polysaccharides chargés qui gélifient en présence d'ions de signe opposé (**Fig.2.7.e**). Cette transition de l'état liquide à l'état de gel des polysaccharides se produit à pH fixe. L'alginate de sodium et le chitosane sont parmi les polysaccharides les plus utilisés pour la gélation ionique [268]. Plusieurs études ont été menées en utilisant cette technique pour encapsuler les HV, comme indiqué dans le **Tableau 2.2.** Les principaux inconvénients de cette technique sont l'efficacité d'encapsulation modérée et le diamètre élevé des nanocapsules comparativement à la technique de la nanoprécipitation.

2.6. Revue bibliographique sur l'utilisation de la nanoprécipitation pour l'encapsulation des huiles essentielles et végétales

Ce travail traite pour la première fois l'encapsulation de l'HE du *Saussurea lappa* CB. Clarke. et l'HV du *Phoenix dactylifera* L. dans des NP en employant la technique de la nanoprécipitation. Une étude bibliographique semble nécessaire sur l'utilisation de cette technique pour l'encapsulation des huiles et le **Tableau 2.3** en résume l'ensemble des travaux qui ont été conduits pendant cette dernière décennie.

2.6.1. Matières premières utilisées

a. Phase organique (phase solvant) : La méthode de la nanoprécipitation implique l'utilisation d'un solvant organique, qui est complètement soluble dans la phase aqueuse externe, induisant une précipitation immédiate du polymère. Selon le **Tableau 2.3**, l'acétone est le solvant le plus recommandé [192,199–202,207,274]. Plusieurs d'autres solvants peuvent être utilisés comme le diméthylsulfoxyde [208], l'éthanol [196], l'acide acétique [194,195,203,204,275], le mélange isopropanol/acétone [193,197], et le tétrahydrofurane [276]. Les polymères utilisés sont souvent biodégradables et biocompatibles ; ils peuvent être synthétiques ou naturels. Eudragit®RS100 [43,196], Eudragit®L100-55 [193], Eudragit®EPO [197], poly-ε-caprolactone [192,199,277], polylactide [202] et poly (lactide- co-glycolide) [207,208] sont des polymères synthétiques largement utilisés pour l'encapsulation des huiles de plantes. Les polymères naturels peuvent aussi être utilisés pour développer des NP, parmi lesquels le chitosane est le plus répandu [194,203,275]. Des tensioactifs comme les esters de sorbitane (span 20 [199]) et les phospholipides (l'Epikuron®200 [207] et la lécithine [192]) sont couramment utilisés pour empêcher l'agrégation des particules.

b. Phase aqueuse (phase non-solvant) : Il peut s'agir d'un mélange de tensioactifs dissous dans le non-solvant. Le Pluronic®F68 [192,207], le Tween 80 [199,274] et l'alcool polyvinylique [193,278] sont des exemples de tensioactifs utilisés. Concernant le non-solvant, l'eau est largement utilisée [193,196,199–202,207,208,274,279].

Tableau 2.3. Utilisation de la nanoprécipitation pour l'encapsulation des huiles essentielles et végétales dans des nanoparticules.

Huile encapsulée	Phase organique			Phase aqueuse		Propriétés biologiques	Application	Réf.
	Polymère	Surfactant	Solvant	Surfactant	Solvant			
C. martini	Poly-ε-caprolactone	Lécithine	Acétone	Pluronic F68	Eau	Antioxydant, antimicrobien	Cosmétique	[192]
Géraniol	Poly-ε-caprolactone	Lécithine	Acétone	Pluronic F68	Eau	Antioxydant, antimicrobien	Cosmétique	[192]
	PluronicF-127	/	Tétrahydrofuran	/	Eau	Antimicrobien	Alimentaire	[276]
Thym	Eudragit L 100-55	/	Acétone : Isopropanol	Alcool polyvinylique	Eau	Antioxydant	Alimentaire	[193]
	Chitosane	/	Acide acétique	/	Méthanol	Antimicrobien	Agriculture	[194]
	Chitosane	/	Acide acétique	/	Méthanol	Antimicrobien	Agriculture	[195]
	Eudragit RS 100	/	Ethanol	/	Eau	Bactériostatique, fongistatique	Médecine	[196]
Bergamote	Eudragit RS100	/	Acétone	/	Eau	Antimicrobien	Alimentaire	[43]
Orange sucrée	Eudragit RS100	/	Acétone	/	Eau	Antimicrobien	Alimentaire	[43]
Romarin	Eudragit EPO	/	Acétone: Isopropanol	/	Eau	Antioxydant	Cosmétique	[197]
	Poly-ε-caprolactone	Span 20	Acétone	Tween 80	Eau	Insecticide	Agriculture	[198]
	Poly-ε-caprolactone	Span 20	Acétone	Tween 80	Eau	Antioxydant, analgésique, antimicrobien	Médecine	[199]
Lavande	Eudragit EPO	/	Acétone:Isopropanol	/	Eau	Antioxydant	Cosmétique	[197]
	Polyéthylène oxide -b-Polylactide	/	Acétone	/	Eau	Antimicrobien	Textile	[200]
Menthe poivrée	Acétate de cellulose	/	Acétone	/	Eau	Antimicrobien	Médecine	[201]
Cannelle	Acétate de cellulose	/	Acétone	/	Eau	Antimicrobien	Médecine	[201]
Citronnelle	Acétate de cellulose	/	Acétone	/	Eau	Antimicrobien	Médecine	[201]
	Polylactide	/	Acétone	/	Eau	Antimicrobien	Médecine	[202]
Poivre noir	Chitosane	/	Acide acétique	/	Méthanol	Antifongique	Agriculture	[204]
Citron vert	Chitosane	/	Acide acétique	/	Méthanol	Antimicobien	Agriculture	[195]

Tableau 2.3 (Suite)

Citron vert	Chitosane	/	Acide acétique	/	Méthanol	Antimicrobien	Alimentaire	[203]
Z. rhoifolium	Poly-ε-caprolactone	Span 60	Acétone	Tween 80	Eau	Pesticide	Agriculture	[274]
P. graveolens	Eudragit RS 100	/	Ethanol	/	Eau	Bactériostatique, fongistatique	Médecine	[196]
E. Caryophyllata	Eudragit RS 100	/	Ethanol	/	Eau	Bactériostatique, fongistatique	Médecine	[196]
Carvacol	Poly (lactide- co-glycolide)	Epikuron 200	Acétone	Pluronic F68	Eau	Antimicrobien	Médecine	[207]
Carvone	Poly (lactide- co-glycolide)	/	Diméthylsulfoxyde	/	Eau	Antimicobien	Alimentaire	[208]
Poivrier	Chitosane	/	Acide acétique	/	Méthanol	Antifongique	Alimentaire	[275]
Anéthole	Poly (lactide- co-glycolide)	/	Diméthylsulfoxyde	/	Eau	Antimicobien	Alimentaire	[208]
Origan	Poly-ε-caprolactone	Span 80	Acétone	Tween 80	Eau	Antimicobien	/	[280]
Rose musquée	Eudragit RS100	/	Acétone	Tween 80	Eau	Cicatrisant	Cosmétique	[209]
Ricin	1,2,4-Triazoline-3,5-dione	/	Acétone	/	Eau	Source d'acides gras insaturés	/	[210]
Olive								
Pépins de courge								
Tournesol								
Noisette								
Son de riz	Poly-ε-caprolactone					Anti-solaire	Cosmétique	[211]
Pignons de pin	Eudragit L 100-55 / Eudragit L100 / Eudragit S100	Poloxamer 188	Acétone	/	Eau	Source d'acides gras insaturés	Médecine	[212]
Babassu	Poly (lactide- co-glycolide)	/	Acétone	Pluronic F68	Eau	Traitement de l'hyperplasie bénigne de la prostate	Médecine	[213]

2.6.2. Propriétés physicochimiques des nanoparticules polymères préparées par nanoprécipitation

A. Propriétés colloïdales

Les NP produites par la technique de la nanoprécipitation présentent généralement une taille nanométrique, une distribution granulométrique étroite avec une EE% élevée. Khoobdel et al. ont constaté que les nanocapsules préparées à base de poly-ε-caprolactone contenant l'HE du romarin possédaient une forme sphérique, une petite taille (145 nm) avec une distribution régulière (indice de polydispersité < 0.3) (**Fig.2.8**) [198]. Dans une autre étude, l'analyse des NP par microscopie électronique en transmission a révélé une nette différence entre la structure des NP vides et celles contenant l'huile de citron vert (**Fig.2.9**) [281]. De plus, les NP contenant l'huile végétale extraite des pignons de pin possèdent un diamètre moyen et une EE% variant entre 236-296 nm et 85-91%, respectivement [212].

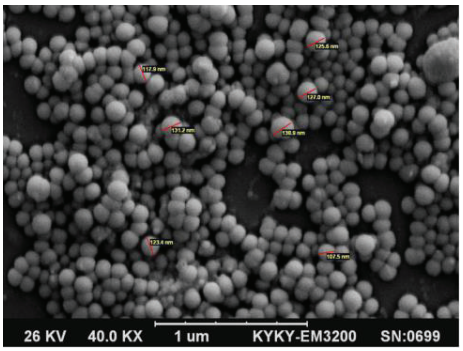


Figure 2.8. Microscopie électronique à balayage des nanoparticules contenant l'huile essentielle du romarin (Khoobdel et al.)[i].

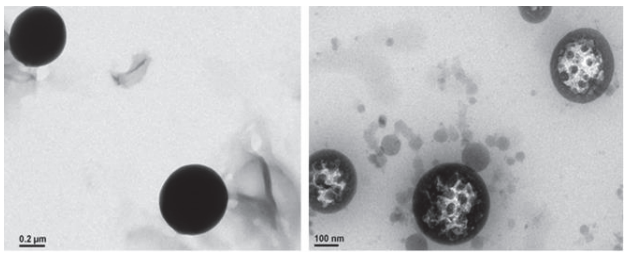


Figure 2.9. Microscopie électronique en transmission des nanoparticules vides (à gauche) et ceux contenant l'huile de citron vert (à droite) (Liakos et al.)[ii].

[i] Khoobdel M, Ahsaei SM, Farzaneh M. Insecticidal activity of polycaprolactone nanocapsules loaded with Rosmarinus officinalis essential oil in Tribolium castaneum (Herbst). *Entomol Res* 2017; 47: 175–184.
[ii] Liakos IL, D'autilia F, Garzoni A, et al. All natural cellulose acetate—Lemongrass essential oil antimicrobial nanocapsules. *Int J Pharm* 2016; 510: 508–515.

Plusieurs travaux ont rapporté l'efficacité de la nanoprécipitation par rapport à d'autres méthodes en termes de taille de NP et d'EE% d'huile. Shakeri et al. ont constaté que l'utilisation de la nanoprécipitation a permis une amélioration significative de l'EE% (21%) et une meilleure stabilité (potentiel ζ de -26 mV) des particules de poly(3-hydroxybutyrate) chargées en carvacrol par rapport à la méthode de la dialyse [206]. En outre, Esfandyari-Manesh et al. ont comparé le diamètre moyen, la distribution de taille et la charge en huile du poly (lactide-co-glycolide) carvone / anéthol-NP préparées par deux techniques ; la nanoprécipitation et l'émulsification évaporation du solvant [208]. Les résultats ont révélé que les particules élaborées par nanoprécipitation sont plus petites en taille (126 et 158 nm pour carvone et anéthole, respectivement), et ont une distribution de taille plus étroite (indice de polydispersité d'environ 0.08) et une EE% plus élevée (12.32% pour la carvone et 14.73% pour l'anéthole). La faible EE% constatée en utilisant la méthode d'émulsification est attribuée à la perte d'huile pendant la phase d'évaporation qui a duré 3 h. De plus, la difficulté pour la dispersion mutuelle de la phase organique en utilisant cette méthode se traduit par des particules plus grosses [208]. Fraj et al. ont rapporté des résultats similaires en termes de taille de particule, de potentiel ζ et d'EE% pour l'HE d'*Origanum vulgare* L. contenue dans des NP de poly-ε-caprolactone préparées par nanoprécipitation et double émulsion [280]. La taille des particules, le potentiel ζ et l'EE% trouvés sont de 181.6 nm, -40.9 mV, 85.89% et 1759 nm, -15.7 mV, 47.5% pour la nanoprécipitation et la double émulsion, respectivement.

B. Libération *in vitro* de l'huile encapsulée

La libération *in vitro* des HE ou HV à partir des NP est largement étudiée. En 2015, Christofoli et ses collaborateurs ont examiné la libération de l'HE du *Zanthoxylum rhoifolium* L. à partir des NP de poly-ε-caprolactone préparées par nanoprécipitation [205]. Les résultats ont montré une courbe de libération biphasique ; une libération initiale rapide pendant la première heure suivie d'une libération ralentie après 12 h pour atteindre un maximum de libération (81.9%) à 72 h (**Fig.2.10**). La première phase est due à la fraction d'huile adsorbée à la surface des NP. Alors que la deuxième est attribuée à la diffusion de l'huile du cœur des NP vers l'extérieur [205]. Ce profil de libération est similaire à ce qui est observé dans des travaux antérieurs [194,200,207].

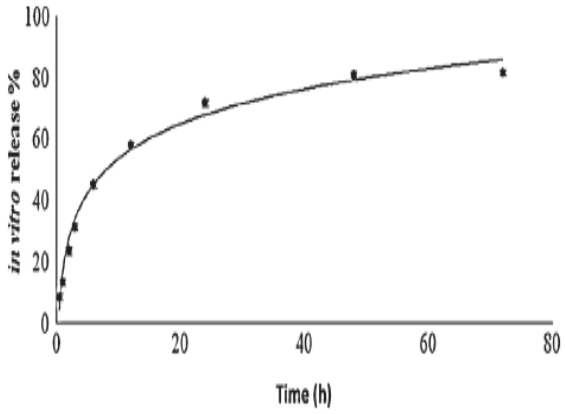


Figure 2. 10. Profil de libération de l'huile essentielle du *Zanthoxylum rhoifolium* L. à partir des nanoparticules de poly-ε-caprolactone (Christofoli et al.)[i].

Les études *in vitro* démontrent que différents facteurs peuvent affecter la libération des huiles à partir de systèmes colloïdaux. Ces facteurs comprennent le type de la paroi polymérique et l'huile à encapsuler. Il est montré que la libération du carvacrol est plus rapide par rapport à celle du thymol à partir des NP de chitosane [194]. Les temps de libération maximaux sont de 540 et 630 min pour une libération de 100% de carvacrol et de thymol, respectivement. Ce résultat s'explique par le fait que le carvacrol est plus hydrophile que le thymol, donc au contact de l'eau, une libération plus importante est attendue [194]. Dans une autre étude, Popiolski et ses collaborateurs ont rapporté que la libération de l'HE du *Lavandula dentata* L. à partir des NP de copolymères polyéthylène oxyde-acide b-polylactique dépend du poids moléculaire du polylactide [200]. En effet, deux types de polylactide ayant différents poids moléculaires (4.5 et 10 KDa) sont utilisés pour la conception des NP. La libération de l'essence à partir des NP formées par le polylactide (10KDa) était d'environ 40% et ce pourcentage est resté le même pendant 24 h. Alors que pour les NP de polylactide (4.5KDa), seulement 5% sont libérés. Cette différence était liée à la taille moyenne des NP. Au fait, les NP produites à partir du polylactide à poids moléculaire élevé sont significativement plus petites que celles produites à partir du polylactide à poids moléculaire faible ; ce qui favorise la diffusion de l'huile de lavande du noyau interne vers le milieu externe, conduisant ainsi à augmenter la quantité d'huile libérée [200].

[i] Christofoli M, Cristina E, Costa C, et al. Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from Zanthoxylum rhoifolium (Rutaceae) in Bemisia tabaci populations. *Ind Crop Prod* 2015; 70: 301–308.

C. Stabilité des nanoparticules

La stabilité des NP préparées par la nanoprécipitation est largement étudiée dans la littérature. Fraj et al. ont comparé la stabilité des NP contenant l'HE d'*Origanum vulgare* L. préparées par deux techniques la nanoprécipitation et la double émulsion ; pendant 60 jours à différentes température (4, 25 et 40 °C) et ont suivi la teneur en carvacrol, le constituant majeur de l'HE. Les résultats ont montré que les NP sont physiquement stables avec une forte rétention en carvacrol [280]. De même, Badri et al. n'ont constaté aucun changement significatif de la taille et du potentiel ζ des NP contenant l'huile de nigelle en fonction de la température stockées pendant un mois (**Fig.2.11)** [279].

Le grand défi qui freine la faisabilité des applications biologiques des HE et HV dans plusieurs domaines est leur instabilité en présence de la lumière, la chaleur et l'humidité. Dans ce contexte, l'étude de la photodégradation (rayonnements UV-A et UV-C) des NP de poly-ε-caprolactone contenant l'HE de *Zanthoxylum rhoifolium* L. est étudiée [274]. Les résultats ont révélé que l'huile non encapsulée subit une photodégradation de 94.3% après 7 h d'exposition à la lumière, tandis que la dégradation des NP n'est que 44.8%. Cela a confirmé la propriété de la paroi polymérique à protéger les molécules bioactives [274]. Des résultats similaires sont trouvés avec des NP contenant l'huile de bourrache avec la bétaméthasone [282].

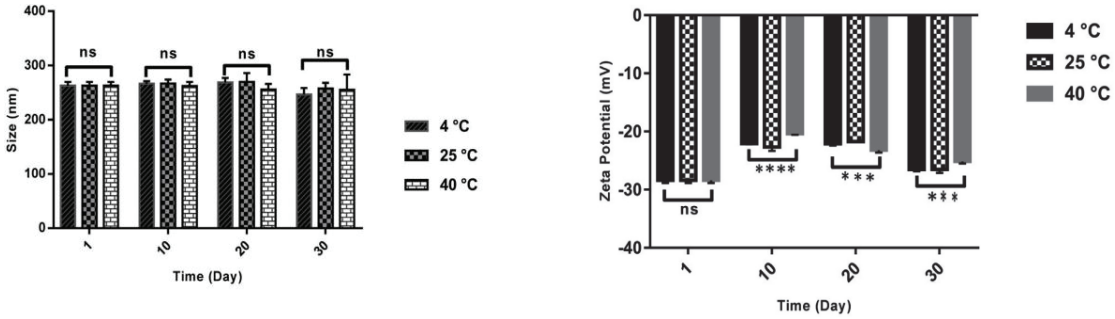


Figure 2.11. Etude de stabilité des nanoparticules contenant l'huile de nigelle stockées pendant un mois à différente températures en termes de taille et du potentiel zêta (Badri et al.)[i].

[i] Badri W, El-Asbahani A, Miladi K, et al. Poly (ε-caprolactone) nanoparticles loaded with indomethacin and Nigella Sativa L. essential oil for the topical treatment of inflammation. *J Drug Deliv Sci Technol* 2018; 46: 234–242.

D. Reproductibilité à grande échelle

Avec le développement des stratégies de conception de nanovecteurs, la reproductibilité et l'applicabilité d'un point de vue industriel restent cruciales dans le choix d'une technique appropriée pour produire des nanovecteurs chargés d'HE ou HV avec des propriétés prévisibles. En ce qui concerne le processus de nanoprécipitation, Ephrem et ses collaborateurs ont comparé les propriétés colloïdales des nanocapsules contenant l'huile essentielle du romarin préparées à petite et à grande échelles [199]. Les résultats ont révélé que l'extrapolation à l'échelle industrielle n'a pas d'influence sur les caractéristiques des NP qui ont une forme sphérique, un diamètre moyen de 230 nm, un potentiel ζ de -20 mV avec une EE% supérieure à 99% et une bonne stabilité [199].

2.6.3. Paramètres affectant les propriétés colloïdales des nanoparticules préparées par nanoprécipitation

Les principaux paramètres qui gouvernent les propriétés physicochimiques des NP mises en jeu sont les conditions opératoires et la composition polymérique (polymère, huile, tensioactif).

A. Effet du polymère

Différents travaux sont réalisés pour étudier l'effet du polymère sur les propriétés des NP préparées par la méthode de déplacement du solvant. Dans ce contexte, l'impact de la quantité du poly-ε-caprolactone sur le diamètre moyen des NP contenant l'HE du *Rosmarinus officinalis* L. est étudié et les résultats ont montré que la taille des particules est proportionnelle à la quantité du polymère. En effet, une quantité élevée du polymère entraîne une augmentation de l'épaisseur de la paroi polymérique ce qui augmente la taille des particules au détriment de leur nombre. Des résultats similaires sont raportés par Badri et al. avec les NP de poly-ε-caprolactone contenant l'huile d'argan (**Fig.2.12**) [278]. De plus il est constaté que la structure poreuse de l'Eudragit®L100 a entrainé la fuite de l'huile extraite des pignons de pin encapsulée dans les NP, diminuant ainsi le taux de l'EE% [212].

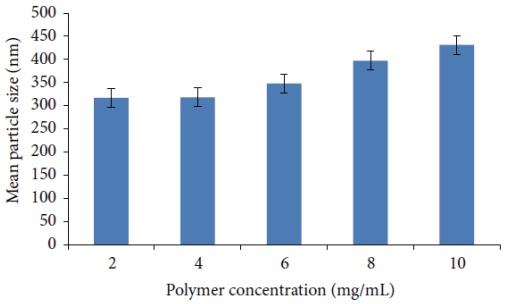


Figure 2.12. Effet de la concentration du polymère sur les propriétés colloïdales des nanoparticules polymères de poly-ε-caprolactone (Badri et al.)[i].

B. Effet de l'huile encapsulée

Concernant l'effet du type d'huile à encapsuler, Liakos et al. ont déterminé la taille de trois types de NP à base d'acétate de cellulose produites dans les mêmes conditions tout en variant l'huile [201]. Les résultats ont révélé que la taille des particules croit dans l'ordre suivant ; NP contenant l'huile de la cannelle, NP contenant l'huile de la menthe poivrée puis celles contenant l'huile de la citronnelle. Cette différence est attribuée à la structure chimique de l'huile encapsulée. Le géranial et le néral, les principaux composants de l'huile de la citronnelle, ont de longues chaînes carbonées (~ 10 atomes de carbone), ce qui entraîne une augmentation de la taille des capsules lorsqu'elles sont fixées à l'acétate de cellulose. Alors que pour l'huile de la cannelle, le composé majoritaire (le cinnamaldéhyde) réagit avec le groupe hydroxyle de l'acétate de cellulose créant ainsi une liaison hémiacétal responsable de la compression des NP ce qui réduit la taille des particules [201]. Dans une autre étude réalisée par Badri et al., la taille des NP augmente avec la quantité d'huile d'argan encapsulée (**Fig.2.13**) [278].

En plus de la taille, l'huile encapsulée peut affecter la charge superficielle des particules. Il est rapporté que l'augmentation de la quantité d'huile de citronnelle entraine un accroissement du potentiel ζ des NP à base d'acétate de cellulose [201]. Les auteurs ont lié cette variation à la présence de certaines molécules d'huile sur la surface externe des particules. Dans une autre étude, la présence de l'HE du citron vert à la surface des NP de chitosane a diminué le potentiel ζ de +61.1 à +57.0 mV dû à la diminution des groupes NH_3^+ libres de chitosane suite à leur interaction avec l'HE [203].

[i] Badri W, Miladi K, Eddabra R, et al. Elaboration of nanoparticles containing indomethacin: Argan oil for transdermal local and cosmetic application. *J Nanomater* 2015; 2015: 1–9.

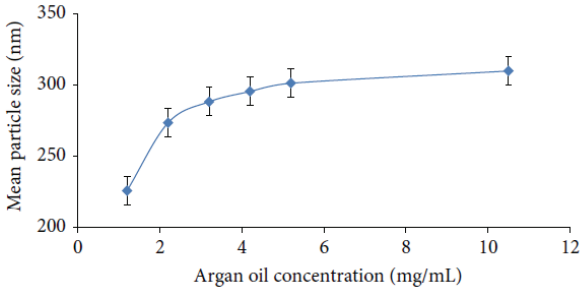


Figure 2.13. Effet de la quantité d'huile sur les propriétés colloïdales des nanoparticules polymères de poly-ε-caprolactone (Badri et al.)[i].

C. Effet du tensioactif

Au moyen de la technique de la nanoprécipitation, des NP avec une stabilité colloïdale suffisante peuvent être produites sans aucun besoin de tensioactif. Actuellement, plusieurs rapports ont mis en évidence l'effet négligeable du surfactant sur les propriétés physico-chimiques des NP contenant des HE [43,195,275,276,196,197,200–204,208]. Le même scénario s'est produit avec les HV. Badri et al. (2015) ont souligné que la quantité d'alcool polyvinylique utilisée comme tensioactif n'a d'effet significatif sur le diamètre moyen des NP de poly-ε-caprolactone qu'au-delà de 0.1 mg/ml en raison du dépôt de tensioactif supplémentaire sur la surface des particules (**Fig.2.14**)[278].

Certains HE peuvent jouer le rôle de tensioactif. C'est le cas des HE de la menthe poivrée, de la cannelle et de la citronnelle qui présentent de longues queues d'hydrocarbures avec des têtes hydrophiles ayant des groupements fonctionnels [201].

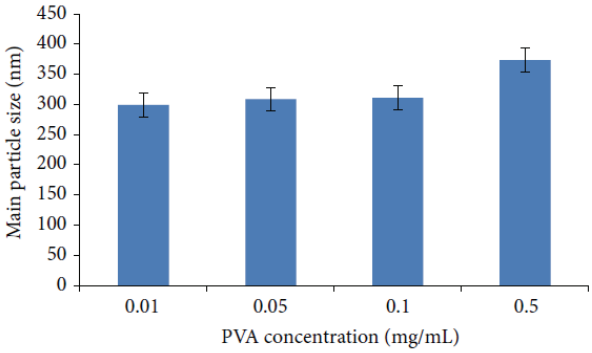
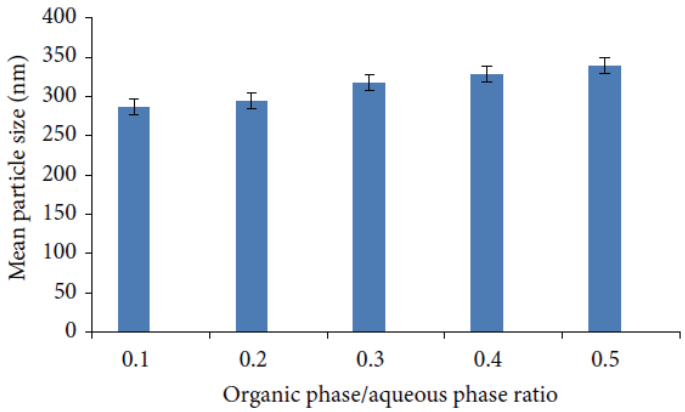


Figure 2.14. Effet de la quantité du tensioactif sur les propriétés colloïdales des nanoparticules polymères de poly-ε-caprolactone (Badri et al.)[i].

[i] Badri W, Miladi K, Eddabra R, et al. Elaboration of nanoparticles containing indomethacin: Argan oil for transdermal local and cosmetic application. *J Nanomater* 2015; 2015: 1–9.

D. Effet du rapport volumique phase organique / phase aqueuse

L'effet du rapport entre la phase organique et la phase aqueuse peut affecter la taille des particules. Il est montré que la taille des NP est proportionnelle à ce rapport en raison de la diffusion lente du solvant organique (acétone) vers la phase aqueuse ce qui rend la précipitation du polymère lente entrainant une augmentation de la taille des NP (**Fig.2.15**) [278].



Fifure 2.15. Effet du rapport volumique : acétone / eau sur les propriétés colloïdales des nanoparticules polymères de poly-ε-caprolactone (Badri et al.)[i].

E. Effet des conditions opératoires

En plus des facteurs mentionnés ci-dessus, les conditions opératoires peuvent affecter les propriétés physico-chimiques des NP préparées par nanoprécipitation. Dans ce contexte, Badri et al. ont étudié l'effet de la vitesse d'agitation et de la vitesse d'addition de la phase organique et ont noté que la taille des particules de poly-ε-caprolactone contenant l'huile d'argan est inversement proportionnelle à la vitesse d'agitation et à la vitesse d'addition de la phase organique à la phase aqueuse [278].

Dans l'ensemble la nanoprécipitation largement utilisée pour l'encapsulation des HE et HV permet d'obtenir des NP avec des caractéristiques physicochimiques bien adaptées pour leur application dans plusieurs domaines : alimentaire, agricole, médicale, cosmétique et en textile (**Tableau 2.3**).

[i] Badri W, Miladi K, Eddabra R, et al. Elaboration of nanoparticles containing indomethacin: Argan oil for transdermal local and cosmetic application. *J Nanomater* 2015; 2015: 1–9.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III

MATERIELS ET METHODES

CHPITRE III
MATERIELS ET METHODES

Stratégie du travail

Cette partie est consacrée à la description des matériels et méthodes utilisés afin de mener à bien la présente étude. Elle englobe quatre sous-parties essentielles. La première section porte sur l'extraction et l'analyse de l'huile des noyaux de dattes et celle du costus. La seconde consiste en une étude paramétrique de la nanoprécipitation pour identifier et optimiser les différents paramètres influençant la préparation des NP vides à base de PMMA (Eudragit®RS100). La troisième porte sur la préparation et la caractérisation des NP chargées d'huile ; et enfin dans la dernière partie les méthodes permettant d'accéder aux activités biologiques des huiles sous leurs formes libres et encapsulées sont détaillées. Un schéma récapitulatif montrant la stratégie expérimentale suivie dans le présent travail est illustré ci-dessous. Tous les réactifs et produits utilisés tout au long de cette étude sont insérés en **Annexe A.**

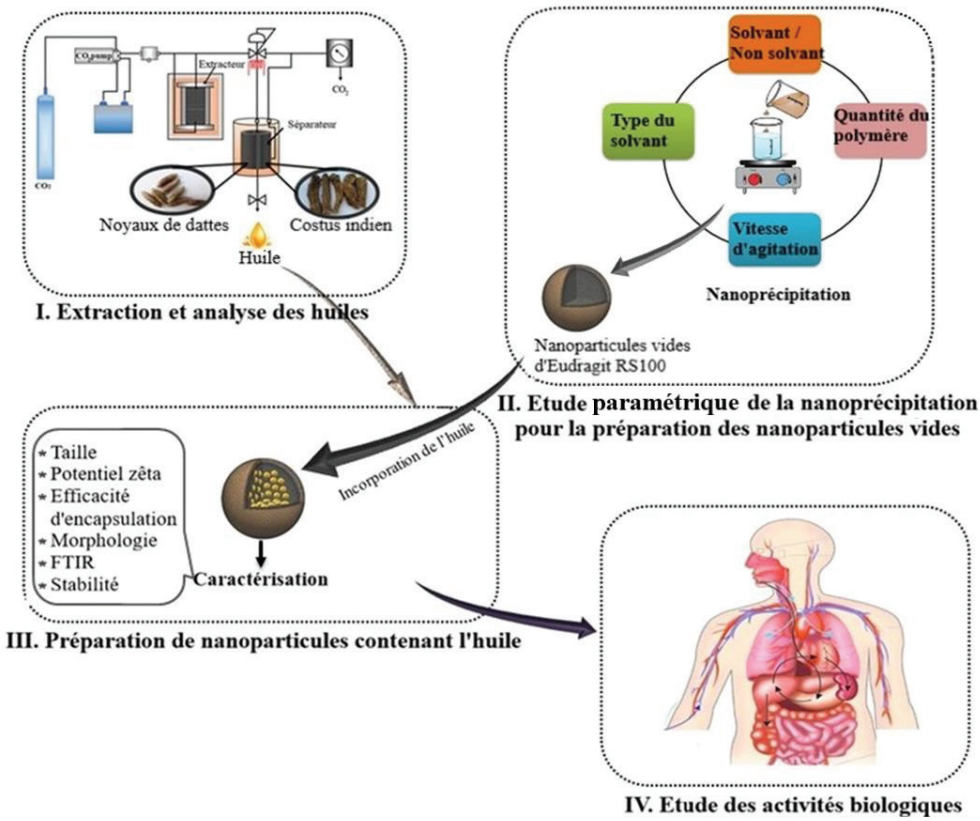


Figure 3.1. Stratégie du travail expérimental.

Partie 1. Extraction et analyse des huiles

3.1. Préparation des matrices végétales

Les noyaux de dattes utilisées dans cette étude proviennent de la variété « Ghars », récoltée dans la région du Sahara (Biskra, Algérie). Les racines sèches du costus indien sont achetées chez un herboriste (Bordj Bou Arreridj, Algérie). Les deux matières végétales ont subi un traitement préliminaire : lavage, séchage et broyage. Les poudres obtenues sont stockées par la suite dans des récipients étanches. Les taux d'humidité résiduelle sont respectivement de 8 et 10% pour la poudre des racines du costus et celle noyaux de dattes. La **Figure 3.2** montre les matières végétales utilisées avant et après prétraitement.

a)

b)

Figure 3.2. Illustration des matières végétales utilisées avant et après prétraitement : **(a)** Noyaux de dattes ; **(b)** Racines du costus indien.

3.2. Pilote d'extraction par CO_2 supercritique

L'extraction est réalisée dans un pilote construit par la société Separex (Champigneulles, France) (série 4343 type SF2). L'installation comprend : un extracteur en acier inoxydable, deux séparateurs en série pour le fractionnement et la récupération des extraits et une pompe haute pression qui peut aller jusqu'à 700bar **(Fig 3.3**). Le débit maximal

du CO_2 est de 200 g/min. Le CO_2 utilisé est d'une pureté de 99.5% et est fourni par SIDAL SPA Air liquide (Alger, Algérie).

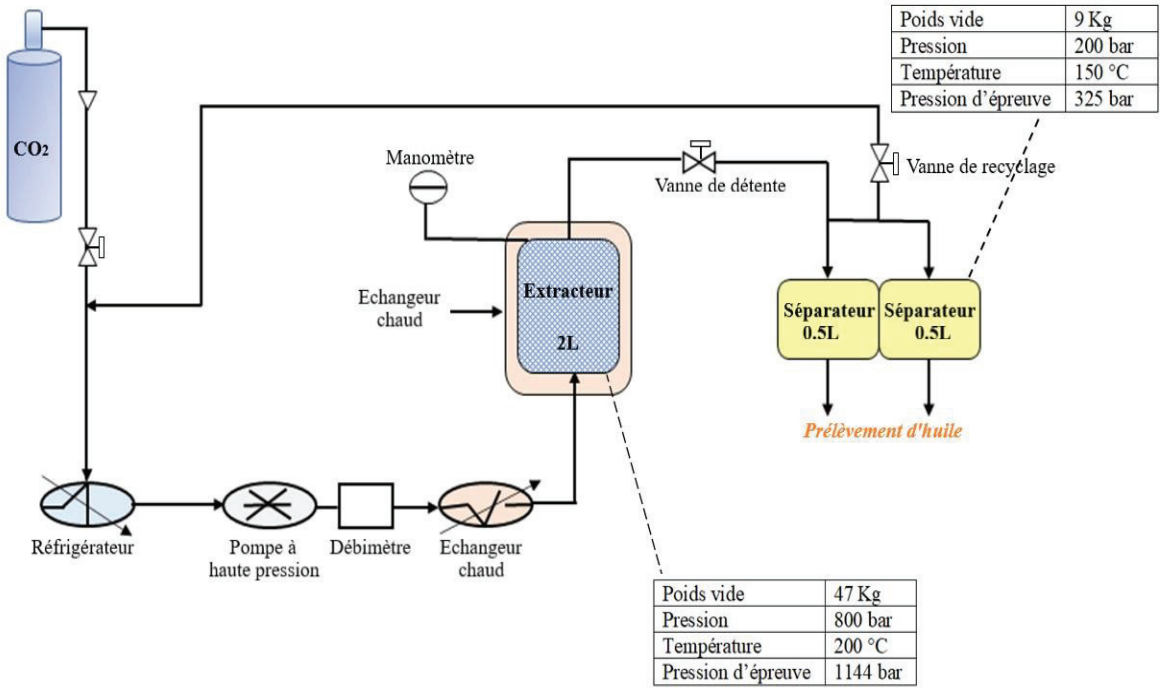


Figure 3.3. Schéma du pilote d'extraction par CO_2 supercritique.

3.3. Protocole de l'extraction par CO_2 supercritique

En se basant sur l'étude élaborée par Louaer et ses collaborateurs [170], les conditions opératoires utilisées pour l'extraction de l'huile des noyaux de dattes sont résumées dans le **Tableau 3.1**.

Pour l'huile de costus, une série d'expériences est effectuée afin d'optimiser la pression, la température et le diamètre des particules (Voir **Annexe B**). Les conditions optimales retenues sont regroupées dans le **Tableau 3.1**.

Tableau 3.1. Conditions opératoires optimales de l'extraction supercritique de l'huile des noyaux de dattes et celle du costus.

Paramètre opératoire	Huile des noyaux de dattes	Huile de costus
Mode	Dynamique	Dynamique
Pression de CO_2	250bar	100bar
Débit du CO_2 supercritique	50g/min	50g/min
Masse initiale de la poudre	80g	80g
Diamètre de la poudre	0.3mm	0.3mm
Température d'extraction	60°C	40°C
Température de séparation	30°C	30°C
Temps d'extraction	210min	180min

Les huiles sont recueillies et conservées à 4 °C à l'abri de la lumière pour éviter toute dégradation. Le rendement d'huile en pourcentage (R) est calculé par l'équation 3.1 :

$$R = \frac{P_H}{P_P} \times 100 \qquad (3.1)$$

Avec :

P_H : poids de l'huile extraite en g

P_P : poids de la plante traitée en g.

3.4. Analyse de l'huile essentielle du costus indien

L'HE du costus est analysée à l'Institut des Sciences Analytique (ISA) (Villeurbanne, France) par un chromatographe en phase gazeuse (CPG) (Agilent 6890N) lié à un détecteur à ionisation de flamme (FID) et couplé à la spectrométrie de masse (MS) (Agilent 5973N) en utilisant deux colonnes capillaires, l'une polaire (INNOWAX) et l'autre apolaire (HP-1). Les conditions opératoires sont répertoriées dans les **Tableaux 3.2** et **3.3.**

Tableau 3.2. Conditions opératoires des analyses par chromatographie en phase gazeuse.

Colonne capillaire	**INNOWAX**	**HP-1**
Longueur	60 m	50 m
Diamètre interne	0.32 mm	0.32 mm
Epaisseur de phase	0.50 µm	0.50 µm
Température du détecteur (FID)	250 °C	250 °C
Gaz vecteur	Hélium	Hélium
Débit	1.3 ml/min	1.3 ml/min
Température de l'injecteur	250 °C	250 °C
Programmation du four	2 min à 60°C 2°C/min de 60 à 245°C 30 min à 245°C	8 min at 80 °C 2°C/min de 80 à 220 °C 10°C/min de 220 à 310°C 20 min à 310 °C
Quantité injectée	1µl	1µl
Mode d'injection	Split 1/60	Split 1/60

Tableau 3.3. Conditions opératoires des analyses par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Colonne capillaire	**HP-5MS**
Courant d'ionisation	70 eV
Longueur	30 m
Diamètre interne	0.25 mm
Epaisseur de phase	0.25 µm
Température du détecteur	250 °C
Gaz vecteur	Hélium
Débit	1.0 ml/min
Température de l'injecteur	250 °C
Programmation du four	2 min à 60°C ; 3°C/min de 60 à 250°C ; 2min à 250°C ; 10°C/min de 250 à 325°C puis 15min à 325°C.
Quantité injectée	1µl
Mode d'injection	Split 1/60

L'identification des constituants de l'HE se fait par comparaison du spectre de masse de chaque pic séparé par CPG avec ceux reportés dans des librairies de référence (Wiley et NIST data gateway 2005). La calibration pour les indices de rétention est obtenue par injection d'un mélange d'alcanes de C5 à C30.

3.5. Analyse de l'huile végétale des noyaux de dattes

L'HV des noyaux de dattes est analysée à l'Institut des Sciences Analytiques (Villeurbanne-France), par CPG-FID (Agilent 6890N) en utilisant la colonne INNOWAX dans les mêmes conditions opératoires que ceux de l'huile de costus mentionnées dans le **Tableau 3.2.** L'huile est traitée, avant injection, comme suit :

- Mettre à reflux 200 µl de corps gras avec 4 ml de solution méthanolique de soude (0.5N) pendant 10 min.
- Ajouter 5ml de solution méthanolique de trifluorure de bore (10%) et porter au reflux pendant 5 min.
- Après addition de l'eau, faire l'extraction par 2 ml d'hexane
- Sécher la phase organique avec du sulfate de sodium et injecter la dans CPG-FID.

Partie 2. Etude paramétrique de la nanoprécipitation

3.1. Préparation des nanoparticules vides

Les NP sont préparées au moyen de la nanoprécipitation. La phase organique, obtenue en dissolvant du PMMA (Evonik, Allemagne) dans un solvant organique, est ajoutée lentement à la phase aqueuse, constituée d'eau seulement (eau déionisée du système Milli-Q), à température ambiante et sous agitation magnétique modérée (**Fig.3.4**). La diffusion du solvant vers le non-solvant conduit à la formation instantanée d'une suspension de NP. Le solvant organique est évaporé ultérieurement à l'aide de d'un rotavapor R-124® de Buchi.

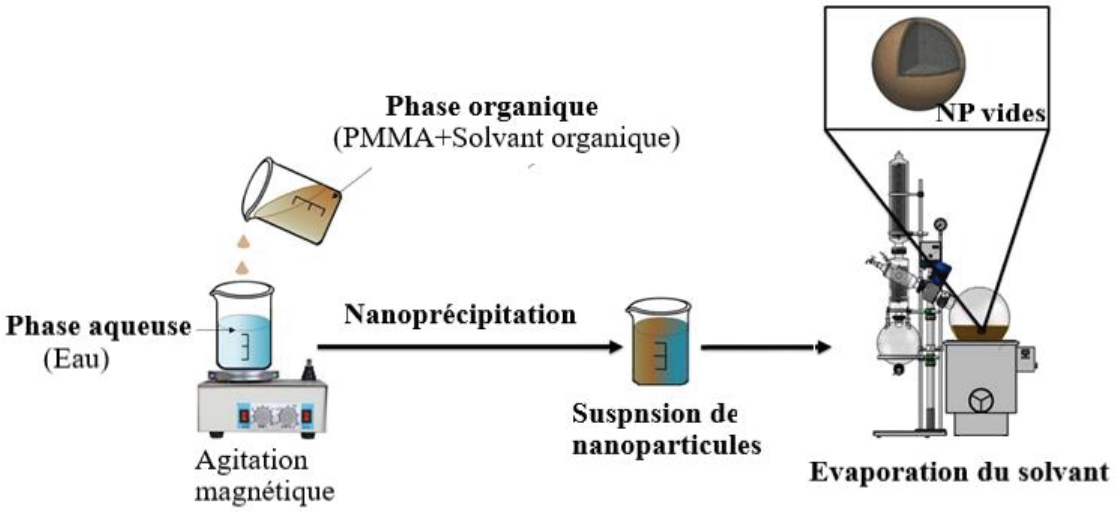


Figure 3.4. Préparation des nanoparticules de PMMA vides.

3.2. Etude de l'effet de différents facteurs opératoires

Différents paramètres sont examinés pour l'optimisation des NP modèles conçues pour l'encapsulation des HE et HV. Le **Tableau 3.4** résume l'ensemble des formulations qui sont réalisées.

Tableau 3.4. Effets de différents paramètres sur la taille des particules et le potentiel ζ des nanoparticules vides à base de PMMA. Les valeurs « en gras » indiquent les paramètres modifiés.

Paramètre étudié	Formulation	Phase organique				Phase aqueuse (ml)	Vitesse (rpm)
		Eudragit (mg/ml)	Acétone (ml)	Ethanol (ml)	Méthanol (ml)		
Type du solvant & Rapport volumique solvant / non-solvant	F1	16	**10**	-	-	30	500
	F2	16	**12**	-	-	30	500
	F3	16	**15**	-	-	30	500
	F4	16	**20**	-	-	30	500
	F5	16	**30**	-	-	30	500
	F6	16	-	**10**	-	30	500
	F7	16	-	**12**	-	30	500
	F8	16	-	**15**	-	30	500
	F9	16	-	**20**	-	30	500
	F10	16	-	**30**	-	30	500
	F11	16	-	-	**10**	30	500
	F12	16	-	-	**12**	30	500
	F13	16	-	-	**15**	30	500
	F14	16	-	-	**20**	30	500
	F15	16	-	-	**30**	30	500
Concentration en polymère	F16	**28**	15	-	-	30	500
	F17	**40**	15	-	-	30	500
	F18	**52**	15	-	-	30	500
	F19	**64**	15	-	-	30	500
	F20	**28**	-	15	-	30	500
	F21	**40**	-	15	-	30	500
	F22	**52**	-	15	-	30	500
	F23	**64**	-	15	-	30	500
	F24	**28**	-	-	15	30	500
	F25	**40**	-	-	15	30	500
	F26	**52**	-	-	15	30	500
	F27	**64**	-	-	15	30	500
Vitesse d'agitation	F28	16	15	-	-	30	**300**
	F29	16	15	-	-	30	**700**
	F30	16	-	15	-	30	**300**
	F31	16	-	15	-	30	**700**
	F32	16	-	-	15	30	**300**
	F33	16	-	-	15	30	**700**

La concentration du polymère est la concentration dans le solvant organique.

3.2.1. Influence de la nature du solvant et du rapport volumique solvant/non-solvant

Le choix du solvant se fait essentiellement sur la base de sa miscibilité avec le non-solvant (l'eau) et de son pouvoir à solubiliser le polymère. Pour étudier l'effet du solvant ainsi que le rapport volumique solvant/non-solvant sur les propriétés colloïdales des NP, quinze solutions organiques de PMMA (16 mg/ml) sont préparées à différents rapports volumiques (1/3, 2/5, 1/2, 2/3 et 1/1) en variant le solvant organique (acétone, éthanol et méthanol). Le volume du non-solvant est maintenu constant (30 ml) pour toutes les expériences. Toutes les formulations préparées sont évaluées en termes de taille de particules, de distribution en taille et de potentiel ζ.

3.2.2. Influence de la concentration en polymère

Différentes solutions organiques de PMMA (15 ml) à différentes concentrations sont préparées (16, 28, 40, 52 et 64 mg/ml) en utilisant les trois solvants organiques. La taille des particules, l'indice de polydispersité et le potentiel ζ sont à nouveau évalués pour toutes les formulations.

3.2.3. Influence de la vitesse d'agitation

Pour évaluer l'effet de la vitesse d'agitation sur les propriétés colloïdales des NP obtenues, différentes solutions organiques de PMMA à (16 mg/ml) sont préparées à un rapport volumique de ½ sous trois vitesses d'agitation (300, 500 et 700 rpm). Les NP résultantes sont à nouveau caractérisées.

3.3. Caractérisation des nanoparticules vides

3.3.1. Diffusion dynamique de la lumière

La suspension des NP est soumise à une analyse par diffusion dynamique de la lumière en utilisant un Zetasizer Nano ZS200 (Malvern Instruments, Royaume-Uni) pour mesurer la taille moyenne des particules, l'indice de polydispersité et le potentiel ζ. Les NP sont dispersées dans une solution de NaCl (1 mM) avant chaque mesure. Toutes les mesures sont effectuées en triple à température ambiante et à un pH avoisinant 6.5.

3.3.2. Microscopie électronique à balayage

La Microscopie Electronique à Balayage (MEB ou SEM pour Scanning Electron Microscopy) est une méthode d'analyse microscopique permettant d'observer des objets en relief. Celle-ci est basée sur une interaction électron-matière entre un faisceau électronique et la surface de l'échantillon à analyser. Cette interaction génère des électrons secondaires se

trouvant dans des états d'énergie faible. Ils sont accélérés vers différents détecteurs permettant ainsi la reconstruction d'une image tridimensionnelle de la surface [283].

La MEB est réalisée à l'aide d'un microscope FEI Quanta 250 FEG au Centre Technologique des Microstructures (CTμ) de l'Université de Lyon (Villeurbanne, France). Une goutte de la suspension de NP est fixée sur un support spécifique au MEB (plot métallique) à l'aide d'un ruban adhésif double face, puis séchée à température ambiante. L'échantillon est recouvert d'une fine couche de métal (d'environ 2 à 3 nm d'épaisseur) pour qu'il réémet les électrons à l'intérieur de la chambre d'observation du microscope. Cette étape est réalisée par pulvérisation cathodique du cuivre en utilisant un métalliseur. Les échantillons ainsi préparés sont observés au microscope sous une tension d'accélération de 15 kV.

Partie 3. Encapsulation des huiles dans des nanoparticules polymères

3.1. Protocole de préparation

Les NP sont préparées dans les conditions optimales préalablement déterminées (Partie 2). Pour ce faire, différentes quantités de l'HE du costus ou de l'HV des noyaux de dattes (15, 30, 60, 120, 240 et 300 mg) sont dissoutes dans la solution organique de PMMA à 16 mg/ml (**Fig.3.5**). L'acétone est choisi comme solvant organique pour l'huile des noyaux de dattes et l'éthanol pour l'huile de costus indien. La phase organique est ajoutée à 30 ml d'eau sous agitation magnétique (500 rpm) et à température ambiante. Le solvant organique est évaporé ultérieurement à l'aide d'un rotavapor R-124® Buchi (9°C, 25rpm).

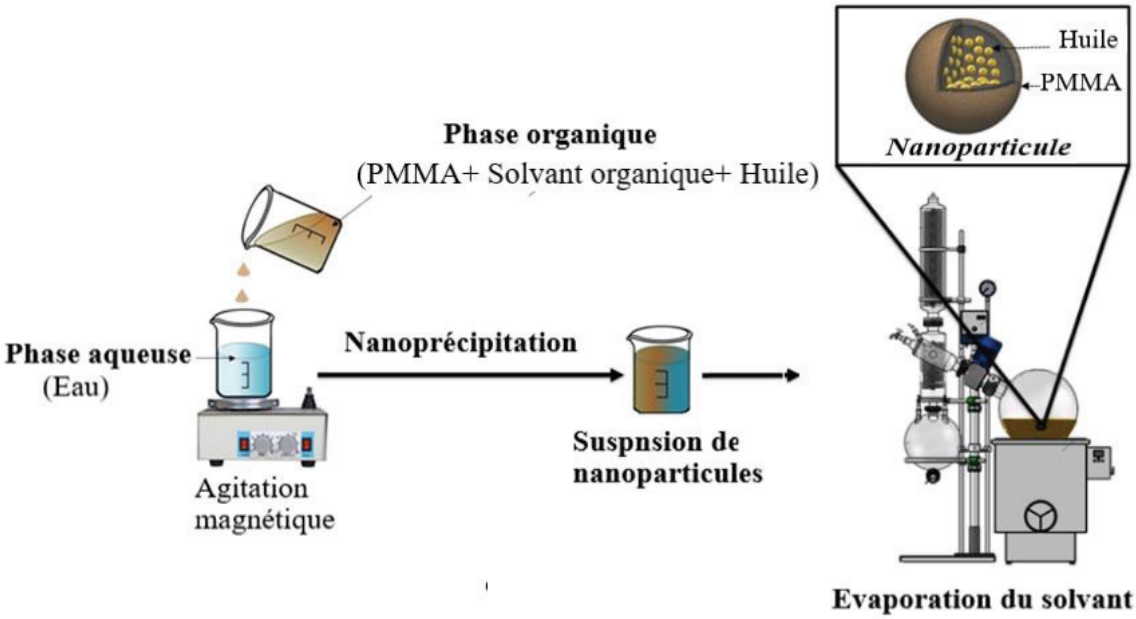


Figure 3.5. Préparation des nanoparticules de PMMA chargées d'huile.

3.2. Caractérisation des nanoparticules

3.2.1. Diffusion dynamique de la lumière

Les NP sont analysées en termes de taille, d'indice de polydispersité et de potentiel ζ à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS200 comme décrit précédemment dans la partie 2 (3.3.1).

3.2.2. Microscopie électronique en transmission

La microscopie électronique en transmission (MET, ou TEM pour Transmission Electron Microscopy) repose sur le même principe que le MEB, mais le faisceau d'électrons

est « transmis » à travers un échantillon très mince, ce qui permet de l'observer en « transparence » [284].

Dans notre étude, les NP sont visualisées immédiatement après préparation, à l'aide d'un microscope Philips CM120 fonctionnant à 120 kV, au Centre Technologique des Microstructures (CTμ) de l'Université de Lyon (Villeurbanne, France). Pour cela,10µl de la suspension de NP sont déposés directement sur la grille du microscope qui sera observée après séchage à l'air libre.

3.2.3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourrier

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier ou Fourier Transform InfraRed Spectroscopy (FTIR) en anglais est l'une des techniques les plus utilisées pour l'identification des groupements fonctionnels et leurs éventuelles interactions dans une molécule [283].

Le polymère, l'huile de costus et celle des noyaux de dattes sous leurs formes libres et encapsulées sont analysés à l'aide d'un spectromètre FTIR (spectromètre Thermo Scientific Technologies FTIR avec logiciel IR MONIC Solution). Une lyophilisation est effectuée avant l'analyse des NP liquides dont les conditions opératoires sont insérées en **Annexe C**. Les spectres sont enregistrés dans une plage de 400 à 4000 cm^{-1}.

3.2.4. Efficacité d'encapsulation

- **Nanoparticules contenant l'huile des noyaux de dattes**

La dispersion colloïdale des NP contenant l'HV des noyaux de dattes est soumise à une centrifugation à 15000 tr/min pendant 30 min. Le surnageant est éliminé et la quantité d'huile encapsulée est mesurée après ajout du chloroforme. La solution résultante a été filtrée et analysée par un spectrophotomètre ultraviolet UV-1800 (Shimadzu, Japon) à une longueur d'onde égale à 274.8 nm. L'EE% et le DL(µg d'huile/mg de polymère) sont déterminées en utilisant les équations 2.3 et 2.4 (Chapitre II). La méthode analytique a fait l'objet d'une validation en termes de linéarité, précision et répétabilité (voir **Annexe D**).

- **Nanoparticules contenant l'huile de costus**

La détermination de l'EE% de l'HE du costus par UV-visible n'est pas possible vu l'apparition de plusieurs pics dans le spectre ce qui rend le choix de la longueur d'onde maximale difficile (voir **Annexe D**).

3.3. Stabilité colloïdale des nanoparticules

Afin d'évaluer la stabilité colloïdale, les formulations des NP obtenues sont stockées pendant 3 mois à 4, 25 et 40°C. La stabilité physique des NP est évaluée en termes de taille des particules et de potentiel ζ.

De plus, la stabilité des NP aux variations de pH est examinée à travers le potentiel ζ. Pour ce faire, le potentiel ζ de différentes formulations est mesuré à température ambiante et à différents pH (3, 4, 5, 7, 9, 10 et 12). Le pH est ajusté par l'ajout de solutions d'HCl ou du NaOH à l'aide d'un pH-mètre pH510 (Mettler Toledo, Viroflay, France).

3.4. Analyse statistique

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type. La comparaison entre les différentes données est déterminée par analyse de variance (ANOVA) suivi d'un post-test de Tukey à l'aide du logiciel XLSTAT. La différence est considérée comme significative si p-value est inférieure à 0.05.

Partie 4. Etude des activités biologiques

3.1. Stratégie du travail

En se basant sur la littérature reportée dans le chapitre I, les principales utilisations médicinales de l'huile des noyaux de dattes et celle du costus portent sur l'activité antioxydante et anti-inflammatoire, respectivement. De ce fait, la stratégie suivie dans cette partie porte sur l'étude de ces deux activités pour les deux huiles sous leurs formes libres et encapsulées. Ainsi l'étude de l'activité de ces formulations sur l'inhibition des enzymes clés de plusieurs maladies à savoir : l'α-amylase et l'α-glucosidase pour le diabète sucré ; l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase pour l'Alzheimer est menée.

3.2. Activité anti-inflammatoire

L'étude de l'effet anti-inflammatoire de l'HE du costus sous sa forme libre et encapsulée sur la lignée cellulaire A549 est effectuée au niveau du service de l'inflammation et l'immunité de l'épithélium respiratoire – Hôpital Lyon Sud - Université Claude Bernard Lyon 1, France.

3.2.1. Lignées cellulaires et conditions de culture

Les cellules épithéliales alvéolaires humaines (lignée A549) sont obtenues auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection LGC Standard, Molsheim, France). Les cellules sont cultivées dans du DMEM/F-12 enrichi avec 10% (v/v) de FBS et 1% (v/v) d'un mélange d'antibiotique (pénicilline : streptomycine). Les cellules sont cultivées sous atmosphère humide en présence de 5 % de CO_2 à 37°C. Le milieu de culture est renouvelé régulièrement pour assurer un bon développement des cellules. De la trypsine (0.05%) est utilisée pour décrocher les cellules de leur support afin de procéder aux différentes expériences. Après avoir compté les cellules par un compteur automatique (EVE de VWR), elles sont réparties dans des puits de culture cellulaire (2.10^6 cellules/puits) et laissées incuber pendant 5h en présence de 5 % de CO_2 à 37°C.

3.2.2. Traitement des plaques

Des plaques de 12 puits sont utilisées tout au long de cette étude. Le protocole de traitement des plaques est illustré dans la **Figure 3.6.**

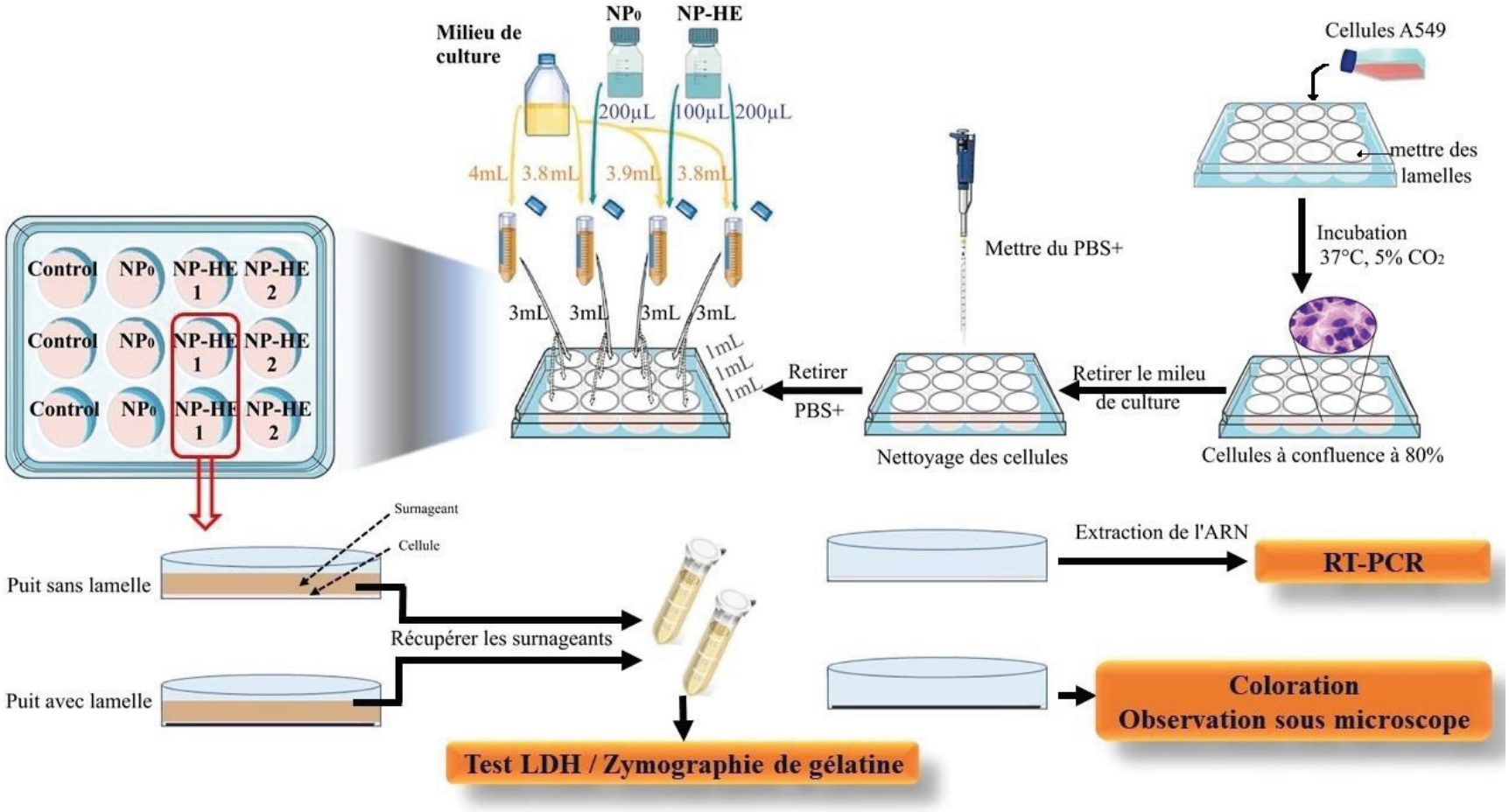


Figure 3.6. Traitement cellulaire des plaques. **NP0 :** Nanoparticules vides ; **NP-HE :** Nanoparticules contenant l'huile essentielle du costus à 4mg/ml ; **NP-HE 1 :** Nanoparticules contenant l'huile essentielle du costus à 100µg/ml ; **NP-HE2 :** Nanoparticules contenant l'huile essentielle du costus à 200µg/ml.

Chaque lot de trois puits a subi le même traitement (ligne verticale) ; des lamelles sont ajoutées aux quatre derniers puits (ligne horizontale). Lorsque les cellules A549 sont à 80 % de confluence, elles vont subir différents traitements à savoir : les NP vides, la solution de l'huile de costus (200µg/ml d'huile dans du DMSO), le DMSO seul et les NP chargées d'huile de costus à différentes concentrations (12.5, 25, 50, 75, 100 et 200 µg/ml d'huile). Parallèlement à cela, les cellules témoins reçoivent le même volume de solvant que les cellules traitées (1ml de milieu de culture DMEM/F-12). Les cultures sont ensuite incubées à 37°C en présence de 5 % de CO_2 durant 24h. La méthode suivie pour la préparation des différentes concentrations est insérée en **Annexe E.1.**

Après incubation, les surnageants de culture de tous les puits sont récupérés et conservés au congélateur à -20°C jusqu'à réalisation d'un test de cytotoxicité et d'une zymographie de gélatine.

Dans le but de conserver l'ARN des cellules, du RNAlater (750µl) est ajouté aux puits dépourvus de lamelles. Une visualisation des cellules contenues dans les puits pourvus de lamelles est réalisée par la suite. Enfin, les plaques sont conservées au congélateur à -80°C jusqu'à réalisation d'une qPCR *(Quantitative Polymerase Chain Reaction)*.

3.2.3. Test de cytotoxicité

Le test de cytotoxicité LDH (Lactate déshydrogénase) est une méthode indirecte et colorimétrique qui permet de déterminer la cytotoxicité cellulaire *in vitro.* Ce test est basé sur le fait que lors de la mort cellulaire, des enzymes cytoplasmiques comme la LDH, peuvent être libérées dans le milieu à cause de la perte de l'intégrité de la paroi plasmique. En mesurant la quantité de la LDH relâchée, il est possible de déterminer le taux de cellules ayant subi une lyse ou des dommages. La LDH provenant des cellules favorise l'oxydation du lactate en pyruvate avec une réduction simultanée du NAD^+ en NADH. Dans une seconde étape, la diaphorase, catalyseur provenant du kit, réduit le sel de tétrazolium par transfert des protons du NADH en formazan de couleur rouge et qui peut être détecté par spectrophotométrie (**Fig.3.7**) [285]. L'intensité de la coloration reflète la quantité de LDH libérée et donc la mort cellulaire.

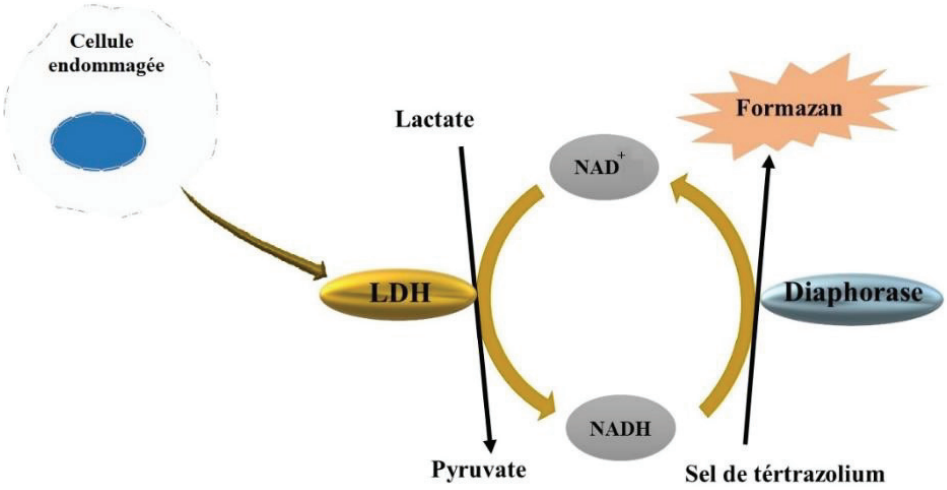


Figure 3.7. Principe du test de cytotoxicité LDH.

Un test de cytotoxicité LDH est réalisé sur les surnageants issus des différents traitements cellulaires en utilisant le kit d'analyse de cytotoxicité Pierce LDH (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) selon le protocole suivant :

- Dans une plaque à 96 puits fond plats, déposer 50 µl de chaque surnageant.
- Déposer 1 quadruplet de contrôle positif « *LDH positive control* ».
- Déposer 1 quadruplet de contrôle négatif (Tampon phosphate salin).
- Ajouter 50 µl de « *Reaction Mixture* » à chaque puit et mélanger avec une pipette multicanaux. Le protocole de la préparation des réactifs est inséré en **Annexe E.2.**
- Incuber la plaque à température ambiante pendant 30min à l'abri de la lumière.
- Déposer 50 µl de « *Solution Stop* » et mélanger en tapotant.
- Lire l'absorbance à 492 et 680nm et soustraire la valeur mesurée à 680nm de celle mesurée à 492nm. Le pourcentage de cytotoxicité est mesuré en appliquant l'équation 3.2 :

$$\%\ Cytotoxicité = \frac{\text{Actvité LDH des composés traités} - \text{Actvité LDH contrôle négatif}}{\text{Actvité LDH contrôle positif} - \text{Actvité LDH contrôle négatif}} \times 100 \qquad (3.2)$$

3.2.4. Observation microscopique des changements morphologiques cellulaires

Après les traitements cellulaires, les changements de morphologie des cellules A549 sont visualisés au microscope optique après fixation et coloration avec le kit Kwik-Diff

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Le protocole de coloration est comme suit :

- Ajouter 1ml de fixateur aux puits contenant des lamelles, laisser reposer puis aspirer ce dernier.
- L'opération est répétée avec l'éosine et le bleu de méthylène qui servent à colorer respectivement le cytoplasme et le noyau.
- Retirer les lamelles, les laver et les mettre sur des lames.
- Procéder à une observation sous microscope optique.

3.2.5. Traitement cellulaire par lipopolysaccharide

L'étude de l'activité anti-inflammatoire porte sur la suppression de l'expression des cytokines inflammatoires chez les cellules A549, après activation par lipopolysaccharide (LPS). Les cellules sont traitées 1 h avant la stimulation par LPS avec des NP vides et des NP contenant l'huile de costus à 25 µg/ml. Après 1 h d'incubation, les cellules sont lysées ; des études quantitatives des cytokines et médiateurs inflammatoires ainsi que des métalloprotéases sont réalisées.

3.2.6. Etude quantitative des cytokines et des médiateurs inflammatoires

A. Extraction de l'ARN

L'extraction des ARN totaux est effectuée grâce à un Kit EZ-10 DNAaway RNA Miniprep Kit de Biobasic en suivant les indications du fabricant (voir **Annexe E.3** et **E.4**).

B. Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Des ADN complémentaires (ADNc) sont synthétisés à partir des ARN totaux grâce à une Reverse Transcriptase en utilisant de l'ARN comme matrice. La Reverse Transcription (RT-PCR) est effectuée à l'aide du Kit « Superscript®TM IV » (Thermo Fischer Scientific), dans un thermocycleur « Gene AMP PCR System 2400 » (Perkin Elmer) en suivant les indications du fabricant (voir **Annexe E.5**).

C. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

La PCR quantitative (qPCR) ou PCR en temps réel est une réaction de PCR classique visant à amplifier une matrice d'ADN (simple ou double brin) afin de quantifier par fluorescence la formation du produit de PCR. Dans notre étude, elle nous a permis de déterminer de façon indirecte l'effet des traitements testés (NP chargées et NP vides après stimulation des A549 par LPS) sur l'expression de gènes cibles codant pour différents

cytokines et médiateurs inflammatoires à savoir : l'interleukine (IL1β), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNFα) et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF). La qPCR est réalisée à l'aide du kit « TaqMan® Fast Advanced Master Mix » (Thermo Fischer Scientific), dans un thermocycleur en suivant les instructions du fabricant (voir **Annexe E.6**). Le TBP est utilisé comme gène de normalisation. Les amorces Taqman utilisés sont : hTBP (Hs99999910_m1), hCSF2 (Hs00929873_m1), hTNFα (Hs00174128_m1) et hIL1β (Hs 01555410_m1)

E. Extrapolation des résultats de qPCR

Les courbes d'amplification obtenues sont analysées avec le logiciel « AriaMx » (Agilent) afin de déterminer le cycle seuil (Thershold Cycle, Ct) de chaque gène. Le Ct correspond au nombre de cycles de qPCR nécessaires pour que l'ADN amplifié soit détectable. Chaque résultat de Ct représente la moyenne des Ct issus de trois répétitions. La méthode développée par Livak et Schmittgen [286] est utilisée dans le but d'évaluer l'expression relative de notre gène par rapport au gène de normalisation en appliquant l'équation suivante :

$$\text{Quantité initiale du gène} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \qquad (3.3)$$

Avec : ΔCt=Ct gène cible-Ct gène de référence,

$\Delta\Delta Ct$=(ΔCt) condition expérimentale -(ΔCt) condition contrôle.

3.2.7. Etude quantitative des métalloprotéases

La zymographie de gélatine décrite en 1980 par Heussen, C. et Dowdle, E.B [287] est utilisée pour quantifier les métalloprotéases (MMP) secrétées par les cellules traitées. C'est une technique électrophorétique simple, extrêmement sensible, utilisée pour quantifier les gélatinases, autrement dits métalloprotéases (MMP-2 et MMP-9) dans les échantillons en se basant sur leur poids moléculaire (kDa) ainsi que la dégradation de leur substrat préférentiel (la gélatine). Le principe de cette méthode porte sur la digestion de la gélatine incorporée dans un gel de polyacrylamide par des gélatinases migrant à travers le gel. Après coloration, les zones de digestion forment des bandes claires sur un fond sombre où la gélatine est dégradée par MMP. Le protocole suivi pour déterminer les MMP libérées par les A549 est illustré dans la **Figure 3.8** et il consiste à :

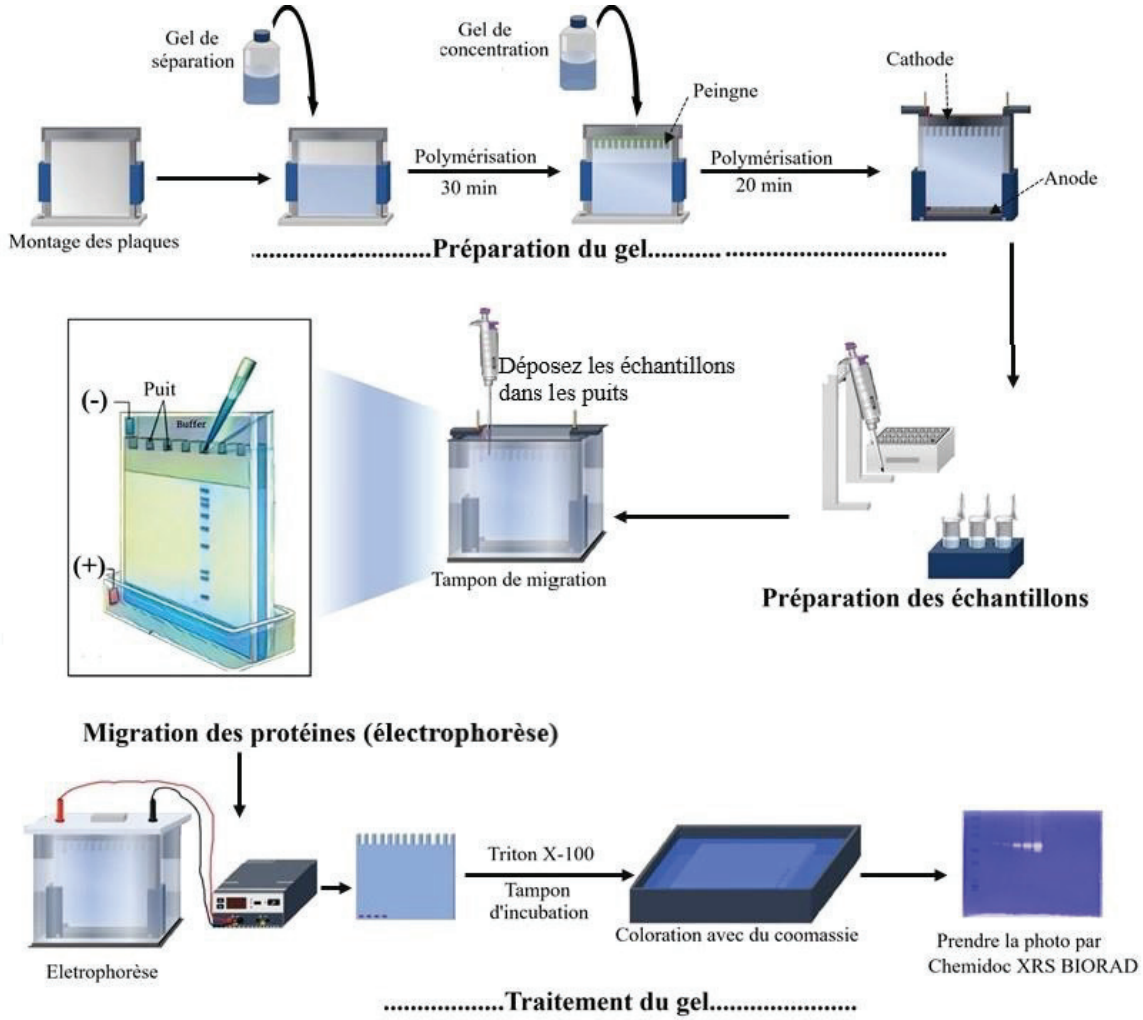


Figure 3.8. Protocole de la zymographie de gélatine.

A. Préparation des gels

- Faire le montage des plaques en verres.
- Préparer la solution de séparation à 10% d'acrylamide et la déposer entre les plaques.
- Déposer 150 µl d'isopropanol pour niveler le gel.
- Laisser polymériser environ 30 min.
- Préparer la solution de concentration à 4% d'acrylamide et la déposer en-dessus du gel de séparation.
- Placer les peignes et laisser polymériser environ 20 min. La composition des deux gels ainsi que le protocole de préparation des différentes solutions et tampons

utilisés est inséré en **Annexe E.7.**

- Après solidification, retirer les peignes et laver les puits avec de l'eau distillée.

B. Préparation des échantillons

- Pipeter 5µl des surnageants décongelés issus de différents traitements cellulaires.
- Ajouter 7µl PBS+, 3µl Tampon de charge 5X et une goutte du bleu laemmli 5X.

C. Traitement des gels par électrophorèse

- Pour faire séparer les protéines, le gel est soumis à une électrophorèse à 4°C et à 10 mA jusqu'à ce que les protéines s'alignent au début du gel de séparation. Puis la migration se fait à 20 mA.
- Décoller le gel des plaques à la fin de la migration et retirer le gel de concentration.

D. Traitement du gel

- Laver le gel dans du triton X-100 (2 %) sous agitation pendant environ 30min à température ambiante.
- Laisser le gel dans le tampon d'incubation à 37 °C pendant 24 h.
- Mettre le gel dans le tampon de coloration pendant 10 min sous agitation sous la sorbonne puis dans le tampon de décoloration pendant environ 2h.

Prendre la photo du gel à l'aide du ChemidocXRS BIORAD. Les activités enzymatiques sont détectées sous forme de bandes claires de lyse de la gélatine sur un fond bleu. Une analyse densitométrique des différentes bandes est effectuée à l'aide du logiciel Image J pour quantifier l'activité enzymatique.

3.3. Activité antioxydante

L'étude de l'activité antioxydante de l'HV des noyaux de dattes sous sa forme libre et encapsulée est effectuée *in vitro* en se basant sur des réactions colorimétriques quantitatives à l'aide d'un lecteur de microplaques (PerkinElmer Multimode Plate Reader EnSpire) au niveau du centre national de recherche biotechnologique (CRBt), Constantine, Algérie.

Il n'existe pas de méthode universelle par laquelle le profil antioxydant des échantillons est déterminé quantitativement d'une manière bien précise vue la complexité du processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants. De ce fait, diverses méthodes et outils analytiques sont développées pour l'évaluation de l'activité antiradicalaire [288].

Dans notre travail, quatre méthodes sont utilisées à savoir : DPPH, ABTS, CUPRAC et le pouvoir réducteur. Dans chaque cas, la capacité antioxydante est comparée à celle d'un antioxydant standard, l'Hydroxyanisole butylé (BHA). Le protocole de préparation de différents réactifs et solutions est en **Annexe F.**

3.3.1. Méthode de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)

A. Principe

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) fut l'un des radicaux libres les plus utilisés pour étudier l'activité antiradicalaire des composés phénoliques. Cette dernière consiste à ajouter le radical DPPH•, possédant un électron non apparié sur un atome du pont d'azote, à une solution méthanolique contenant un piégeur de radicaux libres pouvant céder un atome d'hydrogène qui va réduire le DPPH• de couleur violette en 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazine de couleur jaune [289](**Fig.3.9**).

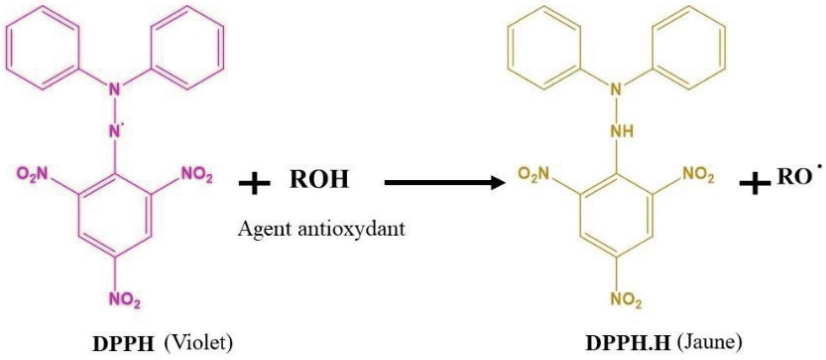


Figure 3.9. Mécanisme du piégeage du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH).

B. Protocole

L'activité antioxydante DPPH de l'HV sous sa forme libre et encapsulée est évaluée selon le protocole précédemment décrit par Blois [290], comme illustré dans la **Figure 3.10.** Dans une microplaque à 96 puits, 40 µl de la solution échantillon à différentes concentrations sont mélangées et incubées pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante avec 160 µl de la solution de DPPH. L'absorbance est lue à 517 nm et la capacité de piégeage du DPPH a été déterminée par rapport au blanc en appliquant l'équation 3.4.

$$DPPH\ Inhibition\ \% = \frac{A_{blanc} - A_{échantillon}}{A_{blanc}} \times 100 \qquad (3.4)$$

Où A_{blanc} : l'absorbance du blanc ; $A_{échantillon}$: l'absorbance de l'échantillon. La CI_{50} (µg/ml) « la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % des radicaux libres »

est mesurée graphiquement à partir de la droite de régression du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration et comparée à celle du BHA.

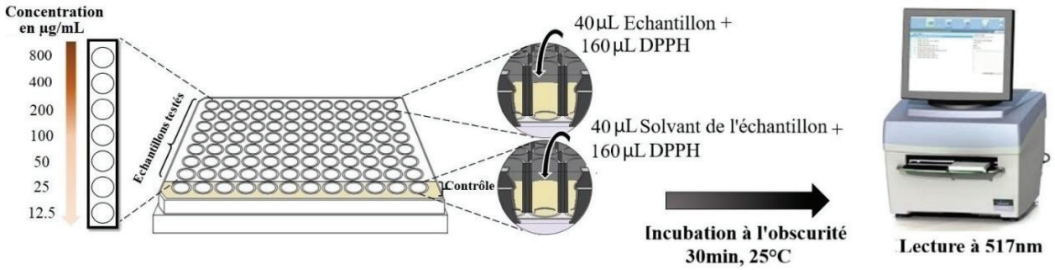


Figure 3.10. Protocole suivi pour l'étude de l'activité antioxydante ''DPPH''.

3.3.2. Méthode de l'ABTS (2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

A. Principe

Le profil antioxydant d'une molécule est déduit de sa capacité à réduire le radical ABTS$^{\bullet+}$ (un radical de couleur bleu, formé de la réaction d'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) avec le persulfate de potassium). La réduction de l'ABTS$^{\bullet+}$, par transfert de proton, conduit à la décoloration de la solution et l'absorbance sera alors mesurée par spectrométrie à 734nm [291]. La **Figure 3.11** montre le principe de cette méthode.

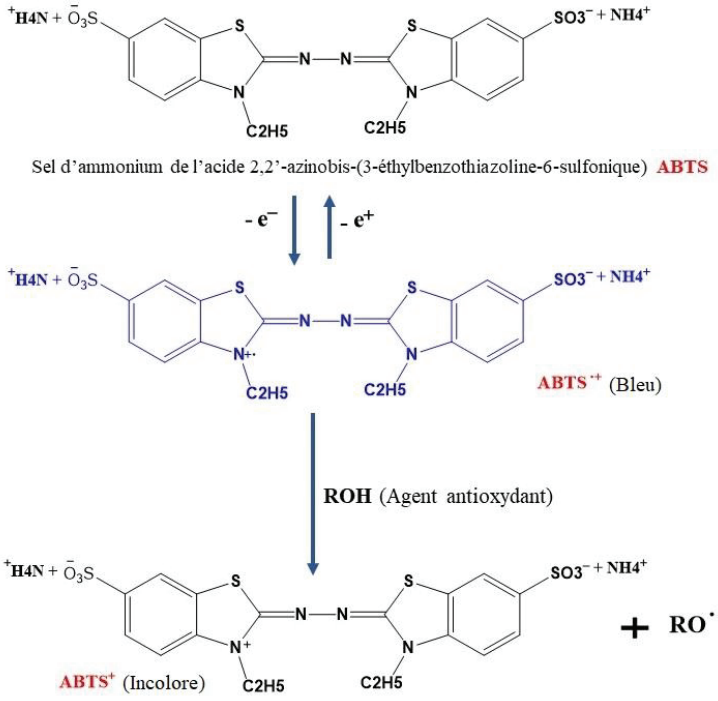


Figure 3.11. Formation et piégeage de l'ABTS$^{\bullet+}$ en présence d'un agent antiradicalaire.

B. Protocole

L'activité de piégeage de l'ABTS$^{\bullet+}$ est évaluée selon le protocole précédemment décrit par Re et al.[292], avec de légères modifications, comme indiqué dans la **Figure 3.12.** Dans une microplaque à 96 puits, 40 µl de la solution échantillon à différentes concentrations sont ajoutées à 160 µl de solution d'ABTS$^{\bullet+}$. L'absorbance est lue à 734 nm et la capacité de piégeage de l'ABTS$^{\bullet+}$ est déterminée par rapport au blanc en appliquant l'équation 3.5.

$$ABTS\ Inhibition\% = \frac{A_{blanc} - A_{échantillon}}{A_{blanc}} \times 100 \qquad (3.5)$$

Où A_{blanc} : l'absorbance du blanc ; $A_{échantillon}$: l'absorbance de l'échantillon. La CI_{50} de différentes solutions testées est mesurée et comparée à celle du BHA.

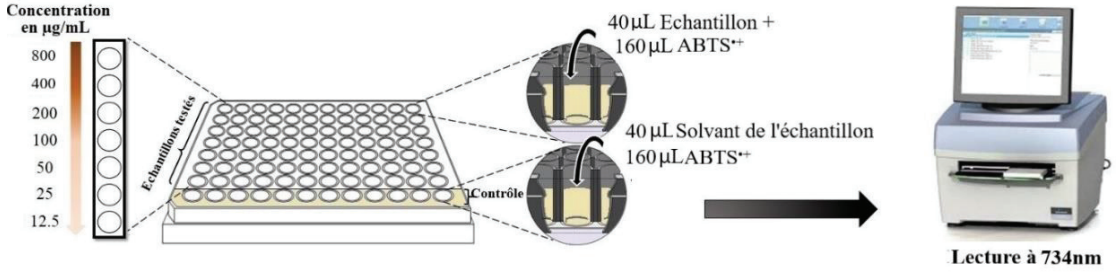


Figure 3.12. Protocole suivi pour l'étude de l'activité antioxydante ''ABTS''.

3.3.3. Méthode de CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity)

A. Principe

La méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) consiste à déterminer le pouvoir antioxydant par réduction du cuivre. Le principe de cette méthode porte sur le fait qu'en présence d'un agent antiradicalaire, le complexe cuivre (Cu^{2+})-néocuproïne est réduit en gagnant un électron [293], comme le montre la **Figure 3.13**. La conversion du Cu^{+2} en Cu^{+1} est suivie par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450 nm.

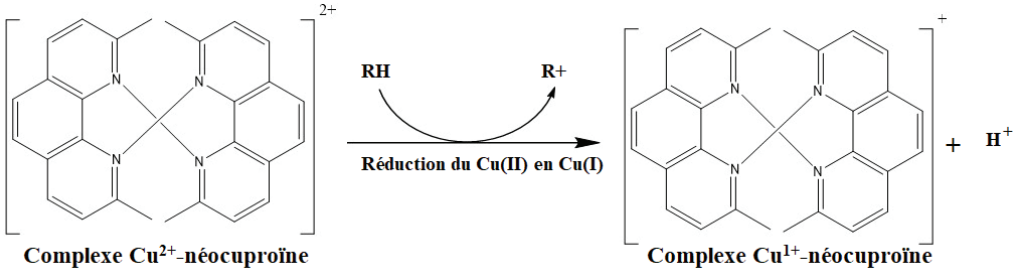


Figure 3.13. Principe de la méthode de CUPRAC (Réduction du complexe Cu^{2+}-néocuproïne.

B. Protocole

La capacité à réduire le cuivre est évaluée selon le protocole précédemment décrit par Apak et al. [294], comme illustré dans la **Figure 3.14.** Dans une microplaque à 96 puits, 40 µl de la solution échantillon à différentes concentrations sont ajoutées à 60 µl de la solution d'acétate d'ammonium (1M), 50 µl de néocuproïne (7.5mM) et 50 µl de chlorure de cuivre (10mM). L'absorbance est lue après 1h d'incubation à température ambiante à 450 nm. Le BHA est utilisé comme standard. L'activité antioxydante est évaluée à titre de A0.5 (µg/ml) indiquant la concentration correspondant à 0.50 d'absorbance. Elle est déterminée graphiquement à partir de la droite de régression d'absorbance en fonction de la concentration pour chaque échantillon testé.

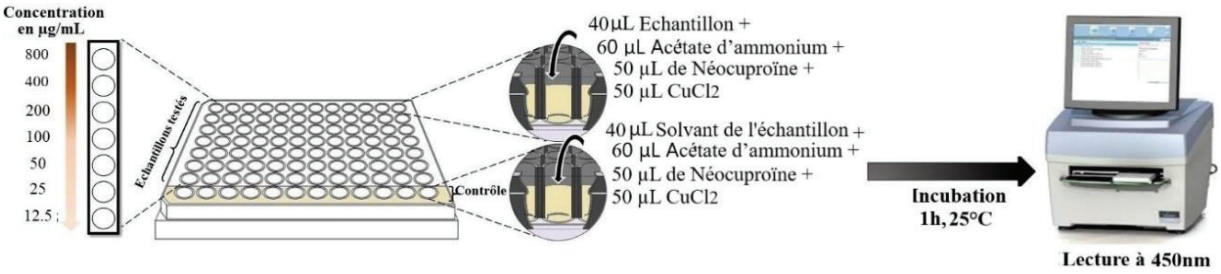


Figure 3.14. Protocole suivi pour l'étude de l'activité antioxydante ''CUPRAC''.

3.3.4. Pouvoir réducteur (Reducing power test)

A. Principe

La méthode Reducing power ou le pouvoir réducteur est décrite par Oyaizu en 1986. Elle est basée sur la capacité d'un antioxydant à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) en fer ferreux (Fe^{2+}) (Eq 3.6). L'addition du Fe^{3+} au produit réduit conduit à la formation du bleu de Prusse ($Fe[Fe(CN)_6]^-$) (Eq 3.7), qui a une forte absorbance à 700nm [288]. Cette réaction est révélée par le virage de la coloration du jaune au bleu-vert.

$$Fe(CN)6^{-3} + \text{antioxydant} \rightarrow Fe(CN)_6^{-4} + \text{antioxydant}\cdot \quad (3.6)$$

$$Fe(CN)_6^{-4} + Fe^{3+} \rightarrow Fe[Fe(CN)_6]^- \quad (3.7)$$

B. Procédure

Dans une microplaque à 96 puits, mélanger 10 µl de l'échantillon à différentes concentrations avec 40 µl du tampon phosphate à pH 6.6 et 50 µl de ferricyanure de potassium à 1%. Après incubation pendant 20 min à 50°C, 50 µl d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour

arrêter la réaction. La lecture de l'absorbance se fait à 700nm après addition de 40 µl d'eau distillée et 10 µl de chlorure du fer à 0.1%, comme illustré dans la **Figure 3.15**. L'activité antioxydante est évaluée à titre de A0.5 et comparée à celle du BHA.

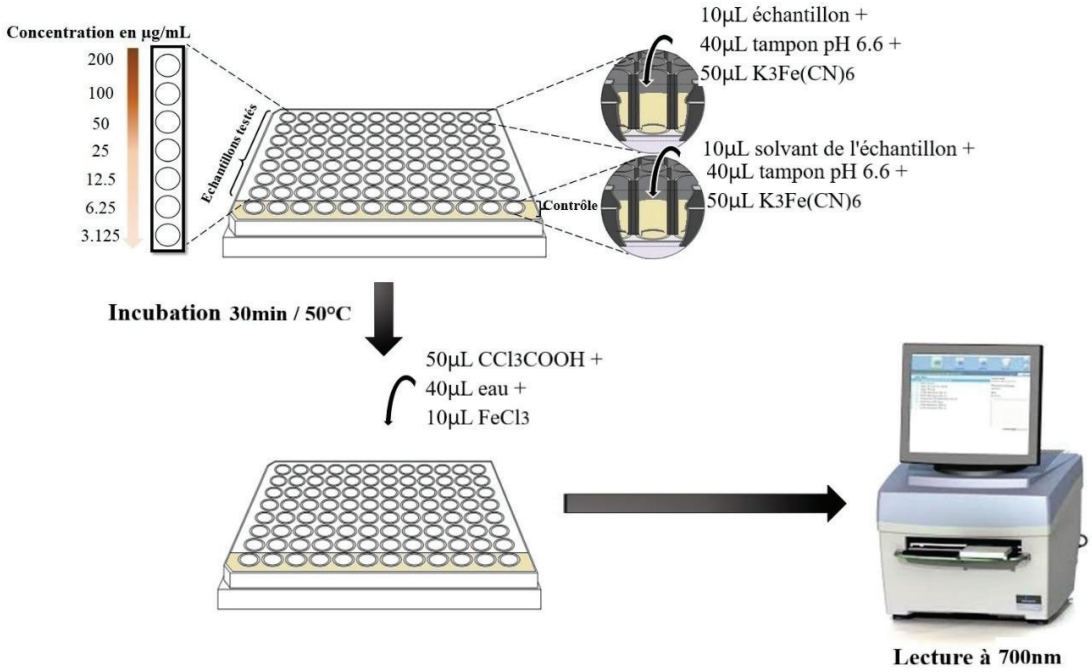


Figure 3.15. Protocole suivi pour l'étude de l'activité antioxydante ''pouvoir réducteur''.

3.4. Activité enzymatique

L'étude de l'activité enzymatique de l'huile des noyaux de dattes et celle du costus sous leurs formes libres et encapsulées est effectuée *in vitro* en se basant sur des réactions colorimétriques quantitatives à l'aide d'un lecteur de microplaques (PerkinElmer Multimode Plate Reader EnSpire) au niveau du centre national de recherche biotechnologique (CRBt), Constantine, Algérie.

L'activité enzymatique est évaluée à titre de CI50 (µg/ml) indiquant la concentration correspondant à une inhibition de 50% d'enzyme. Elle est déterminée graphiquement à partir de la droite de régression de pourcentage d'inhibition d'enzyme en fonction de la concentration pour chaque échantillon testé et comparée à celle des standards. Le protocole de la préparation des réactifs et des enzymes est inséré en **Annexe G**.

3.4.1. Activité anti-Alzheimer

A. Principe

Le principe de cette méthode est basé sur la capacité des enzymes : l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase à hydrolyser en thiocholine l'acétylthiocholine et la butyrylthiocholine, respectivement (**Fig.3.16**). La thiocholine réagit avec l'acide 5,5′-dithiobis (2-nitrobenzoïque) et génère un chromophore jaune qui peut être quantifié à 412 nm.

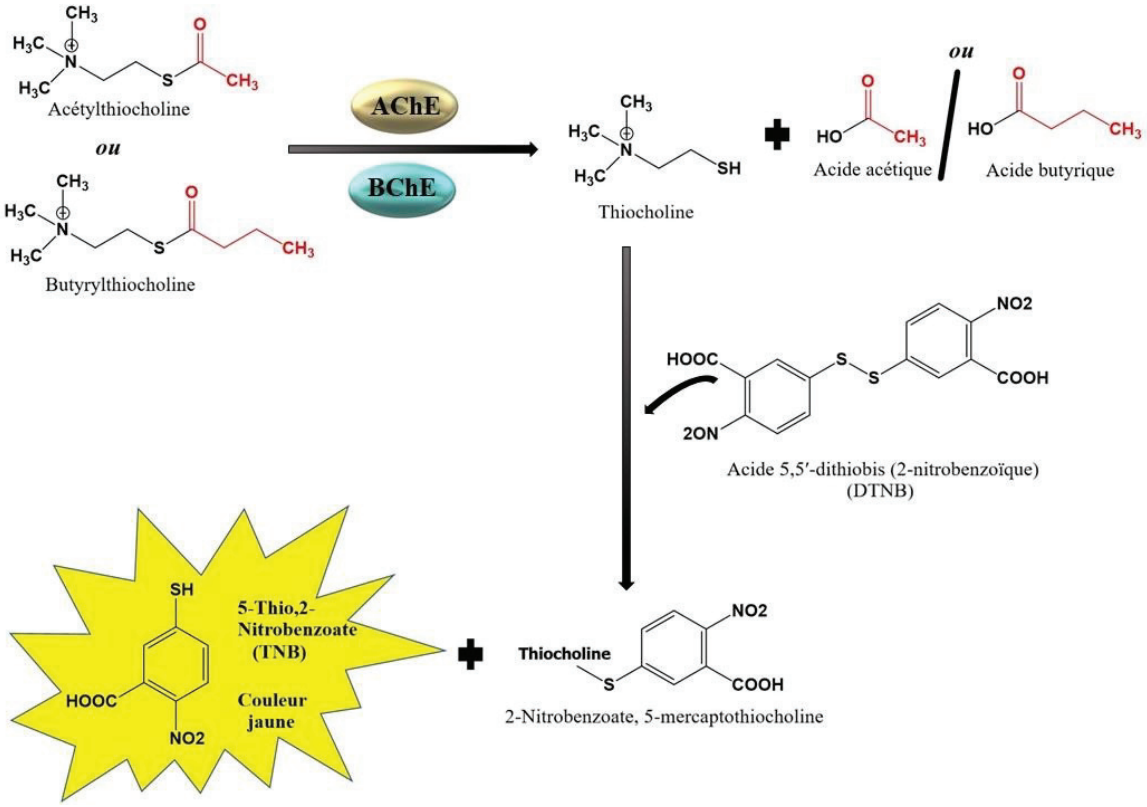


Figure 3.16. Mécanisme d'action de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase.

B. Protocole

L'activité anti-Alzheimer de l'huile des noyaux de dattes et celle du costus sous leur formes libre et encapsulée est évaluée *in vitro* contre l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase selon la méthode précédemment décrite par Ellman et al. [295]. Le protocole suivi est illustré dans la **Figure 3.17.** Dans une microplaque, 10 µl de la solution échantillon à différentes concentrations sont mélangées et incubées pendant 15 min à 25°C avec 150 µl de solution tampon (pH 8) et 20 µl d'acétylcholinestérase ou de

butyrylcholinestérase. Ensuite, 10 µl de l'acide 5,5′-dithiobis (2-nitrobenzoïque) sont ajoutés avec 10 µl d'acétylthiocholine ou de butyrylthiocholine. L'absorbance est lue à 412 nm et le pourcentage d'inhibition de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase est déterminé par rapport au blanc en appliquant l'équation 3.8.

$$\% \, Inhibition = \frac{A_{blanc} - A_{échantillon}}{A_{blanc}} \times 100 \qquad (3.8)$$

Où A_{blanc} : l'absorbance du blanc ; $A_{échantillon}$: l'absorbance de l'échantillon. La galantamine est utilisée comme référence.

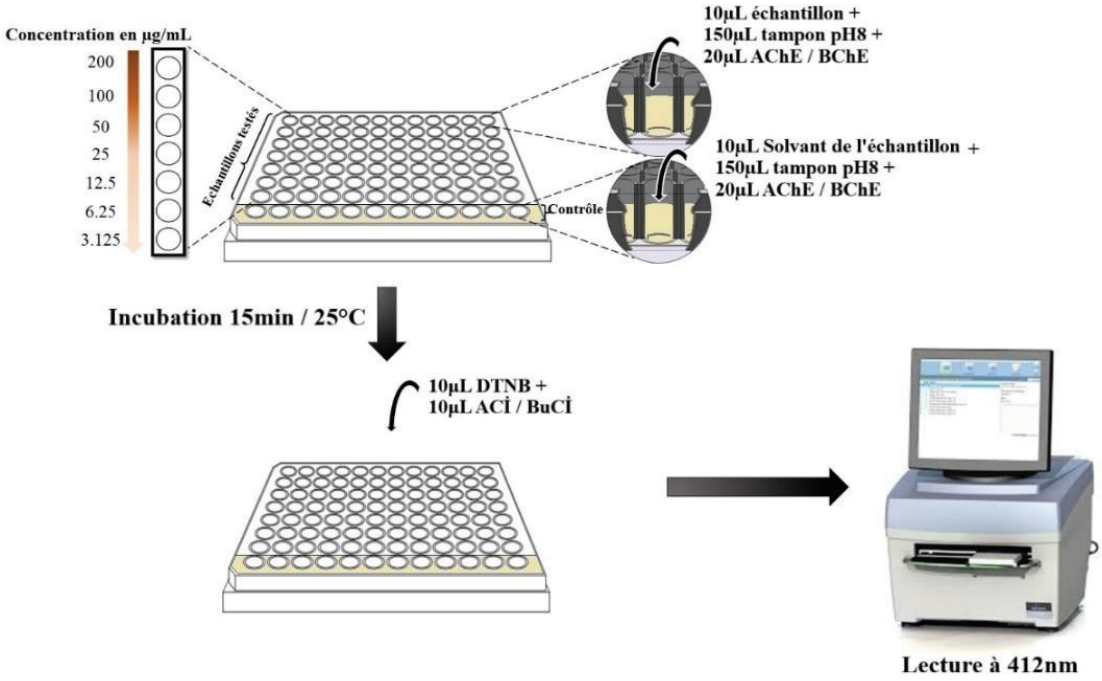


Figure 3.17. Protocole suivi pour l'étude de l'activité anti-Alzheimer.

3.4.2. Activité antidiabétique

A. Principe

L'α-amylase pancréatique hydrolyse les amidons complexes en oligosaccharides dans l'intestin grêle, qui seront hydrolysés par la suite avec d'autres oligosaccharides, trisaccharides et disaccharides par l'α-glucosidase intestinale en glucose et autres monosaccharides d'où un taux élevé est un signe du diabète sucré [296](**Fig.3.18**). Le principe de la méthode adoptée pour étudier l'activité antidiabétique porte sur la capacité de

l'α-amylase et l'α-glucosidase à hydrolyser l'amidon et le 4-nitrophényl α-D-glucopyranoside, respectivement.

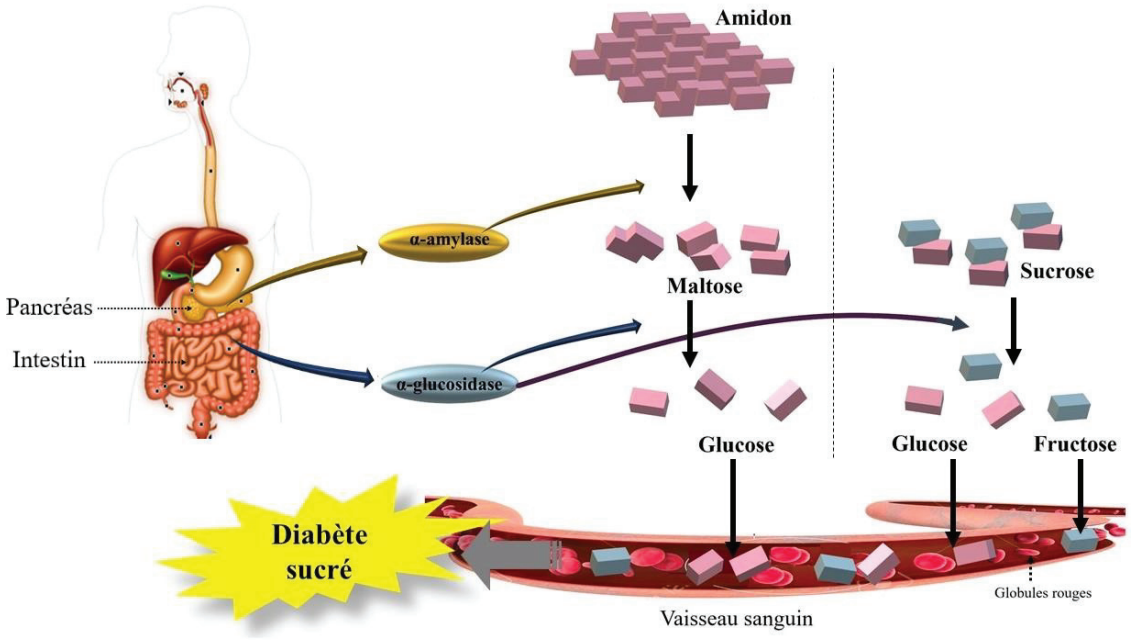


Figure 3.18. Mécanisme d'action de l'α-amylase et de l'α-glucosidase.

B. Protocole de l'activité anti-amylase

L'activité inhibitrice de l'alpha-amylase est réalisée par la méthode Caraway-Somogyi (Iodure de potassium-Iode (IKI))[297]. Dans une microplaque, 25 µl de la solution échantillon à différentes concentrations sont mélangées avec une solution d'α-amylase (50 µl). Après incubation à 37°C pendant 10min, la réaction est démarrée en ajoutant 50 µl de la solution d'amidon. La plaque sera à nouveau incubée pendant 10 min à 37°C et analysée par un lecteur de microplaques à 630 nm après l'ajout de 25 µl d'HCl et 100 µl de la solution d'IKI. La **Figure 3.19** illustre la répartition de différentes solutions dans la microplaque utilisée. L'inhibition de l'activité α-amylase est calculée en appliquant l'équation 3.9 et comparée à celle d'un médicament standard : Acarbose.

$$\text{Inhibition } (\%) = \left(1 - \frac{(Ac - Ae)(As - Ab)}{(Ac - Ae)}\right) \times 100 \qquad (3.9)$$

Avec : $\mathbf{A_c}$: Absorbance [Amidon+IKI+HCl+Volume de solvant d'échantillon +Volume tampon Enzyme] ;

$\mathbf{A_e}$: Absorbance [Enzyme+Amidon+IKI+HCL+ Volume de solvant d'extrait] ;

As : Absorbance [Enzyme+Extrait+Amidon+IKI+HCl] ;

A_b : Absorbance [Extrait+IKI+125µl de tampon].

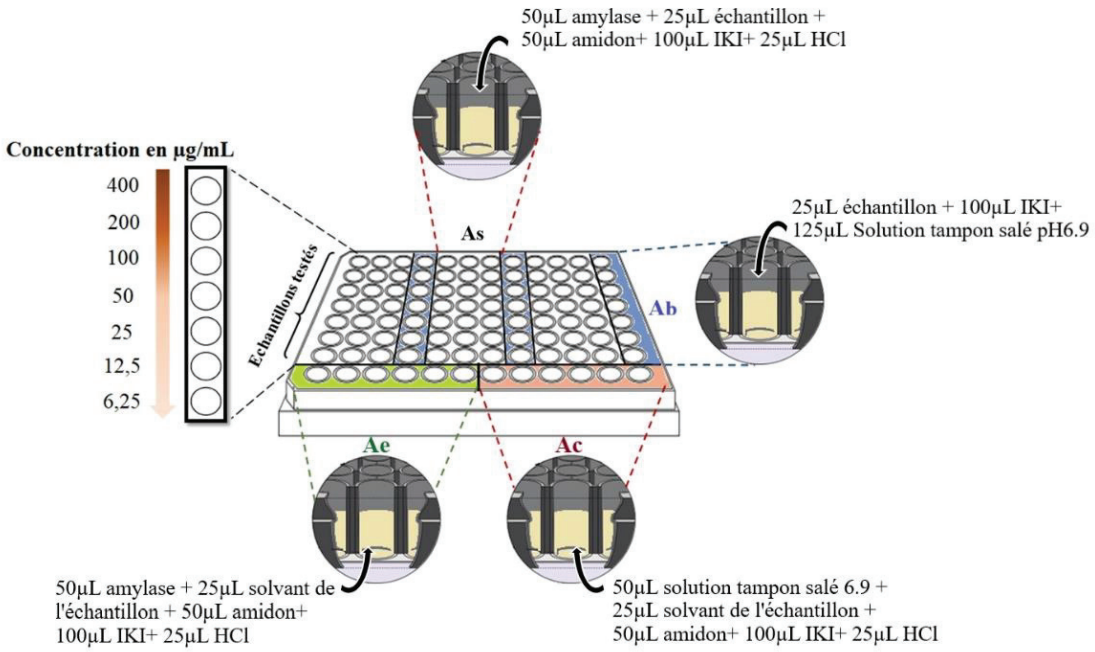


Figure 3.19. Schéma de la plaque utilisée pour l'étude de l'activité inhibitrice d'α-amylase.

c. Protocole de l'activité anti-glucosidase

L'activité inhibitrice de l'α-glucosidase est réalisée en appliquant la méthode décrite précédemment par Vadivelan et al. avec quelques modifications [298]. Cinquante microlitres de la solution échantillon à différentes concentrations sont pré-incubées avec 100 µl de la solution d'enzyme à 37°C pendant 15 min ; puis 50 µl de la solution de p-nitrophényl α-D glucopyranoside sont ajoutées au mélange, comme illustré dans la **Figure 3.20.** L'absorbance est lue à 405 nm après incubation à 37°C pendant 5 min. Le pourcentage d'inhibition de l'a-glucosidase est calculé selon l'équation 3.8. L'acarbose est utilisé comme référence.

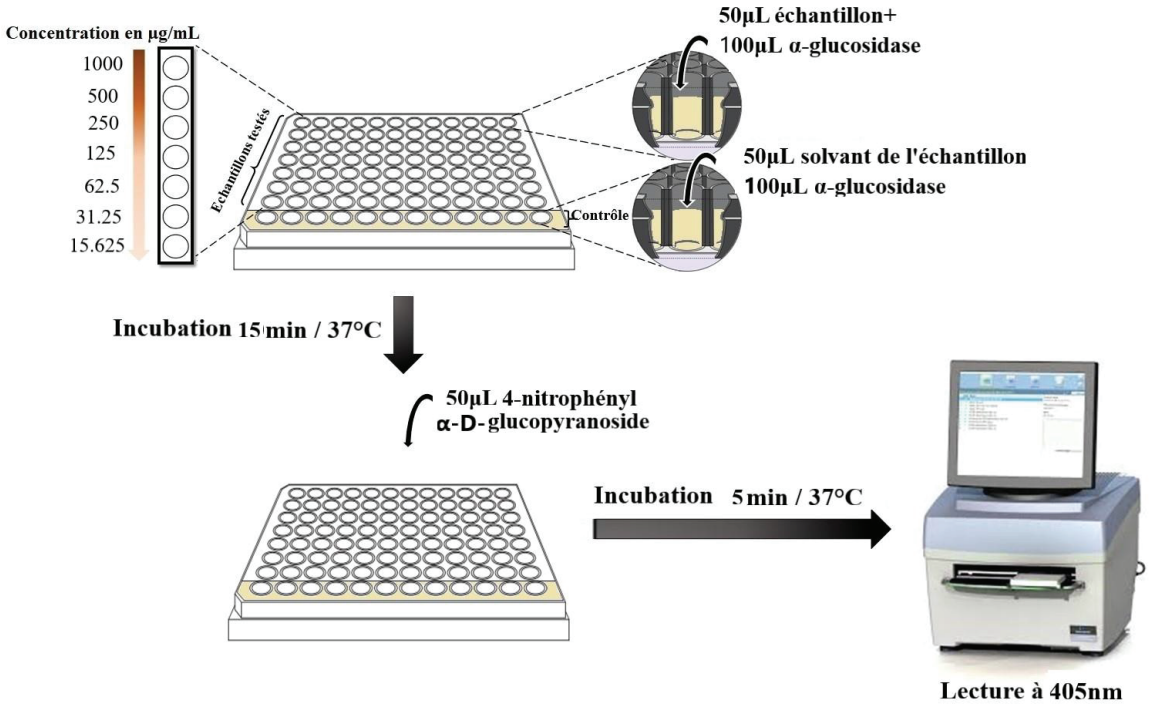


Figure 3.20. Protocole suivi pour l'étude de l'activité anti-glucosidase.

CHAPITRE IV

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE IV
RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Introduction

Dans le présent chapitre, tous les résultats obtenus avec leurs discussions sont exposés en suivant la méthodologie du chapitre III.

- La première partie comporte les résultats de l'analyse par GC-MS des deux extraits ;
- La deuxième partie illustre les résultats de l'étude paramétrique de la nanoprécipitation ainsi que la caractérisation des nanoparticules vides ;
- La troisième partie est consacrée aux résultats de la caractérisation des nanoparticules chargées d'huile ;
- Et enfin la dernière partie concerne les résultats des activités biologiques à savoir : antioxydante, anti-inflammatoire, anti-Alzheimer et antidiabétique.

4.2. Résultats de l'analyse des huiles

4.2.1. Analyse de l'huile des noyaux de dattes

L'huile végétale obtenue par fluide supercritique est un liquide visqueux ayant une couleur jaune clair (**Fig.4.1**).

Figure 4.1. Aspect de l'huile végétale des noyaux de dattes.

La composition en acides gras de l'HV obtenue est récapitulée dans le **Tableau 4.1.** Un total de 18 composants a été identifié, représentant 98.769 % du poids total d'huile dont 58.027% sont des acides gras insaturés et 40.742% correspondent aux acides gras saturés. Il est également remarqué que l'acide oléique est le composé majoritaire avec 47.737% du poids total, suivi de l'acide laurique (15.17%), l'acide palmitique (10.45%), l'acide myristique (10.155%) et l'acide linoléique (8.768%). Ces résultats sont en accords avec ceux rapportés par différents travaux où il est constaté la prédominance de ces cinq acides gras, mais en quantités variables [75,81,88,94,98] (voir Chapitre I). D'autres composés apparaissent comme traces dans notre huile tels : l'acide arachidonique, l'acide linolénique, l'acide stéarique, l'acide caprique et l'acide caprylique.

Tableau 4.1. Composition chimique de l'huile végétale de noyaux de dattes déterminée par par chromatographie en phase gazeuse.

No	Composant	Symbole	Formule	IR-WAX	Quantité (%)
1	Acide caprylique	C8 : 0	$C_8H_{16}O_2$	1404	0.215
2	Acide caprique	C10 : 0	$C_{10}H_{20}O_2$	1609	0.264
3	Acide laurique	C12 : 0	$C_{12}H_{24}O_2$	1817	15.17
4	Acide tridécylique	C13 : 0	$C_{13}H_{26}O_2$	1919	0.035
5	Acide myristique	C14 : 0	$C_{14}H_{28}O_2$	2024	10.155
6	Acide pentadécylique	C15 : 0	$C_{15}H_{30}O_2$	2126	0.072
7	Acide palmitique	C16 : 0	$C_{16}H_{32}O_2$	2233	10.45
8	Acide palmitoléique	C16 : 1	$C_{16}H_{30}O_2$	2261	0.100
9	Acide margarique	C17 : 0	$C_{17}H_{34}O_2$	2335	0.082
10	Acide stéarique	C18 : 0	$C_{18}H_{36}O_2$	2440	3.608
11	Acide oléique	C18 : 1	$C_{18}H_{34}O_2$	2468	47.737
12	Acide linoléique	C18 : 2	$C_{18}H_{32}O_2$	2515	8.768
13	Acide linolénique	C18 : 3	$C_{18}H_{30}O_2$	2583	0.361
14	Acide gadoléique	C20 : 1	$C_{20}H_{32}O_2$	2645	0.528
15	Acide arachidonique	C20 : 4	$C_{20}H_{38}O_2$	2670	0.533
16	Acide hénéicosylique	C21 : 0	$C_{21}H_{42}O_2$	2748	0.03
17	Acide béhénique	C22 : 0	$C_{22}H_{44}O_2$	2851	0.382
18	Acide lignocérique	C24 : 0	$C_{24}H_{48}O_2$	>3000	0.279
			Acides gras insaturés		**58.027**
			Acides gras saturés		**40.742**
			Total		**98.769**

4.2.2. Analyse de l'huile de costus

L'HE obtenue est peu visqueuse avec une couleur jaune brunâtre, une odeur très forte et une saveur piquante (**Fig.4.2**).

Figure 4.2. Aspect de l'huile essentielle du costus.

Deux méthodes complémentaires sont utilisées (GC-FID et GC-MS) pour mieux connaitre la composition de l'HE. De ce fait, deux types de colonnes capillaires sont utilisés (HP-Innowax et HP-1) afin d'obtenir des informations satisfaisantes sur la composition de l'HE et éviter la co-élution de certains constituants. Les pourcentages relatifs des composants de l'huile sont représentés dans le **Tableau 4.2**. Un total de 21 composants est identifié, représentant 82.75% du poids total. Les principaux constituants de l'essence sont le dehydrocostus lactone comme composé majoritaire (55.39%), suivi du costunolide (8.87%), dehydrosaussurea lactone (6.55%) et de l'aplotaxène (4.73%). Les sesquiterpènes oxygénés représentent 75.92% de l'ensemble des constituants, tandis que 8 des 21 constituants sont des hydrocarbures sesquiterpènes, correspondant à 5.94% de l'HE brute. La composition chimique de l'HE est en accord avec celle rapportée dans des travaux précédents [136,139,143]. Chen et al. ont constaté que les huiles extraites des racines de costus provenant de sept provinces contiennent toutes les deux principaux composants, le dehydrocostus lactone et le costunolide à des teneurs allant de 16.30 à 25.36% et de 4.28 à 8.32%, respectivement [143]. La variation de la composition de l'extrait peut être attribuée à des facteurs climatiques et saisonniers, au moment de la récolte ainsi qu'à la durée de stockage de la plante.

D'autres composés présentant un intérêt médicinal sont présents à l'état de traces dans notre huile comme le β-eudesmol, l'oxyde de caryophyllène, le β-ionone et l'α-humulène (**Tableau 4.2**).

Tableau 4.2. Composition chimique de l'huile essentielle du costus déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

No	Composant	Formule	IR-HP-1	IR-WAX	Quantité (%)
1	Béta elemène	$C_{15}H_{24}$	1388	1808	0.288
2	Dihydroionone	$C_{13}H_{22}O$	1396	-	0.088
3	Alpha ionone	$C_{13}H_{20}O$	1406	1876	0.147
4	Trans Béta Caryophyllène	$C_{15}H_{24}$	1419	1628	0.288
5	Néryl acétone	$C_{13}H_{22}O$	1428	-	0.029
6	Alpha humulène	$C_{15}H_{24}$	1452	1704	0.033
7	Béta ionone	$C_{13}H_{20}O$	1464	1946	0.093
8	Alpha+Gamma curcumène	$C_{15}H_{22}$ /$C_{15}H_{24}$	1471	1801/1719	0.06
9	Pentadécène-1	$C_{15}H_{30}$	1474	1539	0.06
10	Béta sélinène	$C_{15}H_{24}$	1482	1750	0.308
11	Alpha sélinène	$C_{15}H_{24}$	1493	1758	0.17
12	Alpha élémol	$C_{15}H_{26}O$	1534	2108	0.085
13	Eléma- 1,3,11(13)-Trién-12-al	$C_{15}H_{22}O$	1555	-	0.206
14	Oxyde Caryophyllène	$C_{15}H_{24}O$	1570	2024	0.291
15	Béta Eudesmol	$C_{15}H_{26}O$	1636	2268	1.256
16	Aplotaxène	$C_{17}H_{28}$	1660	2623	4.734
17	Béta costol	$C_{15}H_{24}O$	1748	2532	1.865
18	Alpha costol	$C_{15}H_{24}O$	1754	2607	1.034
19	Dehydrosaussurea lactone	$C_{15}H_{20}O_2$	1861	-	6.556
20	Costunolide	$C_{15}H_{20}O_2$	1891	-	8.874
21	Dehydrocostus lactone	$C_{15}H_{18}O_2$	1962	-	55.399
22	Inconnu	-	2118	-	0.446
23	Inconnu	-	2146	-	0.44
	Total				**82.75**

Sesquiterpènes hydrocarbonés : 5.94% ; Sesquiterpènes oxygénés : 75.92% ; Inconnu : 0.89.

4.3. Résultats de l'étude paramétrique de la nanoprécipitation

Dans le but d'optimiser les NP à base de PMMA, une série d'expériences sur les variables liées au processus de la nanoprécipitation est menée afin de montrer leur impact sur les propriétés colloïdales des NP y compris, la taille des particules, l'indice de polydispersité

et le potentiel ζ. Le **Tableau 4.3** résume les résultats de l'analyse des NP vides préparées en faisant varier les quantités des ingrédients de la formulation et les conditions opératoires.

Tableau 4.3. Résultats du diamètre et du potentiel zêta pour les différentes formulations synthétisées. Les valeurs « en gras » indiquent les paramètres modifiés.

	Eudragit (mg/ml)	Rapport volumique			Vitesse d'agitation (rpm)	Diamètre (nm)	Potentiel ζ (mV)
		Acétone	Ethanol	Méthanol			
F1	16	1/3	-	-	500	59 ± 1	44 ± 2
F2	16	**2/5**	-	-	500	52 ± 1	50 ± 2
F3	16	**1/2**	-	-	500	50 ± 1	51 ± 4
F4	16	**2/3**	-	-	500	49 ± 2	53 ± 3
F5	16	**1/1**	-	-	500	49 ± 1	48 ± 2
F6	16	-	**1/3**	-	500	49 ± 3	39 ± 2
F7	16	-	**2/5**	-	500	47 ± 1	39 ± 3
F8	16	-	**1/2**	-	500	45 ± 2	39 ± 2
F9	16	-	**2/3**	-	500	51 ± 1	38 ± 2
F10	16	-	**1/1**	-	500	54 ± 4	43 ± 2
F11	16	-	-	**1/3**	500	48 ± 3	71 ± 3
F12	16	-	-	**2/5**	500	46 ± 5	70 ± 2
F13	16	-	-	**1/2**	500	45 ± 1	64 ± 3
F14	16	-	-	**2/3**	500	50 ± 1	59 ± 4
F15	16	-	-	**1/1**	500	53 ± 2	51 ± 1
F16	**28**	1/2	-	-	500	51 ± 2	45 ± 2
F17	**40**	1/2	-	-	500	65 ± 3	53 ± 2
F18	**52**	1/2	-	-	500	78 ± 1	53 ± 1
F19	**64**	1/2	-	-	500	88 ± 4	54 ± 3
F20	**28**	-	1/2	-	500	44 ± 2	37 ± 2
F21	**40**	-	1/2	-	500	55 ± 1	45 ± 2
F22	**52**	-	1/2	-	500	59 ± 1	47 ± 1
F23	**64**	-	1/2	-	500	63 ± 1	45 ± 6
F24	**28**	-	-	1/2	500	45 ± 1	64 ± 3
F25	**40**	-	-	1/2	500	49 ± 4	63 ± 2
F26	**52**	-	-	1/2	500	53 ± 3	73 ± 3
F27	**64**	-	-	1/2	500	54 ± 1	72 ± 2
F28	16	1/2	-	-	**300**	61 ± 2	48 ± 3
F29	16	1/2	-	-	**700**	42 ± 1	49 ± 5
F30	16	-	1/2	-	**300**	56 ± 2	40 ± 2
F31	16	-	1/2	-	**700**	35 ± 1	41 ± 2
F32	16	-	-	1/2	**300**	54 ± 2	62 ± 3
F33	16	-	-	1/2	**700**	34 ± 2	66 ± 4

La concentration du polymère est définie par rapport au solvant organique.

4.3.1. Effet du rapport volumique solvant / non solvant et de la nature du solvant organique

Le rapport phase organique / phase aqueuse fait partie des paramètres les plus critiques pour la formation spontanée des NP par la méthode de la nanoprécipitation [299]. Pour évaluer cet effet, différents rapports (1/3, 2/5, 1/2, 2/3 et 1/1) du volume de solvant par rapport au volume de non-solvant (S/NS) sont réalisés en utilisant trois types de solvants : acétone, éthanol et méthanol, comme illustré dans le **Tableau 4.3.** La **Figure 4.3** montre la relation entre la taille des NP et le rapport S/NS pour les trois types de solvants utilisés après leur évaporation.

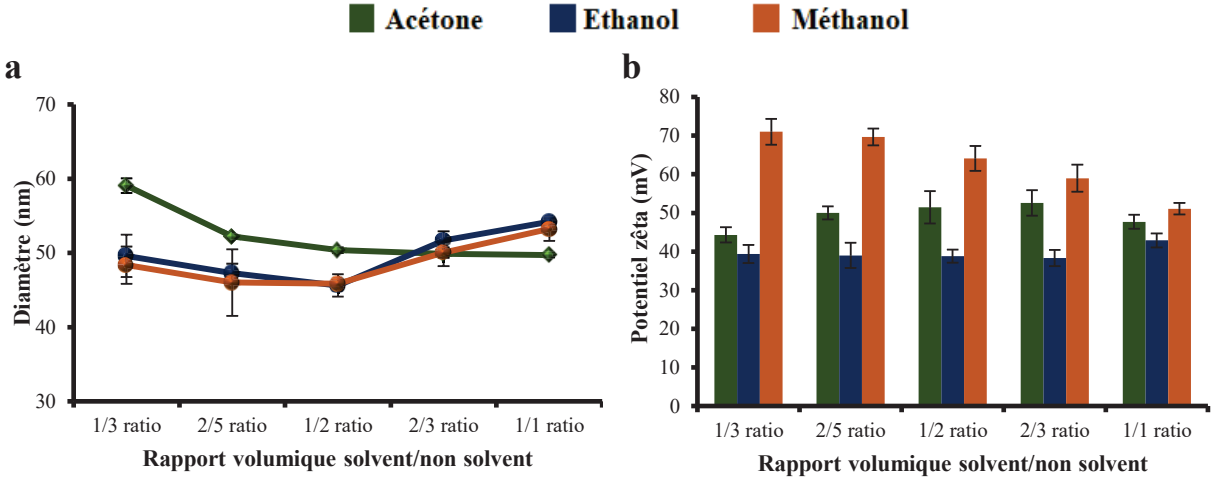


Figure 4.3. Effet du rapport volumique solvant/non solvant sur le diamètre **(a)** et le potentiel zêta **(b)** des nanoparticules.

Il est observé qu'avec une augmentation du rapport volumique acétone/eau de 1/3 à 1/1, il y a une diminution significative de la taille des particules de 59 ± 1 à 49 ± 1 nm (**Fi.4.3.a**). Une telle diminution de la taille en fonction du rapport volumique peut s'expliquer par la viscosité réduite de la phase organique, ce qui facilite la diffusion de l'acétone dans l'eau. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Limayem et ses collaborateurs [300]. Dong et Feng ont constaté que l'augmentation du volume du solvant tout en préservant la même quantité du polymère conduit à une diminution de la viscosité de la phase organique, et donc la taille des particules [301].

La **Figure 4.3.a** montre également qu'en augmentant le rapport volumique de l'éthanol à l'eau de 1/3 à 1/2, une légère diminution de la taille des particules est observée de

49 ± 3 à 45 ± 2 nm. Cependant, à des rapports de volumes très élevés, il y a une augmentation de la taille des particules de 51 ± 1 à 54 ± 1 nm pour des rapports de volume de 2/3 et 1/1, respectivement. La même tendance s'est manifestée avec le méthanol. En augmentant le rapport du méthanol / eau de 1/3 à 1/2, la taille des NP diminue de 48 ± 3 nm à 45 ± 1 nm et des NP présentant des diamètres plus importants sont obtenues avec des rapports de volume élevés. Néanmoins, l'analyse statistique de ces résultats démontre que les changements de taille des particules n'étaient pas significatifs pour le méthanol et l'éthanol (la valeur p-ANNOVA était supérieure à 0.05). Ces résultats sont liés en se référant à des travaux antérieurs à la solubilité des solvants organiques dans l'eau [302]. En effet, il est constaté que la taille des particules change considérablement lors de l'utilisation de solvants partiellement solubles dans l'eau comme le cas de l'acétate d'éthyle et le carbonate de propylène. Alors qu'elle ne change pas d'une façon significative en utilisant un solvant entièrement miscible avec l'eau. Les valeurs diélectriques de l'acétone, l'éthanol et le méthanol sont respectivement 21.30 ± 0.02, 25.02 ± 0.02 et 33.30 ± 0.02 [303]. Ainsi, l'éthanol et le méthanol sont plus miscibles avec l'eau par rapport l'acétone, ce qui traduit l'effet négligeable de ces deux solvant sur la taille des particules.

Pour une étude plus approfondie, la variation de la dispersion de taille est étudiée en fonction du rapport S/NS pour toutes les NP développées. La **Figure 4.4** illustre pour tous les solvants testés, une distribution granulométrique unimodale étroite pour un rapport volumique de 1/2. Concernant l'acétone, on constate une distribution de taille unimodale avec des rapports volumiques de 1/3, 2/5 et 1/2, et qui devient plus étroite pour le rapport 1/2. Tandis qu'une distribution bimodale est observée avec les rapports volumiques : 2/3 et 1/1. Ces résultats s'accordent avec ceux de Tarhini et al. qui ont suggéré lors du développement des NP à base de protéines par le biais de la nanoprécipitation que la distribution de taille est très large avec des rapports supérieurs à 1/2 [304]. Résultats aussi confirmés par Badri et al. [305].

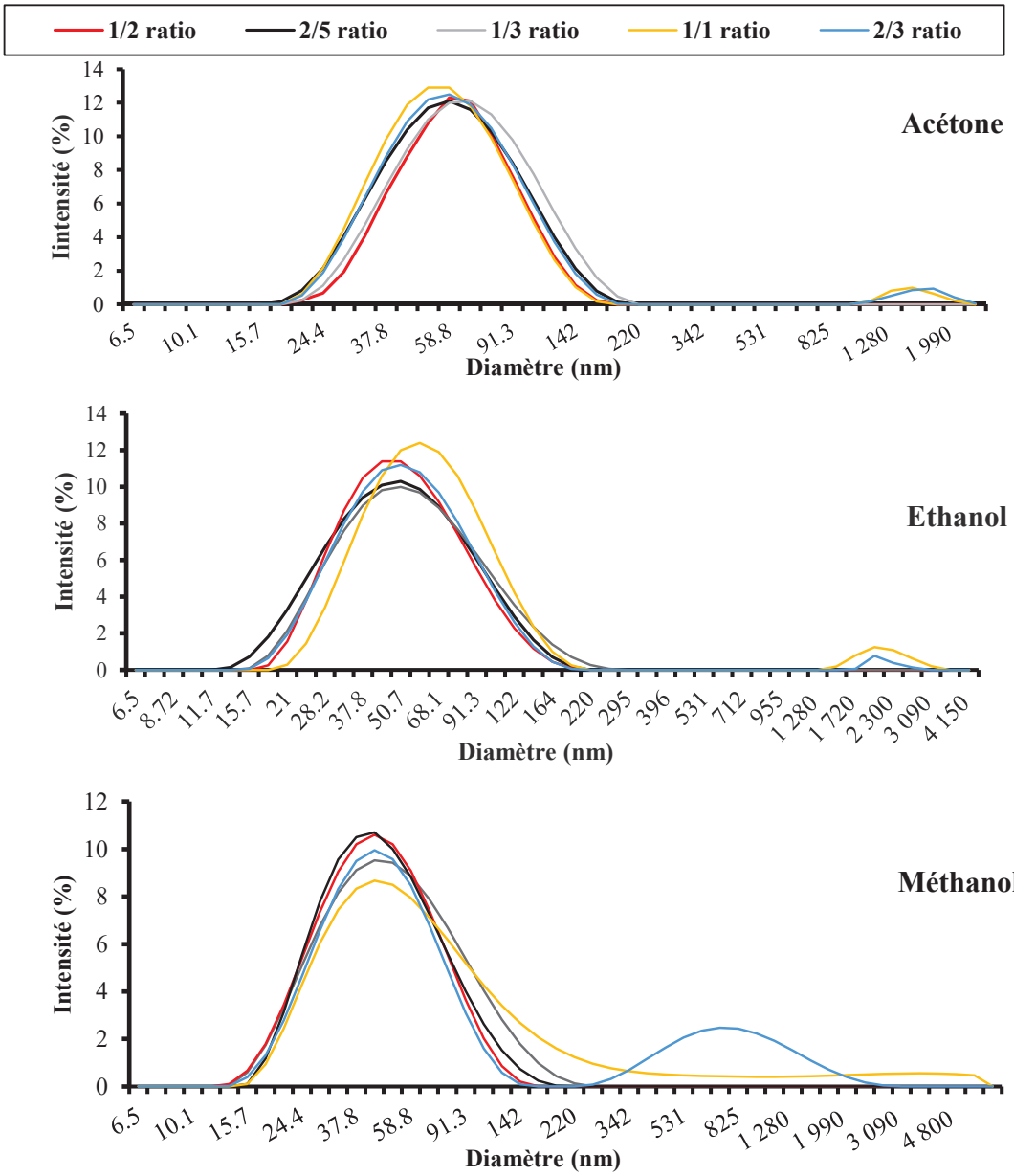


Figure 4.4. Distribution de taille des nanoparticules à base de PMMA à différents rapports volumiques solvant/non solvant (1/3, 2/5, 1/2, 2/3 et 1/1) pour l'acétone, l'éthanol et le méthanol.

Il est également observable que, pour l'éthanol, les NP ne présentent pas de distribution unimodale à des rapports supérieurs à 1/2 où un petit pic est apparu indiquant la présence d'agrégats (**Fig.4.4**). Le même résultat s'est reproduit avec le méthanol pour des rapports élevés (2/3 et 1/1) mais les pics d'agrégation dans ce cas sont plus larges. En effet, un pic de forme gaussienne non parfaite est observé pour le rapport volumique 1/1.

L'influence du rapport volumique S/NS sur le potentiel ζ est également étudiée et les résultats sont montré dans la **Figure 4.3.b** Toutes les NP ont un potentiel ζ positif à cause de la présence des groupements positifs quaternaires d'ammonium dans le PMMA comme décrit précédemment [43]. Concernant l'effet du rapport volumique sur le potentiel ζ, il n'est significatif que pour le méthanol. En augmentant le rapport S/NS, le potentiel ζ diminue et les NP deviennent moins stables. Ceci est en accord avec les résultats de la distribution de taille où les NP préparées avec du méthanol montrent l'agrégation la plus élevée pour un rapport de 1/1. Dans le cas de l'acétone et de l'éthanol, l'effet du rapport volumique est insignifiant. Des résultats similaires rapportés par Badri et al. ont révélé l'effet négligeable du rapport volumique acétone / eau sur le potentiel ζ des NP de polycaprolacone préparées par la nanoprécipitation [41].

D'après tous ces résultats, un rapport volumique de 1/2 semble favoriser la formation de NP de petite taille avec une distribution unimodale étroite et un potentiel ζ élevé pour les trois solvants utilisés et sera retenu pour l'étude des autres facteurs.

4.3.2. Effet de la concentration en polymère

L'effet de la concentration en polymère sur la taille et le potentiel ζ des particules est évaluée pour les trois types de solvants et les résultats sont montrés sur la **Figure 4.5.**

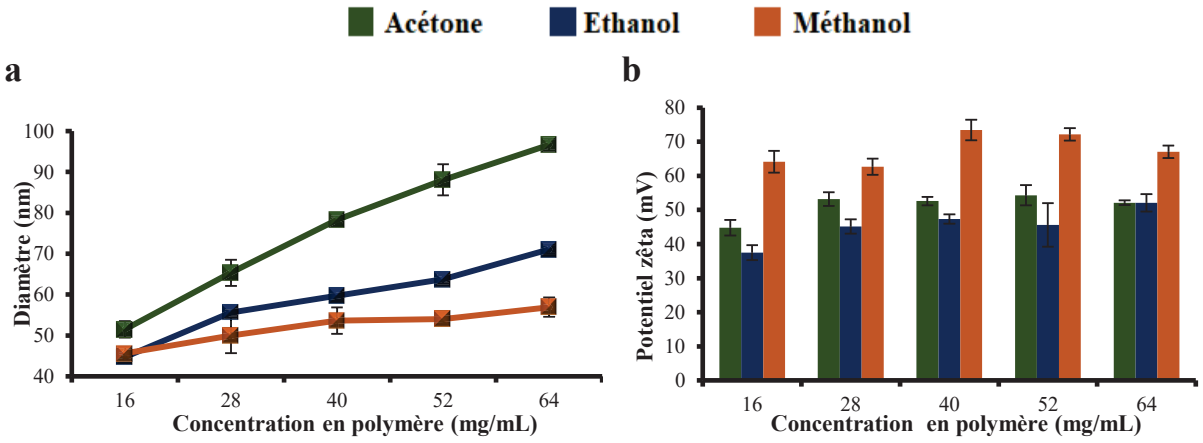


Figure 4.5. Effet de la concentration en polymère sur le diamètre **(a)** et le potentiel zêta **(b)** des nanoparticules.

Nous notons que la taille des particules est dépendante de la concentration en PMMA. La concentration et la taille des NP évoluent dans le même sens quel que soit le solvant

organique utilisé (**Fig.4.5**). Ce résultat est déjà mis en évidence par de nombreux travaux [301,302,306]. Badri et al. ont attribué l'augmentation de la taille des particules à l'augmentation de la viscosité de la phase organique qui réduit la diffusion de l'acétone vers la phase aqueuse [41].

Notre étude montre également que la taille des NP dépend du type de solvant organique. Les NP obtenues avec de l'acétone sont plus grandes que celles obtenues avec de l'éthanol ou du méthanol (**Fig.4.5.a**). En effet, d'après l'étude de Bilati et al. l'augmentation de la taille des particules est due à la constante diélectrique faible du solvant (ε) [307]. Ainsi, l'acétone, ayant une constante diélectrique inférieure à celles de l'éthanol et du méthanol [303], donne des NP plus grandes. Des résultats similaires sont aussi constatés [308]. L'affinité du solvant (X) pour le non solvant s'est avérée cruciale pour optimiser la taille finale des particules [305]; elle est calculée selon l'équation 4.1:

$$X = Vns*(\delta s-\delta ns)^2/RT \qquad (4.1)$$

Où Vns est le volume molaire du solvant; δs et δns sont les paramètres de solubilité Hildebrand du solvant et du non-solvant, respectivement; R est la constante des gaz et T est la température absolue [307]. Plus la valeur de X est élevée, plus l'affinité du solvant pour le non-solvant est faible, plus la vitesse de diffusion est lente et donc plus la taille des NP augmente [305]. Les paramètres de solubilité Hildebrand de l'acétone, l'éthanol, le méthanol et l'eau sont respectivement 19.7, 26.2, 29.7 et 48 [309]. Ainsi, l'affinité des non-solvants pour l'eau varieront dans l'ordre suivant : méthanol > éthanol > acétone. Par conséquent, la vitesse de diffusion de l'acétone est la plus lente et les NP obtenues sont les plus grandes.

En ce qui concerne le potentiel ζ des NP obtenues, la **Figure 4.5.b** montre que la variation de la concentration en polymère ne présente pas d'effet significatif, comme rapportés par Badri et al. [41].

4.3.3. Effet de la vitesse d'agitation

L'effet de la vitesse d'agitation sur les propriétés colloïdales des particules est évalué pour les trois types de solvants et les résultats sont illustrés dans la **Figure 4.6.**

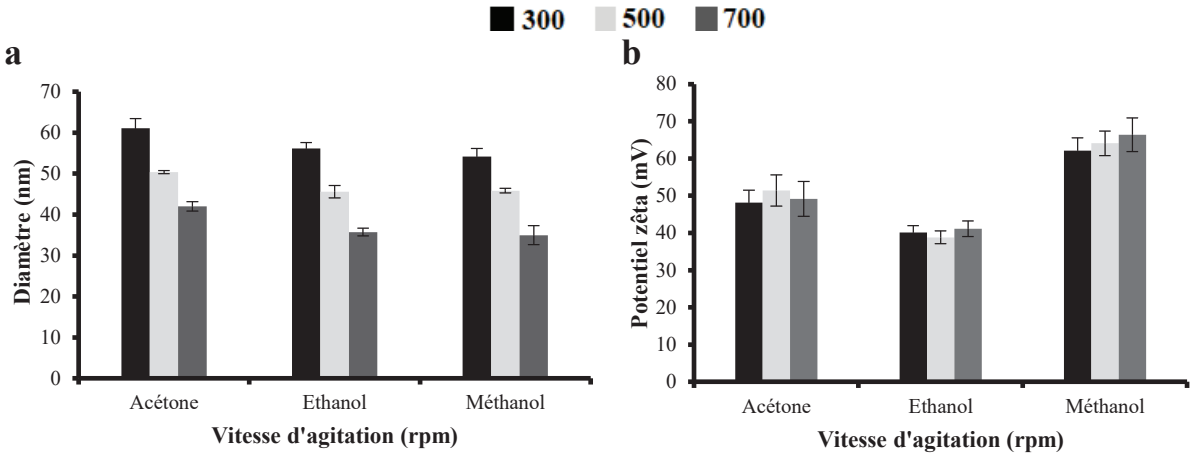


Figure 4.6. Effet de la vitesse d'agitation sur le diamètre **(a)** et le potentiel zêta **(b)** des nanoparticules.

La taille des NP préparées par nanoprécipitation dépend de la vitesse d'agitation (**Fig.4.6.a**). En effet, plus la vitesse est élevée, plus la taille des NP diminue. En augmentant la vitesse d'agitation de 300 à 700 rpm, la taille des particules diminue significativement de 61 ± 2 nm à 42 ± 1 nm, de 56 ± 2 à 35 ± 1 nm et de 54 ± 2 à 34 ± 2 nm pour l'acétone, l'éthanol et méthanol, respectivement. Ce comportement est attendu puisqu'il a déjà été constaté pour des NP formées de polycaprolactone [41] et de polylactide [310]. Une telle diminution de la taille peut s'expliquer par le fait qu'en augmentant la vitesse d'agitation, la force de cisaillement augmente ce qui entraine une diffusion plus rapide du solvant vers le non-solvant [271].

Concernant l'influence de la vitesse d'agitation sur le potentiel ζ, les résultats montrent que l'effet est insignifiant ($p > 0,05$) (**Fig.4.6.b**). Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Badri et al. [41]. Il est néanmoins important de préciser que la vitesse d'agitation la plus élevée (700 rpm) forme une mousse qui gêne par la suite l'évaporation du solvant. Sur cette base, 500rpm est choisie comme vitesse optimale.

Pour conclure, les paramètres étudiés ont tous un rôle crucial dans la préparation des NP à base de PMMA. Les conditions optimales donnant des particules avec une taille convenable, une distribution uniforme et un potentiel ζ élevé sont : un rapport volumique S/NS de 1/2 ; une concentration en PMMA de 16 mg/ml ; et une vitesse d'agitation de 500 rpm.

4.3.4. Morphologie des nanoparticules vides

Les trois formulations optimisées de NP sont visualisées par MEB et évaluées en termes de forme et de texture. La **Figure 4.7** montre que toutes les NP ont une forme sphérique, régulière et sont de l'échelle submicrométrique.

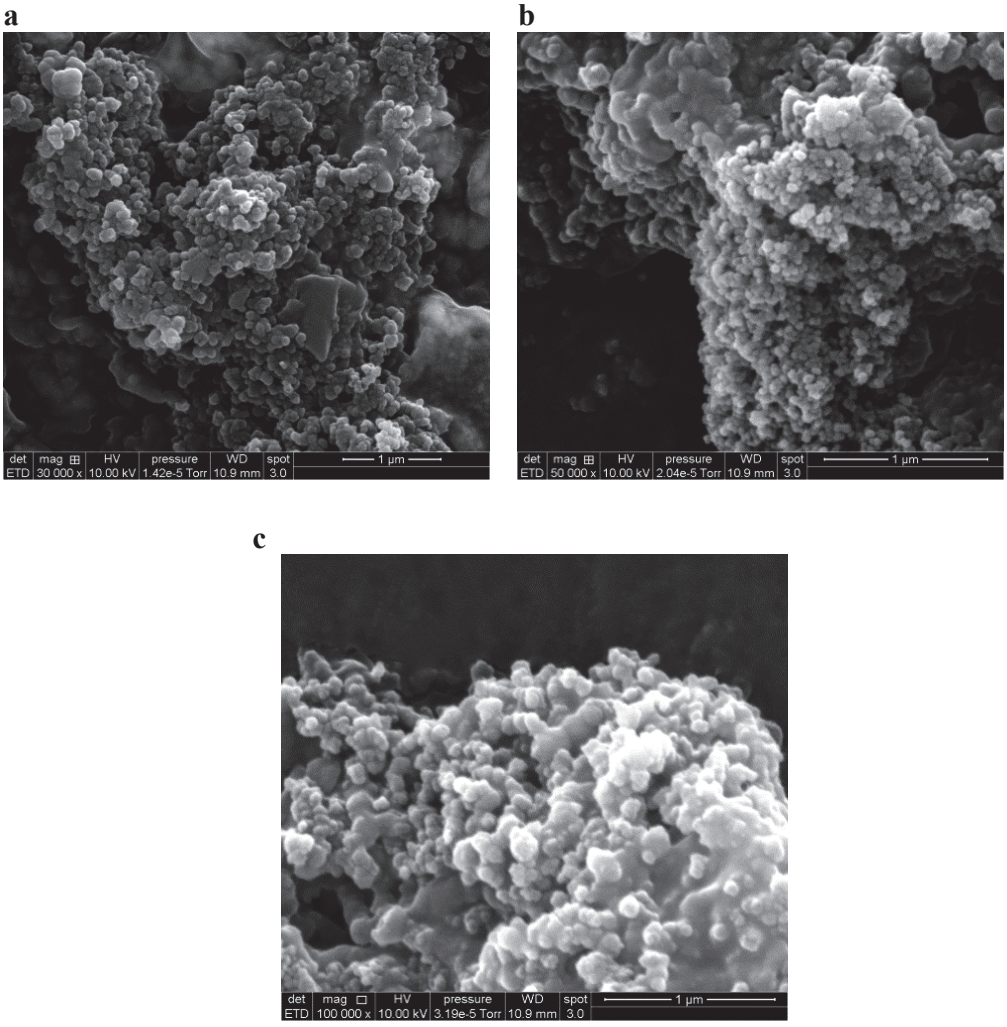


Figure 4.7. Images de nanoparticules à base de PMMA préparées avec de l'acétone **(a),** de l'éthanol **(b)** et du méthanol **(c)** par microscopie électronique à balayage.

4.4. Caractérisation des nanoparticules chargées en huile des noyaux de dattes

4.4.1. Résultats de l'analyse par diffusion dynamique de la lumière

Pour obtenir la quantité adéquate de l'HV des noyaux de dattes à encapsuler, différentes quantités sont étudiées (15, 30, 60, 120, 240 et 300 mg) et les NP préparées sont analysées en termes de taille, potentiel ζ et EE%, comme illustré dans le **Tableau 4.4.**

Tableau 4.4. Résultats de diamètre du potentiel ζ et d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules chargées en huile des noyaux de dattes.

Quantité d'huile (mg)	Diamètre (nm)	Potential ζ (mV)	EE (%)	DL (µg/mg polymer)
0	50 ± 1	51 ± 4	/	/
15	126 ± 2	57 ± 4	99.0 ± 1.0	61.9 ± 0.6
30	150 ± 1	62 ± 3	97.3 ± 3.0	121.6 ± 3.8
60	187 ± 2	62 ± 2	99.0 ± 1.0	247.5 ± 2.5
120	217 ± 3	59 ± 4	98.0 ± 1.0	490.0 ± 5.0
240	228 ± 3	46 ± 5	91.3 ± 3.2	913.3 ± 32.1
300	231 ± 3	48 ± 1	85.7 ± 3.1	1070.8 ± 38.2

La suspension contenant les NP vides a une couleur blanche transparente. Cependant, elle a perdu sa transparence et est devenue de plus en plus opaque en augmentant la quantité d'huile incorporée (**Fig.4.8).**

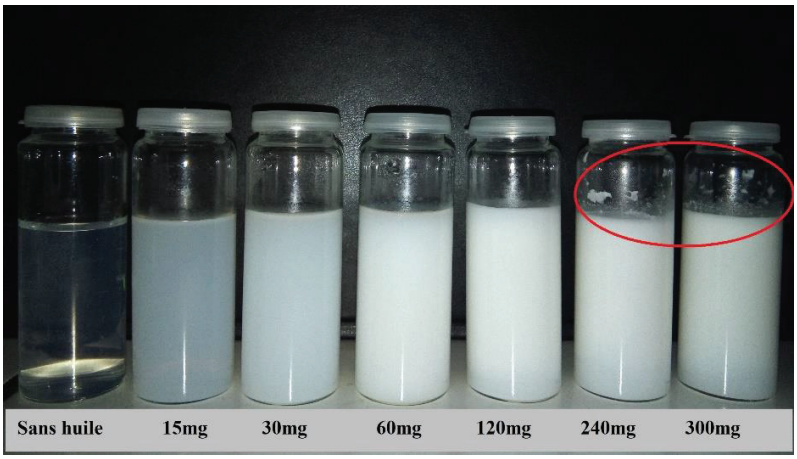


Figure 4.8. Variation de couleur des suspensions de nanoparticules chargées d'huile des noyaux de dattes en fonction de la quantité d'huile incorporée.

Ce Résultat est en concordance avec les mesures de la taille des particules, montrées sur la **Figure 4.9.a**, où toutes les NP préparées ont un diamètre moyen supérieur à celui des NP vides. Résultats conformes avec d'autres travaux [311]. Ainsi, en augmentant la quantité d'huile de 15 à 120 mg, une augmentation significative de la taille des particules est enregistrée de 126 ± 2 à 217 ± 3 nm. Alors qu'au-delà de 120 mg, une légère augmentation de la taille des particules est constatée. Pour 240 et 300 mg d'huile, le diamètre des particules

est de 228 ± 3 et 231 ± 3 nm, respectivement. De plus, les suspensions ne présentent pas un aspect homogène et certaines gouttes d'huile apparaissent (**Fig.4.8**). Donc, nous pouvons supposer qu'il y a une quantité optimale d'HV à encapsuler dans notre NP. Le même résultat est confirmé par Badri et al. [278].

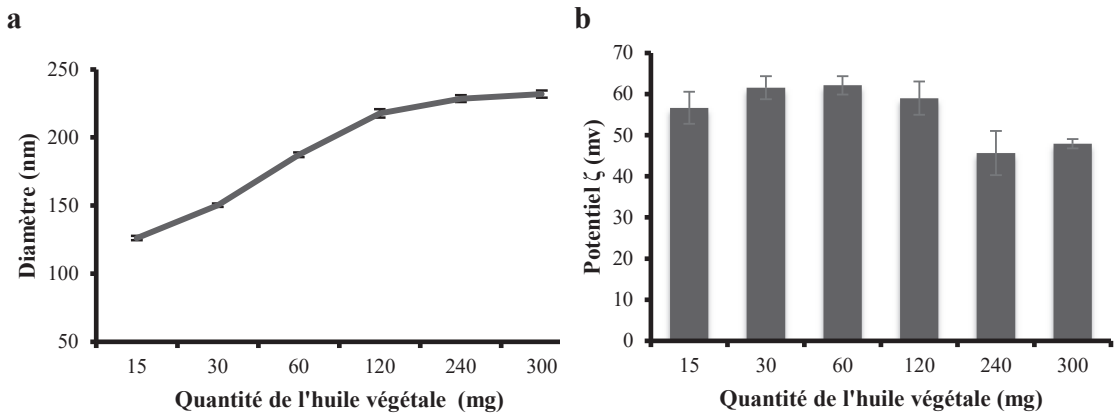


Figure 4.9. Effet de la quantité d'huile des noyaux de dattes sur la taille **(a)** et le potentiel ζ **(b)** des nanoparticules chargées.

Dans le but de sélectionner la quantité adéquate d'extrait à encapsuler, une analyse plus approfondie est effectuée pour corréler entre la quantité d'huile et le rayon cubique des NP en supposant que le nombre de NP est constant et qu'uniquement leur taille qui varie en fonction de la quantité de polymère ou d'huile utilisés (Eq. 4.2).

$$r^3 \approx \frac{m}{Np} \qquad (4.2)$$

Avec :

r : le rayon de la nanoparticule.

m : la quantité de polymère ou d'huile utilisés.

Np : le nombre de nanoparticules.

Pour les NP chargées d'huile, la taille des particules augmente en augmentant la quantité d'huile de 15 à 120 mg ; ce qui est confirmée par la bonne corrélation entre la quantité d'huile et le rayon des NP (R^2=0.9866) (**Fig.4.10**). Alors qu'avec des quantités plus élevées (240 et 300 mg), les particules n'augmentent pas en taille. Ceci est peut-être expliqué par le fait que les NP sont saturées en huile. Donc, la quantité maximale d'huile à encapsuler ne doit excéder 120mg.

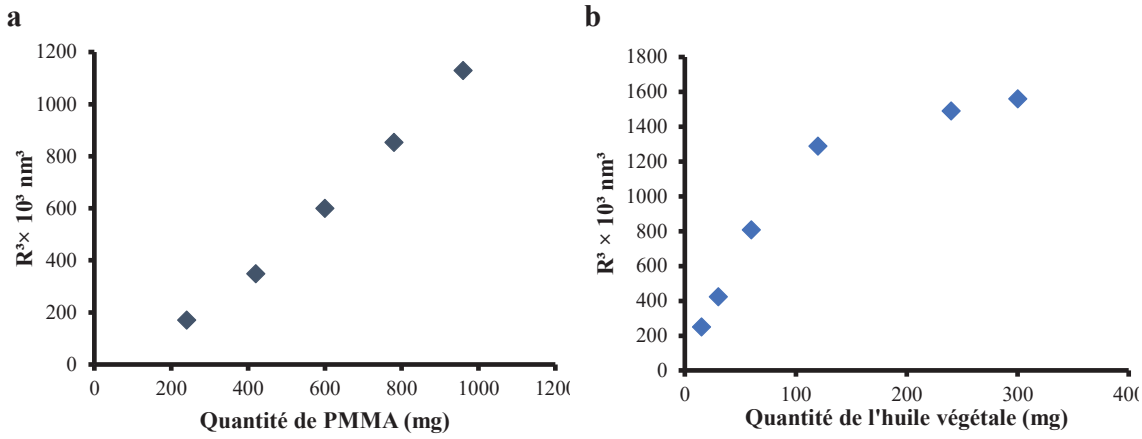


Figure 4.10. Corrélation entre la quantité du polymère **(a),** la quantité d'huile des noyaux de dattes **(b)** et le rayon cubique des nanoparticules.

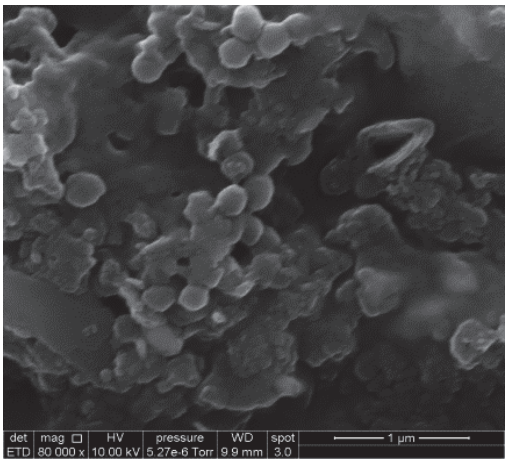
Pour l'effet de la quantité d'huile sur le potentiel ζ, nous notons pour les NP une légère variation en augmentant la teneur de l'extrait encapsulé (**Fig.4.9.b**). De plus, des valeurs plus élevées sont enregistrées par rapport aux NP vides, où leur potentiel ζ est de 51 ± 4 mV. Ce résultat est attribué à l'incorporation de l'huile qui peut interagir avec le polymère, influençant ainsi la charge des NP. La **Figure 4.9.b** montre également que toutes les valeurs mesurées du potentiel ζ sont supérieures à +30mV ce qui indique que ces NP sont physiquement stables.

Une mesure de l'EE% est effectuée par spectroscopie UV-visible et les résultats sont montrés dans le **Tableau 4.4.** Presque la totalité de l'huile des noyaux de dattes est encapsulée dans les NP ; les valeurs de l'EE% sont comprises entre 97 et 99%. Alors que de faibles valeurs sont notées à des quantités plus élevées d'huile (>120mg), ce qui confirme notre hypothèse.

4.4.2. Résultats de l'analyse par microscopie électronique

Les images obtenues par MEB des NP chargées en huile ne sont pas très nettes et explicatives ce qui nous a conduit à analyser ces particules par MET. Les résultats ont permis de bien visualiser la forme sphérique et régulière de ces dernières (voir **Fig.4.11**).

a



b

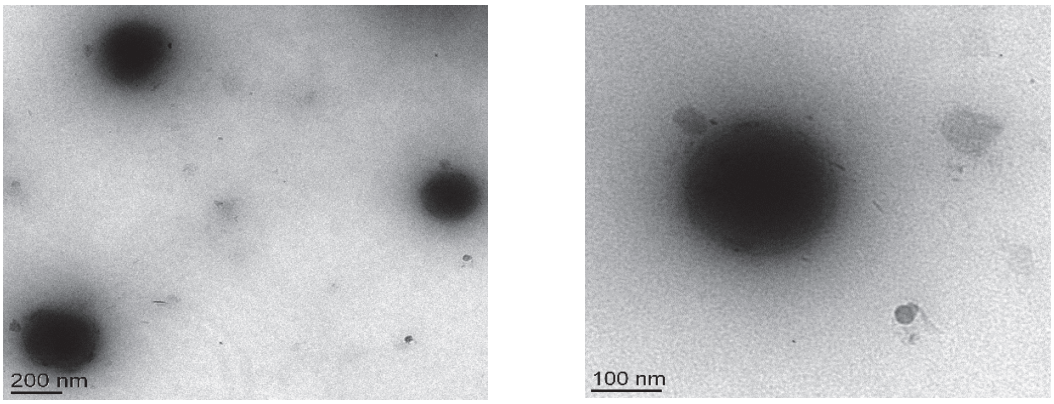


Figure 4.11. Images de microscopie électronique à balayage **(a)** et de microscopie électronique en transmission **(b)** de nanoparticules de PMMA chargées d'huile des noyaux de dattes.

4.4.3. Résultats de l'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Dans le but d'étudier l'interaction chimique entre l'huile des noyaux de dattes et le polymère, une analyse par FTIR est réalisée. Généralement, l'interaction principe actif-polymère conduit à la formation de nouvelles bandes d'absorption et/ou à l'expansion des bandes d'absorption dans les spectres FTIR [312]. Les spectres de l'huile non encapsulée, du PMMA et des NP chargées sont illustrés dans la **Figure 4.12.**

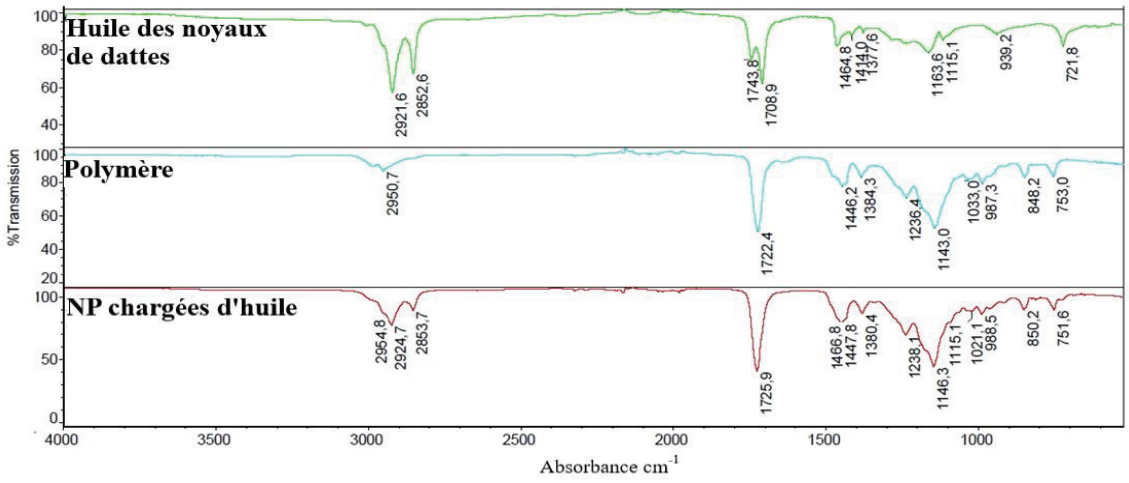


Figure 4.12. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour l'huile des noyaux de dattes, le PMMA et les NP chargées.

Les pics à 2921 et 2852 cm^{-1}, détectés dans le spectre de l'huile, correspondent aux vibrations d'élongation du C–H aliphatique dans les groupements CH_2 et CH_3 terminaux, respectivement. La bande d'absorption à 1708cm^{-1} est liée aux vibrations d'élongation C=O de l'acide carboxylique ; alors que celle à 1464 cm^{-1} est attribuée à l'élongation C=C des groupes carbonyles. De plus, les pics à 1743 et 1163cm^{-1} sont dus respectivement aux vibrations d'élongation des groupements C=O et C-O de l'ester. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans la littérature [89,313,314].

Le spectre FTIR du PMMA montre des pics caractéristiques à 2950, 1722 et 1143 cm^{-1} attribués respectivement aux vibrations d'étirement des C–H aliphatiques, des C=O et C–O des groupes esters. Cela est conforme à ce qui est rapporté précédemment [315,316].

La superposition des spectres de l'huile et du PMMA sur celui des NP chargées révèle une augmentation de l'intensité du pic à 1725 cm^{-1} et l'apparition de certains pics caractéristiques des groupements fonctionnels de l'huile des noyaux de dattes à 2924, 2853 et 1466 cm^{-1}. Cela signifie que l'HV est bien encapsulée dans les NP.

4.5. Caractérisation des nanoparticules chargées en huile de costus

4.5.1. Résultats de l'analyse par diffusion dynamique de la lumière

Les NP contenant l'HE du costus, préparées par le procédé de la nanoprécipitation, sont caractérisées en suivant la même démarche adoptée pour l'huile des noyaux de dattes.

De ce fait, différentes quantités d'huile sont incorporées et les NP résultantes sont analysées par DLS, comme le montre le **Tableau 4.5.**

Tableau 4.5. Résultats du diamètre et du potentiel ζ des nanoparticules chargées en huile essentielle du costus.

Quantité d'huile (mg)	Diamètre (nm)	Potentiel ζ (mV)
0	45 ± 2	39 ± 2
15	60 ± 2	40 ± 1
30	86 ± 1	41 ± 1
60	112 ± 1	39 ±1
120	145 ± 1	45 ± 2
240	155 ± 1	43 ± 1

La taille moyenne des NP chargées d'huile est significativement plus élevée que celle des NP vides ($p < 0,05$). Des résultats similaires sont déjà rapportés dans la littérature [192,311]. Concernant l'aspect des nanosuspensions, le même phénomène s'est reproduit avec l'essence de costus. En effet, la couleur de la suspension devient de plus en plus opaque en augmentant la quantité d'huile. A des concentrations élevées (plus de 120mg), la suspension n'est plus homogène (apparition de quelques traces d'huiles) **(Fig.4.13)**.

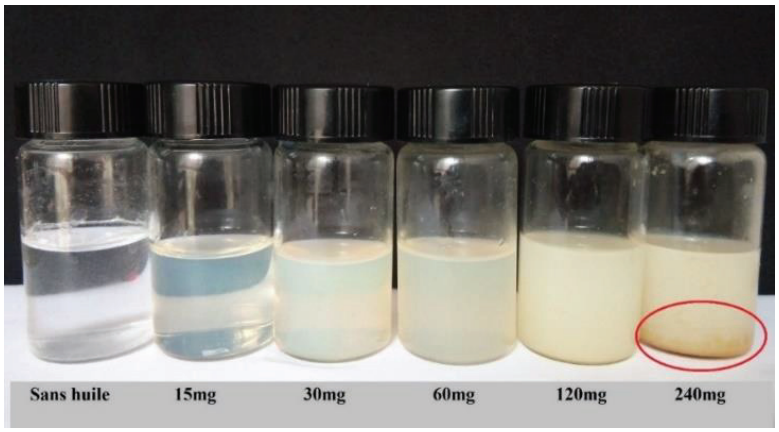


Figure 4.13. Variation de couleur des suspensions de nanoparticules chargées d'huile essentielle du costus.

Nous observons qu'au-delà de 120mg, l'effet sur la taille des NP est négligeable (**Fig.4.14.a**). Ce résultat est confirmé par le calcul du coefficient de corrélation (eq.4.2), R^2=0.9998 (**Fig.4.15**).

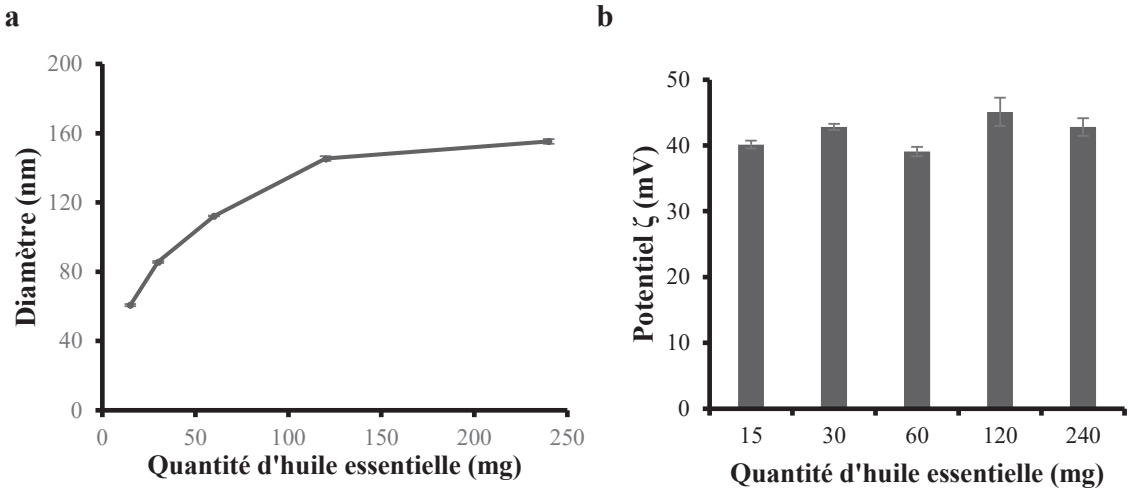


Figure 4.14. Effet de la quantité d'huile de costus sur la taille **(a)** et le potentiel ζ **(b)** des nanoparticules chargées.

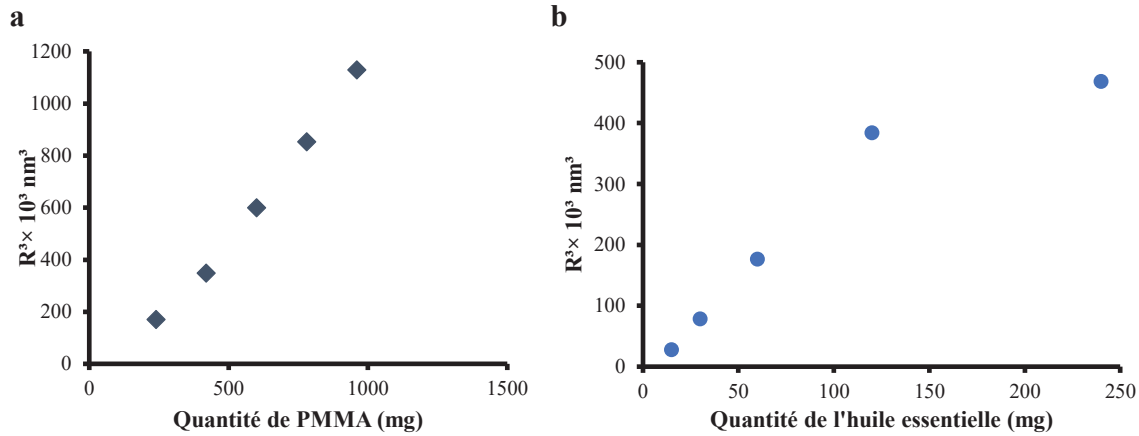


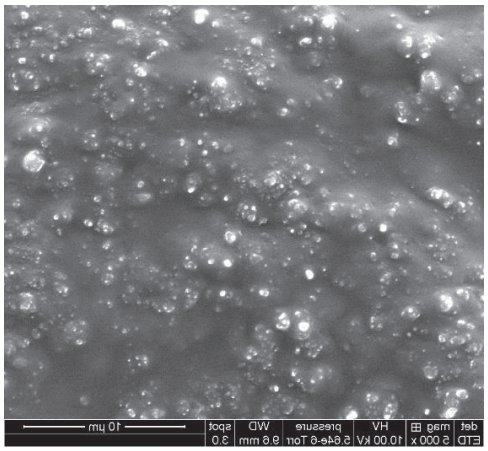
Figure 4.15. Corrélation entre la quantité du polymère **(a),** la quantité de l'huile de costus **(b)** et le rayon cubique des nanoparticules.

Nous avons également étudié l'effet de la teneur en huile encapsulée sur le potentiel ζ et les résultats montrés dans la **Figure 4.14.b** révèle une très faible variation. Toutes les NP synthétisées sont physiquement stables (potentiel ζ > + 30 mV).

4.5.2. Résultats de l'analyse par microscopie électronique

Comme l'image des NP chargées avec l'essence de costus obtenue par MEB n'est pas très nette, nous avons analysé ces dernières par MET. L'aspect sphérique et régulier de ces particules apparait clairement dans la **Figure 4.16**.

a



b

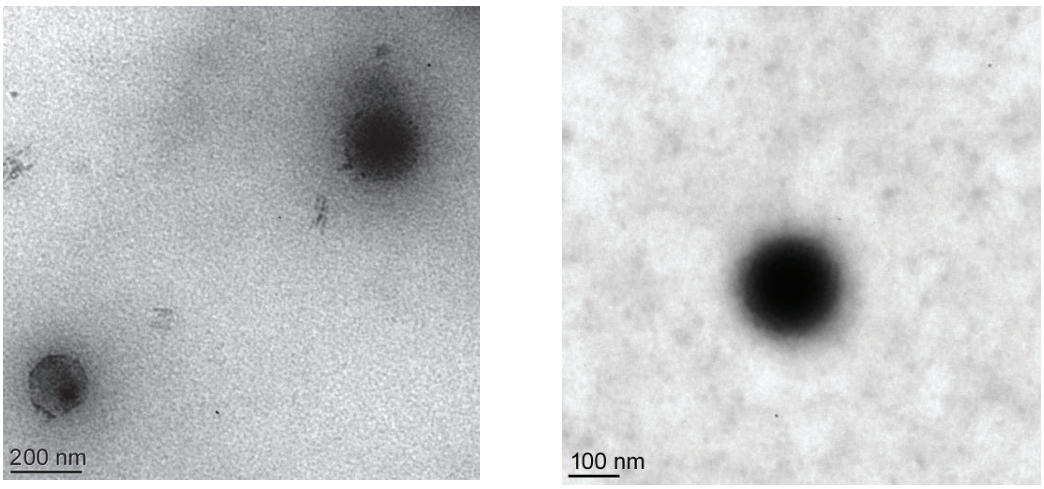


Figure 4.16. Images de microscopie électronique à balayage **(a)** et de microscopie électronique en transmission **(b)** des nanoparticules de PMMA chargées de l'huile de costus.

4.5.3. Résultats de l'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Une analyse par FTIR est réalisée pour étudier l'interaction chimique entre l'huile de costus et PMMA, comme illustré dans la **Figure 4.17.**

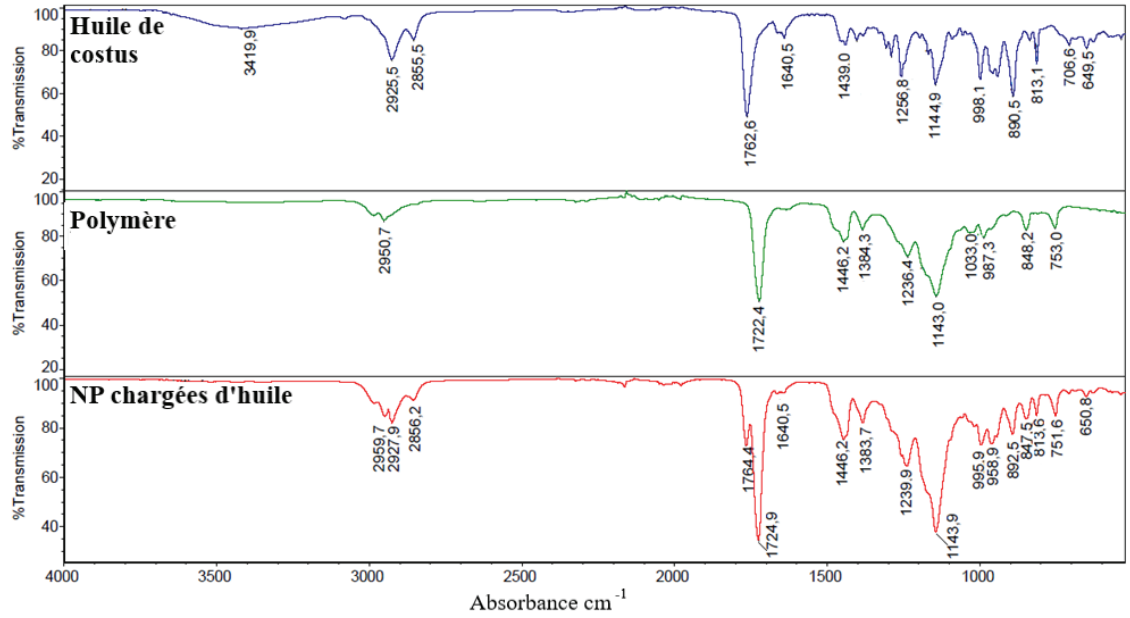


Figure 4.17. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour l'huile de costus, le PMMA et les nanoparticules chargées.

Le spectre de PMMA concorde avec celui qui est déjà discuté dans la **section 4.4.3.** Pour le spectre de l'HE, la large bande à 3419 cm^{-1} correspond au groupement O–H des phénols et des alcools ; alors que les petits pics à 2925 et 1439 cm^{-1} sont dus respectivement aux vibrations d'élongation et de déformation des liaisons C–H des hydrocarbures saturés [317]. La forte bande d'absorption à 1762 cm^{-1} est attribuée aux lactones à cinq carbone, présents dans le dehydrosaussurea lactone, le dehydrocostus lactone et le costunolide [318]. De plus, les pics à 1640 cm^{-1} et ceux compris entre 649 et 998 cm^{-1} sont liés respectivement aux vibrations d'élongation et de déformation de la liaison C = C des alcènes.

La superposition des spectres de l'huile, du PMMA et des NP chargées montre l'augmentation de l'intensité du pic à 1724 cm^{-1}, la disparition du pic à 3419 cm^{-1} et la formation de nouveaux pics à 2927, 2856, 1764, 1640 et 650 cm^{-1} qui caractérisent l'essence de costus. Ce résultat confirme l'encapsulation de l'HE dans les nanoparticules polymères.

4.6. Etude de stabilité des nanoparticules chargées d'huile

La stabilité colloïdale des NP chargées d'huile est étudiée en analysant la taille et le potentiel ζ en fonction de la température (4, 25 et 40 °C) pendant trois mois, comme le montre la **Figure 4.18.**

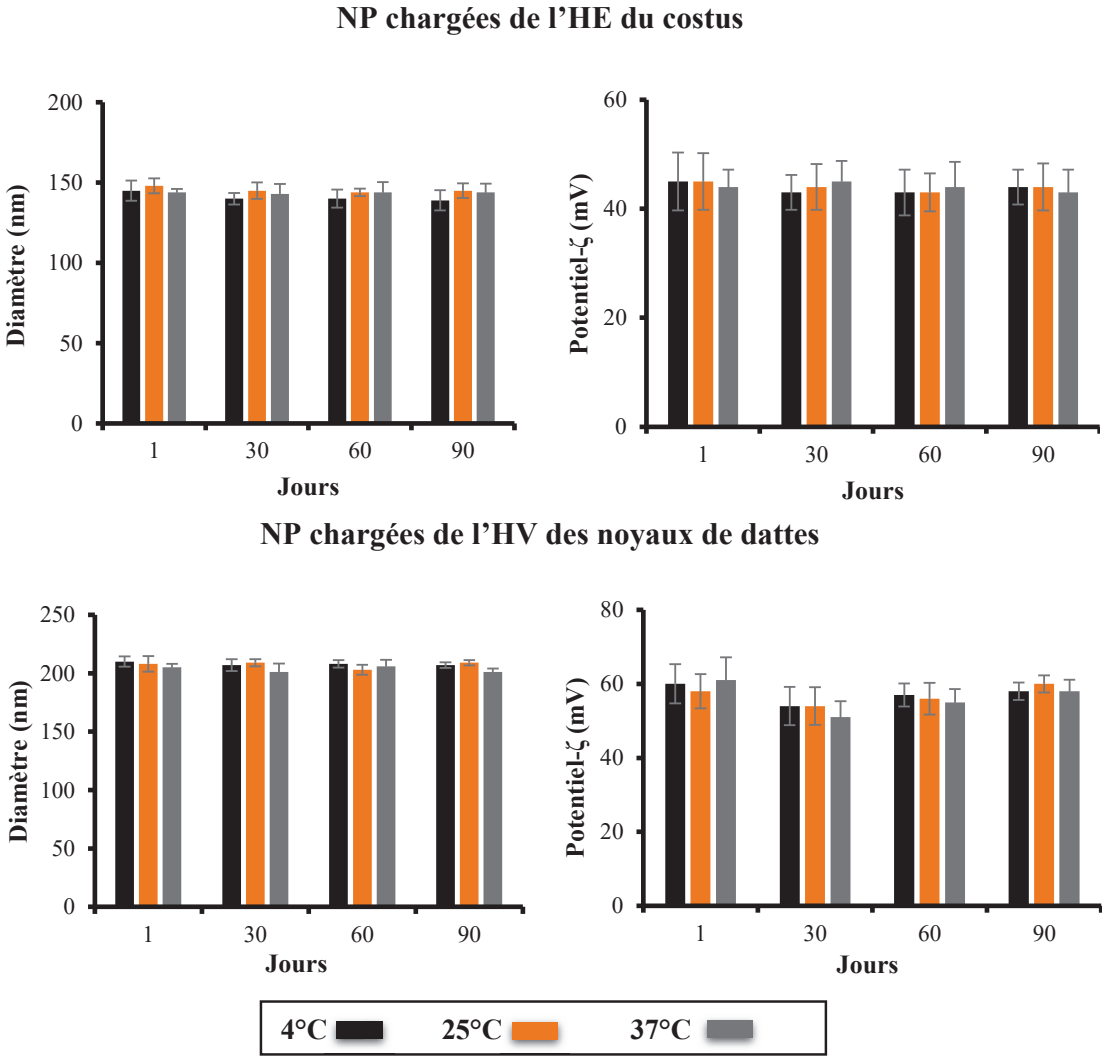


Figure 4.18. Stabilité des nanoparticules à base de PMMA chargées d'huile en termes de taille et de potentiel ζ.

Nous notons pour le diamètre moyen et le potentiel ζ un léger changement pendant toute la période de stockage pour les deux huiles étudiées.

Pour s'assurer de la permanence de la charge en huile des noyaux de dattes dans les nanoparticules au cours du temps, le taux d'encapsulation est mesuré en fonction du temps et de la température et les résultats sont mentionnés dans le **Tableau** ci-dessous.

Tableau 4.6. Résultats des taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules chargées en huile des noyaux de dattes en fonction du temps et de la température.

	Taux d'efficacité d'encapsulation (%)		
	4°C	**25°C**	**37°C**
1 Jour	99.2 ± 1.7	99.6 ± 3.0	98.9 ± 0.9
30 Jours	98.5 ± 2.5	97.5 ± 2.5	99.1 ± 1.3
60 Jours	96.9 ± 1.9	99.2 ± 1.9	98.4 ± 1.8
90 Jours	97.6 ± 0.5	98.5 ± 1.9	99.1 ± 1.3

Il apparait clairement que la variation du taux d'encapsulation est négligeable.

La stabilité des nanoparticules par rapport aux variations de pH nous indique qu'en augmentant le pH de 3 à 12, le potentiel ζ diminue de +45 à +32 mV pour l'HE et de +68 à +34 mV pour l'HV (**Fig.4.19**). Boddohi et al. ont liés les changements du potentiel ζ à la diminution de la charge du chitosane induite par la réduction de la concentration en ions H^+ [319]. La diminution du potentiel ζ en allant d'un milieu acide vers un milieu basique n'a pas influé sur la stabilité de la suspension vue que les valeurs sont au-dessus de la limite +30 mV.

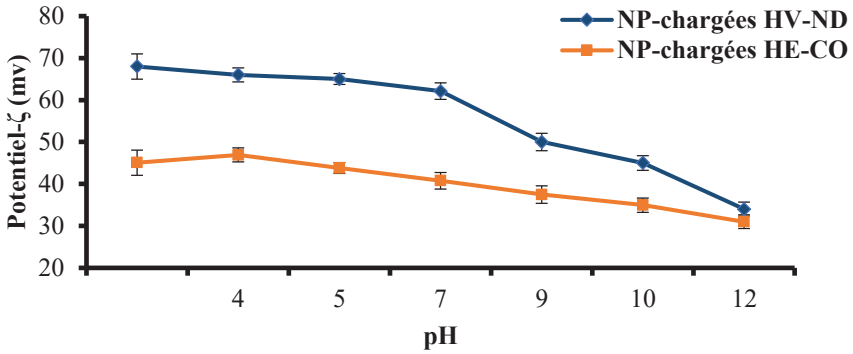


Figure 4.19. Stabilité des nanoparticules à base de PMMA chargées d'huile en termes de pH. HV-ND : Huile végétale des noyaux de dattes ; HE-CO : Huile essentielle du costus.

4.7. Résultats des activités biologiques

4.7.1. Résultats de l'activité anti-inflammatoire

L'inflammation est l'ensemble de réactions de défense naturelle ayant pour but de reconnaître, détruire et éliminer des agents pathogènes, des irritants ou des cellules endommagées. L'hôte répond à une inflammation par la production et la libération des médiateurs pro-inflammatoires (cytokines) comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-10 et le TNF-α. Ce dernier induit à son tour la production d'autres cytokines inflammatoires comme GM-CSF et

potentialise l'inflammation [320]. La cellule produit aussi des métalloprotéinases matricielles telles que MMP-9 et MMP-2, responsables du remodelage tissulaire [321] et de la modulation de l'inflammation [322].

L'extrait des racines de costus et ses principales lactones sesquiterpéniques sont largement testés pour leurs effets anti-inflammatoires. Dans le présent travail, l'étude de l'activité anti-inflammatoire est réalisée sur la lignée cellulaire A549 après avoir fait un test de cytotoxicité pour déterminer la concentration d'huile non cytotoxique.

A. Etude de cytotoxicité par test LDH

Un test LDH est établi pour étudier la cytotoxicité de notre formulation. La lignée cellulaire épithéliale pulmonaire humaine A549 est choisie dans notre étude à raison de son large domaine d'utilisation *in vitro* pour le dépistage de la cytotoxicité des formulations [323]. La viabilité cellulaire est déterminée après traitement des cellules A549 par différentes formulations à savoir : les NP vides, l'huile de costus non encapsulée et les NP correspondantes à différentes concentrations (12.5, 25, 50, 75, 100 et 200µg/mL) pendant 24h. Les résultats du test LDH (exprimés en pourcentage de cytotoxicité par rapport aux cellules témoins non traitées) sont présentés dans la **Figure 4.20.** La non-cytotoxicité des NP vides confirme la biocompatibilité du polymère utilisé. Des résultats similaires sont trouvés concernant la non-cytotoxicité des NP constituées de PMMA après traitement de nombreuses lignées cellulaires telles que RAW264, HaCaT (kératinocytes humains), MDA-MB231 (adénocarcinome mammaire humain invasif), FaDu (cellules de carcinome du pharynx), MCF -7 (adénocarcinome mammaire humain non invasif) [324], macrophages NR8383 [325], CAM (membrane chorioallantoïque) et la lignée de cellules épithéliales cornéennes du lapin [326]. La **Figure 4.20** indique aussi que les nanocapsules chargées d'huile présentent un effet cytotoxique dose-dépendant. En effet, une augmentation graduelle du pourcentage de cytotoxicité est survenue en augmentant la concentration d'huile. Les NP à des concentrations très élevées (≥ 50 µg/ml) sont considérées comme cytotoxiques ; contrairement à celles de 25 et 12.5 µg/ml qui sont non cytotoxiques.

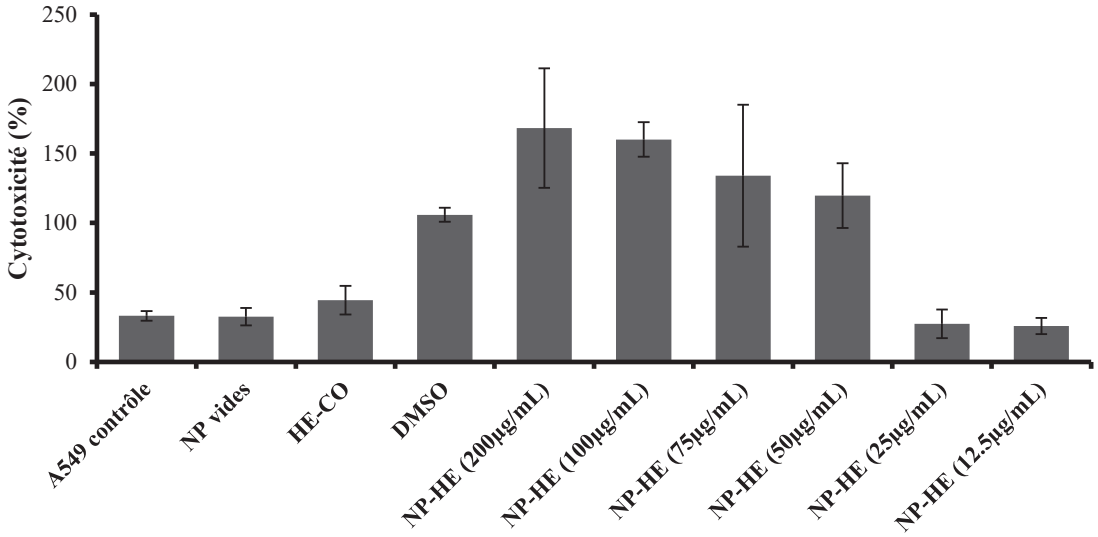


Figure 4.20. Effet cytotoxique de l'huile de costus sous sa forme libre et encapsulée.

B. Evaluation des modifications de la morphologie cellulaire

Dans le but de confirmer les résultats du test LDH, les cellules A549 issues des différents traitements sont observées à l'aide d'un microscope optique après coloration. La **Figure 4.21** montre les images prises pour chaque traitement. Contrairement aux cellules témoins (**Fig. 4.21.A**), des altérations structurelles, une réduction du nombre de cellules viables et une destruction du cytoplasme sont observées lors du traitement avec des particules chargées en HE du costus à des concentrations supérieures ou égales à 50 µg/ml (**Fig.4.21.D, E, F et G**). Cependant, les cellules traitées avec des NP à des concentrations de 12.5 et 25 µg/ml ne présentent pas de changements morphologiques marqués ; ainsi des cellules à confluence, des noyaux plus gros et un cytoplasme intact sont visualisés (**Fig.4.21.B** et **C**). De ce fait, les NP contenant l'extrait du costus à 12.5 et 25 µg/ml ne présentent aucune cytotoxicité.

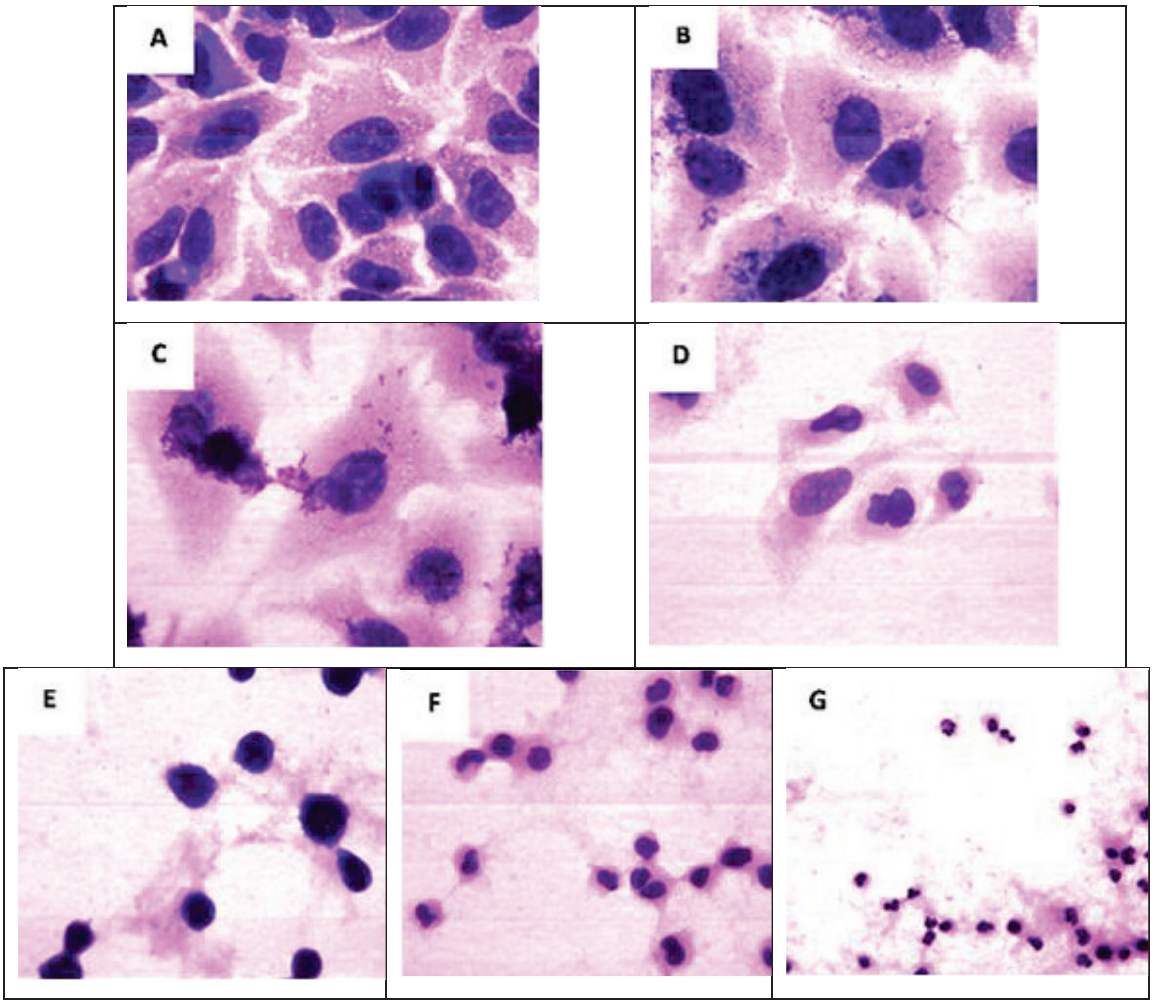


Figure 4.21. Observation microscopique de la morphologie cellulaire des A549. Cellules non traitées (A) ; Cellules traitées par des NP chargées d'huile de costus à différentes concentrations : 12.5 µg/ml (B) ; 25 µg/ml (C) ; 50 µg/ml (D); 75 µg/ml (E); 100 µg/ml (F) et 200 µg/ml (G). Grossissement x400.

C. Evaluation des marqueurs inflammatoires

Le dosage des marqueurs inflammatoires est effectué sur les cellules A549 après traitement par les NP contenant l'huile à 25µg/ml et stimulées par LPS. Ce dernier est utilisé pour déclencher l'expression et la libération des médiateurs inflammatoires par les cellules A549. Une RT-qPCR est utilisée pour l'évaluation de ces marqueurs et les cycles seuils (Ct) obtenus des différents gènes sont estimés à partir des courbes d'amplification à l'aide du logiciel AriaMx. L'expression de l'ARNm de TNF-α, IL-1β et GM-CSF est évaluée par rapport à un gène de normalisation (TBP) en appliquant l'équation 3.3 et les résultats sont

représentés par la **Figure 4.22.** L'extrapolation des résultats de la qPCR est insérée en **Annexe E.8.**

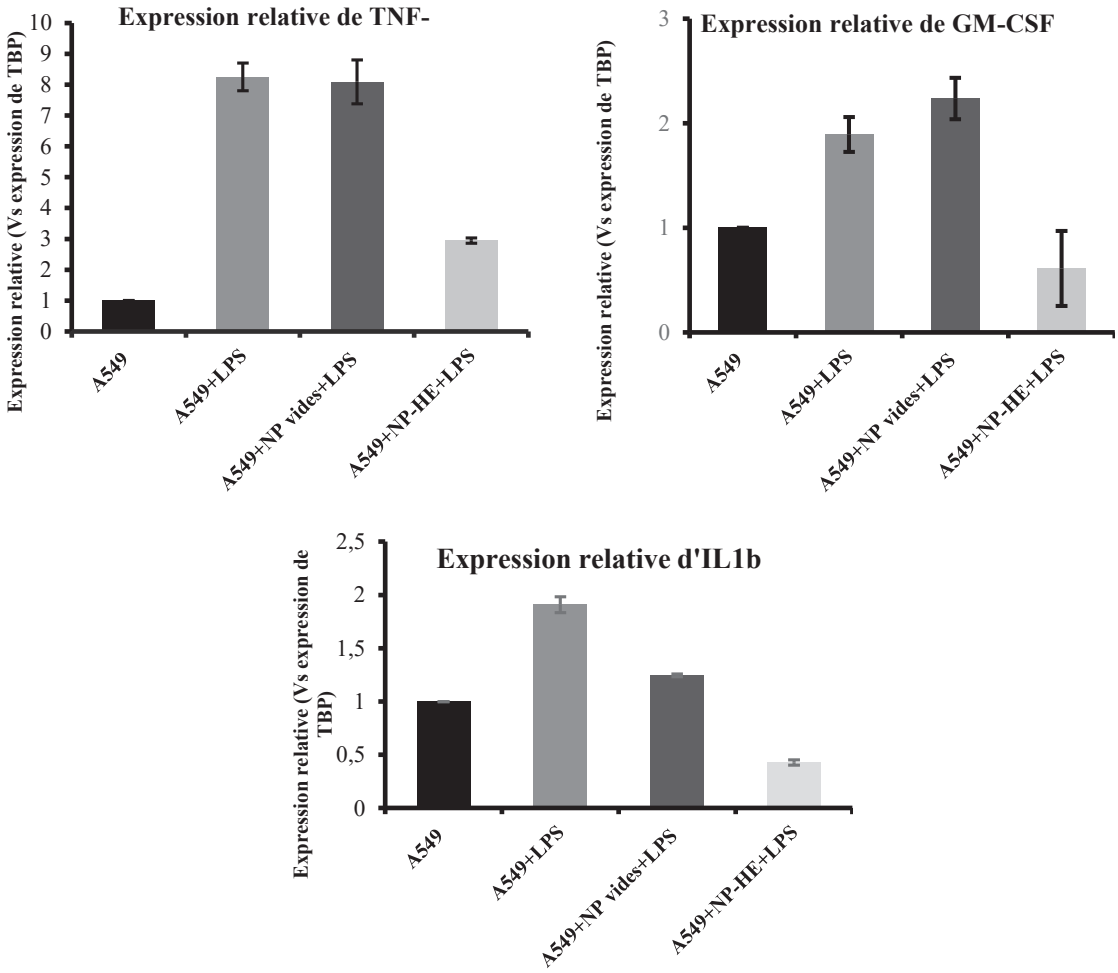
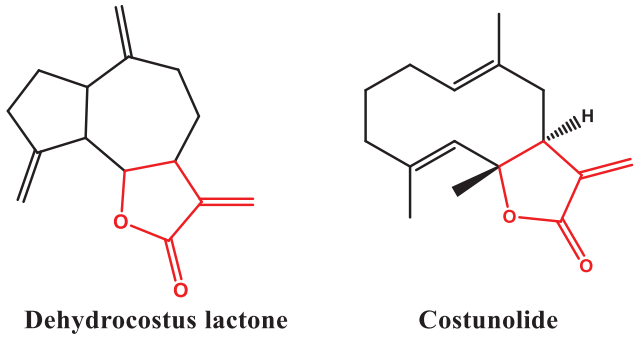


Figure 4.22. Expression de l'ARNm des médiateurs inflammatoires (TNF-α, GM-CSF et l'IL-1β).

La stimulation des cellules A549 avec du LPS a entraîné une forte augmentation de l'expression de l'ARNm des facteurs inflammatoires. Le même résultat est observé lors du traitement par des NP vides.

Par contre, une réduction de l'expression des cytokines est observée lors du traitement avec les NP chargées ; ce qui laisse suggérer que l'HE exerce un effet anti-inflammatoire. Il est reporté que le dehydrocostus lactone et le costunolide peuvent inhiber potentiellement l'expression du TNF-α [148,151,327] et IL-1β [148–150]. L'activité de ces deux constituants n'est pas limitée sur ces deux cytokines. Dans une étude récente menée par Zhou et al. [152],

le dehydrocostus lactone extrait des racines du costus a réduit l'expression d'autres médiateurs inflammatoires comme la MPO, la SOD, la MCP-1, l'IL-17, l'IL-6 et l'IL- 23 ; il réduit également la voie de signalisation inflammatoire associée à COX2, IL-6, IL-23, iNOS et IL-17 [152]. Par la suite, il est démontré que le costunolide régule négativement l'expression de la translocation nucléaire de IL-6, MCP-1, COX2, iNOS et NF-κB dans les cellules microgliales BV-2 [148]. Li et al. ont attribué l'effet anti-inflammatoire du costunolide et du dehydrocostus lactone à leur cycle α-méthylène-γ-butyrolactone (**Fig.4.23**).



Dehydrocostus lactone **Costunolide**

Figures 4.23. Schéma du site actif (α-méthylène-γ-butyrolactone) du costunolide et du dehydrocostus lactone. Le α-méthylène-γ-butyrolactone est marqué en rouge.

Un test de cytotoxicité LDH est parallèlement réalisé pour affirmer la non-cytotoxicité du traitement sur les cellules A549 stimulées par LPS et les résultats présentés dans la **Figure 4.24** confirment la non-cytotoxicité de notre formulation.

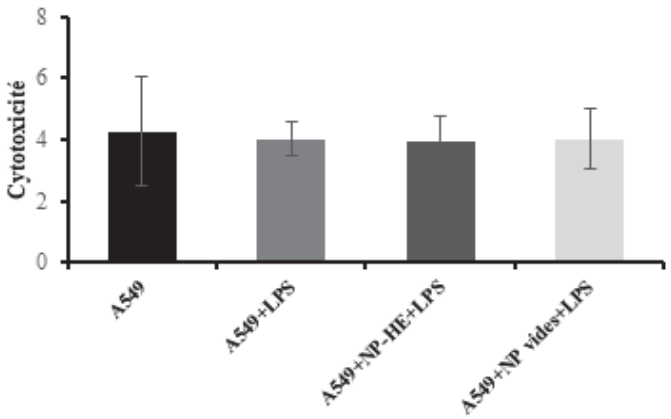


Figure 4.24. Effet cytotoxique des nanoparticules vides et celles chargées en huile de costus à 25 µg/ml lors de la stimulation des A549 par LPS.

D. Zymographie et analyse densitométrique

Une zymographie de gélatine est réalisée pour évaluer l'activité des métalloprotéases libérés par les cellules A549 traitées et les résultats sont rapportés sur la **Figure 4.25.**

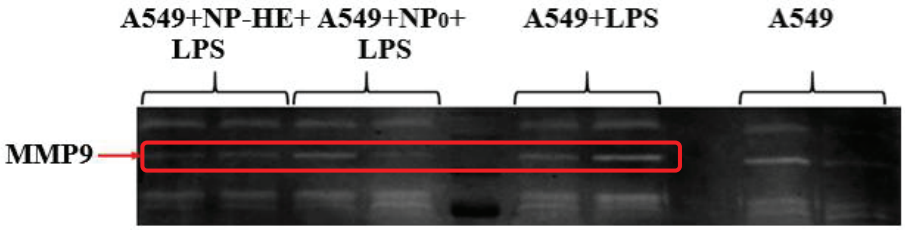


Figure 4.25. Zymographie de gélatine pour MMP9 après traitement des cellules A549 avec nanoparticules vides et ceux contenant l'huile de costus à 25 µg/ml.

La comparaison de l'intensité des bandes se fait en plan horizontal ; une bande claire correspond au lieu où les MMP dégradent la gélatine. Nous notons une diminution de l'intensité de la bande du MMP-9 après traitement des cellules par les NP contenant l'huile de costus par rapport aux cellules ayant subies une stimulation par LPS seulement. Ceci est expliqué par le fait que LPS stimule la production de MMP-9 qui en migrant à travers le gel vont dégrader la gélatine et laisser une bande claire. L'intensité des bandes est proportionnelle à la quantité du MMP libérées par les cellules. Dans l'autre cas, l'HE par son effet anti-inflammatoire, va inhiber la production des MMP-9 ce qui traduit par la suite par une diminution de l'intensité de la bande. Ces résultats sont en accords avec des travaux antérieurs où le costunolide [150] et le dehydrocostus lactone [328] présentent une inhibition remarquable de la MMP-9.

Pour compléter cette étude qualitative, une analyse densitométrique par le logiciel ImageJ est effectuée et les résultats illustrés dans la **Figure 4.26** confirment ceux de la zymographie où les NP contenant l'essence de costus réduisent l'activité des MMP-9.

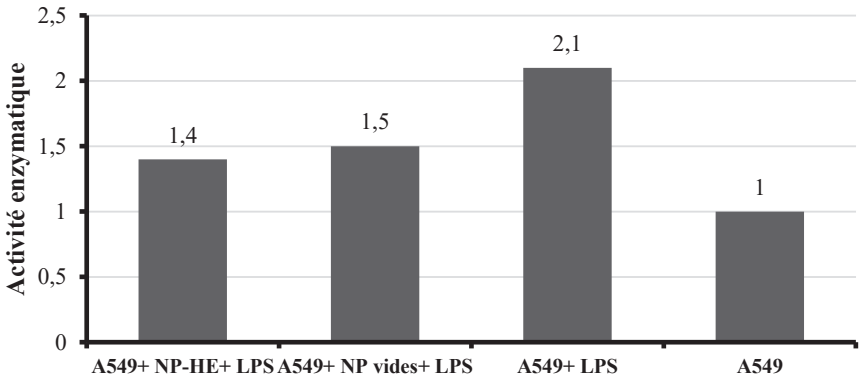


Figure 4.26. Analyse densitométrique après traitement des cellules A549 avec les nanoparticules vides et ceux contenant l'huile de costus à 25 µg/ml.

Dans l'ensemble, nous déduisons que l'huile de costus possède une activité anti-inflammatoire importante qui se traduit par la réduction de l'expression des cytokines inflammatoires et des MMP-9.

4.7.2. Résultats de l'activité antioxydante

L'organisme humain est soumis à une grande variété d'agression chimiques (fumées de combustion, tabagisme, métaux de transition, toxines), physiques (radiations ionisantes, ultraviolet, traumatisme), et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation des facteurs de croissance ou facteurs hormonaux) [329]. La plupart de ces agressions débouchent sur une même expression appelée stress oxydatif ou stress oxydant, qui se définit comme étant une perturbation de l'équilibre endogène entre les radicaux libres (espèces réactives de l'oxygène) et les agents antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages au niveau des tissus graisseux, de l'ADN et des protéines [330]. Des études épidémiologiques montrent aujourd'hui que plus le taux en antioxydants est élevé, moins est le risque de développer un cancer ou des maladies cardiovasculaires [331]. Les radicaux libres présentent un électron de valence non apparié dans l'orbitale externe ; ils peuvent être des dérivés de l'azote comme le monoxyde d'azote NO•, ou de l'oxygène tels le radical hydroxyle OH• ou l'anion superoxyde O2•-[330]. En présence des antioxydants, l'équilibre est rétabli soit par réduction (gain d'un autre électron) ou par oxydation (perte de l'électron libre) [332].

En se basant sur l'étude bibliographique illustrée dans le chapitre I, la méthode de DPPH est la seule méthode utilisée pour exploiter l'effet antioxydant de l'huile des noyaux

de dattes ; et comme il n'existe pas d'une méthode unique *in vitro* vue la complexité du processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, d'autres méthodes à savoir ; l'ABTS, le CUPRAC et le pouvoir réducteur sont employées dans notre étude pour évaluer cet effet pour l'huile libre et encapsulée. L'activité de différents échantillons est déduite à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant le piégeage des radicaux libres qui s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune pour le DPPH et du bleu à l'incolore pour l'ABTS ; ou en suivant la réduction du cuivre ou du fer ferrique qui se reflète par le virage de la couleur verte à l'orange pour le CUPRAC et du jaune au bleu pour le pouvoir réducteur. Les résultats sont comparés à ceux des antioxydants standards, et sont regroupés dans le **Tableau 4.7** en termes de pourcentages d'inhibition pour chaque concentration.

Tableau 4.7. Résultats des tests DPPH, ABTS, CUPRAC et pouvoir réducteur de l'huile des noyaux des dattes, des nanoparticules chargées et des standards.

C(µg/ml)	**12.5**	**25**	**50**	**100**	**200**	**400**	**800**
			DPPH (% inhibition)				
Huile	-	-	-	-	5.4±2.9	11.1±1.4	18.1±2.0
NP	-	2.4±0.5	2.6±0.9	3.4±0.7	7.5±0.4	14.0±0.8	21.5±0.9
BHA	48.2± 2.6	62.4± 2.8	81.1±1.4	84.2±0.1	87.2±1.2	88.9±2.3	90.2±2.5
			ABTS (% inhibition)				
Huile	-	5.9±0.7	6.0±0.9	8.4±1.2	10.6±1.4	13.1±1.8	16.4±0.9
NP	-	-	4.2±1.1	4.6±1.6	8.9±0.3	11.4±2.6	18.9±4.8
BHA	64.7±0.6	78.5±2.7	88.4±1.3	95.3±0.3	95.6±0.5	95.8±0.2	95.9±0.1
			CUPRAC (Absorbance)				
Huile	-	0.17±0.03	0.22±0.03	0.28±0.01	0.42±0.01	0.73±0.01	1.16±0.01
NP	-	0.16±0.01	0.21±0.02	0.27±0.00	0.43±0.00	0.69±0.02	1.03±0.01
BHA	1.15±0.07	1.95±0.21	3.08±0.18	3.56±0.04	3.36±0.01	3.77±0.01	3.95±0,01
C(µg/ml)	**3.125**	**6.25**	**12.5**	**25**	**50**	**100**	**200**
			Pouvoir réducteur (Absorbance)				
Huile	-	-	-	0.03±0.00	0.06±0.01	0.17±0.01	0.25±0.07
NP	-	-	-	0.04±0.00	0.08±0.01	0.19±0.06	0.26±0.07
BHA	0.09±0.01	0.12±0.01	0.19±0.02	0.38±0.02	0.77±0.02	1.72±0.03	3.52±0.02

(-) : Absence d'absorbance.
Les valeurs moyennes sont exprimées en moyenne ± SD de trois mesures parallèles.
Huile : Huile des noyaux de dattes ; NP : nanoparticules contenant l'huile des noyaux de dattes.

En comparant les résultats obtenus avec ceux du BHA, nous déduisons que l'huile des noyaux de dattes présente une très faible activité antioxydante. Aucun virage de couleur n'est détecté sur les microplaques issues des différents tests (voir **Fig.4.27**). Concernant le test du DPPH, les valeurs de la CI_{50} sont très élevées (> 0.8mg/ml) (**Tableau 4.8**). De même sont les valeurs de la CI_{50} pour le test d'ABTS et des A0.5 pour les méthodes CUPRAC et pouvoir réducteur. La CI_{50} (DPPH) trouvée dans notre étude est comparable à celles obtenues par d'autres travaux de recherche [95,98] (voir chapitre I). La CI_{50} de la variété Ghars issue de la région de Ghardaïa est de 46.9 mg/ml [98]; alors que celle récoltée de la région de Ouargla est trouvée à 140 mg/ml [95]. La variété utilisée dans notre étude provient de la région de Biskra. Cette différence est donc attribuée à l'origine de la plante. En effet, les variations géographiques et les changements climatiques peuvent affecter la qualité de l'huile et son pouvoir antioxydant [333].

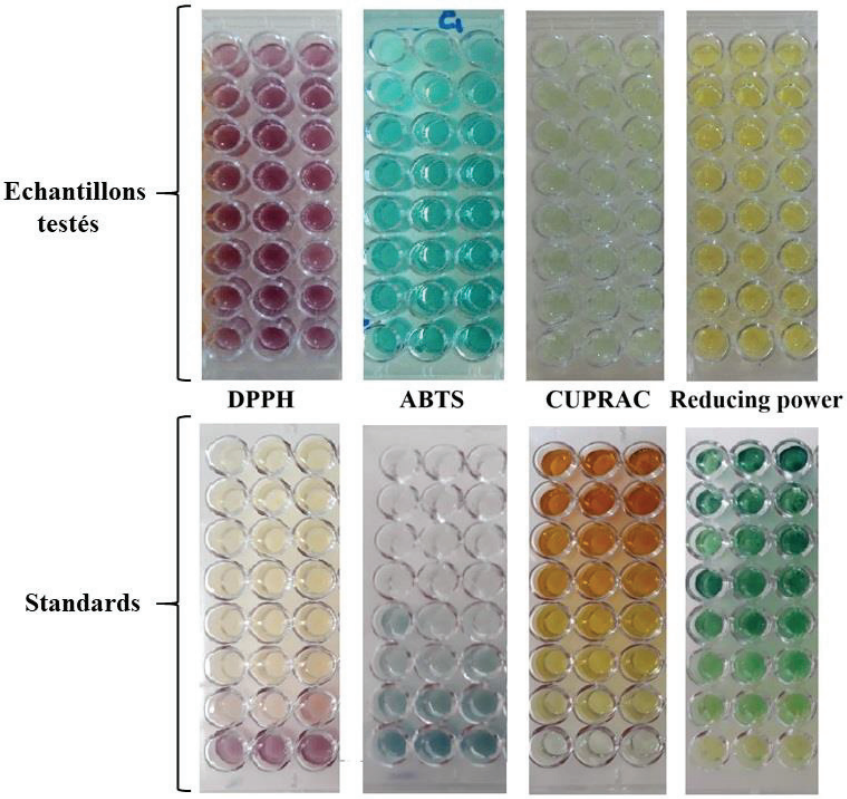


Figure 4.27. Résultats de l'étude de l'activité antioxydante sur microplaque.

Tableau 4.8. Résultats de la mesure des CI_{50} et des A0.5 de l'huile des noyaux de dattes, des nanoparticules chargées et du standard pour les différents tests (DPPH, ABTS, CUPRAC et pouvoir réducteur).

	Huile	NP chargées	BHA
CI_{50} DPPH (µg/ml)	> 800	> 800	12.7 ± 3.8
CI_{50} ABTS (µg/ml)	> 800	> 800	6.7 ± 0.5
A0.5 CUPRAC (µg/ml)	246.5 ± 3.4	242.0 ± 7.8	3.5 ± 0.1
A0.5 Pouvoir réducteur (µg/ml)	> 200	> 200	32.9 ± 0.3

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans l'extrait des noyaux de dattes en ce qui concerne la saveur, la durée de conservation et la résistance à l'oxydation. Ainsi, une meilleure stabilité à l'oxydation est liée à la présence de ces derniers à des taux élevés [65]. Dans ce contexte et afin d'expliquer la faible activité antioxydante, nous avons quantifié la teneur en polyphénols totaux de l'HV des noyaux de dattes et les résultats montrent un taux égal à 2.74 ± 1.7 µg/mg. Le principe de la méthode utilisée est inséré en **Annexe F.7.** Des résultats similaires sont trouvés par Herch et al. [91] (3.12 - 3.45 µg/mg), Jaih et al. [107] (0.79 - 1.77 µg/mg), Basuny et al. [93] (3.19 µg/mg) et Besbes et al. [106] (0.22 - 0.52 µg/mg). Ces résultats sont attribués à la polarité du solvant utilisé dans le procédé de l'extraction. Différentes études révèlent une relation proportionnelle entre la polarité du solvant utilisé, la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante [80,334–336]. Dans notre étude le CO_2, vue qu'il est non polaire, il a une faible capacité à dissoudre des composés polaires tels que les polyphénols ; ce qui entraine une faible activité antioxydante. Il est rapporté que l'ajout d'un co-solvant tel que le méthanol au procédé d'extraction par CO_2 supercritique améliore le taux des polyphénols extraits [337,338]. Une étude similaire menée par Djenidi et al. a aboutit à des quantités considérables en polyphénols (56.7µg/mg) en ajoutant du méthanol [339].

La faible activité antioxydante trouvée par ces méthodes est donc attribuée à la faible teneur en antioxydants naturels. Ces méthodes colorimétriques ont permis de montrer la faible activité antioxydante de l'HV des noyaux de dattes, contrairement à ce qui est publié où le rôle efficace dans la prévention du stress oxydatif est prouvé. Dammak et al. ont étudié l'effet protecteur de l'huile des ND contre le stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène sur des kératinocytes épidermiques humaines normales et les résultats ont montré qu'elle augmente l'activité des enzymes antioxydantes endogènes : Superoxide

dismutase, catalase et glutathione peroxidase [113]. Dans une autre étude menée par ces même auteurs, l'huile des noyaux de dattes diminue l'expression la protéine P53 qui endommage l'ADN suite à l'irradiation UV-B des peaux humaines saines [114]. De plus, il est prouvé que l'acide oléique est aussi efficace que l'α- et le γ-tocophérol pour prévenir les risques des produits de peroxydation lipidique, tels que l'instabilité génomique, le dysfonctionnement mitochondrial et la sénescence cellulaire, qui sont tous des signes distinctifs du processus de vieillissement [340]. Alors, nous pouvons conclure que l'extrait des noyaux de dattes est peut-être efficace dans le management du stress oxydatif et du vieillissement cellulaire mais pas par le biais de l'activité antiradicalaire liée à la présence des antioxydants naturels.

4.7.3. Résultats de l'activité anti-Alzheimer

Les maladies neurodégénératives et plus particulièrement la maladie d'Alzheimer est devenue un problème majeur de santé publique. Outre les problèmes que pose cette maladie, son coût global pour la société en termes de soins et d'accompagnement ne cesse de s'alourdir vue sa prévalence qui croît sur un rythme alarmant. La maladie d'Alzheimer s'agit d'un trouble neurodégénératif chronique du cerveau caractérisé par un déclin progressif des activités de la vie quotidienne, du comportement et de la cognition. Elle est due à un déficit en neurotransmetteur cholinergique : l'acétylcholine [341]. Le traitement de cette maladie porte donc sur l'inhibition des enzymes qui dégradent l'acétylcholine dans la synapse, à savoir : l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase, augmentant ainsi la disponibilité de l'acétylcholine pour stimuler les récepteurs dans le cerveau [342,343].

L'activité anticholinestérase de l'huile des noyaux de dattes et celle du costus sous leurs formes libres et encapsulées est évaluée pour la première fois dans notre étude et comparée à celle d'un médicament standard : la galantamine.

A. Cas de l'huile de costus

L'HE du costus et les NP correspondantes ont inhibé l'activité de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase de manière dose-dépendante, comme illustré dans la **Figure 4.28.**

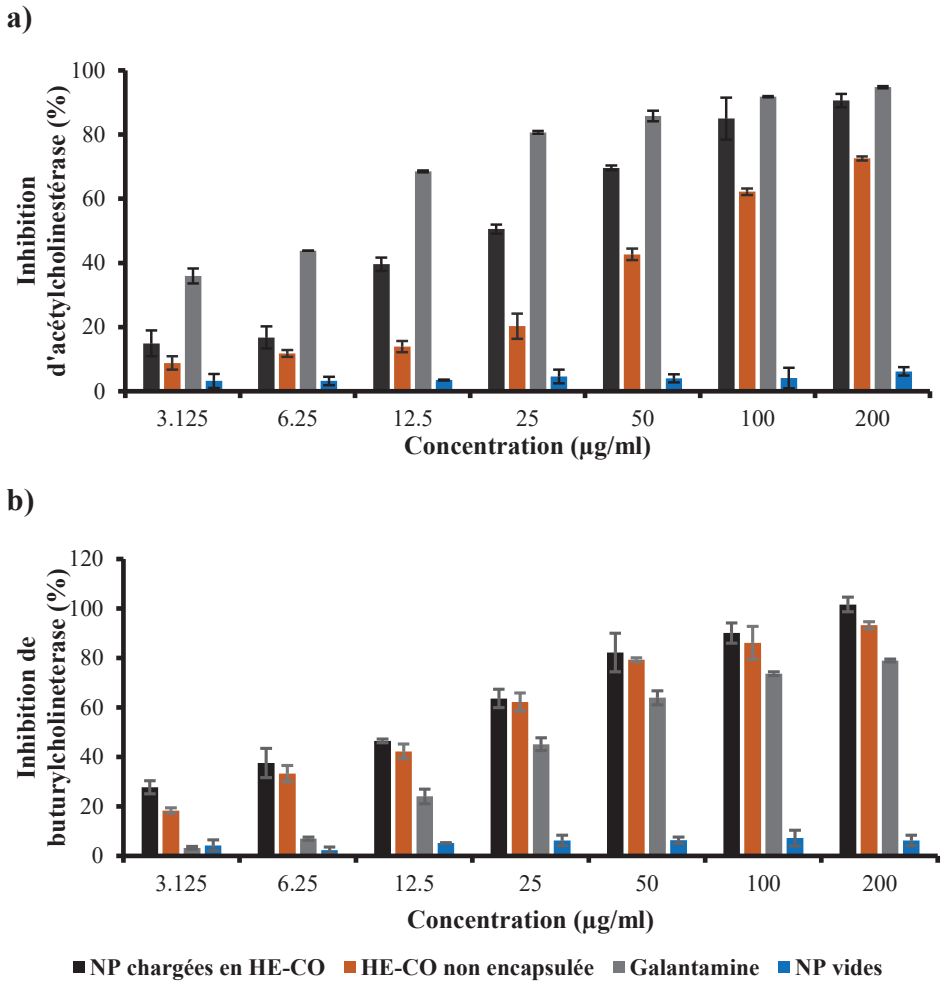


Figure 4.28. Inhibition par l'huile de costus, les nanoparticules et la galantamine de l'acétylcholinestérase **(a)** et de la butyrylcholinestérase **(b)**.

Concernant la butyrylcholinestérase, les NP chargées en huile ont montré une meilleure inhibition que la galantamine. À la concentration la plus élevée (200 µg/ml), l'ordre d'inhibition est : NP chargées en huile (101.6%) > huile non encapsulée (93.2%) > galantamine (78.9%) ; Alors que pour l'acétylcholinestérase, il est comme suit : galantamine (94.8%) > NP chargées en huile (90.6%) > huile non encapsulée (72.6%) (voir **Tableau 4.9**).

Tableau 4.9. Résultats de l'activité anticholinestérase de l'huile de costus, des nanoparticules et de la galantamine.

C(µg/ml)	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
				Inhibition de l'acétylcholinestérase %			
Huile	8.8 ± 2.1	11.8 ± 1.1	13.9 ± 1.8	20.3 ± 3.9	42.7 ± 1.8	62.2 ± 1.0	72.6 ± 0.6
NP chargées	14.9 ± 4.0	16.7 ± 3.4	46.3 ± 2.1	58.2 ± 2.7	73.0 ± 4.0	85.0 ± 6.5	90.6 ± 2.1
NP vides	3.2 ± 2.2	3.2 ± 1.3	3.5 ± 0.1	4.6 ± 2.1	4.0 ± 1.3	4.1 ± 3.2	6.2 ± 1.3
Galantamine	35.9 ± 2.3	43.8 ± 0.0	68.5 ± 0.3	80.7 ± 0.4	85.8 ± 1.6	91.8 ± 0.2	94.8 ± 0.3
				Inhibition de la butyrylcholinestérase %			
Huile	18.3 ± 2.6	33.3 ± 3.3	42.2 ± 2.9	62.2 ± 3.7	79.3 ± 0.7	88.3 ± 6.7	93.2 ± 1.5
NP chargées	27.7 ± 1.1	37.5 ± 5.9	46.4 ± 0.7	63.6 ± 3.7	82.1 ± 7.8	90.0 ± 3.3	101.6±2.9
NP vides	4.2 ± 2.2	2.3 ± 1.3	5.2 ± 0.1	6.2 ± 2.1	6.3 ± 1.3	7.2 ± 3.2	6.2 ± 2.1
Galantamine	3.3 ± 0.6	6.9 ± 0.6	24.0 ± 2.9	45.1 ± 2.6	63.8 ± 2.8	73.6 ± 0.8	78.9 ± 0.6

C : Concentration.

En comparant l'inhibition des NP vides avec ceux contenant l'huile contre les deux enzymes, on suggère que l'huile de costus présente une activité anti-Alzheimer. Ce résultat est en accord avec celui du Ponnusankar et al. lorsqu'ils ont testé l'inhibition *in vitro* de l'acétyl- et de la butyrylcholinestérase par l'extrait méthanolique des racines du costus [344]. D'autres travaux ont également révélé que les lactones sesquiterpéniques ont un effet anticholinestérasique [345–347].

Li et ses collaborateurs ont rapporté que l'effet biologique du costunolide et du dehydrocostus lactone, les principaux constituants de notre huile, est lié à leur squelette α-méthylène-γ-butyrolactone [348]. Au fait, la double liaison de l'α-méthylène-γ-butyrolactone constitue un site électrophile capable de s'engager dans des réactions de type Michael avec des groupes nucléophiles de certains groupes essentiels des sites actifs dans le corps humain tels les acides aminés et les peptides (L-cystéine, glutathion) ou les enzymes contenant des groupes sulfhydriles (**Fig.4.29**) [349]. Selon l'étude menée par Frasco et al., la présence de groupes sulfhydriles libres dans les molécules de cholinestérases humaines entraine une inhibition micromolaire irréversible [350].

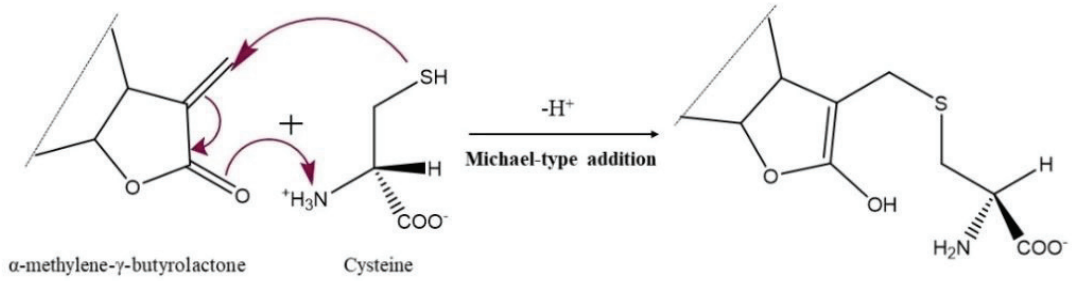


Figure 4.29. Mécanisme de l'addition de type Michael au fragment α-méthylène-γ-butyrolactone des lactones sesquiterpéniques. La structure contenant le groupement sulfhydrile (-SH) représente le nucléophile (résidu de protéine : cystéine, par exemple).

Dans la présente étude, l'activité anti-Alzheimer *in vitro* est réalisée sur la butyrylcholinestérase dérivant du sérum de cheval similaire à 90.1% à celle de l'homme [351] et sur l'acétylcholinestérase provenant d'*Electrophorus electricus*.

Donc nous pouvons considérer que la butyrylcholinestérase utilisée contient des groupes sulfhydriles capables de réagir avec l'α-méthylène-γ-butyrolactone du costunolide et du dehydrocostus lactone. Ce qui explique l'effet inhibiteur élevé de l'essence de costus par rapport à la galantamine. Les valeurs de CI50 obtenues avec l'huile libre et la galantamine sont respectivement 17.4 et 34.7 µg/ml, comme illustré dans le **Tableau 4.10.**

Tableau 4.10. Concentrations d'inhibition de 50% des enzymes cholinestérases pour l'huile de costus, les nanoparticules et la galantamine.

	CI50 (Acétylcholinestérase) (µg/ml)	**CI50 (Butyrylcholinestérase) (µg/ml)**
Huile essentielle	67.4 ± 3.7	17.4 ± 1.1
NP chargées	25.0 ± 2.0	14.9 ± 1.9
Galantamine	6.3 ± 1.2	34.7 ± 1.9

Parallèlement, il est rapporté que l'acétylcholinestérase de l'*Electrophorus electricus* ne contient pas de groupes sulfhydriles libres et que l'inhibition enzymatique est millimolaire [350]. Cela permet d'expliquer la valeur élevée de CI50 de l'huile de costus (CI50=67.4 ± 3.7 µg/ml) ; comparativement à celle contre la butyrylcholinestérase (CI50 = 17.4 ± 1.1 µg/ml).

La **Figure 4.28** illustre également que l'huile de costus sous sa forme encapsulée montre une meilleure activité anti-cholinestérase que l'huile non encapsulée. Une diminution

des valeurs de CI50 est notée pour les deux enzymes, comme représenté dans le **Tableau 4.10.** Les valeurs de CI50 sont de 25.0 et 67.4 µg/ml contre l'acétylcholinestérase ; et de 14.9 et 17.4 µg/ml contre la butyrylcholinestérase pour les NP chargées en huile et l'huile non encapsulée, respectivement. Cela est conforme aux rapports précédents où ils affirmaient une amélioration de l'activité biologique lors de l'encapsulation des HE [43].

Comme rapporté précédemment, l'extrait méthanolique des racines du *Saussurea lappa* inhibe l'acétyl- et la butyrylcholinestérase respectivement à 58.7 et 94.5 µg/ml [344]. Ces valeurs sont nettement plus élevées que celles obtenues dans la présente étude. Alors, les NP synthétisées peuvent s'avérer prometteuses pour l'inhibition des enzymes associées à la maladie d'Alzheimer. Outre la concentration d'inhibition des enzymes, le processus d'extraction vert assure une très bonne qualité des extraits en respectant les exigences de l'OMS.

B. Cas de l'huile des noyaux de dattes

Les résultats de l'inhibition de l'activité des cholinestérases par l'HV des noyaux de dattes libre et encapsulée sont représentés dans la **Figure 4.30.**

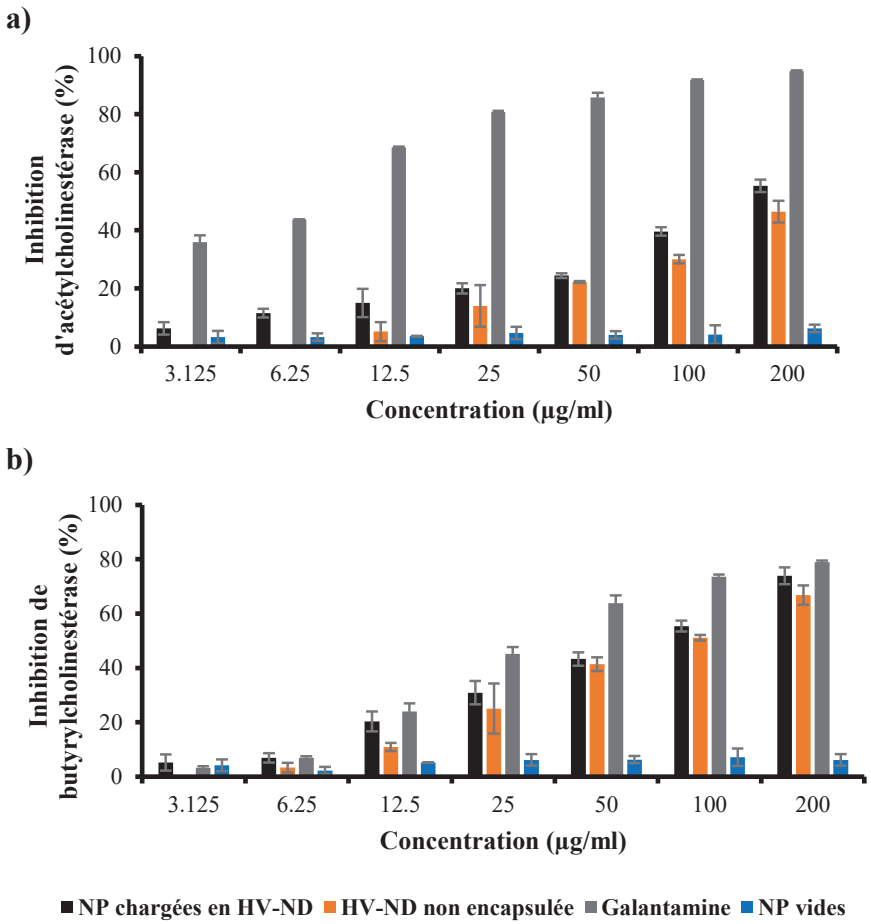


Figure 4.30. Inhibition par l'huile des noyaux de dattes, les nanoparticules et la galantamine de l'acétylcholinestérase **(a)** et de la butyrylcholinestérase **(b).**

Une faible activité est constatée sur l'acétylcholinestérase. La galantamine a montré un effet inhibiteur plus puissant en termes de pourcentage (94.8%) pour une concentration de 200µg/ml suivi par les NP contenant l'huile et l'huile non encapsulée avec des taux d'inhibition de l'ordre de 55.3 et 46.3%, respectivement. De plus, une activité modérée de l'huile est remarquée contre la butyrylcholinestérase ; les pourcentages d'inhibition sont de l'ordre de 66.8, 73.9 et 78.9% pour l'huile non encapsulée, les NP chargées et la galantamine, respectivement (**Tableau 4.11**). La mesure des CI50 de l'huile libre et encapsulée corrobore l'activité modérée de l'huile des noyaux de dattes sur les deux enzymes (voir **Tableau 4.12**).

Tableau 4.11. Résultats de l'activité anticholinestérase de l'huile des noyaux de dattes, des nanoparticules et de la galantamine.

C(µg/ml)	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
				Inhibition de l'acétylcholinestérase %			
Huile végétale	-	-	5.1 ± 3.2	13.9 ± 7.2	22.1 ± 0.3	30.1 ± 1.4	46.4 ± 3.8
NP chargées	6.2 ± 2.1	11.5 ± 1.5	14.9 ± 4.9	20.0 ± 1.8	24.4 ± 0.8	39.6 ± 1.4	55.3 ± 1.1
NP vides	3.2 ± 2.2	3.2 ± 1.3	3.5 ± 0.1	4.6 ± 2.1	4.0 ± 1.3	4.1 ± 3.2	6.2 ± 1.3
Galantamine	35.9±2.3	43.8 ± 0.0	68. 5± 0.3	80.7 ± 0.4	85.8 ± 1.6	91.8 ± 0.2	94.8 ± 0.3
				Inhibition de la butyrylcholinestérase %			
Huile végétale	-	3.4 ± 1.7	10.9 ± 1.4	25.1 ± 9.2	41.4 ± 2.5	51.1 ± 1.0	66.8 ± 3.6
NP chargées	5.2 ± 2.9	6.9 ± 1.7	20.3 ± 3.7	30.9 ± 4.3	43.3 ± 2.4	55.4 ± 2.0	73.9 ± 3.1
NP vides	4.2 ± 2.2	2.3 ± 1.3	5.2 ± 0.1	6.2 ± 2.1	6.3 ± 1.3	7.2 ± 3.2	6.2 ± 2.1
Galantamine	3.3 ± 0.6	6.9 ± 0.6	24.0 ± 2.9	45.1 ± 2.6	63.8 ± 2.8	73.6 ± 0.8	78.9 ± 0.6

C : Concentration.

Tableau 4.12. Concentrations d'inhibition de 50% des enzymes cholinestérases pour l'huile des noyaux de dattes, les nanoparticules et la galantamine.

	CI50 (Acétylcholinestérase) (µg/ml)	CI50 (Butyrylcholinestérase)(µg/ml)
Huile végétale	> 200	98.1±6.8
NP chargées	168.7 ± 6.9	88.6±6.3
Galantamine	6.3 ± 1.2	34.7 ± 1.9

Similairement à l'étude menée sur l'huile de costus, l'inhibition de la butyrylcholinestérase se fait majoritairement par l'action de l'inhibiteur sur les groupements sulfhydriles de l'enzyme via la réaction de Michael. Cette dernière s'agit d'une addition nucléophile d'un carbanion sur un composé carbonylé insaturé (aldéhyde, cétone, ester, nitrile, amide) formant ainsi une liaison carbone-carbone, ou carbone-soufre. Différentes études ont révélé la réticulation des dérivés de triglycérides (acide oléique) avec des dérivés aminés et phosphorés par l'addition de Michael [352,353]. Donc, on peut déduire que l'acide oléique, composant majoritaire de l'huile des noyaux de dattes, permet d'inhiber de la même manière la butyrylcholinestérase. Ceci ne peut s'appliquer à l'acétylcholinestérase utilisée vue qu'elle ne contient pas de groupements sulfhydriles.

Parallèlement, plusieurs rapports ont illustré l'effet majeur des polyphénols sur l'inhibition des enzymes cholinestérases et plus particulièrement l'acétylcholinestérase [354,355]. Ils ont montré que l'acide cinnamique possède un potentiel inhibiteur d'acétylcholinestérase trois fois plus élevé que le médicament standard (donépézil) [356]. De

plus, Balkis et al. ont noté que la position, le nombre, la substitution des groupes hydroxyles et l'état d'oxydation des flavonoïdes peuvent varier l'efficacité de l'inhibition de cette enzyme [357]. En tenant compte des résultats de ces travaux, on peut attribuer la faible activité de l'HV sur l'acétylcholinestérase à sa teneur très faible en polyphénols totaux.

Dans l'ensemble, l'huile des noyaux de dattes possède une activité anti-Alzheimer modérée. Pour ce qui est de l'huile de costus, elle peut servir comme alternative aux anticholinestérasiques utilisés actuellement dans la prise en charge de la maladie malgré leur effets indésirables tels que les vomissement, les nausées, la diarrhée, la confusion et l'agitation [358].

4.7.4. Résultat de l'activité antidiabétique

Le diabète sucré, un trouble métabolique caractérisé par une hyperglycémie attribuable à une carence insulinique, est devenu une cause importante de mortalité et de morbidité à l'échelle mondiale [359]. L'un des plus grands défis de la gestion du diabète est le contrôle efficace et cohérent de l'hyperglycémie postprandiale. Le régime alimentaire sain des personnes diabétiques fait l'objet de nombreux débats. Actuellement, la plupart des experts sont convaincus que l'apport total en glucides est un facteur relativement fiable pour prédire la glycémie postprandiale [360]. L'inhibition de l'α-amylase et de l'α-glucosidase, enzymes impliquées dans la digestion des glucides, peut réduire considérablement l'hyperglycémie postprandiale [361,362]. En effet, l'α-amylase décompose les glucides à chaîne longue ; tandis que l'α-glucosidase convertit l'amidon et les disaccharides en sucre simple (glucose) [296]. Par conséquent, l'inhibition de ces deux enzymes semble être une stratégie importante dans la gestion du diabète sucré. Dans ce contexte, l'effet antidiabétique de l'huile de costus et celui des noyaux de dattes est testé sur ces enzymes, pour la première fois, *in vitro* et comparé à celui d'un médicament standard ; l'acarbose. Les résultats sont présentés comme suit :

A. Cas de l'huile de costus

L'huile de costus et les NP correspondantes ont montré une inhibition dose-dépendante des α-amylase et α-glucosidase, comme illustré dans la **Figure 4.31** et le **Tableau 4.13.**

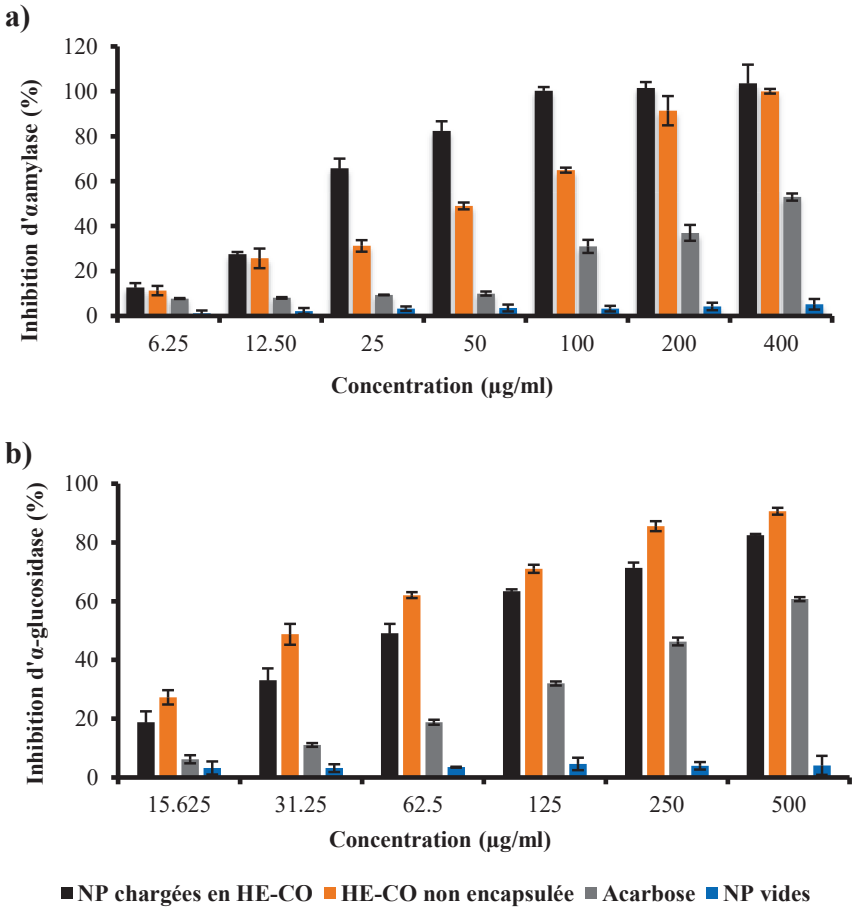


Figure 4.31. Inhibition par l'huile de costus, les nanoparticules et l'acarbose de l'α-amylase **(a)** et de l'α-glucosidase **(b)**.

Tableau 4.13. Résultats de l'activité antidiabétique de l'huile de costus, des nanoparticules et de l'acarbose.

C (µg/ml)	6.25	12.5	25	50	100	200	400
			Inhibition de l'α-amylase %				
Huile essentielle	11.3 ± 2.0	25.7 ± 4.4	31.2 ± 2.5	49.0 ± 1.5	64.9±1.0	91.4±6.5	100.0±1.0
NP chargées	12.7 ± 2.0	27.5 ± 1.0	65.8 ± 4.3	82.4 ± 4.2	100.3±1.6	101.5±2.7	100.5±8.3
NP vides	1.2 ± 1.2	2.2 ± 1.3	3.3 ± 1.0	3.6 ± 1.5	3.3 ± 1.3	4.3 ± 1.6	5.2 ± 2.3
Acarbose	7.8 ± 0.2	8.1 ± 0.3	9.5 ± 0.1	10.7 ± 0.9	31.8±2.9	37.2±3.5	53.1 ± 1.6
C (µg/ml)	**15.625**	**31.25**	**62.5**	**125**	**250**	**500**	
			Inhibition de l'α-glucosidase %				
Huile essentielle	27.3 ± 2.4	48.7 ± 3.5	62.0 ± 1.0	71.0 ± 1.4	85.6 ± 1.7	90.7 ± 1.6	
NP chargées	18.7 ± 3.8	33.0 ± 4.1	49.1 ± 3.1	63.0 ± 0.6	71.3± 1.8	82.5 ± 0.4	
NP vides	3.2 ± 2.2	3.2 ± 1.3	3.5 ± 0.1	4.6 ± 2.1	4.0 ± 1.3	4.1 ± 3.2	
Acarbose	6.2 ± 1.4	11.5 ± 0.6	18.8 ± 0.8	32.0 ± 0.7	46.2 ± 1.3	60.7 ± 0.7	

C : Concentration.

En comparant l'effet des capsules formulées avec celui des capsules vides, nous déduisons que l'essence du costus est pourvue d'un effet antidiabétique. Résultat confirmé par Raafat et ses collaborateurs dont l'étude a révélé que l'extrait des racines du costus est plus efficace dans le contrôle du diabète gestationnel chez des femmes enceintes avec un profil de sécurité élevé sur le fœtus [363]. La **Figure 4.31** montre également que l'activité inhibitrice de l'huile est extrêmement forte en comparaison avec l'acarbose. De cette étude, il apparait clairement dans le **Tableau 4.14** que les concentrations d'inhibition des 50% des enzymes par l'huile non encapsulée sont plus faibles que celle obtenues avec le standard. La valeur varie de 65.9 à 365.3 µg/ml pour l'α-amylase, et de 42.1 à 271.7 µg/ml pour l'α-glucosidase.

Tableau 4.14. Concentrations d'inhibition de 50% d'α-amylase et d'α-glucosidase pour l'huile de costus, les nanoparticules et l'acarbose.

	CI50 (α-amylase) (µg/ml)	**CI50 (α-glucosidase) (µg/ml)**
Huile essentielle	65.9 ± 1.7	42.10 ± 3.0
NP chargées	22.9 ± 0.3	75.8 ± 4.4
Acarbose	365.3 ± 10.7	271.7 ± 7.1

D'après Eliza et al., l'effet antidiabétique de l'HE est lié à la présence du costunolide. Ils ont prouvé que l'administration de cette molécule chez des rats diabétiques (20 mg/kg de poids corporel) réduit le glucose plasmatique de façon dose-dépendante, diminue l'hémoglobine glycosylée et augmente l'insuline plasmatique et le glycogène tissulaire [364]. Dans une autre étude, la sensibilité accrue de l'insuline à absorber le glucose est attribuée à la stimulation des îlots bêta pancréatiques à sécréter de l'insuline par cette même molécule [365].

En ce qui concerne le mécanisme d'inhibition des enzymes clés contrôlant le diabète, presque toutes les α-glucosidases sont inhibées au niveau de leur groupements sulfhydriles [366,367]. Ceci n'est pas le cas avec l α-amylase, malgré la présence de ces groupements ; ce qui explique cette différence entre les valeurs de CI50 des deux enzymes.

Il est également rapporté que les α-amylases possèdent des groupements sulfhydriles, mais l'effet inhibiteur de l'huile de costus n'est pas similaire à celui contre l'α-glucosidase. Schramm et al. ont constaté que les groupements sulfhydriles ne sont pas absolument

nécessaires dans la réaction d'inhibition de l'α-amylase puisque leur oxydation complète coïncide avec une inactivation à 80% de l'enzyme [368]. Ces observations suggèrent que le groupement α-méthylène-γ-butyrolactone des lactones sesquiterpéniques est indispensable pour l'activité anti-glucosidase. De plus, l'activité contre l'α-amylase est peut-être due à la présence d'autres groupements doués d'une activité inhibitrice. Padilla-Gonzalez et al. ont rapporté que l'effet thérapeutique des sesquiterpènes lactones ne se limite pas à la fraction lactone, bien que d'autres fragments structuraux comme les groupes époxy, péroxy ou aldéhyde ne doivent pas être exclus [349].

En ce qui concerne l'α-amylase, l'encapsulation de l'huile de costus a permis d'améliorer l'inhibition (CI50) par rapport à l'huile libre de 65.9 à 22.9 µg/ml, comme indiqué dans le **Tableau 4.14.** Des résultats similaires sont rapportés où les capsules formulées avec l'extrait de *Psoralea corylifolia* ont montré un meilleur effet antidiabétique comparativement à la forme libre [369]. Dans une autre étude réalisée par Kavitha et al., l'amélioration de l'activité antidiabétique de l'extrait de *Nilgirianthus ciliatus* est liée à l'encapsulation de l'huile [370]. Cependant, des résultats inattendus sont constatés avec l'α-glucosidase où les NP chargées (CI50=75.8 µg/ml) ont présenté une activité d'inhibition plus faible par rapport à la forme libre (CI50=42.1 µg/ml) (**Tableau 4.14**).

B. Cas de l'huile des noyaux de dattes

L'étude de l'activité antidiabétique est réalisée avec l'huile des noyaux de dattes et les NP correspondantes et les résultats sont illustrés dans la **Figure 4.32.**

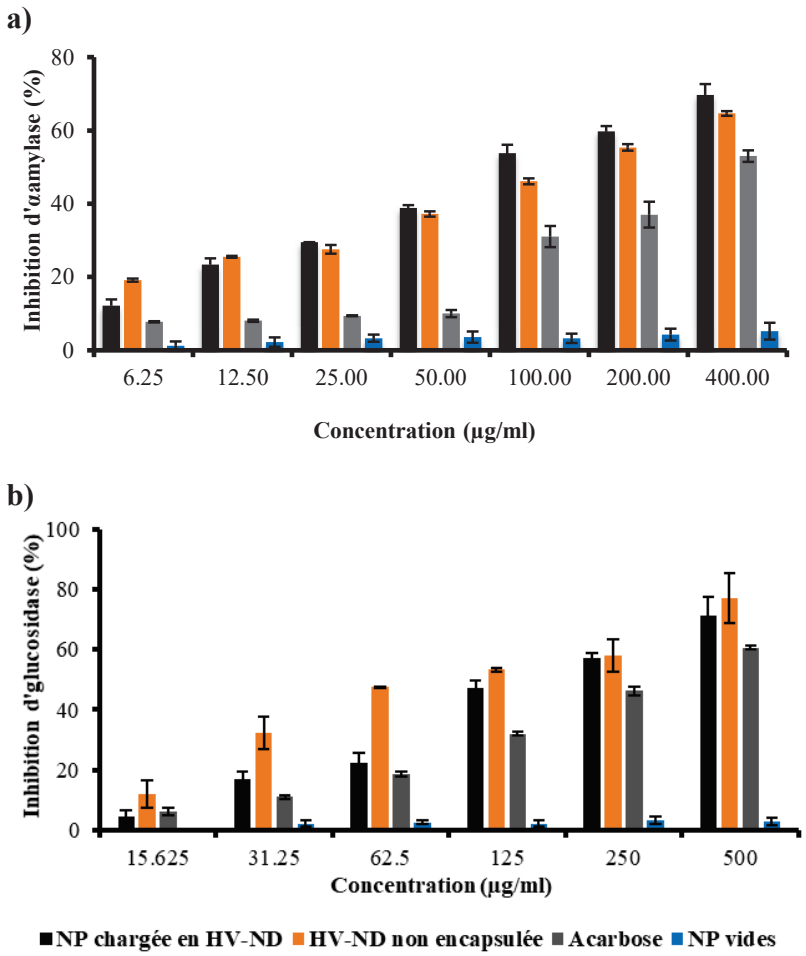


Figure 4.32. Inhibition par l'huile des noyaux de dattes, les nanoparticules et l'acarbose de l'α-amylase **(a)** et de l'α-glucosidase **(b)**.

Une inhibition dose dépendante des deux enzymes est constatée. Les NP chargées en huile ont montré un effet inhibiteur de l'α-amylase plus important avec un pourcentage de 69.7% à la concentration de 400µg/ml comparativement à l'huile non encapsulée et l'acarbose avec des taux d'inhibition de 64.6 et 53.0%, respectivement. De la réponse de l'inhibition de l'α-glucosidase par l'acarbose (60.7%) et l'huile sous ses deux formes libre (77.1%) et encapsulée (71.3%), il apparait que l'acarbose est la moins efficace (**Tableau 4.15**). Résultats confirmés par les valeurs des CI50 (voir **Tableau 4.16**).

Tableau 4.15. Résultats de l'activité antidiabétique de l'huile des noyaux de dattes, des nanoparticules et de l'acarbose.

C (µg/ml)	6.25	12.5	25	50	100	200	400
				Inhibition de lα-amylase %			
Huile végétale	19.1±0.4	25.5±0.2	27.5±1.2	37.2±0.7	46.1±0.8	55.4±0.9	64.6±0.7
NP chargées	12.2±1.7	23.4±1.7	29.5±0.1	38.8±0.8	53.8±2.3	59.3±1.5	69.7±3.0
NP vides	1.2 ± 1.2	2.2 ± 1.3	3.3 ± 1.0	3.6 ± 1.5	3.3 ± 1.3	4.3 ± 1.6	5.2 ± 2.3
Acarbose	7.8 ± 0.2	8.1 ± 0.3	9.5 ± 0.1	10.7±0.9	31.8±2.9	37.2±3.5	53.1±1.6
C (µg/ml)	**15.625**	**31.25**	**62.5**	**125**	**250**	**500**	
				Inhibition de l'α-glucosidase %			
Huile végétale	12.0±4.5	32.4±5.4	47.6±0.1	53.3±0.5	58.2±5.4	77.1±8.2	
NP chargées	4.4±2.0	16.9±2.7	22.3±3.2	47.3±2.4	57.2±1.9	71.3±5.9	
NP vides	3.2 ± 2.2	3.2 ± 1.3	3.5 ± 0.1	4.6 ± 2.1	4.0 ± 1.3	4.1 ± 3.2	
Acarbose	6.2±1.4	11.5±0.6	18.8±0.8	32.0±0.7	46.2± 1.3	60.7±0.7	

C : Concentration

Tableau 4.16. Concentrations d'inhibition de 50% d'α-amylase et d'α-glucosidase pour l'huile des noyaux de dattes, les nanoparticules et l'acarbose.

	CI50 (α-amylase) (µg/ml)	CI50 (α-glucosidase) (µg/ml)
Huile végétale	148.9±7.2	88.9±2.3
NP chargées	87.6±4.8	155.3±6.6
Acarbose	365.3±10.7	271.7±7.1

En comparant l'activité des NP chargées à celle des NP vides, on en déduit que l'effet antidiabétique est dû à la présence de l'huile des noyaux de dattes et plus précisément aux acides gras insaturés. En effet, plusieurs études ont mis en évidence l'efficacité de ces derniers dans la gestion du diabète du type 2 [371–373]. L'analyse par GC-MS a révélé que l'huile des noyaux de dattes est constituée principalement d'acide gras insaturés (58.027%) dont 47.7% sous forme d'acide oléique et 8.8% d'acide linoléique.

En examinant le **Tableau 4.16**, nous constatons que l'huile des noyaux de dattes est plus efficace dans l'inhibition de l'α glucosidase par rapport à l'α amylase ; ainsi les valeurs de CI50 sont de l'ordre de 88.9 et 148.9 µg/ml, respectivement. Comme signalé précédemment, le mécanisme d'inhibition de l'α glucosidase est dû aux groupements sulfhydriles de l'enzyme via la réaction de Michael. Effectivement l'acide oléique peut engendrer ce type de réaction [374,375]. Des études antérieures ont confirmé ce résultat. Des analyses cinétiques menées par Su et ses collaborateurs ont montré que l'acide oléique est un

inhibiteur compétitif de l'α-glucosidase [374]. De plus, Miyazawa et al. ont constaté que l'augmentation du nombre de doubles liaisons des acides gras améliore l'effet inhibiteur de l'α-glucosidase [375].

Concernant l'inhibition de l'α-amylase, il est déjà signalé qu'elle ne dépend pas uniquement des groupements sulfhydriles. D'ailleurs, les polyphénols peuvent aussi inhiber l'α-amylase d'une façon compétitive, non-compétitive ou mixte [376]. Le taux faible des polyphénols présents dans l'huile explique l'activité modérée sur cette enzyme.

Un autre résultat similaire à celui de l'huile de costus est observé. L'encapsulation de l'HV a amélioré son activité seulement sur l'α-amylase (**Tableau 4.16**).

L'ensemble des résultats obtenus montre que les deux huiles étudiées peuvent être utilisées pour leur effet antidiabétique comme alternatives aux hypoglycémiants oraux dont la prise est souvent associée à des effets indésirables tels que : la diarrhée, l'inconfort gastro-intestinal, les nausées, les flatulences, les crampes et la prise du poids [377].

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE
&
PERSPECTIVES

Devant la montée en puissance de la demande en produits naturels, la médecine a connu au cours de la dernière décennie une émergence considérable dans l'emploi des médicaments à base de plantes par rapport aux substances synthétiques en raison de leur coût, accessibilité et efficacité. Dans ce contexte s'inscrit notre thèse qui a pour objectif de formuler l'huile essentielle du costus (*Saussurea lappa* CB. Clarke) et l'huile végétale des noyaux de dattes (*Phoenix dactylifera* L.) pour des applications pharmaceutiques. En se basant sur la revue bibliographique établie, une stratégie est adoptée pour bien élucider les différentes étapes entreprises pour l'élaboration de ce travail qui peut être décomposée en trois parties distinctes :

- La première partie est consacrée à l'extraction de deux variétés d'huiles ; l'huile végétale des noyaux de dattes et l'huile essentielle du costus indien par un procédé vert et la détermination de leurs compositions chimiques.
- La deuxième a trait au processus d'encapsulation de ces extraits principalement la nanoprécipitation en optimisant les différents paramètres influant sur la synthèse des nanoparticules vides, suivi de l'encapsulation des huiles dans les nanocapsules.
- Dans la troisième partie, certaines activités biologiques des capsules chargées en huiles sont examinées, testées et comparées à celles des extraits non encapsulés et des standards.

L'analyse des travaux effectués a permis d'aboutir aux résultats suivants :

Les rendements de l'extraction par CO_2 supercritique dans les conditions optimales des deux matrices végétales sélectionnées sont respectivement 23 et 14% pour les racines du costus et les noyaux de dattes. L'analyse des extraits par GC/MS a permis d'identifier les composés majoritaires de chacun d'eux en révélant que l'huile végétale des noyaux de dattes se compose principalement d'acides gras insaturés tel que l'acide oléique (47.7%).

Pour l'huile essentielle du costus, le dehydrocostus lactone (55.39%) et le costunolide (8.87%) (des lactones sesquiterpéniques) apparaissent comme principaux constituants.

A propos de l'encapsulation, des nanoparticules polymères à base d'Eudragit®RS100 sont utilisées comme nanovecteurs des huiles afin d'améliorer leurs stabilités et booster leurs biodisponibilités. Parmi les techniques d'élaboration de ces nanoparticules, la nanoprécipitation a été choisie vue sa simplicité, rapidité et reproductibilité. Le développement des nanoparticules est basé sur le choix approprié de la quantité du polymère, le type du solvant organique, le rapport phase organique / phase aqueuse ainsi que la vitesse d'agitation pour leur conférer les propriétés requises. Ainsi, les conditions optimales donnant des nanoparticules avec des propriétés colloïdales convenables sont fixées à 1/2 pour le rapport volumique solvant / non solvant, à 16mg/ml pour la concentration en polymère et à 500rpm pour la vitesse d'agitation.

Une fois synthétisées, les nanoparticules chargées en huiles sont caractérisées. L'analyse par la diffusion dynamique de la lumière a révélé une taille comprise entre 145 et 217 nm plus importante que celle des nanoparticules vides et un potentiel ζ supérieur en valeur absolue à 40mV (pH=6.5) dans les deux cas étudiés leur garantissant une bonne stabilité. Ce résultat est confirmé par la variation de la température et du pH. Les nanocapsules visualisées par microscopie électronique en transmission ont présenté une forme sphérique et régulière. L'analyse des spectres IR montre des interactions entre les huiles et le polymère. Une spectroscopie RMN est suggérée pour identifier clairement ces différentes interactions qui ont eu lieu lors de l'encapsulation. Parallèlement à ces paramètres, le taux d'encapsulation est déterminé par UV-visible. Cette technique a permis d'accéder au taux d'encapsulation de l'huile des noyaux de dattes uniquement ; 98% de l'huile sont encapsulées.

La valorisation des nanoparticules développées est mise en évidence à travers différents effets biologiques étudiés *in vitro* tels que : l'effet antioxydant, anti-inflammatoire, anti-Alzheimer et antidiabétique.

Nous soulignons le potentiel prometteur des nanoparticules à améliorer la performance biologique des entités bioactives. En effet, les nanoparticules contenant l'huile de costus exercent un effet anti-Alzheimer plus élevé que celui de l'huile non

encapsulée, avec des CI50 de 25.0 et 14.9 µg/ml sur l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase, respectivement ; un effet antidiabétique plus marqué que le médicament standard sur l'α-amylase (22.9 µg/ml) et l'α-glucosidase (75.8 µg/ml) ; ainsi qu'une activité anti-inflammatoire remarquable révélée par la réduction de l'activité enzymatique de la métalloprotéase MMP-9 et de l'expression des cytokines inflammatoires: TNF-α, GM-CSF et IL1β. Concernant les nanoparticules contenant l'huile des noyaux de dattes, une activité antidiabétique supérieure à celle du médicament standard est enregistrée. Les concentrations d'inhibition de 50% d'α-amylase et d'α-glucosidase sont respectivement 87.6 et 155.3 µg/ml. Son effet anti-Alzheimer modéré est confirmé par les valeurs des CI50 ; 168.7 µg/ml pour l'acétylcholinestérase et 88.6µg/ml pour la butyrylcholinestérase. De plus, une faible activité antioxydante constatée pour ces nanoparticules est attribuée à la faible teneur en polyphénols totaux.

Pour conclure, nous avons montré à travers ce manuscrit, que les nanoparticules développées chargées de molécules naturelles constituent des alternatives très intéressantes par rapport aux différents médicaments d'origine synthétique dans la prise en charge de la maladie d'Alzheimer, du diabète ou des maladies inflammatoires. Par ailleurs, des études complémentaires sont recommandées pour la poursuite de ces travaux de recherche. Concernant les particules contenant l'huile des noyaux de dattes, il faut envisager une étude de cytotoxicité sur des lignées cellulaires afin de déterminer la concentration requise non néfaste pour l'organisme humain ainsi qu'une évaluation de l'effet antioxydant en déterminant l'activité des nanoparticules sur des enzymes antioxydantes endogènes suite à l'irradiation UV des peaux humaines saines. En outre, nos perspectives concernant les particules contenant l'huile de costus portent sur la détermination de l'efficacité d'encapsulation et l'étude de l'expression de l'ARNm d'autres cytokines inflammatoires tels que : IL8, chemokine ligand (CCL2) etc. Nous pouvons également approfondir notre travail de recherche sur le plan clinique *in vivo*. Il s'agit donc de discriminer les propriétés pharmacocinétiques, la biodisponibilité et la voie métabolique impliquée. De plus, nous proposons d'étendre cette étude à la recherche d'autres activités biologiques de ces extraits encapsulés à savoir l'activité antimicrobienne, anticancéreuse et larvicide.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

[1] Mainardi T, Kapoor S, Bielory L. Complementary and alternative medicine: herbs, phytochemicals and vitamins and their immunologic effects. *J allergu cinical Immunol* 2009; 123: 283–94.

[2] Robinson MM, Xiaorui Z. The world medicines situation (Traditional medicines: global situation, issues andchallenges). *World Health Organization*.

[3] Wachtel-Galor S, Benzie IFF. Herbal medicine: An introduction to its history, usage, regulation, current trends, and research needs. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S (eds) *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. CRC Press, 2011, pp. 1–10.

[4] Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon* 2001; 39: 603–613.

[5] Selles C. *Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen: Anacyclus pyrethrum L, Application de l'extrait aqueux à l'inhibition de corrosion d'un acier doux dans H2SO4 0.5M*. Thèse de Doctorat, Université Abou Beker Balkaid. Tlemsen, 2012, pp. 3-4.

[6] Dhifi W, Bellili S, Jazi S, et al. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Med* 2016; 3: 25.

[7] Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore GC, et al. Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules* 2017; 22: 70.

[8] Yara-Varón E, Li Y, Balcells M, et al. Vegetable oils as alternative solvents for green oleo-extraction, purification and formulation of food and natural products. *Molecules* 2017; 22: 1474.

[9] Kumar A, Sharma A, Upadhyaya KC. Vegetable oil: Nutritional and industrial perspective. *Curr Genomics* 2016; 17: 230–240.

[10] Moghaddam M, Mehdizadeh L. Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. In: Grumezescu AM, Holban AM (eds) *Soft Chemistry and Food Fermentation*. Elsevier Inc., 2017, pp. 379–419.

[11] Sagiri SS, Anis A, Pal K. A Review on encapsulation of vegetable oils : Strategies, preparation methods and application. *Polym Plast Technol Eng* 2016; 55: 37–41.

[12] Saha S, Ghosh M. Antioxidant effect of vegetable oils containing conjugated linolenic acid isomers against induced tissue lipid peroxidation and inflammation in rat model. *Chem Biol Interact* 2011; 190: 109–120.

[13] Kochikuzhyil BM, Devi K, Fattepur SR. Effect of saturated fatty acid-rich dietary vegetable oils on lipid profile, antioxidant enzymes and glucose tolerance in diabetic rats. *Indian J Pharmacol* 2010; 42: 142–145.

[14] Yu FL, Greenlaw R, Fang Q, et al. Studies on the chemopreventive potentials of vegetable oils and unsaturated fatty acids against breast cancer carcinogenesis at initiation. *Eur J Cancer Prev* 2004; 13: 239–248.

[15] Ganesan K, Sukalingam K, Xu B. Impact of consumption and cooking manners of vegetable oils on cardiovascular diseases-A critical review. *Trends Food Sci Technol* 2018; 71: 132–154.

[16] Adorjan B, Buchbauer G. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour Fragr J* 2010; 25: 407–426.

[17] Raut JS, Karuppayil SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind Crops Prod* 2014; 62: 250–264.

[18] Mihai AL, Popa ME. Essential oils utilization in food industry - a literature review.

Sci Bull Ser F Biotechnol 2013; 17: 187–192.
[19] Ribeiro-Santos R, Andrade M, DeMelo NR, et al. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends Food Sci Technol* 2017; 61: 132–140.
[20] Isman MB, Miresmailli S, MacHial C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochem Rev* 2011; 10: 197–204.
[21] Najib BM, Amine F, Abdelkrin K. Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles : Revue de littérature. *Rev Agrobiol* 2019; 9: 1653–1659.
[22] Penchev PI. *Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions*. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, 2010; pp. 16-23.
[23] Mnayer D. *Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens*. Thèse de Doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 2016; pp.104-106.
[24] Sodeifian G hossein, Sajadian SA, Ardestani NS. Optimization of essential oil extraction from Launaea acanthodes Boiss: Utilization of supercritical carbon dioxide and cosolvent. *J Supercrit Fluids* 2016; 116: 46–56.
[25] Zermane A, Larkeche O, Meniai A-H, et al. Optimization of Algerian rosemary essential oil extraction yield by supercritical CO2 using response surface methodology. *Comptes Rendus Chim* 2016; 19: 538–543.
[26] Haloui I, Meniai A-H. Supercritical CO2 extraction of essential oil from Algerian Argan (Argania spinosa L.) seeds and yield optimization. *Int J Hydrogen Energy* 2017; 42: 12912–12919.
[27] Larkeche O, Zermane A, Meniai A-H, et al. Optimization of hydrodistillation of rosemary essential oil: Comparison with supercritical CO2 extraction. *Int J Energy Optim Eng* 2020; 9: 3.
[28] Vargas CE, Mendes MF, Azevedo DA, et al. Extraction of the essential oil of abajeru (Chrysobalanus icaco) using supercritical CO2. *J Supercrit Fluids* 2010; 54: 171–177.
[29] Uquiche E, Cirano N, Millao S. Supercritical fluid extraction of essential oil from Leptocarpha rivularis using CO2. *Ind Crops Prod* 2015; 77: 307–314.
[30] Turek C, Stintzing FC. Stability of essential oils: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2013; 12: 40–53.
[31] Hădărugă DI, Hădărugă NG, Costescu CI, et al. Thermal and oxidative stability of the Ocimum basilicum L. essential oil/β-cyclodextrin supramolecular system. *Beilstein J Org Chem* 2014; 10: 2809–2820.
[32] Bogusz MJ, Al-Tufail M. Chapter 18 Toxicological aspects of herbal remedies. In: *Handbook of Analytical Separations. Vol 6*. 2008, pp. 589–610.
[33] Sarigiannis DA, Karakitsios SP, Gotti A, et al. Exposure to major volatile organic compounds and carbonyls in European indoor environments and associated health risk. *Environ Int* 2011; 37: 743–765.
[34] Sköld M, Karlberg A-T, Matura M, et al. The fragrance chemical β-caryophyllene—air oxidation and skin sensitization. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 538–545.
[35] Matthäus B. Oxidation of edible oils. In: Decker EA, Elias RJ, McClements DJ (eds) *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications*. Woodhead Publishing Limited, 2010, pp. 183–283.
[36] Chen B, Mcclements DJ, Decker EA. Minor components in food oils : A critical

review of their roles on lipid oxidation chemistry in bulk oils and emulsions. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2011; 51: 901–916.

[37] Elmowafy M, Samy A, Abdelaziz AE, et al. Polymeric nanoparticles based topical gel of poorly soluble drug: Formulation, ex-vivo and in vivo evaluation. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci* 2017; 6: 184–191.

[38] Bolhassani A, Javanzad S, Aghasadeghi M, et al. Polymeric nanoparticles. *Hum Vaccin Immunother* 2014; 10: 321–332.

[39] Bilia AR, Guccione C, Isacchi B, et al. Essential oils loaded in nanosystems : A developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-Based Complement Altern Med* 2014; 2014: 1–14.

[40] GültekİN HE, DeğİM Z. Biodegradable Polymeric Nanoparticles are effective Systems for Controlled Drug Delivery. *FABAD J Pharm Sci* 2013; 38: 107–118.

[41] Badri W, Miladi K, Agha Q, et al. Effect of process and formulation parameters on polycaprolactone nanoparticles prepared by solvent displacement. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2017; 516: 238–244.

[42] Lammari N, Froiio F, Louaer M, et al. Poly (ethyl acrylate-co-methyl methacrylate-co-trimethylammoniethyl methacrylate chloride) (Eudragit RS 100) nanocapsules as nanovector carriers for Phoenix dactylifera L. seeds oil: a versatile antidiabetic agent. *Biomacromolecules* 2020; DOI: https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255.

[43] Froiio F, Ginot L, Paolino D, et al. Essential oils-loaded polymer particles: Preparation, characterization and antimicrobial property. *Polymers (Basel)* 2019; 11: 1017.

[44] Santos SS, Lorenzoni A, Pegoraro NS, et al. Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2014; 116: 270–276.

[45] Contri R V., Ribeiro KLF, Fiel LA, et al. Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: Influence on the physicochemical properties. *J Exp Nanosci* 2013; 8: 913–924.

[46] Chabrier J. *Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie*. Thèse de Doctorat, Univeristé de Loraine, 2018, pp.10-11.

[47] Anne-Sophie Limonier. *La Phytothérapie de demain : les plantes médicinales au cœur de la pharmacie*. Thèse de Doctorat, Université Aix-Maeseille, 2018; pp.21.

[48] OMS (Organisation Mondiale de la Santé). Médecine traditionnelle. 2003.

[49] Guendzi C. *Contribution à l'analyse physico-chimique de l'huile d'arachides, d'amandes et de leur mélange. Détermination de leurs pouvoirs antimicrobiens*. Mémoire de Master, Université de Tlemcen, 2017; pp.1.

[50] Barka A. *Evaluation des indices de nature physico-chimiques de quelques huiles alimentaires de friture et impact sur la santé du consommateur*. Mémoire de Master, Université de Tlemcen, 2016; pp.5.

[51] Lligadas G, Ronda JC, Galia M, et al. Plant oils as platform chemicals for polyurethane synthesis : current state-of-the-art. *Biomacromolecules* 2010; 11: 2825–2835.

[52] Meier MAR, Jurgen MO, Schubert US. Plant oil renewable resources as green alternatives in polymer science. *Chem Soc Rev* 2007; 36: 1788–1802.

[53] Xenakis A, Papadimitriou V, Sotiroudis TG. Colloidal structures in natural oils. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2010; 15: 55–60.

[54] Ahmed J, Ramaswamy HS. Physico-chemical properties of commercial date pastes (Phoenix dactylifera). *J Food Eng* 2006; 76: 348–352.

[55] Ogungbenle H. Chemical and fatty acid compositions of date palm fruit (Phoenix dactylifera L) flour. *Bangladesh J Sci Ind Res* 2011; 46: 255–258.
[56] Chaira N, Ferchichi A, Mrabet A, et al. Characterisation of date juices extracted from the rest of sorting of Deglet Nour variety. *Biotechnology(Faisalabad)* 2007; 6: 251–256.
[57] Al-Hooti SN, Sidhu JS, Al-Saqer JM, et al. Chemical composition and quality of date syrup as affected by pectinase/cellulase enzyme treatment. *Food Chem* 2002; 79: 215–220.
[58] Abdellaoui R, Boukhiar A, Kechadi K, et al. Preparation of a natural candy from date (Phoenix dactylifera L.), olive (Olea europaea L.), and carob (Ceratonia siliqua L.) fruits. *J Food Qual* 2018; 2018: 1–9.
[59] Matloob MH. Zahdi date vinegar: Production and characterization. *Am J Food Technol* 2014; 9: 231–245.
[60] Mohammed SSD, Yohanna B, Wartu JR, et al. Wine produced from fermentation of honey slurry and dates palm fruit juice blend using Saccharomyces cerevisiae isolated from palm wine. *Int J Biol* 2018; 10: 52.
[61] Hamad I, Abdelgawad H, Al Jaouni S, et al. Metabolic analysis of various date palm fruit (Phoenix dactylifera L.) cultivars from Saudi Arabia to assess their nutritional quality. *Molecules* 2015; 20: 13620–13641.
[62] Ismail WIW, Radzi MNFM. Evaluation on the benefits of date palm (Phoenix dactylifera) to the brain. *Altern Integr Med* 2013; 2: 4.
[63] Bouguedoura N, Benkhalifa A, Bennaceur M. Le palmier dattier en Algérie. In: Aberlenc-Bertossi F (ed) *Biotechnologie du palmier dattier*. OpenEddition books, 2010, pp. 15–22.
[64] Baliga MS, Baliga BRV, Kandathil SM, et al. A review of the chemistry and pharmacology of the date fruits (Phoenix dactylifera L.). *Food Res Int* 2011; 44: 1812–1822.
[65] Mrabet A, Jiménez-Araujo A, Guillén-Bejarano R, et al. Date seeds: A promising source of oil with functional properties. *Foods* 2020; 9: 787.
[66] Lecheb F, Benamara S. Feasibility study of a cosmetic cream added with aqueous extract and oil from date (Phoenix dactylifera L.) fruit seed using experimental design. *J Cosmet Sci* 2015; 66: 359–370.
[67] Chandrasekaran M, Bahkali AH. Valorization of date palm (Phoenix dactylifera) fruit processing by-products and wastes using bioprocess technology – Review. *Saudi J Biol Sci* 2013; 20: 105–120.
[68] Mrabet A, Rodríguez-Gutiérrez G, Guillén-Bejarano R, et al. Valorization of Tunisian secondary date varieties (Phoenix dactylifera L.) by hydrothermal treatments: New fiber concentrates with antioxidant properties. *LWT - Food Sci Technol* 2015; 60: 518–524.
[69] ELkhadem B, Rekia M. *Valorisation des noyaux de dattes par production de bioénergie dans la région d'Adrar*. Mémoire de Master, Université d'Adrar, 2019; pp.5-13.
[70] Boussena Z, Khali M. Extraction et composition chimique d'huile de noyaux de dattes algériennes. *Nutr Santé* 2016; 5: 100–106.
[71] Mimounia Y. *Développement de produits diététiques hypoglycémiants à base de dattes molles variété «Ghars», la plus répandue dans la cuvette de Ouargla*. Thèse de Doctorat, Université de Ouargla, 2015; pp.52-53.

[72] Kamergi N, Girault E. Une filière équitable en Palestine: Les dattes Medjool. *Artisans Du Monde*, 2014, p. 37.
[73] Senoussi M, Chenouf C. *Extraction et caractérisation physico-chimique de l'huile des noyaux de dattes (Ghars, Deglat-Nour, Meche-Degla)*. Mémoire de Master, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi- B.B.A, 2018; pp.6-7.
[74] Ghnimi S, Umer S, Karim A, et al. Date fruit (Phoenix dactylifera L.): An underutilized food seeking industrial valorization. *NFS J* 2017; 6: 1–10.
[75] Tafti AG, Panahi B. Chemical composition of seed and seed oil from Iranian commercial date cultivars. *J Food Bioprocess Eng* 2019; 2: 1–8.
[76] Hussain MI, Semreen MH, Shanableh A, et al. Phenolic composition and antimicrobial activity of different emirati date (Phoenix dactylifera L.) pits: A comparative study. *Plants* 2019; 8: 497.
[77] Babiker EE, Atasoy G, Özcan MM, et al. Bioactive compounds, minerals, fatty acids, color, and sensory profile of roasted date (Phoenix dactylifera L.) seed. *J Food Process Preserv* 2020; 00: e14495.
[78] Al-Juhaimi F, Ghafoor K, Özcan MM. Physical and chemical properties, antioxidant activity, total phenol and mineral profile of seeds of seven different date fruit (Phoenix dactylifera L.) varieties. *Int J Food Sci Nutr* 2012; 63: 84–89.
[79] Besbes S, Blecker C, Deroanne C, et al. Date seeds: Chemical composition and characteristic profiles of the lipid fraction. *Food Chem* 2004; 84: 577–584.
[80] Kchaou W, Abbès F, Blecker C, et al. Effects of extraction solvents on phenolic contents and antioxidant activities of Tunisian date varieties (Phoenix dactylifera L.). *Ind Crops Prod* 2013; 45: 262–269.
[81] Bouhlali E dine T, Alem C, Ennassir J, et al. Phytochemical compositions and antioxidant capacity of three date (Phoenix dactylifera L.) seeds varieties grown in the South East Morocco. *J Saudi Soc Agric Sci* 2017; 16: 350–357.
[82] Salomón-Torres R, Sol-Uribe JA, Valdez-Salas B, et al. Effect of four pollinating sources on nutritional properties of medjool date (Phoenix dactylifera l.) seeds. *Agriculture* 2020; 10: 1–13.
[83] Thouri A, Chahdoura H, Arem A El, et al. Antioxidant activity, volatile and nonvolatile composition of two Phoenix dactylifera L. by-products. *J Coast Life Med* 2017; 5: 254–260.
[84] Metoui M, Essid A, Bouzoumita A, et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activity of Tunisian date palm seed. *Polish J Environ Stud* 2019; 28: 267–274.
[85] Bouhlali E dine T, Hmidani A, Bourkhis B, et al. Effect of Phoenix dactylifera seeds (dates) extract in triton WR-1339 and high fat diet induced hyperlipidaemia in rats: A comparison with simvastatin. *J Ethnopharmacol* 2020; 259: 112961.
[86] Kchaou W, Abbès F, Mansour R Ben, et al. Phenolic profile, antibacterial and cytotoxic properties of second grade date extract from Tunisian cultivars (Phoenix dactylifera L.). *Food Chem* 2016; 194: 1048–1055.
[87] Radfar R, Farhoodi M, Ghasemi I, et al. Assessment of phenolic contents and antioxidant and antibacterial activities of extracts from four varieties of Iranian date palm (Phoenix dactylifera L.) seeds. *Appl Food Biotechnol* 2019; 6: 173–184.
[88] Al Juhaimi F, Özcan MM, Adiamo OQ, et al. Effect of date varieties on physico-chemical properties, fatty acid composition, tocopherol contents, and phenolic compounds of some date seed and oils. *J Food Process Preserv* 2018; 42: 1–6.

[89] Olowokere JA, Onen AI, Odineze MC, et al. Extraction and characterization of oil from date palm (Phoenix dactylifera) seed. *Asian J Appl Chem Res* 2019; 3: 1–9.
[90] Bouallegue K, Allaf T, Besombes C, et al. Phenomenological modeling and intensification of texturing/grinding-assisted solvent oil extraction: case of date seeds (Phoenix dactylifera L.). *Arab J Chem* 2019; 12: 2398–2410.
[91] Herch W, Kallel H, Boukhchina S. Physicochemical properties and antioxidant activity of Tunisian date palm (Phoenix dactylifera L.) oil as affected by different extraction methods. *Food Sci Technol* 2014; 34: 464–470.
[92] Nehdi IA, Sbihi HM, Tan CP, et al. Chemical composition of date palm (Phoenix dactylifera L.) seed oil from six Saudi Arabian cultivars. *J Food Sci* 2018; 83: 624–630.
[93] Basuny AMM, AL-Marzooq MA. Production of mayonnaise from date pit oil. *Food Nutr Sci* 2011; 2: 938–943.
[94] Akbari, M. Oil characteristics and fatty acid profile of seeds from three varieties of date palm (Phoenix dactylifera) cultivars in Bushehr-Iran. *African J Biotechnol* 2012; 11: 12088–12093.
[95] Boukouada M, Ghiaba Z, Gourine N, et al. Chemical composition and antioxidant activity of seed oil of two algerian date palm cultivars (Phoenix dactylifera). *Nat Prod Commun* 2014; 9: 1777–1780.
[96] Soliman SS, Al-Obeed RS, Ahmed TA. Physico-chemical characteristics of oil produced from seeds of some date palm cultivars (Phoenix dactylifera L.). *J Environ Biol* 2015; 36: 455–459.
[97] Dehdivan NS, Panahi B. Physicochemical properties of seeds and seeds oil extracted from Iranian date palm cultivars. *Biol Forum – An Int J* 2017; 9: 139–144.
[98] Laghouiter OK, Benalia M, Gourine N, et al. Chemical characterization and in vitro antioxidant capacity of nine Algerian date palm cultivars (Phoenix dactylifera L.) seed oil. *Med J Nutrition Metab* 2018; 11: 103–117.
[99] Raza MQ, Arshad MU, Arshad MS, et al. Characterization from three varieties of compositional and functional characteristics of date seeds and oil (Phoenix dactylifera L.). *IntJBiosci* 2019; 15: 1–14.
[100] Al-Shahib W, Marshall RJ. Fatty acid content of the seeds from 14 varieties of date palm Phoenix dactylifera L. *Int J Food Sci Technol* 2003; 38: 709–712.
[101] Severac E. *Valorisation enzymatique des huiles végétales*. Thèse de Docorat, Université de Toulouse, 2017; pp.65-66.
[102] Cuvelier ME, Maillard MN. Stabilité des huiles alimentaires au cours de leur stockage. *Ol Corps Gras Lipides* 2012; 19: 125–132.
[103] Boukouada M, Yousfi M. Phytochemical study of date seeds lipids of three fruits (Phoenix dactylifera L) produced in Ouargla region. *Ann la Fac des Sci Sciemces I'Ingénieur* 2009; 1: 66–74.
[104] Nehdi I, Omri S, Khalil MI, et al. Characteristics and chemical composition of date palm (Phoenix canariensis) seeds and seed oil. *Ind Crops Prod* 2010; 32: 360–365.
[105] Habib HM, Kamal H, Ibrahim WH, et al. Carotenoids, fat soluble vitamins and fatty acid profiles of 18 varieties of date seed oil. *Ind Crops Prod* 2013; 42: 567–572.
[106] Besbes S, Blecker C, Deroanne C, et al. Date seed oil: Phenolic, tocopherol and sterol profiles. *J Food Lipids* 2004; 11: 251–265.
[107] Jaih AAM, Rahman RA, Razis AFA, et al. Fatty acid, triacylglycerol composition and antioxidant properties of date seed oil. *Int Food Res J* 2019; 26: 517–527.

[108] Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother* 2003; 57: 321–325.
[109] Ahsan H, Ahad A, Iqbal J, et al. Pharmacological potential of tocotrienols: a review. *Nutr Metab (Lond)* 2014; 11: 52.
[110] Besbes S, Blecker C, Deroanne C, et al. Quality characteristics and oxidative stability of date seed oil during storage. *Food Sci Technol Int* 2004; 10: 333–338.
[111] Besbes S, Blecker C, Deroanne C, et al. Heating effects on some quality characteristics of date seed oil. *Food Chem* 2005; 91: 469–476.
[112] Hamitri-guerfi F, Madani K, Hadjal S, et al. Development of a new margarine added date seed oil : characteristics and chemical composition of date seed oil. *Int J Nutr Food Eng* 2015; 9: 12.
[113] Dammak I, Boudaya S, Benabdallah F, et al. Date seed oil inhibits hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human epidermal keratinocytes. *Int J Dermatol* 2010; 49: 262–268.
[114] Dammak I, Boudaya S, Benabdallah F, et al. Effect of date seed oil on p53 expression in normal human skin. *Connect Tissue Res* 2010; 51: 55–58.
[115] Benabdellah F, Chakroun N, Dammak I, et al. Sperm quality improvement after date seed oil in vitro supplementation in spontaneous and induced oxidative stress. *Asian J Androl* 2009; 11: 393–398.
[116] Al-Zuhair S, Taher H, Al Dhaheri S, et al. Biodiesel production from oils extracted from date pits. *Green Sustain Chem* 2017; 7: 48–56.
[117] Azeem MW, Hanif MA, Al-Sabahi JN, et al. Production of biodiesel from low priced, renewable and abundant date seed oil. *Renew Energy* 2016; 86: 124–132.
[118] Yousuf RG, Winterburn JB. Waste date seed oil extract as an alternative feedstock for Poly (3-hydroxybutyrate) synthesis. *Biochem Eng J* 2017; 127: 68–76.
[119] Elouadi Y, Beladjila A, Bouyanzer A, et al. The palm oil from seed of Phoenix dactylifera (oil of both Deglet Nour and Kentichi) as a natural antioxidants and environment-friendly inhibitors on the corrosion of mild steel in HCl 1M. *Moroccan J Chem* 2017; 5: 139–152.
[120] Abdul-Afiq M., Rahman RA, Che Man Y., et al. Date seed and date seed oil. *Int Food Res J* 2013; 20: 2035–2043.
[121] Al-Muhtaseb AH, Jamil F, Myint MTZ, et al. Cleaner fuel production from waste Phoenix dactylifera L. kernel oil in the presence of a bimetallic catalyst: Optimization and kinetics study. *Energy Convers Manag* 2017; 146: 195–204.
[122] Bousba N. *Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires*. Thèse de Doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 2011; pp.3-4.
[123] El-Asbahani A, Miladi K, Badri W, et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics* 2015; 483: 220–243.
[124] Chizzola R. Regular monoterpenes and sesquiterpenes (essential oils). In: Ramawat KG, Mérillon JM (eds) *Natural products*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, pp. 2973–3008.
[125] Morsy NFS. Chemical structure, quality indices and bioactivity of essential oil constituents. In: El-Shemy H (ed) *Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants*. IntechOpen, 2017, pp. 175–206.
[126] Pandey MM, Rastogi S, Rawat AKS. Saussurea costus: Botanical, chemical and pharmacological review of an ayurvedic medicinal plant. *J Ethnopharmacol* 2007;

110: 379–390.
[127] Madhuri K, Elango K, Ponnusankar S. Saussurea lappa (Kuth root): review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Orient Pharm Exp Med* 2012; 12: 1–9.
[128] Kuniyal CP, Rawat YS, Oinam SS, et al. Kuth (Saussurea lappa) cultivation in the cold desert environment of the Lahaul valley, northwestern Himalaya, India: Arising threats and need to revive socio-economic values. *Biodivers Conserv* 2005; 14: 1035–1045.
[129] Ansari S. Ethnobotany and pharmacognosy of Qust/ Kut (Saussurea lappa,C.B.Clarke) with special reference of unani medicine. *Pharmacogn Rev* 2019; 13: 71–76.
[130] Singh R, Chahal KK, Singla N. Chemical composition and pharmacological activities of Saussurea lappa : A review. *J Pharmacogn Phytochem* 2017; 6: 1298–1308.
[131] Amara U, Mashwani Z ur R, Khan A, et al. Conservation status and therapeutic potential of Saussurea lappa : An overview. *Am J Plant Sci* 2017; 08: 602–614.
[132] Kaur L, Singh A, Kaur J. A brief review of remedial uses of Saussurea lappa. *J Pharmacogn Phytochem* 2019; 8: 4423–4430.
[133] Semwal RB, Pandian A, Semwal DK. Biological applications and secondary metabolites of Saussurea costus (Falc.). *J Conv Knowl Holist Heal* 2020; 4: 201.
[134] Hassan R, Masoodi MH. Saussurea lappa: A comprehensive review on its pharmacological activity and phytochemistry. *Curr Tradit Med* 2019; 6: 13–23.
[135] Jani DP, Jani KD. Analytical profile of Kushtha (Saussuria lappa) extensively used medicinal plant in Ayurveda system of medicine. *J Ayurveda Integr Med Sci* 2017; 2: 63–67.
[136] Liu ZL, He Q, Chu SS, et al. Essential oil composition and larvicidal activity of Saussurea lappa roots against the mosquito Aedes albopictus (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 2012; 110: 2125–2130.
[137] Robinson A, Yashvanth S, Babu S, et al. Isolation of α-amyrin eicosanoate, a triterpenoid from the roots of Saussurea lappa Clarke- Differential solubility as an aid. *J Pharm Sci Technol* 2010; 2: 207–212.
[138] Gautam H, Asrani RK. Phytochemical and pharmacological review of an ethno medicinal plant : Saussurea Lappa. *Vet Res Int* 2018; 6: 1–9.
[139] Zahara K, Tabassum S, Sabir SS, et al. A review of therapeutic potential of Saussurea lappa-An endangered plant from Himalaya. *Asian Pac J Trop Biomed* 2014; 7: S60–S69.
[140] Chang KM, Kim GH. Comparison of volatile aroma components from Saussurea lappa C.B. Clarke root oils. *J Food Sci Nutr* 2008; 13: 128–133.
[141] Madhavi M, Mallika G, Lokanath N, et al. A review on phytochemical and pharmacological aspects of Saussurea lappa A review on phytochemical and pharmacological aspects of Saussurea lappa. *Int J Rev Life Sci* 2012; 2: 24–31.
[142] Choudhary A, Sharma RJ, Singh IP. Determination of major sesquiterpene lactones in essential oil of Inula racemosa and Saussurea lappa using qNMR. *J Essent Oil-Bearing Plants* 2016; 19: 20–31.
[143] Chen F, Tan X, Tang Q, et al. GC-MS analysis of volatile oil from Aucklandia lappa from different producing areas. *China Pharm* 2011; 22: 2187–2189.
[144] Abdelwahab SI, Taha MME, Alhazmi HA, et al. Phytochemical profiling of Costus (Saussurea lappa Clarke) root essential oil, and its antimicrobial and toxicological effects. *Trop J Pharm Res* 2019; 18: 2155–2160.

[145] Benedetto C, Auria MD, Mecca M, et al. Chemical and biological evaluation of essential oil from Saussurea costus (Falc.) Lipsch. from Garhwal Himalaya collected at different harvesting periods. *Nat Prod Res* 2019; 6419: 1–4.
[146] Duraipandiyan V, Al-Harbi NA, Ignacimuthu S, et al. Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones isolated from traditional medicinal plant, Costus speciosus (Koen ex.Retz.) Sm. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12: 13.
[147] Rao KS, Babu GV, Ramnareddy YV. Acylated flavone glycosides from the roots of Saussurea lappa and their antifungal activity. *Molecules* 2007; 12: 328–344.
[148] Rayan NA, Baby N, Pitchai D, et al. Costunolide inhibits proinflammatory cytokines and iNOS in activated murine BV2 microglia. *Front Biosci* 2011; 3: 1079–1091.
[149] Kang JS, Yoon YD, Lee KH, et al. Costunolide inhibits interleukin-1β expression by down-regulation of AP-1 and MAPK activity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 171–177.
[150] He Y, Moqbel S, Xu L, et al. Costunolide inhibits matrix metalloproteinases expression and osteoarthritis via the NF-κB and Wnt/β-catenin signaling pathways. *Mol Med Rep* 2019; 20: 312–322.
[151] Choodej S, Pudhom K, Mitsunaga T. Inhibition of TNF-α-induced inflammation by sesquiterpene lactones from Saussurea lappa and semi-synthetic analogues. *Planta Med* 2018; 84: 329–335.
[152] Zhou Q, Zhang W, He Z, et al. The possible anti-inflammatory effect of dehydrocostus lactone on DSS-induced colitis in mice. *Evidence-Based Complement Altern Med* 2020; 2020: 1–8.
[153] Choi HG, Lee DS, Li B, et al. Santamarin, a sesquiterpene lactone isolated from Saussurea lappa, represses LPS-induced inflammatory responses via expression of heme oxygenase-1 in murine macrophage cells. *Int Immunopharmacol* 2012; 13: 271–279.
[154] Matsuda H, Toguchida I, Ninomiya K, et al. Effects of sesquiterpenes and amino acid–sesquiterpene conjugates from the roots of Saussurea lappa on inducible nitric oxide synthase and heat shock protein in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Bioorg Med Chem* 2003; 11: 709–715.
[155] Yang M, Zhang J, Li Y, et al. Bioassay-guided isolation of dehydrocostus lactone from Saussurea lappa: A new targeted cytosolic thioredoxin reductase anticancer agent. *Arch Biochem Biophys* 2016; 607: 20–26.
[156] Choi YK, Cho S-G, Woo S-M, et al. Saussurea lappa Clarke-derived costunolide prevents TNFα-induced breast cancer cell migration and invasion by inhibiting NF- κ B activity. *Evidence-Based Complement Altern Med* 2013; 2013: 936257.
[157] Cho JY, Kim AR, Jung JH, et al. Cytotoxic and pro-apoptotic activities of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, on the viability of leukocyte cancer cell lines. *Eur J Pharmacol* 2004; 492: 85–94.
[158] Robinson A, Kumar TV, Sreedhar E, et al. A new sesquiterpene lactone from the roots of Saussurea lappa: Structure–anticancer activity study. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18: 4015–4017.
[159] Mitra S., Gopumadhavan S, Hemavathi T., et al. Active-compounds from Saussurea lappa clarke that sup-press hepatitis B virus surface antigen gene expres-sion inhuman hepatoma cells. *Antivir Reseach* 1995; 27: 99–109.
[160] Hou P., Chen W., Zhao X., et al. Analysis of chemical constituents in the assential oil of the Radix Aucklandiae by GC-MS and the effect on platelet aggregation. *Chinese*

J Exp Tradit Med Formulae 2008; 14: 26–30.
[161] Upadhyay OP, Singh RH, Dutta SK. Studies on anti diabetic medicinal plants used in Indian folklore. *Ayurvaidyan* 1994; 9: 159–167.
[162] Wei H, Yan LH, Feng WH, et al. Research progress on active ingredients and pharmacologic properties of Saussurea lappa. *Curr Opin Complement Altern Med* 2014; 1: 1–7.
[163] Neerman M. Sesquiterpene lactones: a diverse class of compounds found in essential oils possessing antibacterial and antifungal properties. *Int J Aromather* 2003; 13: 114–120.
[164] Luna-Herrera J, Costa MC, González HG, et al. Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from Laurus spp. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 548–552.
[165] Butola JS, Samant SS. Saussurea species in Indian Himalayan region: Diversity, distribution and indigenous uses. *Int J Plant Biol* 2010; 1: 43–51.
[166] Herzi N. *Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO2-supercritique et des techniques conventionnelles*. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, 2013; pp. 3-19.
[167] Zermane A. *Etude de l'extraction supercritique application aux systèmes agroalimentaires*. Thèse de Doctorat, Université Mentouri de Constantine, 2010; pp.4-7.
[168] Bonnard N, Brondeau M., Falcy M, et al. *Protocole travaux pratiques: Extraction par CO2 supercritique*. 2017.
[169] Jaih M, AbdulRahman AA, AbdullRazis R, et al. Supercritical fluid extraction of date seed oil. In: *International Food Research Conference (IFRC 2017)*, pp. 117–120.
[170] Louaer M, Zermane A, Larkeche O, et al. Experimental study and optimization of the extraction of Algerian date stones oil (Phoenix dactylifera L.) using supercritical carbon dioxide. *J Food Process Eng* 2019; 42: e13049.
[171] Aris NA, Norhuda I, Adeib IS. Extraction of Phoenix Dactylifera (Mariami) seeds oil using supercritical carbon dioxide (SC-CO2). *Int J Chem Environ Eng* 2013; 4: 32–37.
[172] Aris NA, Norhuda I, Adeib IS. Solubility of phoenix dactylifera seed oil in supercritical carbon dioxide (SC-CO2) using empirical model. *Key Eng Mater* 2014; 594–595: 301–305.
[173] Deschepper R. *Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles et intérêt de la notion chimiotype en aromathérapie*. Thèse de Doctorat, Université d'Aix-Marseille, 2007; pp.41.
[174] Cheminat A, Stampf J., Benezra C, et al. Allergic contact dermatitis to costus: Removal of haptens with polymers. *Acta Dermato- Venereol* 1981; 61: 525–529.
[175] El-Alami El-Hassani N. *Conception et réalisation de capteurs et de biocapteurs électrochimiques à base de nanomatériaux pour le contrôle de la qualité en agroalimentaire et pour l'analyse biomédicale*. Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard-Lyon 1, 2018; pp.37.
[176] Faivre AL. *Administration de substances actives dans la peau : rôle de la composition hydrophile de nanoparticules polymériques*. Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard- Lyon 1, 2019; pp. 3.
[177] Froiio F, Mosaddik A, Morshed MT, et al. Edible polymers for essential oils encapsulation: Application in food preservation. *Ind Eng Chem Res* 2019; 58: 46.

[178] Ruffel L. *Procédé de co-atomisation séchage pour l'encapsulation d'un principe actif au sein de nanoparticules de silice mésoporeuse*. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, 2019.
[179] Reis CP, J.Neufeld R, J.Ribeiro A, et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine* 2006; 2: 8–21.
[180] Krishna RSM, Shivakumar HG, Gowda D, et al. Nanoparticles: A novel colloidal drug delivery system. *Indian J Pharm Edu Res* 2006; 40: 15–21.
[181] Lammari N, Louaer O, Meniai AH, et al. Encapsulation of essential oils via nanoprecipitation process : Overview, progress, challenges and prospects. *Pharmaceutics* 2020; 12: 431.
[182] Rascol E. *Etude des propriétés de surface de nanoparticules à l'interface avec les fluides biologiques et les membranes cellulaires*. Université de Montpellier, 2017.
[183] Rigaux G. *Elaboration, caractérisation et évaluation biologique de nanoparticules biocompatibles pour la thérapie photodynamique et l'imagerie IRM*. Université de Reims Champagne-Ardenne, 2015.
[184] Arulprakasajothi M, Elangovan K, Chandrasekhar U, et al. Performance study of conical strip inserts in tube heat exchanger using water based titanium oxide nanofluid. *Therm Sci* 2018; 22: 477–485.
[185] Eidi H. *Cytotoxicité de nanoparticules polymériques, vecteurs de médicaments*. Thèse de Doctorat, Universite Henri Poincare- Nancy, 2011.
[186] Wu M. *Synthèse de nanoparticules à propriétés de surface contrôlées par polymérisation en miniémulsion pour la vectorisation de molécules actives*. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, 2007; pp.17-28.
[187] Badri W, Eddabra R, Fessi H, et al. Biodegradable polymer based nanoparticles: Dermal and transdermal drug delivery. *J Colloid Sci Biotechnol* 2014; 3: 141–149.
[188] Joshi M. Role of Eudragit in targeted drug delivery. *Int J Curr Pharm Res* 2013; 5: 58–62.
[189] Santos Silva AM, Caland LB, Melo Doro PN, et al. Hydrophilic and hydrophobic polymeric benznidazole-loaded nanoparticles: Physicochemical properties and in vitro antitumor efficacy. *J Drug Deliv Sci Technol* 2019; 51: 700–707.
[190] Hoffart V, Lamprecht A, Maincent P, et al. Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system. *J Control Release* 2006; 113: 38–42.
[191] Date AA, Jain A, Khachane P, et al. Organic solvent-free approach to single step fabrication of Eudragit nanoparticles using Labrasol. *Pharmazie* 2010; 65: 733–736.
[192] Jummes B, Sganzerla WG, da Rosa CG, et al. Antioxidant and antimicrobial poly-ε-caprolactone nanoparticles loaded with Cymbopogon martinii essential oil. *Biocatal Agric Biotechnol* 2020; 23: 101499.
[193] Pina-Barrera AM, Alvarez-Roman R, Baez-Gonzalez JG, et al. Application of a multisystem coating based on polymeric nanocapsules containing essential oil of Thymus vulgaris L. to increase the shelf life of table grapes (Vitis vinifera L.). *IEEE Trans Nanobioscience* 2019; 18: 549–557.
[194] Sotelo-Boyás ME, Correa-Pacheco Z, Bautista-Banos S, et al. Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. *Int J Biol Macromol* 2017; 103: 409–414.
[195] Sotelo-Boyás M., Valverde-Aguilar G, Plascencia-Jatomea M, et al. Characterization of chitosan nanoparticles added with essential oils. In vitro effect on Pectobacterium

carotovorum. *Rev Mex Ing química* 2015; 14: 589–599.
[196] El-Asbahani A, Miladi K, Addi H, et al. Antimicrobial activity of nano-encapsulated essential oils: comparison to non-encapsulated essential oils. *J Colloid Sci Biotechnol* 2015; 4: 39–48.
[197] Silva-Flores PG, Opez LAP-L, Rivas-Galindo VM, et al. Simultaneous GC-FID quantification of main components of Rosmarinus officinalis L . and Lavandula dentata essential oils in polymeric nanocapsules for antioxidant application. *J Anal Methods Chem* 2019; 2019: 1–9.
[198] Khoobdel M, Ahsaei SM, Farzaneh M. Insecticidal activity of polycaprolactone nanocapsules loaded with Rosmarinus officinalis essential oil in Tribolium castaneum (Herbst). *Entomol Res* 2017; 47: 175–184.
[199] Ephrem E, Greige-Gerges H, Fessi H, et al. Optimisation of rosemary oil encapsulation in polycaprolactone and scale-up of the process. *J Microencapsul* 2014; 31: 746–753.
[200] Popiolski TM, Otsuka I, Halila S, et al. Preparation of polymeric micelles of poly (Ethylene Oxide- b -Lactic Acid) and their encapsulation with lavender oil. *Mater Res* 2016; 19: 1356–1365.
[201] Liakos IL, Iordache F, Carzino R, et al. Cellulose acetate - essential oil nanocapsules with antimicrobial activity for biomedical applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2018; 172: 471–479.
[202] Liakos IL, Grumezescu AM, Holban AM, et al. Polylactic acid-lemongrass essential oil nanocapsules with antimicrobial properties. *Pharmaceuticals* 2016; 9: 42.
[203] Sotelo-Boyás ME, Correa-Pacheco ZN, Bautista-Baños S, et al. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *LWT - Food Sci Technol* 2017; 77: 15–20.
[204] Luque-Alcaraz AG, Cortez-Rocha MO, Velázquez-Contreras CA, et al. Enhanced antifungal effect of chitosan/Pepper tree (Schinus molle) essential oil bionanocomposites on the viability of Aspergillus parasiticus spores. *J Nanomater* 2016; 2016: 6060137.
[205] Christofoli M, Cristina E, Costa C, et al. Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from Zanthoxylum rhoifolium (Rutaceae) in Bemisia tabaci populations. *Ind Crop Prod* 2015; 70: 301–308.
[206] Shakeri F, Shakeri S, Hojjatoleslami M. Preparation and characterization of carvacrol loaded polyhydroxybutyrate nanoparticles by nanoprecipitation and dialysis methods. *J Food Sci* 2014; 79: 697–705.
[207] Iannitelli A, Grande R, di Stefano A, et al. Potential antibacterial activity of carvacrol-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles against microbial biofilm. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 5039–5051.
[208] Esfandyari-Manesh M, Ghaedi Z, Asemi M, et al. Study of antimicrobial activity of anethole and carvone loaded PLGA nanoparticles. *J Pharm Res* 2013; 7: 290–295.
[209] Contri R V, Kulkamp-guerreiro IC, Janine S, et al. Nanoencapsulation of Rose-Hip oil prevents oil oxidation and allows obtainment of gel and film topical formulations. *AAPS PharmSciTech* 2016; 17: 863–871.
[210] Chattopadhyay S, Prez F Du. Simple design of chemically crosslinked plant oil nanoparticles by triazolinedione- ene chemistry. *Eur Polym J* 2016; 81: 77–85.
[211] Rigo LA, Silva CR, Oliveira SM, et al. Nanoencapsulation of rice bran oil increases

its protective effects against UVB radiation-induced skin injury in mice. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 93: 11–17.
[212] Averina E, Allémann E. Encapsulation of alimentary bioactive oils of the Baikal Lake area into pH-sensitive micro- and nanoparticles. *LWT - Food Sci Technol* 2013; 53: 271–277.
[213] Sousa VP de, Crean J, Borges VR de A, et al. Nanostructured systems containing babassu (Orbignya speciosa) oil as a potential alternative therapy for benign prostatic hyperplasia. *Int J Nanomedicine* 2013; 8: 3129–3139.
[214] Priyadarshini BM, Antipina MN, Fawzy AS. Formulation and characterisation of poly (lactic-co-glycolic acid) encapsulated clove oil nanoparticles for dental applications. *Inst Eng Technol* 2018; 12: 311–317.
[215] Gomes C, Moreira RG, Castell-perez E. Nanoparticles with entrapped trans - cinnamaldehyde and eugenol for antimicrobial delivery applications. *J Food Sci* 2011; 76: 16–24.
[216] Campo C De, Pereira P, Maria T, et al. Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (Salvia hispanica L.) as wall material: characterization and stability evaluation. *Food Chem* 2017; 234: 1–9.
[217] Freiberger EB, Kaufmann KC, Bona E, et al. Encapsulation of roasted coffee oil in biocompatible nanoparticles. *LWT - Food Sci Technol* 2015; 64: 381–359.
[218] Galindo-Pérez MJ, Quintanar-Guerrero D, Cornejo-Villegas M de los Á, et al. Optimization of the emulsification-diffusion method using ultrasound to prepare nanocapsules of different food-core oils. *LWT - Food Sci Technol* 2018; 87: 333–341.
[219] Frederico N de O, Rodrigues THS, Pereira R de CA, et al. Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from Lippia sidoides Cham. *Ind Crop Prod* 2016; 86: 279–288.
[220] Almeida KB, Ramos AS, Nunes JBB, et al. PLGA nanoparticles optimized by Box-Behnken for efficient encapsulation of therapeutic Cymbopogon citratus essential oil. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2019; 181: 935–942.
[221] Almeida KB, Araujo JL, Cavalcanti JF, et al. In vitro release and anti-herpetic activity of Cymbopogon citratus volatile oil-loaded nanogel. *Rev Bras Farmacogn* 2018; 28: 498–502.
[222] Choi M., Soottitantawat A, Nuchuchua O, et al. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion-diffusion method. *Food Res Int* 2009; 42: 148–156.
[223] Hasheminejad N, Khodaiyan F, Safari M. Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. *Food Chem* 2019; 275: 113–122.
[224] López-meneses AK, Plascencia-jatomea M, Lizardi-mendoza J, et al. Schinus molle L . essential oil-loaded chitosan nanoparticles : Preparation, characterization, antifungal and anti-aflatoxigenic properties. *LWT - Food Sci Technol* 2018; 96: 597–603.
[225] Liu Y, Wang S, Zhang R, et al. Development of poly (lactic acid)/ chitosan fibers loaded with essential oil for antimicrobial applications. *Nanomaterials* 2017; 7: 194.
[226] Hu J, Wang X, Xiao Z, et al. Effect of chitosan nanoparticles loaded with cinnamon essential oil on the quality of chilled pork. *LWT - Food Sci Technol* 2015; 63: 519–526.
[227] Jamil B, Abbasi R, Abbasi S, et al. Encapsulation of cardamom essential oil in chitosan nano-composites : In-vitro efficacy on antibiotic-resistant bacterial pathogens and

cytotoxicity studies. *Front Microbiol* 2016; 7: 1–10.
[228] Feyzioglu GC, Tornuk F. Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (Satureja hortensis L .) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications. *LWT - Food Sci Technol* 2016; 70: 104–110.
[229] Esmaeili A, Asgari A. In vitro release and biological activities of Carum copticum essential oil (CEO) loaded chitosan nanoparticles. *Int J Biol Macromol* 2015; 81: 283–290.
[230] Natrajan D, Srinivasan S, Sundar K, et al. Formulation of essential oil-loaded chitosan e alginate nanocapsules. *J Food Drug Anal* 2015; 23: 560–568.
[231] Lv Y, Yang F, Li X, et al. Formation of heat-resistant nanocapsules of jasmine essential oil via gelatin / gum arabic based complex coacervation. *Food Hydrocolloids* 2014; 35: 305–314.
[232] Sutaphanit P, Chitprasert P. Optimisation of microencapsulation of holy basil essential oil in gelatin by response surface methodology. *Food Chem* 2014; 150: 313–320.
[233] Dima C, Cotârlet M, Alexe P, et al. Reprint of ' Microencapsulation of essential oil of pimento [Pimenta dioica (L) Merr .] by chitosan / k-carrageenan complex coacervation method'. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2014; 25: 97–105.
[234] Woranuch S, Yoksan R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles : I . Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydr Polym* 2013; 96: 578–585.
[235] Hosseini SF, Zandi M, Rezaei M, et al. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles : Preparation , characterization and in vitro release study. *Carbohydr Polym* 2013; 95: 50–56.
[236] Yang X, Gao N, Hu L, et al. Development and evaluation of novel microcapsules containing poppy-seed oil using complex coacervation. *J Food Eng* 2015; 161: 87–93.
[237] Yang Z, Peng Z, Li J, et al. Development and evaluation of novel flavour microcapsules containing vanilla oil using complex coacervation approach. *Food Chem* 2014; 145: 272–277.
[238] Devi N, Deka C, Hazarika D, et al. Study of complex coacervation of gelatin A and sodium alginate for microencapsulation of olive oil. *J Macromol Sci Part A* 2012; 49: 936–945.
[239] Zhang K, Zhang H, Hu X, et al. Synthesis and release studies of microalgal oil-containing microcapsules prepared by complex coacervation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2012; 89: 61–66.
[240] Dong Z, Ma Y, Hayat K, et al. Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. *J Food Eng* 2011; 104: 455–460.
[241] Mohammed NK, Tan C, Manap YA, et al. Process conditions of spray drying microencapsulation of Nigella sativa oil. *Powder Technol* 2017; 315: 1–14.
[242] Herculano ED, Paula HCB De, Dias FGB, et al. Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated Eucalyptus staigeriana essential oil. *LWT - Food Sci Technol* 2015; 61: 484–491.
[243] De-Oliveira EF, Paula HCB, De Paula RCM. Alginate / cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2014; 113: 146–151.
[244] Abreu FOMS, Oliveira EF, Paula HCB, et al. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydr Polym* 2012; 89: 1277–1282.
[245] Paula HCB, Sombra FM, Abreu FOMS, et al. Lippia sidoides essential oil

encapsulation by angico gum/chitosan nanoparticles. *J Braz Chem Soc* 2010; 21: 2359–2366.
[246] Beirão da costa S, Duarte C, Bourbon AI, et al. Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of Oregano essential oil. *Food hydrocolloids* 2013; 33: 199–206.
[247] Beirão da costa S, Duarte C, Bourbon AI, et al. Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. *J Food Eng* 2012; 110: 190–199.
[248] Hoyos-leyva JD, Bello-perez LA, Agama-acevedo JE, et al. Characterization of spray drying microencapsulation of almond oil into taro starch spherical aggregates. *LWT - Food Sci Technol* 2019; 101: 526–533.
[249] Wang S, Shi Y, Han L. Development and evaluation of microencapsulated peony seed oil prepared by spray drying : Oxidative stability and its release behavior during in-vitro digestion. *J Food Eng* 2018; 231: 1–9.
[250] Us-medina U, Julio LM, Segura-campos MR, et al. Development and characterization of spray-dried chia oil microcapsules using by-products from chia as wall material. *Powder Technol* 2018; 334: 1–8.
[251] Roccia P, Martínez ML, Llabot JM, et al. Influence of spray-drying operating conditions on sunflower oil powder qualities. *Powd* 2014; 254: 307–313.
[252] Laohasongkram K, Mahamaktudsanee T, Chaiwanichsiri S. Microencapsulation of Macadamia oil by spray drying. *Ital Oral Surg* 2011; 1: 1660–1665.
[253] Chew SC, PingTan C, Nyam KL. Microencapsulation of refined kenaf (Hibiscus cannabinus L.) seed oil by spray drying using β -cyclodextrin / gum arabic / sodium caseinate. *J Food Eng J* 2018; 237: 78–85.
[254] González A, Martínez ML, Paredes AJ, et al. Study of the preparation process and variation of wall components in chia (Salvia hispanica L .) oil microencapsulation. *Powder Technol* 2016; 301: 868–875.
[255] Rodea-gonzález DA, Cruz-olivares J, Román-guerrero A, et al. Spray-dried encapsulation of chia essential oil (Salvia hispanica L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *J Food Eng* 2012; 111: 102–109.
[256] Shamaei S, Sadegh S, Aghbashlo M, et al. Microencapsulation of walnut oil by spray drying : Effects of wall material and drying conditions on physicochemical properties of microcapsules. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2017; 39: 101–112.
[257] Carneiro HCF, Tonon R V, Grosso CRF, et al. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *J Food Eng* 2013; 115: 443–451.
[258] Gallardo G, Guida L, Martinez V, et al. Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. *Food reseach Int* 2013; 52: 473–482.
[259] Rubilar M, Morales E, Contreras K, et al. Development of a soup powder enriched with microencapsulated linseed oil as a source of omega-3 fatty acids. *Eur J Lipid Sci Technol* 2012; 114: 423–433.
[260] Nosari ABFL, Lima JF, Serra OA, et al. Improved green coffee oil antioxidant activity for cosmetical purpose by spray drying microencapsulation. *Rev Bras Farmacogn* 2015; 25: 307–311.
[261] Frascareli EC, Silva VM, Tonon R V, et al. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food Bioprod Process* 2011; 90: 413–424.
[262] Vanderhoff JW, Asser MS El. *Polymer emulsification process*. 1979.

[263] Rodríguez J, Martín MJ, Ruiz MA, et al. Current encapsulation strategies for bioactive oils : From alimentary to pharmaceutical perspectives. *Food Reseach Int* 2016; 83: 41–59.
[264] Rao JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles : Preparation techniques and size-control parameters. *Prog Polym Sci* 2011; 36: 887–913.
[265] Quintanar-Guerrero D, Fessi H, Allémann E, et al. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm* 1996; 143: 133–141.
[266] Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm* 2010; 385: 113–142.
[267] Hassou M. *Modélisation et simulation de la formation des nanocapsules polymériques par la méthode d'émulsion-diffusion*. Université Claude Bernard Lyon1, 2007.
[268] Froiio F, Lammari N, Tarhini M, et al. Chapter 16 - Polymer-based nanocontainers for drug delivery. In: *Smart Nanocontainers Micro and Nano Technologies*. 2020, pp. 271–285.
[269] Jordanovska S. *Les nanoparticules dans l'industrie pharmaceutique : comparaison des méthodes de fabrication*. Université de Bordeaux, 2015.
[270] Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* 1989; 55: R1–R4.
[271] Miladi K, Sfar S, Fessi H, et al. Nanoprecipitation process : From particle preparation to in vivo applications. In: Vauthier C, Ponchel G (eds) *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines.* Springer, 2016, pp. 17–53.
[272] Martínez Rivas CJ, Tarhini M, Badri W, et al. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *Int J Pharm* 2017; 532: 66–81.
[273] Calvo P, Remunan Lopez JL, Vila-Jato, et al. Novel hydrophilic chitosan – polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polym Sci* 1997; 63: 125–132.
[274] Christofoli M, Costa ECC, Bicalho KU, et al. Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from Zanthoxylum rhoifolium (Rutaceae) in Bemisia tabaci populations. *Ind Crops Prod* 2015; 70: 301–308.
[275] Chavez-Magdaleno ME, Luque-Alcaraz AG, Gutierrez-Martınez P, et al. Effect of chitosan-pepper tree (Schinus molle) essential oil biocomposites on the growth kinetics, viability and membrane integrity of colletotrichum gloeosporioides. *Rev Mex Ing Química* 2018; 17: 29–45.
[276] Yegin Y, Perez-Lewis KL, Zhang M, et al. Development and characterization of geraniol-loaded polymeric nanoparticles with antimicrobial activity against foodborne bacterial pathogens. *J Food Eng* 2016; 170: 64–71.
[277] Zhang Y, Xiaoyu Liu, Wang Y, et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Food Control* 2016; 59: 282–289.
[278] Badri W, Miladi K, Eddabra R, et al. Elaboration of nanoparticles containing indomethacin: Argan oil for transdermal local and cosmetic application. *J Nanomater* 2015; 2015: 1–9.
[279] Badri W, El-Asbahani A, Miladi K, et al. Poly (ε-caprolactone) nanoparticles loaded with indomethacin and Nigella Sativa L. essential oil for the topical treatment of inflammation. *J Drug Deliv Sci Technol* 2018; 46: 234–242.
[280] Fraj A, Jaâfar F, Marti M, et al. A comparative study of oregano (Origanum vulgare

L.) essential oil-based polycaprolactone nanocapsules/ microspheres: Preparation, physicochemical characterization, and storage stability. *Ind Crops Prod* 2019; 140: 111669.

[281] Liakos IL, D'autilia F, Garzoni A, et al. All natural cellulose acetate—Lemongrass essential oil antimicrobial nanocapsules. *Int J Pharm* 2016; 510: 508–515.

[282] Weber J, Funk NL, Motta MH, et al. Association of borage oil and betamethasone dipropionate in lipid-core nanocapsules: characterization, photostability and in vitro irritation test. *J Nanosci Nanotechnol* 2016; 16: 1354–1362.

[283] Ben-Ghzaiel T. *Synthèse, caractérisation et étude des propriétés magnétiques et diélectriques de nanocomposites Polyaniline/hexaferrite pour l'absorption des micro-ondes*. Thèse de Doctorat, Université Parris-Saclay, 2020.

[284] Ben-Mabrouk A. *Elaboration de nanocomposites à base de whiskers de cellulose et de polymère acrylique par polymérisation in situ*. Université de Grenoble, 2012.

[285] Aslantürk ÖS. In Vitro cytotoxicity and cell viability assays: Principles, advantages, and disadvantages. In: Larramendy ML, Soloneski S *(eds) Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World.* IntechOpen, 2017, pp. 1–18.

[286] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods* 2001; 25: 402–408.

[287] Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 1980; 196–202.

[288] Gülçin I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Arch Toxicol* 2012; 86: 345–391.

[289] Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* 2011; 48: 412–422.

[290] Blois M. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 4617: 1119–1200.

[291] Ilyasov IR, Beloborodov VL, Selivanova IA, et al. ABTS/PP decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 1131.

[292] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 1231–1237.

[293] Pisoschi AM, Negulescu GP. Methods for total antioxidant activity determination: A review. *Biochem Anal Biochem* 2012; 1: 1–10.

[294] Apak R, Güçlü K, Özyürek M, et al. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric Ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 7970–7981.

[295] Ellman G., Courtney K., Andres V, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88–95.

[296] Nair SS, Kavrekar V, Mishra A. In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. *Eur J Exp Biol* 2013; 3: 128–132.

[297] Zengin G, Sarikurkcu C, Aktumsek A, et al. A comprehensive study on phytochemical characterization of Haplophyllum myrtifolium Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Ind Crops Prod* 2014; 53: 244–251.

[298] Vadivelan R, Krishnan RG, Kannan R. Antidiabetic potential of Asparagus racemosus

willd leaf extracts through inhibition of a-amylase and a-glucosidase. *J Tradit Chinese Med Sci* 2019; 9: 1–4.
[299] Quintanar-Guerrero, Allémann E, Fessi H, et al. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm* 1998; 24: 1113–28.
[300] Limayem Blouza I, Charcosset C, Sfar S, et al. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for pediatric use. *Int J Pharm* 2006; 325: 124–131.
[301] Dong Y, Feng S. Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 2004; 25: 2843–2849.
[302] Song KC, Seok H, Yeop I, et al. The effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2006; 276: 162–167.
[303] Mohsen-nia M, Amiri H, Jazi B. Dielectric constants of water, methanol, ethanol, butanol and acetone: Measurement and computational study. *J Solution Chem* 2010; 39: 701–708.
[304] Tarhini M, Benlyamani I, Hamdani S, et al. Protein-based nanoparticle preparation via nanoprecipitation method. *Materials (Basel)* 2018; 11: 1–18.
[305] Stainmesse S, M-Orecchioni A, Nakache E, et al. Formation and stabilization of a biodegradable polymeric colloidal suspension of nanoparticles. *Colloid Polym Sci* 1995; 273: 505–511.
[306] Chorny M, Fishbein I, Danenberg HD, et al. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation : Effect of formulation variables on size , drug recovery and release kinetics. *J Control Release* 2002; 83: 389–400.
[307] Bilati U, Allémann E, Doelke E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur J Pharm Sci* 2005; 24: 67–75.
[308] Guhagarkar SA, Malshe VC, Padma V. Nanoparticles of polyethylene sebacate: A new biodegradable polymer. *AAPS PharmSciTech* 2009; 10: 935–942.
[309] Khan MR, Sayed E. Sulfur removal from heavy and light petroleum hydrocarbon by selective oxidation. In: *Advances in Clean Hydrocarbon Fuel Processing: Science and Technology*. Woodhead Publishing Limited, pp. 243–261.
[310] Asadi H, Rostamizadeh K, Salari D, et al. Preparation of biodegradable nanoparticles of tri-block PLA–PEG–PLA copolymer and determination of factors controlling the particle size using artificial neural network. *J Microencapsul* 2011; 28: 406–416.
[311] Rosset V, Ahmed N, Zaanoun I, et al. Elaboration of argan oil nanocapsules containing Naproxen for cosmetic and transdermal local application. *J colloid Sci Biotechnol* 2012; 1: 218–224.
[312] Yenilmez E. Desloratadine-Eudragit® RS100 nanoparticles: Formulation and characterization. *Turkish J Pharm Sci* 2017; 14: 148–156.
[313] Jahangirian H, Haron MJ, Yusof NA, et al. Enzymatic synthesis of fatty hydroxamic acid derivatives based on palm kernel oil. *Molecules* 2011; 16: 6634–6644.
[314] Ali MA, Al-hattab TA, Al-hydary IA. Extraction of date palm seed oil (Phoenix Dactylifera) by soxhlet apparatus. *Int J Adv Eng Technol* 2015; 8: 261–271.
[315] Sibokoza SB, Moloto MJ, Mtunzi F, et al. Diphenyldiselenide mediated synthesis of copper selenide nanoparticles and their poly(methyl methacrylate) nanofibers. *Asian*

J Chem 2018; 30: 1455–1459.
[316] Khurshid MF, Hussain T, Masood R, et al. Development and evaluation of a controlled drug delivery wound dressing based on polymeric porous microspheres. *J Ind Text* 2016; 46: 986–999.
[317] Riaz M, Altaf M, Faisal A, et al. Biogenic synthesis of AgNPs with Saussurea lappa C.B. Clarke and studies on their biochemical properties. *J Nanosci Nanotechnol* 2018; 18: 8392–8398.
[318] Zaghloul AM, Yusufoglu HS, et al. New cytotoxic sesquiterpene lactones from Anthemis scrobicularis. *J. Asian Nat. Prod. Res* 2014; 16: 922–929.
[319] Boddohi S, Killingsworth CE, Kippe MJ. Polyelectrolyte multilayer assembly as a function of pH and ionic strength using the polysaccharides chitosan and heparin. *Biomacromolecules* 2008; 9: 2021–2028.
[320] Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in inflammatory disease. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 6008.
[321] Shoshani Y, Pe'er J, Doviner V, et al. Increased expression of inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in pseudophakic corneal edema. *Investig Opthalmology Vis Sci* 2005; 46: 1940.
[322] Manicone A, Mcguire J. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19: 34–41.
[323] Carterson AJ, Bentrup KH zu, Ott M, et al. A549 lung epithelial cells grown as three-dimensional aggregates: Alternative tissue culture model for Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. *Infect Immun* 2005; 73: 1129–1140.
[324] Gargouri M, Sapin A, Bouli S, et al. Optimization of a new non-viral vector for transfection: Eudragit nanoparticles for the delivery of a DNA plasmid. *Technol Cancer Res Treat* 2009; 8: 433–444.
[325] Eidi H, Joubert O, Attik G, et al. Cytotoxicity assessment of heparin nanoparticles in NR8383 macrophages. *Int J Pharm* 2010; 396: 156–165.
[326] Katzer T, Chaves P, Bernardi A, et al. Prednisolone-loaded nanocapsules as ocular drug delivery system: development, in vitro drug release and eye toxicity. *J Microencapsul* 2014; 31: 519–528.
[327] Seo CS, Lim HS, Jeong SJ, et al. Anti-allergic effects of sesquiterpene lactones from the root of Aucklandia lappa Decne. *Mol Med Rep* 2015; 12: 7789–7795.
[328] Kim EJ, Hong JE, Lim SS, et al. The hexane extract of Saussurea lappa and its active principle, dehydrocostus lactone, inhibit prostate cancer cell migration. *J Med Food* 2012; 15: 24–32.
[329] Migdal C, Serres M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences* 2011; 27: 405–412.
[330] Favier A. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actual Chim* 2003; 270: 108–115.
[331] Defraigne JO, Pincemail J. Stress oxydant et antioxydants: Mythes et réalités. *Rev Med Liege* 2008; 63: 10–19.
[332] Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv* 2015; 5: 27986–28006.
[333] Saleh EA, Tawfik MS, Abu-Tarboush HM. Phenolic contents and antioxidant activity of various date palm (Phoenix dactylifera L.) fruits from Saudi Arabia. *Food Nutr Sci* 2011; 02: 1134–1141.

[334] Ardekani MRS, Khanavi M, Hajimahmoodi M, et al. Comparison of antioxidant activity and total phenol contents of some date seed varieties from Iran. *Iran J Pharm Res* 2010; 9: 141–146.
[335] Daoud A, Malika D, Bakari S, et al. Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of Date Palm Pollen (DPP) from two Tunisian cultivars. *Arab J Chem* 2019; 12: 3075–3086.
[336] Siahpoosh A, Taleb AM, Almasi H. In vitro evaluation of antioxidant activity and total phenol contents of some extracts from ripe fruits of Phoenix dactylifera var Berhi. *Int J Pharmacogn Phytochem Res* 2016; 8: 1855–1862.
[337] Farías-Campomanes AM, Rostagno MA, Coaquira-Quispe JJ, et al. Supercritical fluid extraction of polyphenols from lees: overall extraction curve, kinetic data and composition of the extracts. *Bioresour Bioprocess* 2015; 2: 45.
[338] Tyśkiewicz K, Konkol M, Rój E. The application of supercritical fluid extraction in phenolic compounds isolation from natural plant materials. *Molecules* 2018; 23: 2625.
[339] Djenidi H, Khennouf S, Bouaziz A. Antioxidant activity and phenolic content of commonly consumed fruits and vegetables in Algeria. *Prog Nutr* 2020; 22: 224–235.
[340] Fernández del Río L, Gutiérrez-Casado E, Varela-López A, et al. Olive oil and the hallmarks of aging. *Molecules* 2016; 21: 163.
[341] Grossberg GT. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Ther Res* 2003; 64: 216–235.
[342] Mesulam M, Guillozet A, Shaw P, et al. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and alzheimer brain. *Neurobiol Dis* 2002; 9: 88–93.
[343] Lane RM, Potkin SG, Enz A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int J Neuropsychopharmacol* 2005; 9: 101.
[344] Ponnusankar S, Elango K, Kadiyala M. Screening of siddha medicinal plants for its in-vitro acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Pharmacogn Mag* 2014; 10: 294.
[345] Ibrahim M, Farooq T, Hussain N, et al. Acetyl and butyryl cholinesterase inhibitory sesquiterpene lactones from Amberboa ramosa. *Chem Cent J* 2013; 7: 116.
[346] Hegazy M-E, Ibrahim A, Mohamed T, et al. Sesquiterpene lactones from Cynara cornigera: Acetyl cholinesterase inhibition and in silico ligand docking. *Planta Med* 2015; 82: 138–146.
[347] Hajimehdipoor H, Mossadegh M, Naghibi F, et al. Natural sesquiterpene lactones as acetylcholinesterase inhibitors. *An Acad Bras Cienc* 2014; 86: 801–806.
[348] Li Q, Wang Z, Xie Y, et al. Antitumor activity and mechanism of costunolide and dehydrocostus lactone: Two natural sesquiterpene lactones from the Asteraceae family. *Biomed Pharmacother* 2020; 125: 109955.
[349] Padilla-Gonzalez GF, dos Santos FA, Da Costa FB. Sesquiterpene lactones: More than protective plant compounds with high toxicity. *CRC Crit Rev Plant Sci* 2016; 35: 18–37.
[350] Frasco MF, Colletier JP, Weik M, et al. Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. *FEBS J* 2007; 274: 1849–1861.
[351] Moorad DR, Luo C, Saxena A, et al. Purification and determination of the amino acid sequence of equine serum butyrylcholinesterase. *Toxicol Methods* 1999; 9: 219–227.
[352] De-Espinosa LM, Ronda JC, Gallià M, et al. Quinoline-containing networks from enone and aldehyde triglyceride derivatives. *J Polym Sci Part A Polym Chem* 2008;

46: 7207–7224.
[353] Moreno M, Lligadas G, Ronda JC, et al. Phospha-Michael addition to enone-containing triglyceride derivatives as an efficient route to flame retardant renewable thermosets. *J Polym Sci Part A Polym Chem* 2012; 50: 3206–3213.
[354] Jabir NR, Khan FR, Tabrez S. Cholinesterase targeting by polyphenols: A therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther* 2018; 24: 753–762.
[355] Jung M, Park M. Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from Agrimonia pilosa. *Molecules* 2007; 12: 2130–2139.
[356] Lan J-S, Hou J-W, Liu Y, et al. Design, synthesis and evaluation of novel cinnamic acid derivatives bearing N -benzyl pyridinium moiety as multifunctional cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2017; 32: 776–788.
[357] Balkis A, Tran K, Lee YZ, et al. Screening flavonoids for inhibition of acetylcholinesterase identified Baicalein as the most potent inhibitor. *J Agric Sci* 2015; 7: 26–35.
[358] Nair VP, Hunter JM. Anticholinesterases and anticholinergic drugs. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain* 2004; 4: 164–168.
[359] Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes* 2015; 6: 850–867.
[360] Sheard NF, Clark NG, Brand-Miller JC, et al. Dietary carbohydrate (amount and type) in the prevention and management of diabetes: a statement by the american diabetes association. *Diabetes Care* 2004; 27: 2266–2271.
[361] Agarwal P, Gupta R. Alpha-amylase inhibition can treat diabetes mellitus. *Res Rev J Med Heal Sci* 2016; 5: 1–8.
[362] Naquvi KJ, Ahamad J, Mir SR, et al. Review on role of natural alpha-glucosidase inhibitors for management of diabetes mellitus. *Int J Biomed Res* 2011; 2: 374-380.
[363] Raafat K, El-Darra N, Saleh F, et al. Optimization of infrared-assisted extraction of bioactive lactones from Saussurea lappa L. and their effects against gestational diabetes. *Pharmacogn Mag* 2019; 15: 208–218.
[364] Eliza J, Daisy P, Ignacimuthu S, et al. Normo-glycemic and hypolipidemic effect of costunolide isolated from Costus speciosus (Koen ex. Retz.)Sm. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chem Biol Interact* 2009; 179: 329–334.
[365] Li W., Zheng H., Bukuru J, et al. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol* 2004; 92: 1–21.
[366] Faridmoayer A, Scaman CH. Binding residues and catalytic domain of soluble Saccharomyces cerevisiae processing alpha-glucosidase I. *Glycobiology* 2005; 15: 1341–1348.
[367] El-Shora HM, Metwally MA, Khlaf SA. Essential groups and stability of α-glucosidase ofPenicillium notatum. *Ann Microbiol* 2009; 59: 285–291.
[368] Schramm M. Unmasking of sulfhydryl groups in pancreatic α-amylase. *Biochemistry* 1964; 3: 1231–1234.
[369] Shanker K, Mohan GK, Hussain MA, et al. Green biosynthesis, characterization, in vitro antidiabetic activity, and investigational acute toxicity studies of some herbal-mediated silver nanoparticles on animal models. *Pharmacogn Mag* 2017; 13: 188–192.
[370] Kavitha K, Sujatha K, Manoharan S. Biotherapeutic discovery development,

characterization and antidiabetic potentials of Nilgirianthus ciliatus nees derived nanoparticles. *J nanodemicine Biother Discov* 2017; 7: 152.
[371] Teng H, Chen L. α-Glucosidase and α-amylase inhibitors from seed oil: A review of liposoluble substance to treat diabetes. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017; 57: 3438–3448.
[372] Vassiliou EK, Gonzalez A, Garcia C, et al. Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF- both in vitro and in vivo systems. *Lipids Health Dis* 2009; 8: 1–10.
[373] Nguyen T, Um B, Kim S. Two unsaturated fatty acids with potent alpha-glucosidase inhibitory activity purified from the body wall of sea cucumber (Stichopus japonicus). *J Food Sci* 2011; 76: 208–214.
[374] Su CH, Hsu CH, Ng LT. Inhibitory potential of fatty acids on key enzymes related to type 2 diabetes. *BioFactors* 2013; 39: 415–421.
[375] Miyazawa M, Yagi N, Taguchi K. Inhibitory compounds of alpha-glucosidase activity from Arctium lappa L. *J Oleo Sci* 2005; 54: 589–594.
[376] Nyambe-Silavwe H, Villa-Rodriguez JA, Ifie I, et al. Inhibition of human α-amylase by dietary polyphenols. *J Funct Foods* 2015; 19: 723–732.
[377] Fujisawa T, Ikegami H, Inoue K, et al. Effect of two α-glucosidase inhibitors, voglibose and acarbose, on postprandial hyperglycemia correlates with subjective abdominal symptoms. *Metabolism* 2005; 54: 387–390.

LISTE DES ANNEXES

Annexe A

Réactifs, produits chimiques et enzymes utilisés

Tous les réactifs, produits, enzymes et milieux de culture avec leurs caractéristiques sont regroupés dans le Tableau ci-dessous :

Tableau A.1. Caractéristiques des réactifs, produits chimiques et enzymes utilisés.

Produit utilisés				
Produit chimique	***CAS***	***Fournisseur***	***Pureté (%)***	***Masse (g/mol)***
1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)	1898-66-4	Sigma-Aldrich	-	394.32
Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS)	30931-67-0	Sigma-Aldrich	-	548.68
Persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$)	7727-21-1	Sigma-Aldrich	≥ 99	270.32
Acétate d'ammonium ($C_2H_7NO_2$)	631-61-8	Merck Millipore (Supelco)	-	77.08
Chlorure de cuivre ($CuCl_2$)	7447-39-4	Sigma-Aldrich	≥ 99	134.45
Néocuproine ($C_{14}H_{12}N_2$)	484-11-7	Sigma-Aldrich	≥ 98	208.26
Chlorure de fer ($FeCl_3$)	7705-08-0	Sigma-Aldrich	≥ 99	162.20
Ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$)	13746-66-2	Sigma-Aldrich	≥ 99	329.24
Carbonate de sodium (Na_2CO_3)	497-19-8	Sigma-Aldrich	≥ 99	105.99
Folin-Ciocalteu	521-24-4	Sigma-Aldrich	≥ 99	260.20
Acide gallique	149-91-7	Supleco	-	170.12
Hydroxyanisole butylé (BHA)	25013-16-5	Sigma-Aldrich	≥ 98.5	180.24
Acide 5,5′-dithiobis (2nitrobenzoïque)	69-78-3	Sigma-Aldrich	≥ 98	396.35
Iodure d'acétylthiocholine	1866-15-5	Sigma-Aldrich	≥ 98	289.18
Iodure de S-butyrylthiocholine	1866-16-6	Sigma-Aldrich	≥ 98	317.23
Galantamine	1953-04-4	Sigma-Aldrich	≥ 99	368.27
4-nitrophényl α-D-glucopyranoside	3767-28-0	Sigma-Aldrich	≥ 99	301.25
Acarbose	56180-94-0	Sigma-Aldrich	≥ 95	645.60
Iodure de potassium (KI)	7681-11-0	Biochem Chemopharma	≥ 99	166.00
Iode solide (I_2)	7553-56-2	Sigma-Aldrich	≥ 99.8	253.81
Amidon	9005-25-8	Sigma-Aldrich		
Hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4)	7558-79-4	Sigma-Aldrich	≥ 99	141.96
Dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4)	7558-80-7	Sigma-Aldrich	≥ 99	119.98
Enzymes utilisées				
Enzyme	***CAS***	***Fournisseur***	***Origine***	***Type***

Alpha-glucosidase	9001-42-7	Sigma-Aldrich	*Saccharomyces cerevisiae*	Type I, ≥10 U/mg
Alpha-amylase	9001-19-8	Sigma-Aldrich	*Aspergillus oryzaewere*	≥150 U/mg
Acétylcholinestérase	9000-81-1	Sigma-Aldrich	*Electrophorus electricus*	Type-VI-S, EC 3.1.1.7, 200-1,000U/mg
Butyrylcholinestérase	9001-08-5	Sigma-Aldrich	Sérum de cheval	EC 3.1.1.8, ≥10U/mg

Produits et réactifs pour traitement cellulaire

Produit	***Nom***	***Origine***
FBS	Fetal Serum Bovine	Gemini® Bio-Products, West Sacremento, CA
Mélange d'antibiotique	Pénicilline-Streptomycine (10000 U/mL)	Life Technologies®, Grand Island, États-Unis
RNAlater	-	Invitrogen ®,Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, États-Unis
PBS+	Dubecco's Phosphate Buffered Saline (avec $CaCl_2$ et $MgCl_2$)	Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, États-Unis
PBS-	Dubecco's Phosphate Buffered Saline (sans $CaCl_2$ et $MgCl_2$)	Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis
BSA	Bovine Serum Alcaline	Sigma-Aldrich
LPS	Lipopolysaccharide	Issu de *Salmonella abortus* equi S-form (Enzo Life Sciences, Lörrach, Allemagne).
Trypsine	Issue du pancréas de bovin	Sigma Aldrich
Tris-HCl	-	BioRad, États-Unis
Acrylamide/Bisacrylamide	Solution 40%	Sigma Aldrich
SDS	Dodécylsulfate de sodium	Sigma Aldrich
Gélatine	-	Sigma Aldrich
APS	Persulfate d'ammonium	BioRad, États-Unis
TEMED	N,N, N',N'-tétraméthylène diamine	Life Techologies®, Grand Island, États-Unis
Tampon 10X	-	BioRad, États-Unis
Triton X-100	Polyéthylène glycol tert-octylphényl éther	VWR™, États-Unis
Bleu de Coomassie	Brilliant Blue G 250	Serva Electrophoresis™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, États-Unis
Bleu laemmli 5X	-	BioRad, États-Unis
Glycérol	-	Sigma Aldrich
Eau RNAase free	-	Millipore

Buffer Lysis DRP	DNA + RNA + Protein Extraction Kit (E3597)	Biobasics INC (Ontario, Canada)
GT solution	-	Biobasics INC (Ontario, Canada)
NT solution	-	Biobasics INC (Ontario, Canada
Milieu de culture	***Nom***	***Origine***
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagles Medium-Nutrient Mixture F-1	Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis

Annexe B

Extraction de l'huile de costus

Une étude paramétrique été effectuée afin d'examiner l'effet de trois paramètres à savoir : la pression ; la température ; et le diamètre des particules sur le rendement d'extraction de l'huile de costus indien par CO_2 supercritique ; des expériences préliminaires sont réalisées selon les conditions illustrées dans le **Tableau A.2.** Les résultats de ces expériences sont montrés dans les **Figures A.1** et **A.2**.

Tableau A.2. Conditions opératoires utilisées pour l'extraction de l'huile de costus.

Expérience	Température (°C)	Diamètre (mm)	Pression (bar)
E1	40	0.6	100
E2	50	0.6	100
E3	60	0.6	100
E4	40	0.3	100
E5	40	0.9	100
E6	40	0.3	150
E7	40	0.3	200

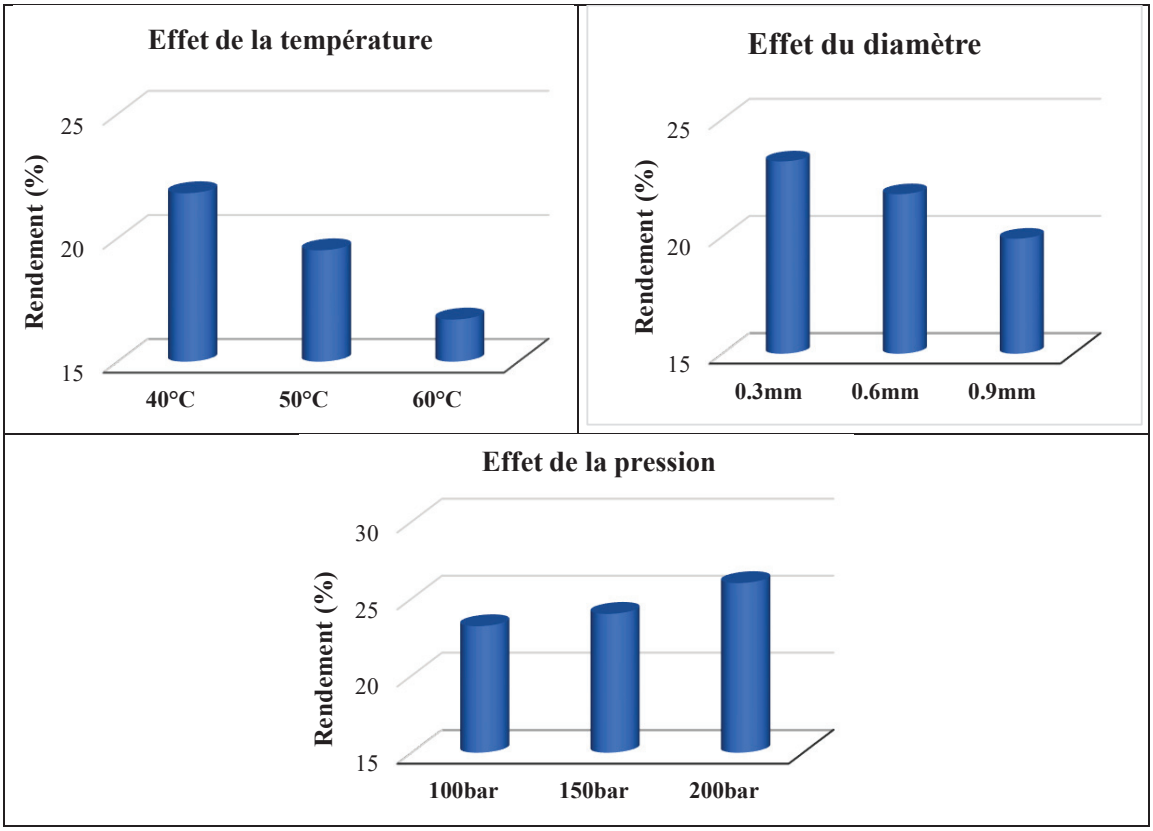


Figure A.1. Effet des différents facteurs sur le rendement de l'huile de costus.

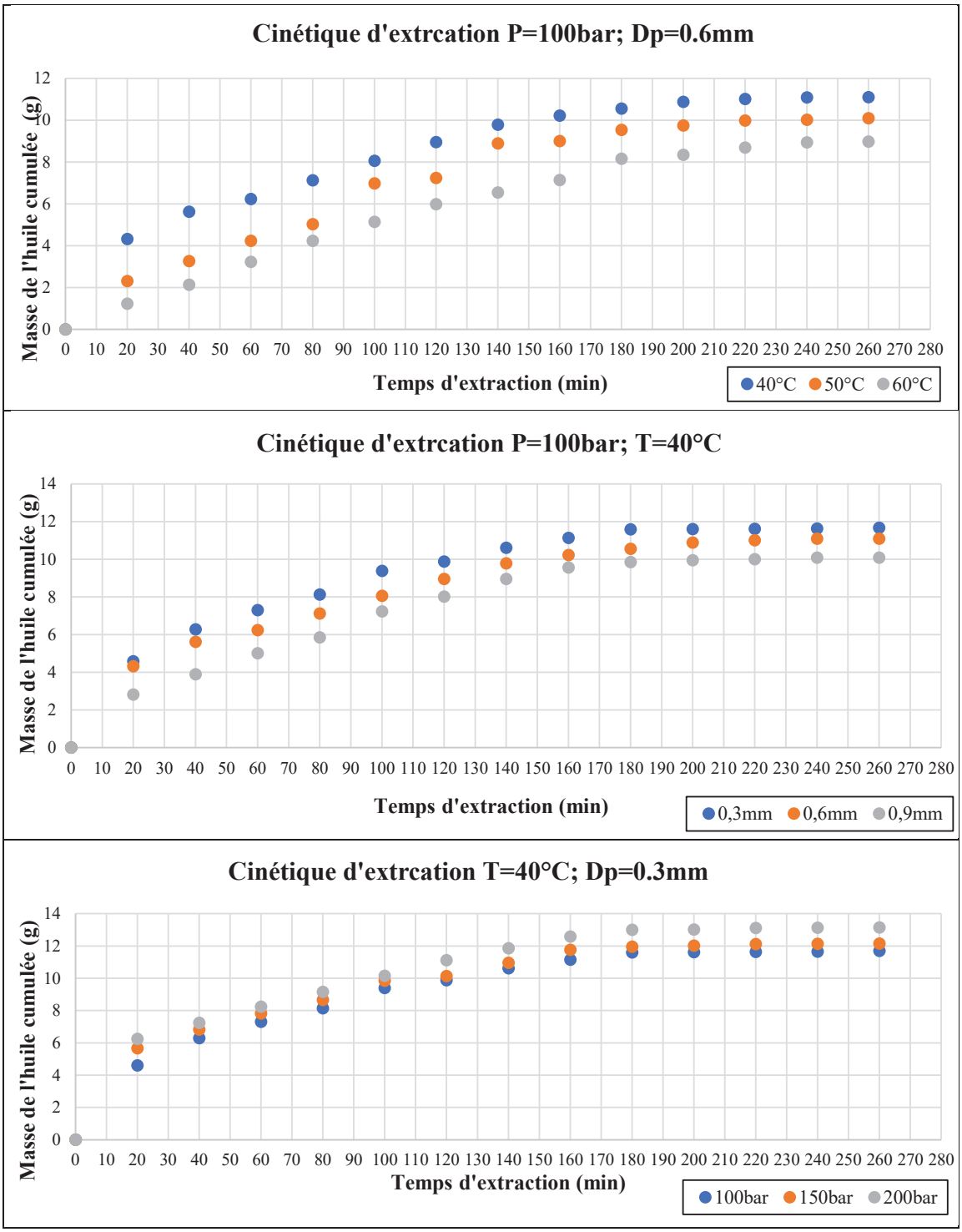


Figure A.2. Analyse des cinétiques d'extraction de l'huile de costus. P : Pression ; T : Température et Dp : Diamètre des particules.

D’après les résultats illustrés ci-dessus, les trois paramètres étudiés avaient un effet remarquable sur le rendement de l’extraction de l'huile de costus indien. L’étude de l’effet de la température montre qu’une augmentation de la température entraine une baisse du rendement, cela est attribué au fait qu’à faible pression (100bar), la perte du pouvoir solvant domine sur l’augmentation de la tension de vapeur du solvant, ce qui entraine une diminution de la solubilité, réduisant ainsi le rendement.

L’étude de l’effet du diamètre a montré que l’augmentation du diamètre des particules influe négativement sur le rendement de l’extraction. Ceci est attribué à la diminution de la surface de contact entre la matrice végétale et le solvant (CO_2).

L’effet de la pression sur le rendement de l’HE du costus est réalisé en fixant la température à 40°C et le diamètre à 0.3mm. Nous notons qu’une augmentation de la pression entraine une augmentation du pouvoir solvant ce qui se traduit par une amélioration du rendement d’extraction

L’observation visuelle des différents échantillons a révélé que l’huile extraite à 150 et 200bar est très visqueuse et se solidifie à température ambiante. C’est peut-être dû à la présence d’autres constituants autre que l’HE. Afin d’éviter cet état de l’extrait, une pression de 100bar est choisie où l’essence est liquide à température ambiante. En résumé, les conditions optimales étaient fixées à : Température (40°C), diamètre (0.3mm) et pression (100bar).

Annexe C

Conditions opératoires le la lyophilisation

élation : Periode de maintien de la congélation : 0 min Vide partiel d'isolation cuve : 5 Sec

ature produits pour fin de congélation : -33 °C

ature étagères pour demande chargement : 20.0 °C Type acquittement chargement : Automatique

Consignes température étagères pour congélation

T° en fin de rampe	-40.0 °C	-40.0 °C	-50.0 °C	-50.0 °C	-50.0 °C	-50.0 °C	-50.0 °C	-50.0 °C	-50.0 °C	-40.0 °C
Durée d'application	03H00mn	03H00mn	00H00mn	00H00mn	00H00mn	00H00mn	00H00mn	00H00mn	00H00mn	00H00mn

hilisation primaire :

lyophilisation primaire sur : Durée chauffe et température produits

e de maintien en fin de lyophilisation primaire : 2 min

érature étagères en début de première rampe : -40 °C

Température à atteindre pour la fin de lyophilisation primaire : -2 °C

Niveau de vide necessaire pour le depart chauffe : 1.102 mBar

Consignes température étagères pour lyophilisation primaire

Consigne vide	0.173	0.173	0.173	0.173	0.173	0.173	0.173	0.100	0.100	0.100
T° en fin de rampe	-40.0 °C	-35.0 °C	-35.0 °C	-20.0 °C	-20.0 °C	-5.0 °C	-5.0 °C	5.0 °C	5.0 °C	5.0 °C
Durée d'application	00H15mn	01H30mn	09H00mn	01H00mn	04H00mn	01H17mn	04H00mn	00H00mn	00H00mn	A la fin

ohilisation secondaire :

ode N°	Durée de la Periode	Consigne T°	Consigne pression	Periode N°	Duree de la Periode	Consigne T°	Consigne pression
	4 jours 0 heures 40 minutes	15 °C	0.010 mBar	11			

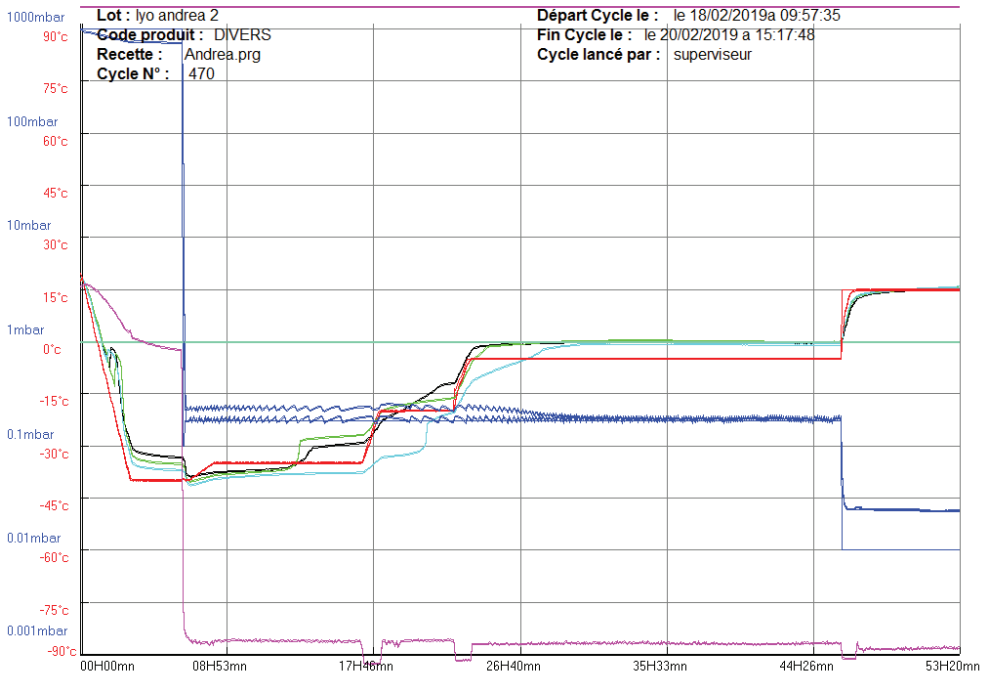


Figure A.3. Conditions opératoires de la lyophilisation.

Annexe D

Analyse des huiles par UV-Visible

D.1. Validation de la méthode analytique UV-Visible de l'huile des noyaux de dattes

Pour valider la méthode d'analyse, une solution mère de l'huile des noyaux de dattes dans du chloroforme (20mg/ml) avec cinq solutions étalons (0.8, 1, 2, 4, 6 et 8 mg/ml) sont préparées. Les absorbances des solutions sont ensuite lues grâce au spectrophotomètre UV et la courbe est tracée par la suite.

D.1.1. Détermination de la longueur d'onde

Le maximum d'absorption défini pour l'huile des noyaux de dattes est de 274.8 nm d'après la **Figure A.4**.

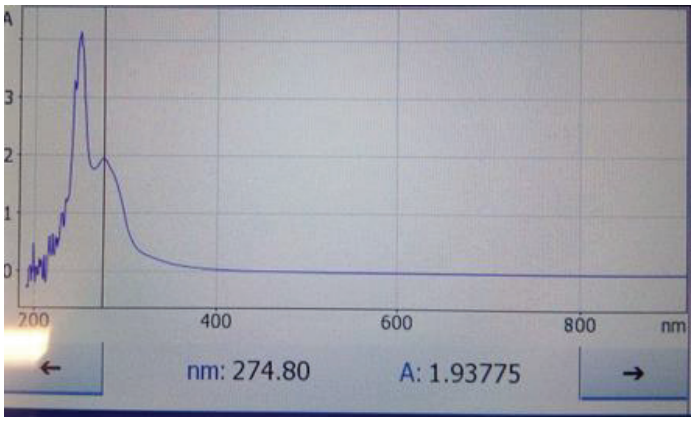


Figure A.4. Sélection de la longueur d'onde maximale de l'huile des noyaux de dattes.

D.1.2. Linéarité de la gamme d'étalonnage

Les résultats obtenus après l'analyse en UV-visible des différentes solutions étalons sont montrés sur le **Tableau A.3.**

Tableau A.3. Absorbances des solutions étalons à différentes concentrations.

C (mg/ml)	Absorbance
0.8	0.109
1.0	0.128
2.0	0.209
4.0	0.415
6.0	0.605
8.0	0.778

La représentation graphique des résultats obtenus et le tracé de la courbe de tendance donne une droite, avec un coefficient de corrélation de 0.9992 **(Figure A.5).**

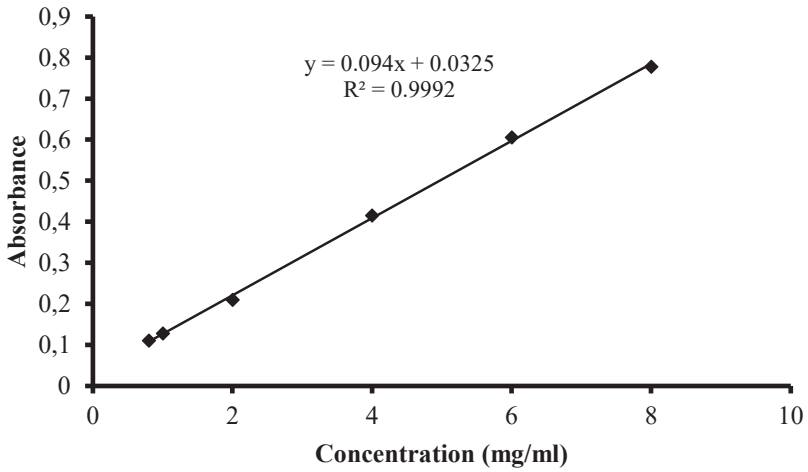


Figure A.5. Courbe d'étalonnage de l'huile des noyaux de dattes.

D.1.3. Exactitude

Les taux de recouvrements de trois solutions sont calculés d'après l'équation A.1 et les résultats sont mentionnés dans le **Tableau A.4.**

$$Taux\ de\ recouvrement\ (\%) = \frac{Concentration\ calculée}{Concentration\ introduite} \times 100 \quad (A.1)$$

Tableau A.4. Etude d'exactitude de la méthode.

Concentration (mg/ml)	Absorbance	Concentration calculée (mg/ml)	Taux de recouvrement (%)
1	0.126	0.994	99.460
2	0.221	2.005	100.260
4	0.409	4.005	100.130

Les taux de recouvrement sont tous supérieurs à 99%, ce qui confirme l'exactitude de la méthode.

D.1.4. Précision

Les écarts-types relatifs (RSD) pour les mesures inter-day et intra-day sont calculés en appliquant l'équation A.2 et les résultats sont illustrés dans le **Tableau A.5.**

$$Ecart\ type\ relatid\ (\%) = \frac{\sigma}{m} \times 100 \quad (A.2)$$

Où, m est la moyenne, σ est l'écart type

Tableau A.5. Etude de répétabilité intra- et inter-day.

Concentration (mg/mL)	Intra-day			Inter-day		
	Moyenne	SD	RSD	Moyenne	SD	RSD
1	0.118	0.004	4.000	0.132	0.005	4.370
2	0.182	0.003	1.830	0.186	0.012	6.460
4	0.418	0.005	1.265	0.425	0.012	2.930

SD: Ecart type; RSD: écarts-types relatifs

Tous les RSD sont inférieurs à 10.0% (**Tableau A.5**), ce qui confirme la répétabilité de la méthode d'analyse.

D.1.5. Limites de détection et de quantification

Les valeurs de limite de détection (LOD) et de limite de quantification (LOQ) sont de 0.13 et 0.44 mg/ml, respectivement.

D.2. Analyse de l'huile de costus par UV-Visible

Plusieurs pics apparaissent dans le spectre UV-visible de l'huile de costus, ce qui rend cette méthode inutile.

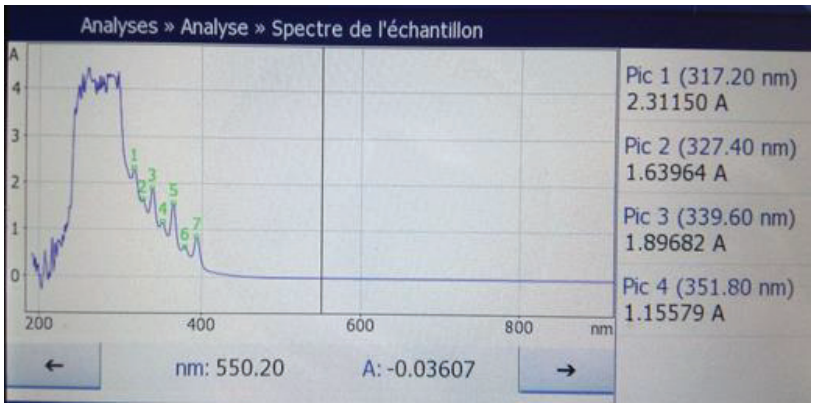


Figure A.6. Sélection de la longueur d'onde maximale de l'huile de costus.

Annexe E

Activité anti-inflammatoire

E.1. Préparation des concentrations

Pour la préparation des aliquots des différentes solutions, on se sert de l'équation (A.3):

$$C_1 .V_1 = C_2 .V_2 \quad (A.3)$$

Où C_1 : la concentration de la solution de NP (4mg/ml),

V_1 : le volume prélevé,

C_2 : La concentration finale,

V_2 : le volume de la solution finale.

V_2 = (Volume de la solution dans un puit X nombre de puits) +1 volume mort

= (1ml X 3) + 1 = 4ml.

Aliquots de NP contenant l'huile

200µg/ml ⟶ 200µl solution mère + 3.8ml milieu de culture

100µg/ml ⟶ 100µl solution mère + 3.9ml milieu de culture

75µg/ml ⟶ 75µl solution mère + 3.925ml milieu de culture

50µg/ml ⟶ 50µl solution mère + 3.950ml milieu de culture

25µg/ml ⟶ 25µl solution mère + 3.975ml milieu de culture

12.5µg/ml ⟶ 12.5µl solution mère + 3.987ml milieu de culture

Aliquots de NP vides

Pour le test de cytotoxicité : 200µl solution mère + 3.9ml milieu de culture

Pour les autres tests : 25µl solution mère + 3.975ml milieu de culture

Aliquots de la solution d'huile

200µg/ml ⟶ 800µl d'huile + 1.6ml DMSO + 1.6ml milieu de culture

E.2. Test de cytotoxicité LDH

E.2.1. Préparation de Reaction Mixture

- Dans un flacon de 15ml, dissoudre un tube de « *Substrate Mix* » dans 11.4ml d'eau.

- Décongeler un tube de « *Assay Buffer* » (0.6ml) à température ambiante.

- Mélanger l'*Assay Buffer* avec le *Substrate Mix* et conserver à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

E.2.2. Préparation du contrôle positif

Mélanger 1µl de LDH Positive Control avec 10ml de PBS^{+} et 1% BSA.

E.3. Extraction de l'ADN

- Mettre 350 µl de *Buffer Lysis DRP tampon* dans les puits contenant les A549.
- Gratter
- Transférer en tube 1.5ml
- Centrifuger 3min à 12000g à 4°C
- Récupérer le surnageant et le placer sur colonne EZ-10 DNA
- Incuber 1min à température ambiante
- Centrifuger 1min à 9000g
- Conserver l'éluat en eppendorf dans la glace.

E.4. Extraction de l'ARN

- Ajouter 250 µl à l'éluat conservé, homogénéiser
- Déposer le mélange sur colonne RZ-10 DNA
- Centrifuger 1min à 9000g
- Conserver l'éluat en eppendorf dans la glace
- Ajouter 500 µl de *GT solution*
- Incuber 1min à température ambiante
- Centrifuger 1min à 9000g
- Eliminer l'éluat
- Centrifuger 1min à 9000g
- Ajouter 500 µl de *NT solution*
- Incuber 1min à température ambiante
- Centrifuger 1min à 9000g
- Eliminer l'éluat
- Centrifuger 2min à 9000g
- Transférer la colonne sur tube de 1.5ml
- Déposer 30 µl d'eau *RNAase free*
- Incuber 2min à température ambiante

- Centrifuger 2min à 9000g pour éluer l'ARN
- Conservation à 4°C puis congélation

E.5. Protocole de la transcription inverse (*SuperScript® IV First-Strand cDNA Synthesis Reaction*)

E.5.1. Hybridation de l'ARN

- Dans un tube de réaction mélanger les composants mentionnés dans le tableau suivant :

Composant	Volume
Amorces Oligo d(T)20 (50µM)	1µl
dNTP mix (10mM)	1µl
ARN matrice	11µl
DEPC (diéthyl pyrocarbonate)-traité l'eau	13µl

- Mélanger et centrifuger brièvement le mélange.
- Chauffer le mélange ARN-amorce à 65 °C pendant 5 min, puis incuber dans la glace pendant au moins 1 min.

E.5.2. Préparation du RT mix

- Dans un tube de réaction, mélanger les composants mentionnés dans le tableau suivant

Composant	Volume
Tampon SSIV	4µl
DTT (100mM)	1µl
RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor	1µl
SuperScript® IV Reverse transcriptase (200U/µL)	1µl

- Mélanger et centrifuger brièvement le mélange.

E.5.3. Combiner l'ARN hybrid avec RT mix

- Incuber le mélange réactionnel à 50–55 °C pendant 10 min.
- Inactiver la réaction en l'incubant à 80 °C pendant 10 min.

E.5.4. Amplification par PCR

Utilisez votre réaction RT immédiatement pour l'amplification par PCR ou conservez-la à -20 °C.

E.6. Protocole de qPCR (Taqman®Fast Advanced Master Mix)

- Dans un tube de réaction, mélanger les composants mentionnés dans le tableau suivant:

Composant	Volume
Taqman®Fast Avanced Master Mix (2X)	10µl
Taqman®Assay (20X)	1µl
Eau sans nucléase	7µl
Volume total par réaction	18µl

- Centrifuger brièvement pour amener le mélange réactionnel au fond du tube et éliminer les bulles d'air.
- Transférer le volume approprié du mélange réactionnel PCR dans chaque puits d'une plaque (96 puits) de réaction optique.
- Ajouter 2µl d'ADNc (1 pg à 100 ng dans de l'eau sans nucléase), dans chaque puits.
- Sceller la plaque avec un film adhésif optique, puis centrifuger brièvement pour amener le mélange de réaction PCR au fond des puits et éliminer les bulles d'air.
- Insérer la plaque dans le thermocycleur. Le programme de la PCR comprend un cycle de dénaturation initiale à 95°C durant 10 min, suivi de 45 cycles d'amplification (dénaturation à 95°C durant 15 secondes et hybridation/élongation à 60°C durant 30 secondes) (**Figure A**.7).

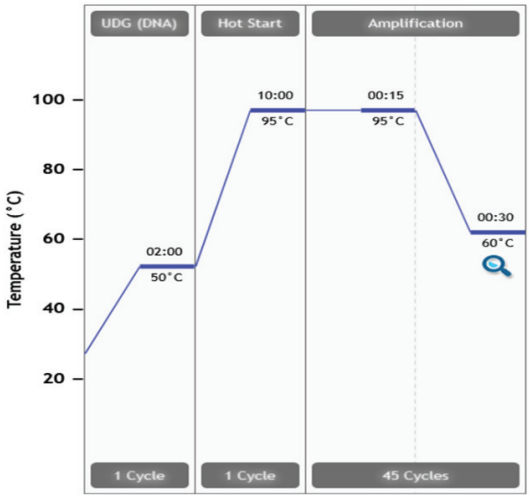


Figure A.7. Programme de PCR.

E.7. Zymographie

E.7.1. Préparation du gel de séparation

Dans un flacon de 50ml, mélanger 3.31 ml d'eau avec :

- Tris-HCl pH 8.8 1.5M (2.5 ml)
- Acrylamide/Bisacrylamide 40% (2.5 ml)
- Dodécylsulfate de sodium (SDS) 10% (100 µl)
- Gélatine 1.5mg/ml (1.5 ml)
- Persulfate d'ammonium (APS) 10% (75 µl)
- N,N, N',N'-tétraméthylène diamine (TEMED) (15 µl)

E.7.2. Préparation du gel de concentration

Dans un flacon de 15ml, mélanger 3.15ml d'eau avec :

- Tris -HCl pH 6.8 0.5M (1.25 ml)
- Acrylamide/Bisacrylamide 40% (500 µl)
- SDS 10% (50 µl)
- APS 10% (37.5 µl)
- TEMED (7.5 µl)

E.7.3. Préparation du tampon de migration (Tris-glycine-SDS)

- Mélanger 100 ml de tampon 10X avec 10ml SDS à 10%.
- Mettre la solution résultante dans 1l d'eau distillée.

E.7.4. Préparation du tampon d'incubation

- Dissoudre 6.06g du Tris (50mM) et 0.74g du $CaCl_2$ (5mM) dans 1l d'eau.
- Ajuster le pH à 7.6 avec du HCl.
- Ajouter 1ml de Triton X-100
- Ajouter 50µl du chlorure de zinc (1mM) pour 100ml de tampon.

E.7.5. Préparation du tampon de coloration

- Dissoudre 5g du bleu de Coomassie dans 50ml d'acide acétique glacial et 200ml du méthanol.
- Compléter à 500ml avec de l'eau distillée.

E.7.6. Préparation du tampon de décoloration

- Mélanger 100ml d'acide acétique avec 200ml du méthanol.
- Compléter à 1l avec de l'eau distillée.

E.7.7. Préparation du tampon de conservation

- Mélanger 50ml d'acide acétique avec 25ml du glycérol.
- Compléter à 550 ml avec de l'eau distillée.

E.8. Extrapolation des résultats de la qPCR

Prenant le cas des cellules A549 traitées par des NP vides, la courbe d'amplification du TNF-α obtenue après une q-PCR de l'ADNc de ces cellules est analysée à l'aide du Logiciel AriaMX et la valeur du cycle seuil (Ct) est de 28.2, comme illustré dans la **Figure A.8.**

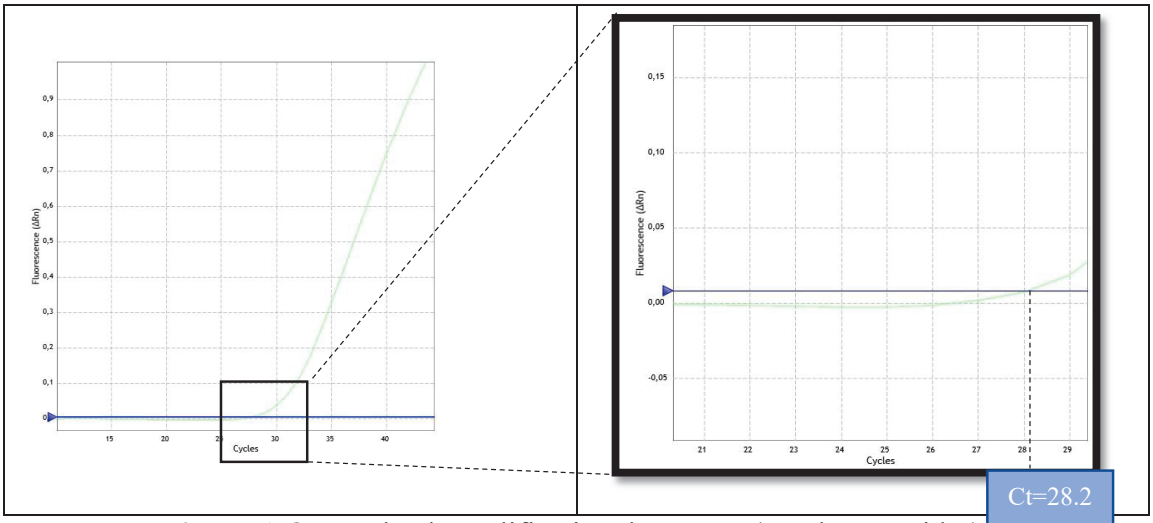


Figure A.8. Courbe d'amplification du TNF-α (cas des NP vides).

Tous les cycles seuils sont déterminés de la même façon et l'expression des gènes codant pour les différents médiateurs inflammatoires (TNF-α, GM-CSF et l'IL-1β) est calculée en utilisant l'équation 3.3 (voir Chapitre III), comme le montre les **Tableau A.6, A.7** et **A.8.**

Tableau A.6. Expression de l'ARNm du médiateur inflammatoire TNF-α.

Echantillons	TBP (Ct)	TNF-α (Ct)	ΔCt	ΔΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
A549	24.25	31.85	7.60	0.00	1.00
LPS	24.59	29.18	4.59	-3.02	8.10
NP vides	23.65	28.23	4.58	-3.02	8.13
NP chargées	23.08	29.17	6.09	-1.51	2.85

Tableau A.7. Expression de l'ARNm du médiateur inflammatoire IL1b.

Echantillons	TBP (Ct)	IL1b (Ct)	ΔCt	ΔΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
A549	24.25	24.25	28.9	0.00	1.00
LPS	24.59	24.59	28.29	-0.61	1.53
NP vides	23.65	23.65	27.91	-0.99	1.99
NP chargées	23.08	23.08	28.83	-0.07	1.05

Tableau A.8. Expression de l'ARNm du médiateur inflammatoire GM-CSF.

Echantillons	TBP (Ct)	GM-CSF (Ct)	ΔCt	ΔΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
A549	24.77	30.89	6.12	0.00	1.00
LPS	24.67	29.71	5.04	-1.08	2.12
NP vides	23.00	27.98	4.98	-1.14	2.20
NP chargées	24.445	30.7	6.26	0.13	0.91

Annexe F

Activité antioxydante

F.1. Solution de DPPH

- Dissoudre 6 mg de DPPH dans un 100 ml du méthanol
- Vérifier l'absorbance à 517 nm (elle doit être comprise entre 0.4 et 0.5).
- Conserver la solution à -20°C à l'abri de la lumière.

F.2. Solution d'ABTS$^{\bullet+}$

- Mélanger 7mM d'ABTS dans l'eau avec 2,45 mM de persulfate de potassium.
- Conserver la solution à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 12 h avant utilisation pour que la solution se stabilise.
- Avant utilisation, vérifier l'absorbance à 734 nm (elle doit être comprise entre 0.6 et 0.7).

F.3. Solution d'acétate d'ammonium (1M)

Dissoudre 1.927 g d'acétate d'ammonium dans 25 ml d'eau (pH 7)

F.4. Solution de chlorure de cuivre (10mM)

Dissoudre 0.0426 g du chlorure de cuivre dans 25 ml d'eau.

F.5. Solution de néocuproine (7.5mM)

Dissoudre 0.039 g de la néocuproine dans 25 ml du méthanol.

F.6. Préparation de Folin Ciocalteu 0.1N

1ml de la solution deuFolin Ciocalteu concentré (2M) est complété à 10ml avec de l'eau distillée (9ml).

F.7. Teneur en polyphénols totaux

Le principe de la méthode adoptée est basé sur le fait qu'en présence de phénols, le réactif de Folin-Ciocalteu, constitué par un mélange d'acide phosphomolybdique et d'acide phosphotungstique est réduit en mélange d'oxydes de tungstène et de molybdène de couleur bleu et qui absorbe à 765 nm.

A. Protocole

Une solution de carbonate de sodium à 7.5% **(**80 µl) est mélangée avec 20 µl de l'huile de noyaux de dattes (1mg/ml) et 100µl du réactif de Folin-Ciocalteu (0.1N). Le mélange est

laissé à l'obscurité pendant 2h. Ensuite, l'absorbance est lue à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'ondes de 765 nm. Une courbe d'étalonnage de 25 à 200 µg/ml est établie avec de l'acide gallique dans les mêmes conditions que l'huile à analyser. La teneur en polyphénols totaux est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'huile (mg EAG/g d'huile).

B. Gamme d'étalonnage de l'acide gallique

Une solution mère de l'acide gallique dans du méthanol (0.2mg/ml) avec huit dilutions (25, 50, 70, 100, 125, 150, 175 et 200 µg/ml) ont été préparées. Dans une microplaque, pipetter 20µl de chaque dilution et ajouter 100µl de la solution Folin Ciocalteu (0.1N) et 80µl du carbonate de sodium (7.5%). Les absorbances sont lues à 765nm après incubation pendant 2h. La droite d'étalonnage est illustrée dans la **Figure A.9.**

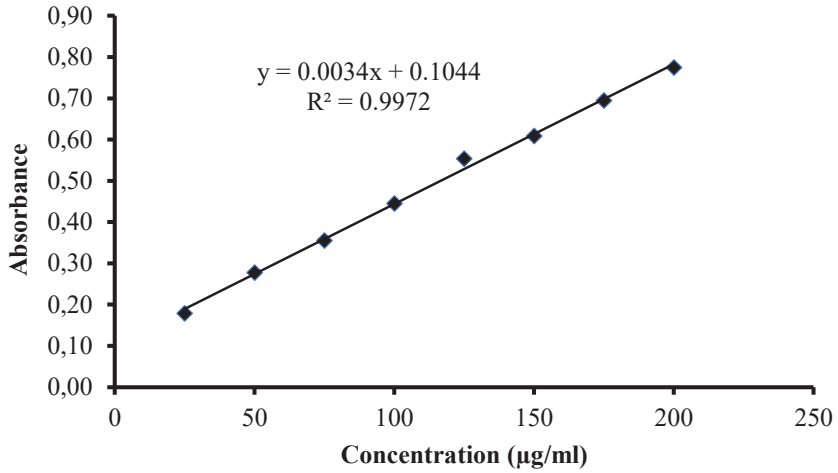


Figure A.9. Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

Annexe G

Activité enzymatique

G.1. Solution tampon

1- 1.56 g de NaH_2PO_4 + 100 ml H_2O → V1

2- 8.890 g de Na_2HPO_4 + 500 ml H_2O → V2

3- V1 +V2 → Solution Tampon comme le montre le tableau ci-dessous ; on ajuste le pH avec du NaOH.

PH	5.8	6.2	6.4	6.6	6.8	7	7.2	7.4	7.6	7.8	8
Na_2HPO_4 (ml)	8	18.5	26.5	37.5	49	61	72	81	87	91.5	94.5
NaH_2PO_4 (ml)	92	81.5	73.5	62.5	51	39	28	19	13	8.5	5.3

G.2. Activité anti-cholinestérase

G.2.1. Solution d'acétylcholinestérase

- Dissoudre 0.2 mg d'acétylcholinestérase dans 4 ml du tampon (PH=8) → Solution mère
- Aliquoter chaque 20 µl de la solution mère d'enzyme dans un eppendorf
- Conserver les eppendorfs dans le congélateur à -20°C.
- Pour le test, diluer un eppendorf dans 3 ml de tampon (PH = 8).
- Contrôler l'absorbance à 412 nm (elle doit être comprise entre 0.4 et 0.5).

G.2.2. Solution de butyrylcholinestérase

- Dissoudre 0.2 mg de butyrylcholinestérase dans 1 ml du tampon (PH=8) → Solution mère
- Aliquoter chaque 20 µl de la solution mère d'enzyme dans un eppendorf
- Conserver les eppendorfs dans le congélateur à -20°C.
- Pour le test, diluer un eppendorf dans 2 ml de tampon (PH = 8).
- Contrôler l'absorbance à 412 nm (elle doit être comprise entre 0.4 et 0.5).

G.2.3. Solution d'acide 5,5′-dithiobis (2nitrobenzoïque)

- 16 mg d'acide 5,5′-dithiobis (2nitrobenzoïque) + 1 ml tampon (PH=7) → Solution A
- 7.5 mg de Bicarbonate de sodium + 1 ml tampon (PH=7) → Solution B

- Solution A + Solution B + 2 ml tampon (PH=7) + 4 ml tampon (PH=8) → volume total 8 ml

G.2.4. Solution d'iodure d'acétylthiocholine

Dissoudre 16g d'iodure d'acétylthiocholine İ dans 4 ml d'eau ; puis ajouter 4 ml du tampon (PH =8).

G.2.5. Solution d'iodure de butyrylthiocholine

Dissoudre 4 mg d'iodure de butyrylthiocholine dans 4 ml d'eau, puis ajouter 4 ml du tampon (PH =8)

G.3. Activité anti-diabétique

G.3.1. Solution d'α-glucosidase

- Dissoudre 1 mg de l'α-glucosidase dans 10 ml du tampon (pH=6.9) → solution mère.
- Aliquoter chaque 1 ml de la solution mère d'enzyme dans un eppendorf
- Conserver les eppendorfs dans le congélateur à -20°C.
- Pour le test, diluer un eppendorf dans 9 ml du tampon.

G.3.2. Solution d'α-amylase

- Dissoudre 1 mg de l'α-glucosidase dans 10 ml du tampon (pH=6.9) → solution mère.
- Aliquoter chaque 1 ml de la solution mère d'enzyme dans un eppendorf
- Conserver les eppendorfs dans le congélateur à -20°C.
- Pour le test, diluer un eppendorf dans 9 ml du tampon.

G.3.3. Solution de 4-nitrophényl α-D-glucopyranoside (5mM)

Dissoudre 15.06mg de 4-nitrophényl α-D-glucopyranoside dans 10ml de solution tampon (pH 6.9).

G.3.4. Solution d'amidon 0.1%

Dissoudre 0.1mg d'amidon dans 100ml d'eau et mettre la solution dans un microonde à plusieurs cycles de 15 sec jusqu'à dissolution totale.

G.3.5. Solution d'IKI

Dissoudre 3 g de d'iodure de potassium (KI) dans 100 ml d'eau ; puis ajouter 127 mg d'iode. Agiter le mélange jusqu'à dissolution complète.

Annexe H

Liste des Productions Scientifiques

Publications Internationales

1- Narimane Lammari, Francesca Froiio, Mehdi Louaer, Maria Chiara Cristiano, Chawki Bensouici, Donatella Paolino, Ouahida Louaer, Abdeslam Hassen Meniai, and Abdelhamid Elaissari. Poly (ethyl acrylate-co-methyl Methacrylate-co-trimethylammoniethyl methacrylate chloride) (Eudragit RS100) Nanocapsules as Nanovector Carriers for Phoenix dactylifera L. Seeds Oil: a Versatile Antidiabetic Agent. **Biomacromolecules**, 2020.
DOI: https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255

2- Narimane Lammari, Tanguy Demautis, Ouahida Louaer, Abdeslam Hassen Meniai, Herve Casabianca, Chawki Bensouici, Gilles Devouassoux, Hatem Fessi, Abderrazzak Bentaher, Abdelhamid Elaissari. Nanocapsules Containing Saussurea lappa Essential Oil: Formulation, Characterization, Antidiabetic, Anti-Cholinesterase and Anti-Inflammatory Potentials. **International journal of pharmaceutics**, 2021, 593, 120138.
DOI: https://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120138

3- Narimane Lammari, Ouahida Louaer, Abdeslam Hassen Meniai, Hatem Fessi, Abdelhamid Elaissari. Plant oils: From chemical composition to encapslated form use. **International journal of pharmaceutics**, 2021, 601, 120538.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120538

4- Narimane Lammari, Ouahida Louaer, Abdeslam Hassen Meniai, Abdelhamid Elaissari. Encapsulation of Essential Oils via Nanoprecipitation Process: Overview, Progress, Challenges and Prospects. **Pharmaceutics** 2020, 12, 431.
DOI : https://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics12050431

Chapitres dans des livres

1- Narimane Lammari, Mohamad Tarhini, Kaim Miladi, Wahida Louaer, Abdeslam Hassen Meniai, Souad Sfar, Hatem Fessi, Abdelhamid Elaissari. Chapter 14- Encapsulation methods of active molecules for drug delivery. In ***Drug delivery devices and therapeutic systems***; Fitzpatrick, D., Ed.; Elsevier; pp. 289-306.

2- Francesca Froiio, Narimane Lammari, Mohamad Tarhini, Munther Alomari, Wahida Louaer, Abdeslam Hassen Meniai, Donatella Paolino, Hatem Fessi, Abdelhamid Elaissari. Chapter 16 - Polymer-based nanocontainers for drug delivery. In ***Smart Nanocontainers Micro and Nano Technologies***; Nguyen, T.A., Eds.; Elsevier Science Publishing Co Inc, 2020; pp. 271–285.

Autres Publications Internationales

Liste des annexes

1- Firdos Alam Khan, Lammari Narimane, Siar Adeeb Shezad Muhammad, Mohammed Alkhater Khulood, Asiri Sarah, Akhtar Sultan, Almansour Iman, Alamoudi Widyan, Haroun Woroud, Louaer Wahida, Meniai Abdeslam Hassen, Elaissari Abdelhamid. Quantum dots encapsulated with curcumin inhibit the growth of colon cancer, breast cancer and bacterial cells. **Nanomedicine**, 2020, 15, 969–980. DOI: https://doi-org/10.2217/nnm-2019-0429

pubs.acs.org/Biomac

Article

Poly(ethyl acrylate-*co*-methyl Methacrylate-*co*-trimethylammoniethyl methacrylate chloride) (Eudragit RS100) Nanocapsules as Nanovector Carriers for *Phoenix dactylifera* L. Seeds Oil: a Versatile Antidiabetic Agent

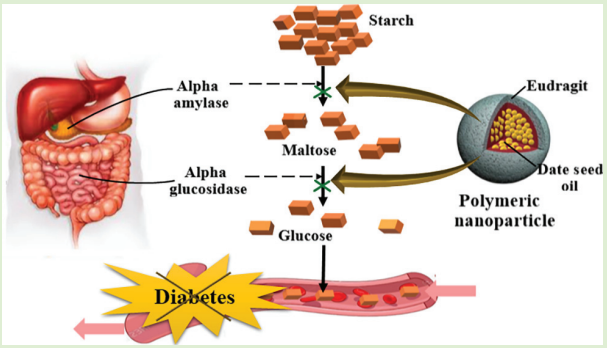
Narimane Lammari, Francesca Froiio, Mehdi Louaer, Maria Chiara Cristiano, Chawki Bensouici, Donatella Paolino, Ouahida Louaer, Abdeslam Hassen Meniai, and Abdelhamid Elaissari*

Cite This: https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255

Read Online

ACCESS | Metrics & More | Article Recommendations | Supporting Information

ABSTRACT: Food waste valorization practices have gained considerable attention focusing on the conversion of the waste into valuable products. In this context, the present study provides an insight into a new Eudragit RS100 based nanosystem as a carrier of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds oil known for its an antidiabetic activity. A priori systematic study was carried out in order to understand the individual impact of all contributing factors considered by the nanoprecipitation method. Then, date seeds oil nanoparticles were prepared, characterized and analyzed for their in vitro inhibition activity against: α-amylase and α-glucosidase. The results showed that the developed nanoparticles had an average diameter around 207 nm, a ζ-potential of +59 mV, and an encapsulation efficiency equal to 97 ± 1% with a loading capacity of 0.48 mg·mg^{-1}. The α-amylase and α-glucosidase IC_{50} were found to be 87.6 and 155.3 μg·mL^{-1}, respectively. Therefore, this study may surely open new perspectives for the development of novel health-promoting plant oils loaded-nanocarriers for several purposes.



1. INTRODUCTION

Diabetes mellitus is a chronic endocrine disorder characterized by hyperglycemia, in which blood sugar levels are high as a result of defects in insulin action, insulin secretion, or both.[1] This metabolic disorder constitutes a major challenge with regards to the life quality and imposes a consistent economic burden on the global health care systems.[2] Life style management and pharmacotherapy constitute the cornerstone of preventing and controlling hyperglycemia. However, 5−10% of the diabetics complain secondary failure as a result of poor patient compliance, dietary changes, weight gain, and reduced activity or exercise.[3] Additionally, treatment with oral hypoglycemic agents is generally linked to several adverse effects, including skin reactions, gastrointestinal discomfort, hematological disorders, nausea, and weight gain.[4,5] Faced with this challenge, the scientists throughout the world turn to phytodrugs to avoid the adverse effects associated with conventional hypoglycemic drugs.[6−8] Piero and co-workers reported that plant-derived medications are crucial in the management of diabetes.[9] For instance, natural products have gained the attention of many researchers as alternative and complementary to chemically synthesized drugs. Besides being edible, plant oils have a variety of uses for human health.[10] Indeed, the demand for plant oil has been rising in pharmaceutical and medicinal fields thanks to their therapeutic properties. Previous published work studies highlighted the paramount role of these phytoagents in treating and preventing several diseases.[11−16]

The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) belongs to the Arecaceae family and is widely distributed in arid and semiarid regions of the world, particularly in the Middle East and North Africa.[17] Date seeds, a byproduct of date processing and consumption, represent 10−15% of the total fruit weight and have been considered as an attractive source of carbohydrates, dietary fibers, proteins, vitamins, and fatty acids.[18] Concurrently, food waste valorization is a recent approach attracting enormous concern throughout the world, leading to the production of a valuable product.[19] A few published works have been reported regarding the valorization of date palm seeds, even though they have been shown to be effective as antioxidant,[20] hepatoprotective,[21] and neuroprotective

Special Issue: Polymer Colloids: From Fundamentals to Application

Received: February 21, 2020
Revised: April 13, 2020
Published: April 14, 2020

Downloaded via UNIV CLAUDE BERNARD LYON 1 on April 29, 2020 at 00:32:04 (UTC).
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

ACS Publications

© XXXX American Chemical Society

agents.[22] In addition, recent studies have put into evidence the antidiabetic potential of date seeds extract.[17,23,24] To the best of our knowledge, the date seeds oil (DS oil) has never been investigated for antidiabetic activity. Recently, we have carried out the extraction of date seeds oil by supercritical carbon dioxide as an alternative to organic solvent extraction processes.[25] Indeed, Supercritical Fluid Extraction (SFE) is an innovative, clean, and environmentally friendly technique that has gained high concern over the traditional or conventional extraction ways like steam-distillation and solvent extraction due to the use of carbon dioxide (CO_2), an inert, nontoxic, nonflammable, and volatile solvent.[26] In addition, it has relatively low critical temperature and pressure (31 °C and 74 bar, respectively), making it very suitable for thermolabile compounds. It is also abundant and available in high purity at relatively low cost and the elimination of its traces from the obtained extract is easy.[27] Nevertheless, the use of DS oil is impeded by its poor aqueous solubility and low bioavailability.[28] Recently, the development of polymer-based nanocarriers has gained emergent concern thanks to their biocompatibility, biodegradability, and nonimmunogenicity properties.[29,30] The polymeric nanoparticles (pNPs) provided a promising platform to encapsulate plant oils in the biological, medicinal, and biomedical fields due to their benefits, including (1) oil protection from degradation or loss, (2) sustained and controlled release, (3) nontoxicity, (4) passive or active targeting, (5) deep tissue penetration, and (6) enhanced biopharmaceutical profile.[31−34] Polymeric nanoparticles include both nanospheres and nanocapsules that, according to the literature, correspond to a polymeric matrix and a polymeric wall surrounding an oil core, respectively.[29,35,36] Natural or synthetic polymers could be used to design pNPs.[37] However, synthetic polymers are more advantageous than natural ones in term of purity and reproducibility.[38,39] Among the several synthetic polymers, Eudragit RS100, a copolymer of ethyl acrylate, methyl-methacrylate, and chlorotrimethyl−ammonio ethyl methacrylate with 4.5−6.8% of quaternary ammonium groups, has been extensively used for developing pNPs.[40−44] Eudragit RS100 seems to be a promising polymer for drug delivery as it is insoluble in aqueous media but is permeable, biocompatible, nontoxic, nonirritant, and provides a controlled drug release.[45] As reported earlier, the topical application of ibuprofen-loaded Eudragit RS100 NPs to rabbit eyes showed no sign of toxicity or irritation with an increased corneal residence time and a better penetration into the anterior chamber of the eye.[46] Similarly, Younis and coworkers revealed the superior ability of silymarin to resolve hepatic fibrosis in bile duct ligated rats when encapsulated in Eudragit RS100 nanoparticles as compared to the free drug.[47] Consequently, the positive charge engendered by Eudragit RS polymer would be expected to facilitate the intimate electrostatic interaction with negatively charged drugs or target tissue surface resulting to maximize cellular uptake of the drug polymer complex.[48,49] Several research works highlighted the efficiency of Eudragit RS100 to target the mucus layer due to its mucoadhesive properties, where an electrostatic interaction was expected between the ammonium groups of Eudragit and negatively charged mucin, the main component of mucosa.[50−53] Additionally, it was reported that terbinafine hydrochloride-loaded Eudragit RS100 nanoparticles exhibit a high electrostatic interaction, with the cornea and conjunctiva having negative charge resulting in maintaining an effective drug concentration at the site of action for prolonged time periods.[48] Similarly, an enhanced adhesion of Eudragit nanoparticles to *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeroginosa* in comparison to anionic polylactic coglycolide nanoparticles was proved.[49] Currently, the stability of Eudragit RS in the gastrointestinal tract and the time-dependent release characteristics allow authors to propose Eudragit RS polymer alone or associated with other polymers as a promising system for colon specific controlled delivery.[54,55]

Among the several methods used for developing pNPs, the nanoprecipitation method is widely used due to its simplicity and reproducibility.[56−58] It was initially patented by Fessi in 1989.[59] It involves the use of two miscible phases: an organic phase, in which the polymer and the active pharmaceutical ingredient (API) are dissolved, and an aqueous phase. Generally, both the polymer and the API must dissolve in the organic phase but not in the second one (the nonsolvent).[60] The nanoprecipitation consists of the addition of one phase to the other one under magnetic stirring, causing the immediate interfacial precipitation of the polymer after diffusion of the organic solvent to the aqueous phase.[34]

As a continuation of the previous work[25] and basing on the information available in literature regarding DS oil, the main objective of the present work was the investigation of the first time ever carried out encapsulation of DS oil, extracted by a supercritical carbon dioxide process, in Eudragit RS100 based-NPs using the nanoprecipitation method, and the assessment of the in vitro antidiabetic activity through α-amylase and α-glucosidase inhibition pathways. For this context, the influence of operating parameters such as polymer amount, organic solvent type, organic/aqueous phase volume ratio, and the stirring speed on the colloidal properties of the free pNPs was investigated. Then, DS oil was encapsulated in the optimized formulation, and the obtained particles were further characterized in terms of particle size, size distribution, zeta potential, encapsulation efficiency, morphology, and stability. Finally, in vitro antidiabetic activity of DS oil and its corresponding NPs was investigated against key enzymes involved in diabetes mellitus: α-amylase and α-glucosidase.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Plant Material. The date palm seeds used in this study were from "Ghars", an Algerian local variety, collected from the Sahara region (Biskra, Algeria). The seeds were cleaned and ground to an approximate size of 0.3 mm. The resultant granules were dried in a vacuum oven for 24 h and stored in an airtight container.

2.2. Chemical Materials. Eudragit RS100 was obtained from Pharma Polymere, Germany. Starch powder, 4-nitrophenyl α-D-glucopyranoside (≥99%), Acarbose (≥95%), α-glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* (Type I, ≥10 units/mg protein), and α-amylase from *Aspergillus oryzae* were all obtained from Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich GmbH, Stern-heim, Germany). Potassium iodide was obtained from Biochem Chemopharma. Deionized water from a Milli-Q system was used in all experiments. All other chemicals and solvents were of analytical grade.

2.3. Supercritical Carbon Dioxide Extraction. A total of 50 g of date seed granules were used for the supercritical carbon dioxide extraction, which was performed by our team work using a dynamic pilot-plant (Separex 4343, type SF2) supplied by Separex (Champigneulles, France) and is schematically shown on Figure 1. The carbon dioxide used was of 99.5% purity and was supplied by SIDAL SPA Air liquid, Algiers, Algeria. The operating extraction parameters and chemical composition were reported in the literature[25] and were as follows: dynamic extraction time, 210 min; CO_2 flow rate, 50 g/min; CO_2 pressure, 250 bar; extraction temperature, 60 °C, separation temperature, 40 °C (Figure 1).

https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255
Biomacromolecules XXXX, XXX, XXX−XXX

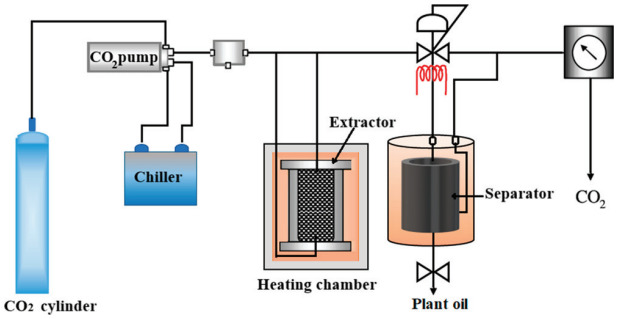


Figure 1. Supercritical carbon dioxide extraction pilot. It mainly consists of a high pressure pump, extraction vessel, pressure regulation system, and one separator vessel. The operating extraction parameters were fixed as follows: CO_2 flow rate, 50 g/min; CO_2 pressure, 250 bar; extraction temperature, 60 °C; and separation temperature, 40 °C.

2.4. Preparation of Free Eudragit-Based Nanoparticles. The pNPs were prepared by means of the nanoprecipitation technique. Three organic solvents were used, acetone, ethanol, and methanol, and the aqueous phase was water. The organic phase was obtained by dissolving Eudragit RS100 in one of the considered organic solvents. Then, it was added carefully and very slowly to the aqueous one at ambient temperature and under moderate magnetic stirring. The evaporation of the organic solvent was performed subsequently using a Buchi Rotavapor R-124.

2.4.1. Effect of Organic/Aqueous Solvent Volume Ratio. A total of 15 Eudragit RS100 organic solutions at concentrations of 16 mg/mL were prepared at different organic/aqueous volume ratios of (1/3, 2/5, 1/2, 2/3, and 1/1). The volume of the nonsolvent was kept at 30 mL for all the experiments. After that, all the prepared formulations were assessed in terms of their particle size, polydispersity index, and ζ-potential.

2.4.2. Effect of Polymer Amount. A total of 15 Eudragit RS100 organic solutions (15 mL) at different concentrations were prepared (16, 28, 40, 52, and 64 mg/mL) using the different solvents. The particle size, polydispersity index, and ζ-potential were again evaluated for all the formulations.

2.4.3. Effect of Stirring Speed. To evaluate the effect of stirring speed on the colloidal properties of the obtained NPs, five Eudragit RS100 organic solutions at concentrations of 16 mg/mL were prepared at a 1/2 volume ratio under three different agitation speeds (300, 500, and 700 rpm), and the obtained nanoparticles were further characterized.

2.5. Preparation of Date Seed Oil-Loaded Eudragit Nanoparticles. To achieve the adequate amounts of vegetable oil to be encapsulated in Eudragit RS100-based NPs through the nanoprecipitation method, different amounts (15, 30, 60, 120, 240, and 300 mg) have been dissolved in Eudragit RS100 organic solution at 16 mg/mL. Then, the organic phase was added to 30 mL of water under magnetic stirring (500 rpm) and ambient temperature.

2.6. Characterization of the Obtained Nanoparticles Dispersion. *2.6.1. Dynamic Light Scattering.* The aqueous suspension of NPs was subjected to analysis by dynamic light scattering (DLS) on a Zetasizer Nano ZS200 (Malvern Instruments, U.K.) to measure the mean particle size, polydispersity index, and ζ-potential. The NPs were dispersed in a 1 mM NaCl solution before every measure. All measurements were carried out in triplicate at ambient temperature and a pH around 6.5.

2.6.2. Transmission Electron Microscopy. Transmission electron microscopy (TEM) was performed with a Philips CM120 microscope at the "Centre Technologique des Microstructures" (CTμ) at the University of Lyon (Villeurbanne, France). A total of 10 μL of suspension was deposited on a microscope grid (copper support covered with carbon) and slowly dried in open air. The dry samples were observed by TEM under 120 kV acceleration voltage. Absorbance was measured by Cary UV−visible spectrophotometer (Varian, Australia), and values were given according to the Beer−Lambert equation at a wavelength of 280 nm.

2.6.3. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was carried out to determine the chemical description of DS oil, Eudragit RS100, and oil-loaded NPs using Thermo Scientific Technologies FTIR spectrometer with IR MONIC solution software.

2.6.4. Encapsulation Efficiency. In order to determine the encapsulation efficiency, a direct method was employed, and a colloid dispersion was subjected to centrifugation at 15000 rpm for 30 min. The supernatant was removed, and the quantity of encapsulated DS oil was measured following total nanoparticles dissolution in chloroform. The resultant solution was filtrated and analyzed by ultraviolet spectrophotometer UV-1800 (Shimadzu, Japan) at λ = 274.8 nm.

The encapsulation efficiency and oil loading were determined by using the following equations:

$$\underset{\text{efficiency}}{\text{encapsulation}}(\text{EE}\%) = \frac{\text{amount of encapsulated date seed oil}}{\text{total amount of date seed oil}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{oil loading}(\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}) = \frac{\text{amount of encapsulated date seed oil}}{\text{total amount of polymer}} \quad (2)$$

The analytical method was subjected to validation in terms of linearity, precision and recovery. The standard curve equation was found to be $Y = 0.094X + 0.0325$ with good regression coefficient (R^2 = 0.9992). The relative standard deviations (RSD) for the interday and intraday precisions were below 10.0%, whereas the oil recovery at different concentrations was in range 99−100%. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values were found to be as 0.13 and 0.44 mg/mL, respectively (Supporting Information).

2.7. Stability Study of Date Seed Oil-Loaded Eudragit-Based Nanoparticles. In order to assess the colloidal stability, the obtained vegetable oil-loaded NPs were stored for a period of one month at 4, 25, and 40 °C. Nanoparticles physical stability was assessed via particle size and ζ-potential measurement. The measurements were carried out after each 10 days.

2.8. In Vitro Antidiabetic Activity. The in vitro antidiabetic activity was based on the assessment of the enzymatic activity by using a 96-well microplate reader, PerkinElmer Multimode Plate Reader EnSpire (National Center of biotechnology Research, Constantine, Algeria).

2.8.1. α-Amylase Inhibition Activity. α-Amylase inhibitory activity was carried out by the Caraway−Somogyi iodine/potassium iodide method as described earlier with slight modifications.[7] A total of 25 μL of sample solution (4 mg/mL; DS oil solution or its corresponding NPs) was mixed in a 96-well microplate with α-amylase solution (50 μL) in phosphate buffer (pH 6.9 with 6 mM sodium chloride) and incubated at 37 °C for 10 min. After preincubation, the reaction was started by adding starch solution (50 μL, 0.1%). Likewise, a blank was prepared by adding sample solution to all reaction reagents without enzyme (α-amylase) solution. The reaction mixture was incubated 10 min at 37 °C. After that, the reaction was stopped by adding 25 μL of HCl (1 M) and followed by the addition of 100 μL of iodine−potassium iodide solution. The sample and blank absorbances were read at 630 nm by a microplate reader. Acarbose was used as a standard (4 mg/mL). The inhibition of α-amylase activity was calculated as follows:

$$\text{inhibition}(\%) = \left(1 - \frac{(A_s - A_b)}{A_{c^+} - A_{c^-}}\right) \times 100 \quad (3)$$

where A_{c^+}, A_{c^-}, A_s, and A_b are defined as the absorbance of 100% enzyme activity (only solvent with the enzyme), 0% enzyme activity (only solvent without the enzyme), a test sample (with the enzyme), and a blank (a test sample without the enzyme), respectively.

https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255
Biomacromolecules XXXX, XXX, XXX−XXX

Table 1. Formulation and Process Effect on Particle Size and Zeta Potential of Free Eudragit-Based NPs[a]

investigated parameter	organic phase				aqueous phase (mL)	stirring speed (rpm)	diameter (nm)	ζ-potential (mV)
	Eudragit (mg/mL)	acetone (mL)	ethanol (mL)	methanol (mL)				
solvent type and solvent/nonsolvent volume ratio	16	**10**	-	-	30	500	59 ± 1	44 ± 2
	16	**12**	-	-	30	500	52 ± 1	50 ± 2
	16	**15**	-	-	30	500	50 ± 1	51 ± 4
	16	**20**	-	-	30	500	49 ± 2	53 ± 3
	16	**30**	-	-	30	500	49 ± 1	48 ± 2
	16	-	**10**	-	30	500	49 ± 3	39 ± 2
	16	-	**12**	-	30	500	47 ± 1	39 ± 3
	16	-	**15**	-	30	500	45 ± 2	39 ± 2
	16	-	**20**	-	30	500	51 ± 1	38 ± 2
	16	-	**30**	-	30	500	54 ± 4	43 ± 2
	16	-	-	**10**	30	500	48 ± 3	71 ± 3
	16	-	-	**12**	30	500	46 ± 5	70 ± 2
	16	-	-	**15**	30	500	45 ± 1	64 ± 3
	16	-	-	**20**	30	500	50 ± 1	59 ± 4
	16	-	-	**30**	30	500	53 ± 2	51 ± 1
polymer amount	**28**	15	-	-	30	500	51 ± 2	45 ± 2
	40	15	-	-	30	500	65 ± 3	53 ± 2
	52	15	-	-	30	500	78 ± 1	53 ± 1
	64	15	-	-	30	500	88 ± 4	54 ± 3
	28	-	15	-	30	500	44 ± 2	37 ± 2
	40	-	15	-	30	500	55 ± 1	45 ± 2
	52	-	15	-	30	500	59 ± 1	47 ± 1
	64	-	15	-	30	500	63 ± 1	45 ± 6
	28	-	-	15	30	500	45 ± 1	64 ± 3
	40	-	-	15	30	500	49 ± 4	63 ± 2
	52	-	-	15	30	500	53 ± 3	73 ± 3
	64	-	-	15	30	500	54 ± 1	72 ± 2
stirring speed	16	15	-	-	30	**300**	61 ± 2	48 ± 3
	16	15	-	-	30	**700**	42 ± 1	49 ± 5
	16	-	15	-	30	**300**	56 ± 2	40 ± 2
	16	-	15	-	30	**700**	35 ± 1	41 ± 2
	16	-	-	15	30	**300**	54 ± 2	62 ± 3
	16	-	-	15	30	**700**	34 ± 2	66 ± 4

[a]The "bold" values show the changed parameters. The concentration of polymer is the concentration before evaporation of organic solvent.

2.8.2. α-Glycosidase Inhibition Activity. α-Glucosidase inhibitory activity was performed by using the method described earlier with slight modifications.[6] A total of 50 μL of sample solution (4 mg/mL; DS oil solution or its corresponding NPs) was preincubated at 37 °C for 15 min in a 96-well microplate with 100 μL of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.9) containing α-glucosidase solution (0.1 U//mL). After that, 50 μL of 5 mM *p*-nitrophenyl α-D-glucopyranoside solution in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.9) was added and incubated for 5 min at 37 °C. The sample and blank absorbances were read at 405 nm by a microplate reader. Acarbose was used as a standard (4 mg/mL). The α-glucosidase inhibitory activity was calculated as follows:

$$\text{inhibition}(\%) = \left(1 - \frac{A_s}{A_b}\right) \times 100 \quad (4)$$

where A_s and A_b are the absorbances of the sample and the blank, respectively.

2.9. Statistical Analysis. The study data are expressed as mean ± standard deviation (SD) and analyzed statistically. The values have been analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and for statistical significance $p < 0.05$ was selected such as criterion.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Actually, the nanotechnology emerged its application to encapsulate natural products and especially plant oils. The current work aims to develop for the first time DS oil-loaded Eudragit RS100 based-NPs by nanoprecipitation process. In order to optimize these nanocarriers, a series of experiments on process and formulation related variables were carried out in order to find out each parameter relation with obtained particles hydrodynamic particle size, zeta potential, and morphology. Table 1 summarizes the results of analyzing free Eudragit RS100 based NPs prepared by varying the amounts of formulation ingredients and operating conditions.

3.1. Effect of Solvent to Nonsolvent Volume Ratio. The organic to aqueous phase ratio is among the most critical parameters for the spontaneous formation of NPs by the nanoprecipitation method.[61] To assess this effect on the NPs size and zeta potential, various ratios (1/3, 2/5, 1/2, 2/3, and 1/1) of solvent to nonsolvent volume (S/NS) were carried out using three types of solvents, acetone, ethanol, and methanol, as illustrated in Table 1. Figure 2A shows the relation between NPs size and solvent/nonsolvent for the three used solvents after their evaporation. It was observed that, with an increasing in acetone/water volume ratio from 1/3 to 1/1, there was a significant decrease in particle size from 59 ± 1 to 49 ± 1 nm. This size decrease is related to the reduced viscosity of the organic phase, which facilitates acetone diffusion to the water.

https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255
Biomacromolecules XXXX, XXX, XXX−XXX

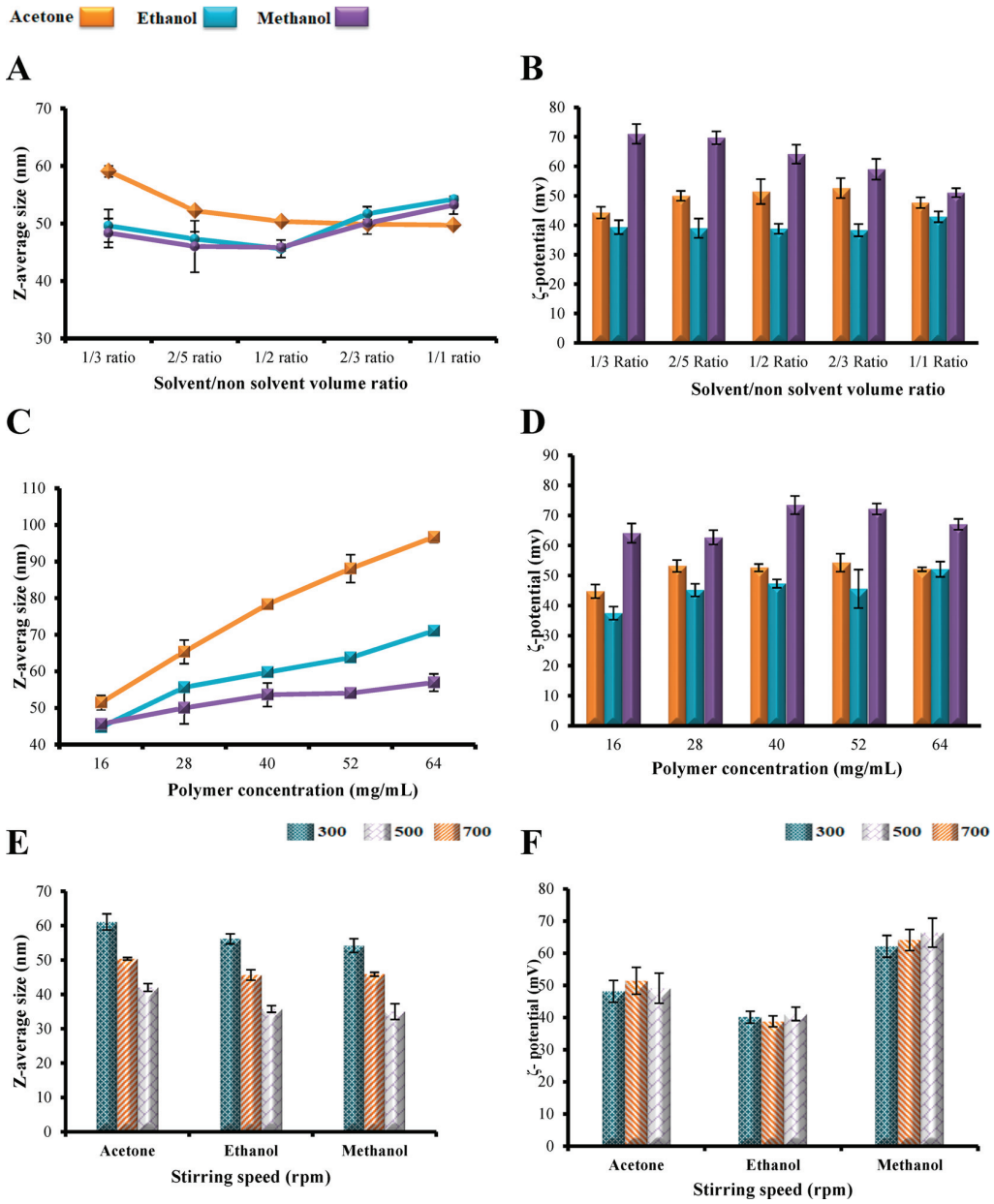


Figure 2. Effect of operating conditions on colloidal properties. The impact of the solvent to nonsolvent volume ratio on (A) *Z*-average size and (B) ζ-potential of Eudragit RS100 nanoparticles. The effect of polymer concentration ratio on (C) size and (D) ζ-potential of Eudragit RS100 nanoparticles. The effect of stirring speed on (D) *Z*-average size and (E) ζ-potential. All of the study was carried out for three types of solvents: acetone, ethanol, and methanol. Measurements from separate assays were combined (n = 3) and represented as mean ± SD.

The obtained results are in agreement with those of Limayem and co-workers.[62] Dong and Feng stated that increasing the volume of the solvent with the same amount of polymer leads to a decrease in the organic phase viscosity and, thus, a decrease in the particle size.[63]

Figure 2A demonstrates also that, by increasing the volume ratio of ethanol to water from 1/3 to 1/2, a slight decrease in particle size was observed from 49 ± 3 to 45 ± 2 nm. However, at very high volume ratios, there was an increase in particle size from 51 ± 1 to 54 ± 1 nm for volume ratios of 2/3 and 1/1, respectively. The same trend was exhibited with methanol. By increasing methanol to water volume ratio from 1/3 to 1/2, nanoparticles decrease in size from 48 ± 3 to 45 ± 1 nm, and bigger NPs were obtained with high volume ratios. However, the statistical analysis of these results demonstrates that the changes in particle size were not significant for methanol and ethanol and the *p*-values were more than 0.05. These results were related in other research work to the miscibility of the organic solvent to water.[64] In fact, they found that the size changed significantly when using partially water-soluble solvents (ethyl acetate and propylene carbonate) as the organic solvent. However, the effect of volume ratio was insignificant when using fully water-soluble solvent. In our case, acetone has a lower solubility in water than the other solvents. This is based on the values of the dielectric constant, since its measurement is often used to evaluate the polarity of

https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255
Biomacromolecules XXXX, XXX, XXX−XXX

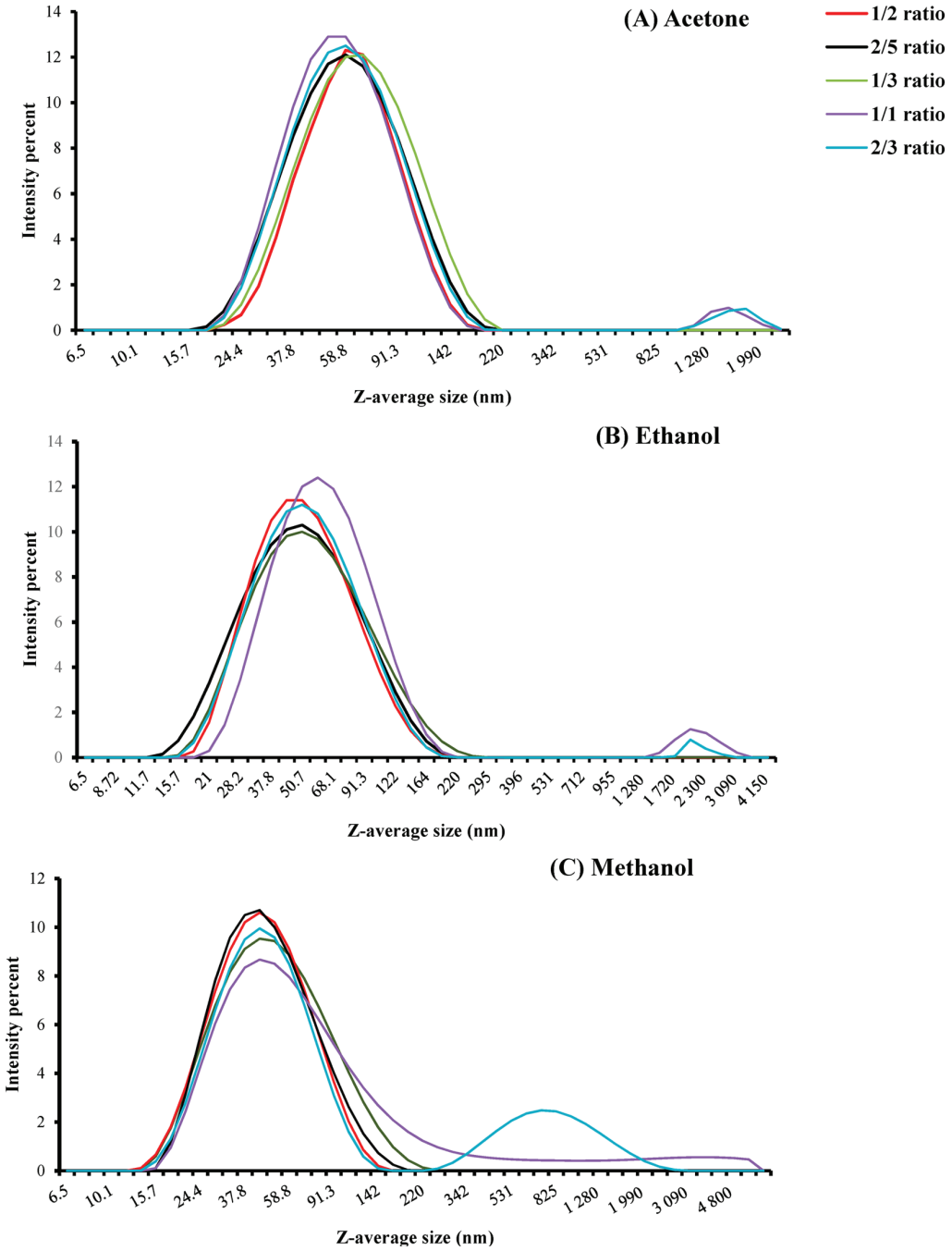


Figure 3. Particle size distribution of Eudragit-based NPs at different solvent/nonsolvent volume ratios: 1/3, 2/5, 1/2, 2/3, and 1/1 for (A) acetone, (B) ethanol, and (C) methanol.

liquids. The dielectric values of acetone, ethanol, and methanol are equal to 21.30 ± 0.02, 25.02 ± 0.02, and 33.30 ± 0.02, respectively.[65] Thus, ethanol and methanol are more miscible in water, and hence, the volume ratio does not have a significant effect on particle size.

For further investigation, the variation of size dispersion was studied as a function of S/NS ratio for all the NPs. Figure 3A shows that with acetone to water volume ratios 1/3, 2/5, and 1/2, Eudragit NPs with unimodal size distribution were observed and became narrower with 1/2 volume ratio, while bimodal size distributions were assessed for 2/3 and 1/1 S/NS volume ratios. These findings are in accordance with what Tarhini and co-workers suggested. While developing protein-based NPs by a nanoprecipitation process, they found that the size distribution was very high, with ratios above 1/2.[66] Similar results have already been found by other work studies.[67]

In the case of ethanol, the NPs do not show unimodal distribution at ratios above 1/2, and a small peak was observed that indicates the presence of aggregation (Figure 3B). The same trend happened with methanol, where the NPs are polydispersed, especially at higher ratios, and the aggregation peaks were higher than those obtained with ethanol. Indeed, a

https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255
Biomacromolecules XXXX, XXX, XXX−XXX

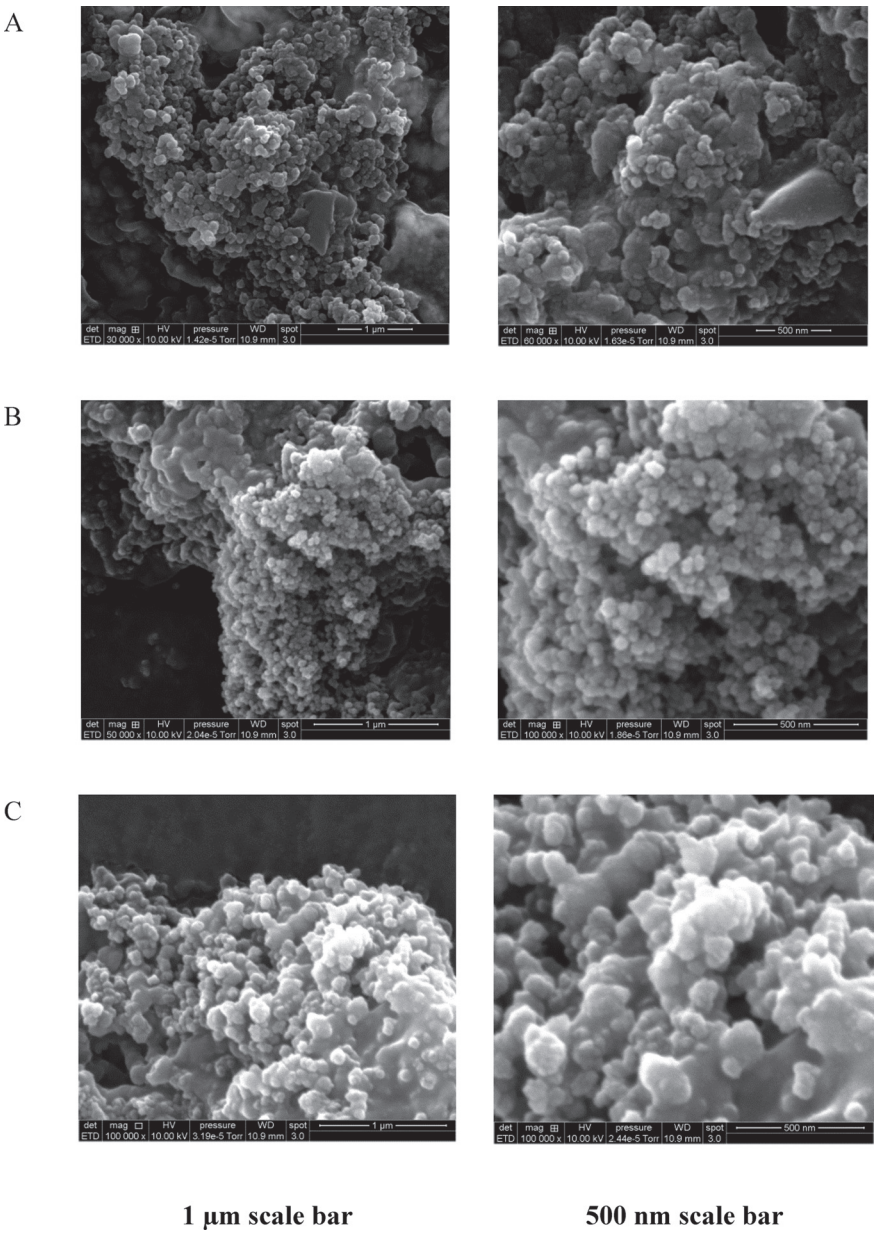


Figure 4. Scanning electron microscopy images of Eudragit RS100-based NPs prepared with acetone (A), ethanol (B), and methanol (C).

nonperfect Gaussian shape peak was observed for the S/NS volume ratio 1/1 (Figure 3C). Thus, for all the tested solvents, a narrow unimodal size distribution was observed at 1/2 S/NS volume ratio.

The influence of S/NS volume ratio on the ζ-potential was also investigated. As shown in Figure 2B, high values of zeta potential were assessed for all the formulations, indicating the high stability of the prepared NPs. The surface of the NPs is positively charged due to ammonium quaternary groups of the polymer, as previously mentioned.[68]

However, the effect was only significant when using methanol as the organic solvent. As the ratio increases, the ζ-potential decreases and, thus, the NPs are less stable. This is in agreement with the results of size distribution, where the NPs prepared with methanol showed the highest aggregation at a higher volume ratio. In the case of acetone and ethanol, the effect of volume ratio was not significant on ζ-potential. Similar results were already published, where neither the organic solvent volume nor the aqueous one affect the ζ-potential of polycaprolacone NPs prepared by a solvent displacement method.[39] From these results, we notice that a 1/2 S/NS volume ratio gave the best results with all the solvents, so it was retained for further experiments.

3.2. Effect of Polymer Concentration and Organic Solvent Type. The polymer concentration had a crucial effect on the size of the NPs obtained by the nanoprecipitation technique. To evaluate this parameter, 15 solutions with different concentrations (16, 28, 40, 52, and 68 mg/mL) of Eudragit RS100 were prepared using three types of organic solvents: acetone, ethanol, and methanol. The results of particle size and ζ-potential are illustrated in Figure 2, where as shown, as the Eudragit RS100 concentration increases, the

https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255
Biomacromolecules XXXX, XXX, XXX−XXX

particle size increases significantly, with p value < 0.05 for all the used solvents (Figure 2C). Similar results were already discussed in the literature.[63,64,69] As reported earlier, the increase in particle size was related to the increase in the viscosity of the organic phase, which reduced the diffusion of acetone to the aqueous phase.[39]

Moreover, the mean particle size depends on the type of organic solvent used. The NPs obtained with acetone were larger than those obtained with ethanol and methanol (Figure 2C). As described earlier, the increase in particle size was related to the low value of solvent dielectric constant (ε).[70] This was confirmed in the present work since the dielectric value of acetone is lower than those of ethanol and methanol.[65] Similar results were also reported.[71]

Additionally, the affinity of the solvent for the nonsolvent was found crucial for final particle size[67] and it was calculated using the following equation:

$$X = Vn \times (\delta s - \delta ns)^2 / RT \quad (5)$$

where Vns is the molar volume of the solvent; δs and δns are Hildebrand solubility parameter for the solvent and the nonsolvent, respectively; R is the gas constant; and T is the absolute temperature.[70] The higher the value of X, the smaller the affinity of the solvent for the nonsolvent, the slower the rate of diffusion and hence the bigger are the obtained NPs.[67] The Hildebrand solubility parameters of acetone, ethanol, and methanol are 19.7, 26.2, and 29.7, respectively, while for water, it is equal to 48.[72] Thus, the affinity of the nonsolvents to water decreased as follows: methanol > ethanol > acetone. Hence, the diffusion rate of acetone is slowest, and thus, the obtained NPs were the largest.

Regarding the ζ-potential of the obtained nanoparticles, Figure 2D shows high values of zeta potential for all the obtained NPs, confirming their high stability, while varying polymer concentration does not significantly affect the zeta potential of Eudragit-based NPs. Similar results were already reported.[39]

3.3. Effect of Stirring Speed. To investigate the effect of stirring speed on the colloidal properties of the obtained NPs, nine samples under different agitation speeds (300, 500, and 700 rpm) were made using three types of organic solvents, acetone, ethanol and methanol, as mentioned in Table 1. By increasing the stirring speed from 300 to 700 rpm, the particle size deceases significantly from 61 ± 2 nm to 42 ± 1 nm, from 56 ± 2 to 35 ± 1 nm and from 54 ± 2 to 34 ± 2 nm for acetone, ethanol, and methanol, respectively (Figure 2E). Miladi and co-workers explained this by more efficient shear mixing and, thus, more rapid diffusion of the solvent to the nonsolvent.[73] Similar results were already found.[74] Moreover, the influence of stirring speed on ζ-potential was carried out, and the results show that the effect was insignificant (p-value > 0.05; Figure 2F). These findings were in concordance with those obtained earlier.[39] Despite this, high stirring speed (700 rpm) gave the smallest particle sizes; 500 rpm was selected as the best agitation speed due to the absence of foam, observed at 700 rpm, which hurdles the solvent evaporation step.

3.4. Nanoparticles Morphology. Three types of NPs prepared with either acetone, ethanol, or methanol at 1/2 volume ratio with 16 mg/mL of Eudragit RS100 were visualized by Scanning Electron Microscopy (SEM) and assessed in terms of shape, surface texture, and smoothness. Figure 4 shows that all the NPs have spherical and regular form. According to the undertaken systematic study of the nanoprecipitation method using Eudragit RS100 as polymer, the three solvents gave spherical and regular NPs with small particle size, uniformity distribution, and high zeta potential, at 1/2 S/NS volume ratio, 16 mg/mL polymer, and 500 rpm as stirring speed.

3.5. Date Seeds Oil Loaded Nanoparticles Characterization. The optimized formulation of free Eudragit RS100 based-NPs was used to encapsulate date seeds oil, extracted by a supercritical CO_2 process using the nanoprecipitation technique. To achieve the adequate amounts of vegetable oil to be encapsulated, various amounts of DS oil had been investigated (15, 30, 60, 120, 240, and 300 mg) using acetone as organic solvent, as mentioned in Table 2.

Table 2. Formulation Effect on Particles Size and Zeta Potential of DS Oil-Loaded Eudragit RS100-Based NPs[a]

date seed oil amount (mg)	diameter (nm)	ζ-potential (mV)	EE (%)	oil loading (μg/mg polymer)
15	126 ± 2	56.6 ± 4	99 ± 1	62 ± 0
30	150 ± 1	61.5 ± 3	98 ± 3	123 ± 4
60	187 ± 2	62.1 ± 2	99 ± 1	248 ± 3
120	217 ± 3	59.0 ± 4	97 ± 1	485 ± 5
240	228 ± 3	45.6 ± 5	92 ± 3	920 ± 30
300	231 ± 3	47.9 ± 1	85 ± 3	1062 ± 38

[a]In all the experiments, the operating parameters were as follows: polymer concentration (16 mg/mL); acetone volume (15 mL); water volume (30 mL); and stirring speed (500 rpm).

Free Eudragit RS100-based NPs had a transparent white color. By incorporating DS oil, the color (i.e., opacity) lost its transparency and increased as the amount of DS oil increased, as shown in Figure 5A. This was in concordance with the measurements of particle size, shown in Figure 5B, where all the samples had a particle size higher than those of free Eudragit RS100-based NPs, which had a size of about 50 ± 1 nm. It is reported that the existence of oil increases the size of nanoparticles.[75] By increasing the oil amount from 15 to 120 mg, a significant increase in particle size was observed from 126 ± 2 to 217 ± 3 nm.

Samples prepared with high amounts (more than 120 mg) did not have a homogeneous aspect and some oil drops were observed visually (Figure 5A), which means that there is an optimum quantity of vegetable oil to be encapsulated in 16 mg/mL Eudragit RS100-based NPs. In another work, the effect of argan oil concentration on particle size was investigated and the results showed that 40 mg/mL of argan oil was an appropriate quantity for the encapsulation of indomethacin; at high concentrations of argan oil, there was not an increase in particle size.[76] This was explained by the fact that the used stabilizer and surfactant were useful for the stability of the system to a specific amount of argan oil in the formulation. Figure 5B indicates also that there was a slight increase in particle size at higher amounts of vegetable oil. Indeed, the particle size values were 228 ± 3 and 231 ± 3 nm for DS oil amounts of 240 and 300 mg, respectively.

Thus, to select an adequate amount of vegetable oil to be encapsulated, further analysis was performed about the correlation between the oil amount and the cubic radius of NPs, as illustrated in Figure 6.

It was assumed that the number of nanoparticles was constant, so they only changed in size depending on the amount of polymer/oil used for the formulation.

https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255
Biomacromolecules XXXX, XXX, XXX−XXX

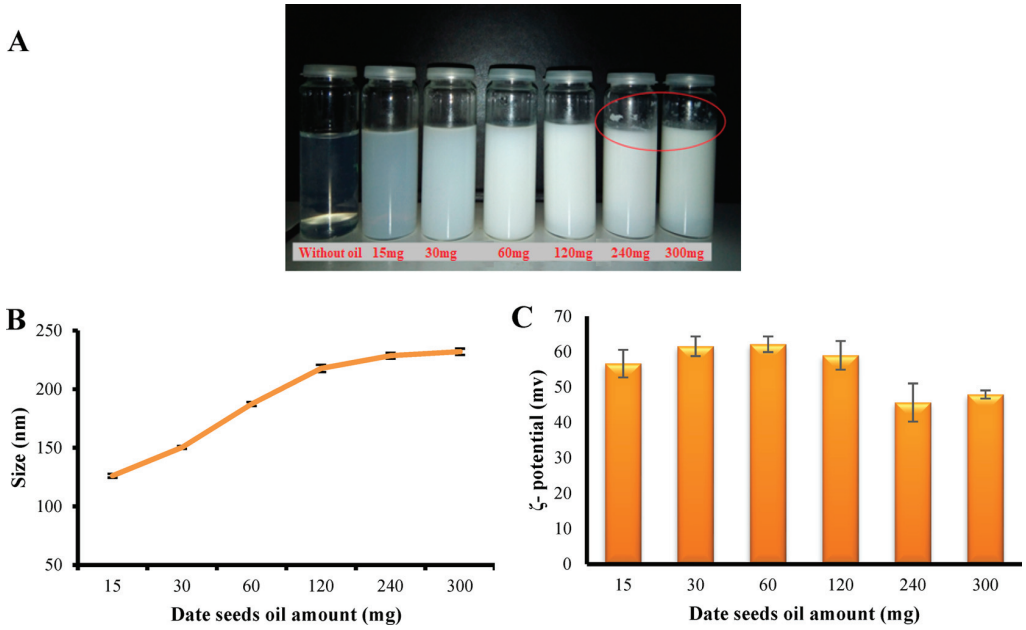


Figure 5. Variation in color of date seeds oil loaded NPs at different oil amounts (A). Effect of date seed oil amount on (B) particle size and (C) ζ-potential of Eudragit RS100-based nanoparticles using acetone as solvent. The results are the mean of three independent experiment ± SD.

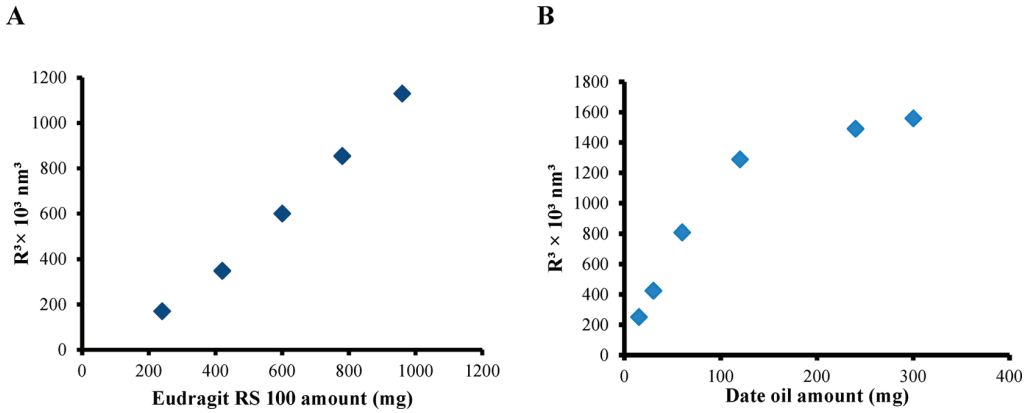


Figure 6. Correlation between Eudragit RS100 amount (A) and date seed oil amount (B) and the cubic radius of NPs. Dots represent the cube radius values of the NPs.

$$R^3 \simeq mp/Np \quad (6)$$

with R being the radius of nanoparticles, mp is the amount of polymer or of oil and Np is the number of particles.

For DS oil-loaded NPs, as the oil amount increases from 15 to 120 mg, the particle size increases, this was confirmed by the good correlation between the oil amount and the radius of NPs. While, at higher amounts (240 and 300 mg), the particles do not increase in size. Indeed, a second generation of NPs appeared. Thus, 120 mg is the adequate quantity of DS oil to be encapsulated.

Further ζ-potential measurements were carried out for all the samples and the results were mentioned in Table 2 and Figure 5C. Varying the amount of plant oil did not have a significant effect on ζ-potential (p-value > 0.05). Additionally, higher values were observed for DS oil-loaded NPs as compared to the values of free Eudragit-based NPs, where their ζ-potential was about 51 ± 4 mv. This was attributed to the addition of oils that could interact with the polymer surface, influence the surface charge of the NPs, and thus shift the ζ-potential to higher values. While, lower values of ζ-potential were observed at higher amount of DS oil (more than 120 mg), which confirms the less stability of these NPs suspensions.

Regarding the encapsulation efficiency, low values were obtained at higher amounts of DS oil, which confirms further our results, as shown in Table 2. The optimal formulation has a high encapsulation efficiency (EE% = 97 ± 1%) with a loading capacity of 0.48 mg/mg of polymer.

According to the images obtained through transmission electron microscopy (TEM), DS oil-loaded NPs exhibit a spherical and a regular form, as demonstrated in Figure 7.

To investigate the chemical interaction between DS oil and Eudragit RS100, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis was carried out. Generally, drug-polymer interaction leads to the formation of new absorption bands and the expansion of the absorption bands in FTIR spectra.[40] The FTIR patterns of DS oil, Eudragit, and loaded NPs were shown

https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255
Biomacromolecules XXXX, XXX, XXX−XXX

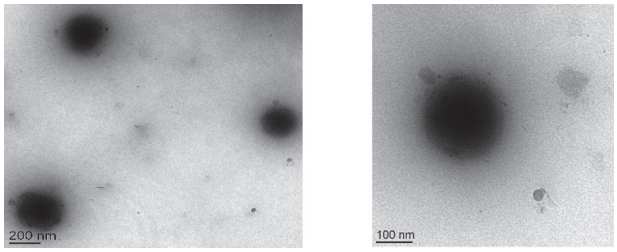


Figure 7. Transmission electron microscopy for DS oil-loaded NPs.

in Figure 8. In the DS oil spectrum, the peaks at 2921 and 2852 cm^{-1} correspond to the stretching vibrations of aliphatic C−H in CH_2 and terminal CH_3 groups, respectively. The peak at 1743 cm^{-1} is owing to the C═O stretching vibration of carboxylic acids of the ester, while the absorption bands at 1708, 1464, and 1163 cm^{-1} are assigned to C═O stretching of the carbonyl groups, C═C stretching, and C—O stretching, respectively. The peak at 721 cm^{-1} corresponds to the aromatic compounds. These results were similar to those obtained in the literature.[77−79] The FTIR spectra of Eudragit RS100 showed characteristic peaks at 2950 cm^{-1} due to C—H aliphatic stretching, at 1722 cm^{-1} due to C═O ester stretching, and a peak at 1143 cm^{-1} that corresponds to the C—O ester group. This was in accordance with what was reported.[80,81] Matching up to the FTIR spectrum of Eudragit with the oil-loaded nanoparticles revealed a reduction in the intensity of the peak at 1725 cm^{-1} as well as coming out of three jointed peaks in 2924, 2853, and 1466 cm^{-1} that characterize DS oil. This might be attributed to the interaction between DS oil and Eudragit RS100 in the nanoparticles. Thus, DS oil was successfully entrapped within polymeric nanoparticles.

3.6. Stability Study of Nanoparticle Dispersion. The colloidal stability of the optimized formulation of DS oil-loaded NPs was investigated by analyzing size and ζ-potential as a function of temperature (4 °C, RT and 40 °C) during one month, as demonstrated in Figure 9A. No significant changes have been observed in the prepared NPs size and ζ-potential.

Additionally, the ζ-potential values of these NPs have been determined under different pH to get crucial information about their stability for biological application. For this purpose, the ζ-potential of the optimized formulation was determined after the addition of either diluted HCl or NaOH to get different pH values (3, 4, 5, 7, 9, 10, and 12). The results demonstrated in Figure 9B indicate a decrease in ζ-potential for all the NPs as the pH of the medium varies from pH = 3 to pH = 12. These results are in conformity with those obtained by Du and co-workers for Carboxymethyl Konjac Glucomannan−Chitosan-based NPs.[82] In another work study, the change in the ζ-potential measurements was related to the decrease in the charge density of the chitosan provoked by the reduction of the concentration of H^+ ions.[83] Although the ζ-potential decreases by varying the pH, the NPs remain stable, with a zeta potential around +37 mv. This finding spotlights the reliability of these nanocarriers to protect DS oil, chosen as model, to broaden the beneficial applications of other plant oils.

3.7. In Vitro Antidiabetic Activity. Diabetes mellitus is mainly associated with hyperglycemia, which is characterized by high circulating blood glucose levels. Thus, the management of diabetes deals with decreasing postprandial hyperglycemia by the inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes like α-amylase and α-glucosidase.[84] For instance, α-amylase breaks down long chain carbohydrates, while α-glucosidase is involved in the breakdown of starch and disaccharides into glucose.[8] Actually, the health care systems rely on the "inhibition of key enzymes" approach for the treatment and management of several pathologies like diabetes.[85] In this context, the study of the antidiabetic effect of DS oil and its corresponding encapsulated form was investigated in vitro against α-amylase and α-glucosidase and compared to that of standard drug: Acarbose. The results are shown in Figure 10.

In vitro α-amylase studies revealed that DS oil in its free and encapsulated forms showed dose-dependent α-amylase inhibition better than the standard drug: acarbose. At the highest concentration (400 μg/mL), the ranked order of inhibition was as follows: DS oil-loaded NPs (68.5%) > unencapsulated DS oil (64.6%) > acarbose (53.0%) (Figure 10A). The difference in inhibition results between DS oil-loaded NPs and free NPs (without oil) is related to the presence of DS oil, which exhibits an antidiabetic effect. The IC_{50} values were 365 ± 10.7, 148.9 ± 7.1, and 87.6 ± 4.8 μg/mL for acarbose, unencapsulated DS oil, and DS oil-loaded NPs, respectively. This result was explained by the chemical composition of DS oil. The fatty acids analysis of the present date seeds oil was

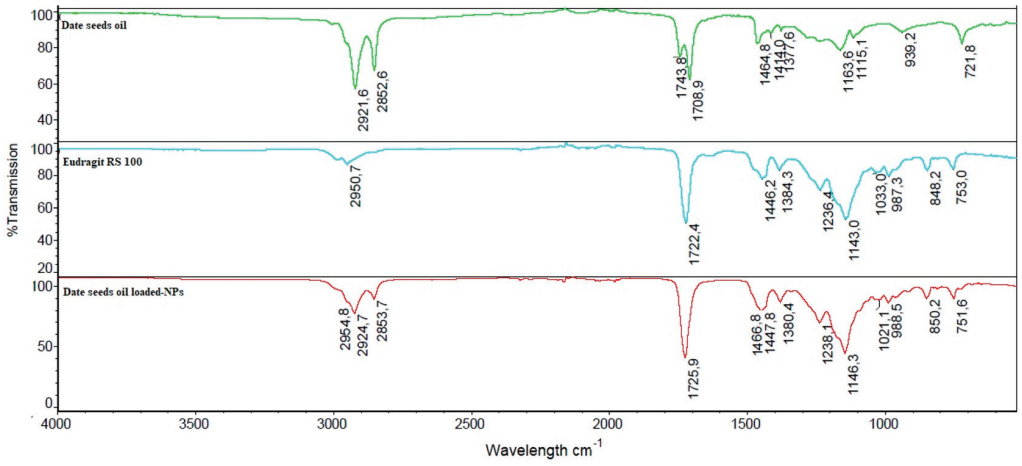


Figure 8. Fourier transform infrared spectroscopy spectra for date seeds oil, Eudragit RS100, and date seed oil-loaded NPs.

https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255
Biomacromolecules XXXX, XXX, XXX−XXX

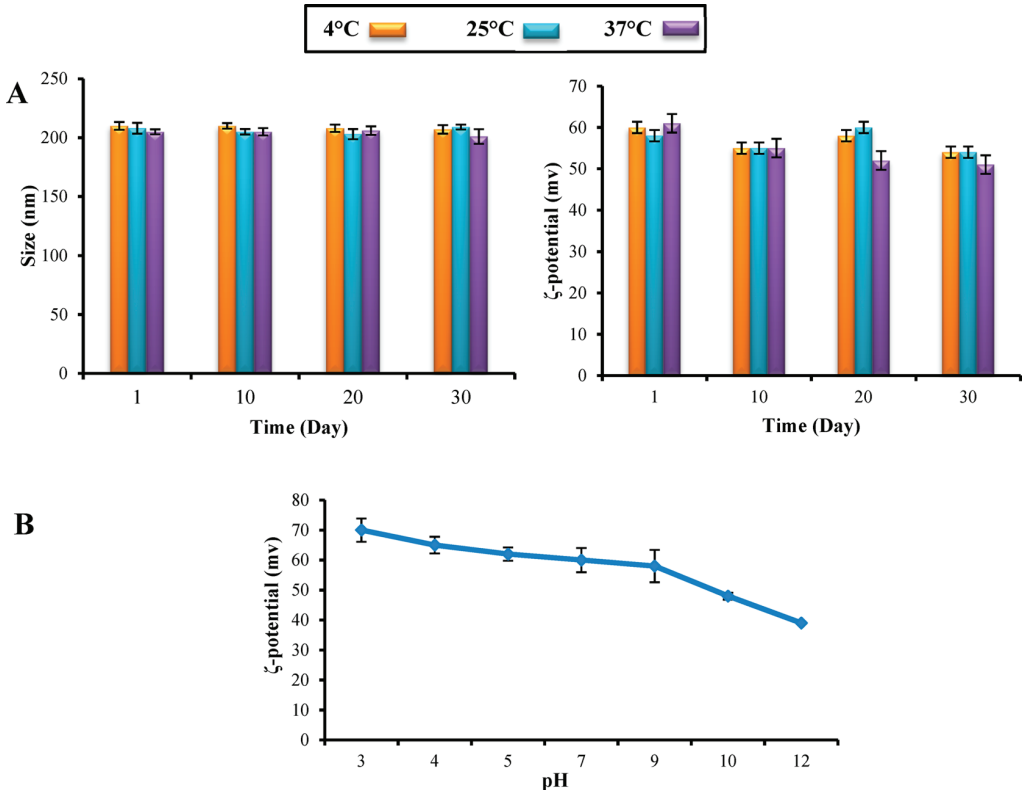


Figure 9. Stability of Eudragit RS100-based NPs containing date seed oil in terms of size, ζ-potential (A), and pH (B). Measurements from separate assays were combined (n = 3) and represented as mean ± SD.

already performed and published by our team work.[25] Oleic acid (C18:1n9) represents the major constituent of the studied DS oil and represents 40.7−43% of the total fatty acids.[25] Simultaneously, several reports highlighted the impact of unsaturated fatty acid in managing type 2 diabetes.[86−88]

The Figure 10A showed also that DS oil-loaded NPs exhibited higher inhibition activity when compared to unencapsulated oil. This result was in accordance with previous studies. In 2017, the in vitro antidiabetic activity of *Psoralea corylifolia* extract silver NPs was investigated and the results revealed that plant extracts within silver NPs were more effective than that of the free form.[89] The enhancement in antidiabetic activity of gelatin encapsulated *Nilgirianthus ciliatus* NPs when compared to the free extracts was ascribed to the sustained release property of these carriers.[90] This result further confirms the benefit of nanoencapsulation in enhancing the biological activity of bioactive agents.

Regarding α-glucosidase inhibitory activity, all the tested samples showed in vitro dose-dependent enzyme inhibition. At the highest concentration (500 μg/mL), acarbose exhibited the highest inhibitory activity (91.05%; Figure 10B). The IC_{50} values were 27.5 ± 1.6, 88.9 ± 2.3, and 155.3 ± 6.6 μg/mL for acarbose, unencapsulated DS oil, and DS oil-loaded NPs, respectively. Like in the α-amylase inhibition study, free NPs did not show any inhibition regarding α-glucosidase enzyme. The α-glucosidase inhibitory effect of DS oil-loaded NPs was related to the presence of oleic acid in DS oil. As reported earlier, kinetic assays demonstrated that oleic acid is a competitive inhibitor of α-glucosidase, and its interactions exhibited a character of static quenching, which means that it would bind to α-glucosidase and form a complex.[91] Miyazawa and co-workers stated that increasing the number of double bound would increase the α-glucosidase inhibitory effect.[92]

Unexpectedly, unencapsulated DS oil demonstrated higher enzyme inhibition activity than the entrapped form. This may be explained by the fact that the oil needs more time to be released from Eudragit RS100-based NPs. Despite the lowest IC_{50} of acarbose, DS oil in its free and encapsulated form shows a paramount inhibition activity and could be chosen as an alternative to traditional oral hypoglycemic agents, as it is a source of unsaturated fatty acids that are crucial fatty acids to the human body, so it would not produce undesirable side effects.

4. CONCLUSION

The present study deals with the valorization of date seeds from waste to wealth using the nanoencapsulation technology. In this context, the new poly methyl methacrylate derivative-based polymeric nanoparticles were designed as nanocarriers for date seed oil, which was a priori extracted by an ecofriendly process, using a simple, fast, and reproducible technique. The proper selection of experimental parameters including, the polymer amount, the type of organic solvent, the organic to aqueous phase ratio and the stirring speed has to be taken into consideration to establish nanoparticles with the required features responsible for the attainment of the final goal. The developed date seed oil-loaded Eudragit RS100 nanoparticles formulations were in the nano size range (207 nm) with high ζ-potential value (+59 mV), an adequate encapsulating efficiency (97%), and good stability upon one-month storage at different temperatures and pH. Furthermore, in vitro antidiabetic activity of the developed particles was investigated

https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255
Biomacromolecules XXXX, XXX, XXX−XXX

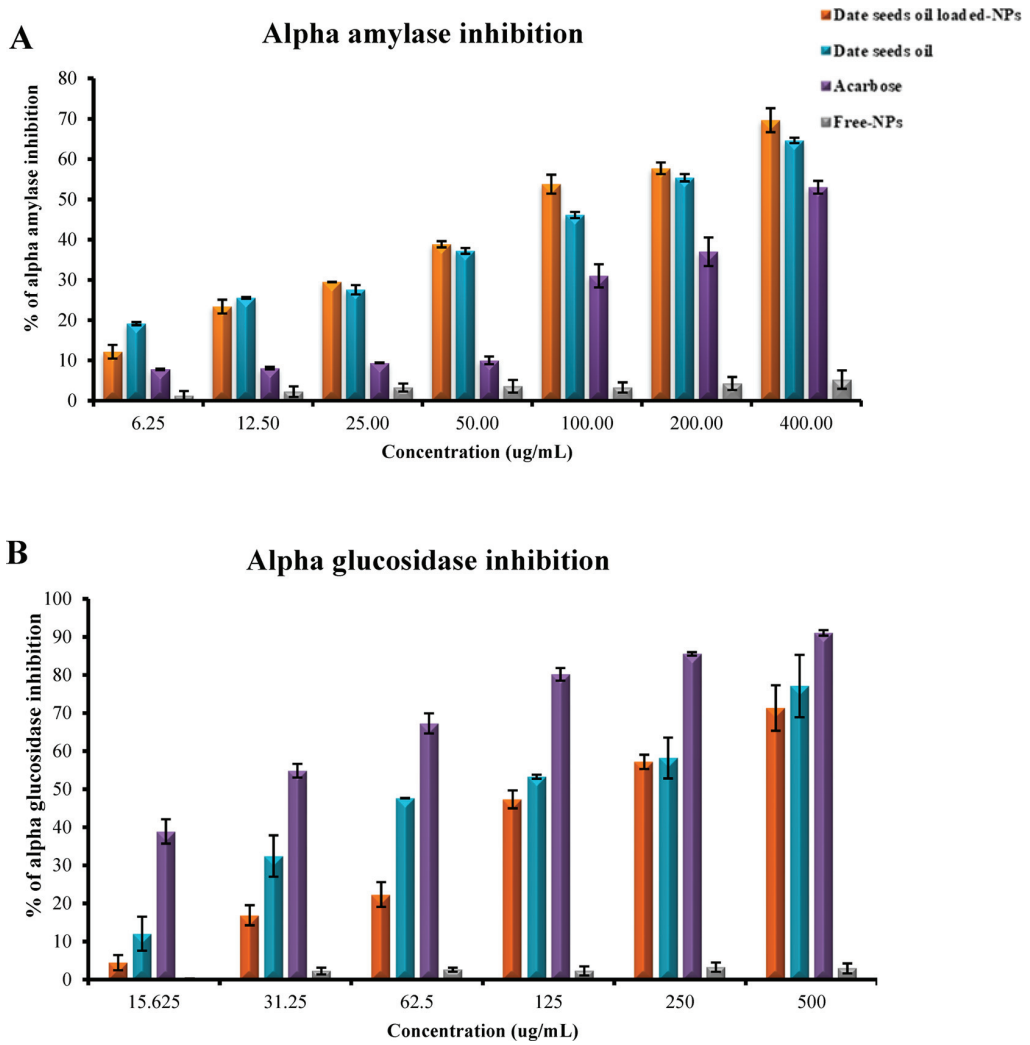


Figure 10. α-Amylase inhibition (A) and α-glucosidase inhibition (B) of unencapsulated date seed oil, free Eudragit RS100-based NPs and date seed oil-loaded Eudragit RS100-based NPs. Measurements from separate assays were combined (n = 3) and represented as mean ± SD.

on α-amylase and α-glucosidase enzymes, and IC_{50} values were found to be 87.6 ± 4.8 and 155.3 ± 6.6 μg/mL, respectively.

In summary, Eudragit RS100 seems to be a promising polymer for date seed oil delivery, as it is biocompatible, nontoxic, and a nonirritant and provides a controlled plant oil release. In addition, its positive charge would be expected to facilitate the intimate electrostatic interaction with target tissues, which have negatively charged surfaces, resulting in a maximizing of the cellular uptake and maintaining effective drug concentration at the site of action for a prolonged time period. Additionally, oleic acid, the main component of date seed oil, besides being beneficial for the human body, may inhibit α-amylase and α-glucosidase enzymes and alleviate the side effects derived from conventional hypoglycemic drugs like skin reactions, gastrointestinal discomfort, nausea, and weight gain. By combining all these approaches, the developed date seed oil-loaded nanoparticles may be considered as an alternative of conventional oral hypoglycemic agents for diabetes type 2 management.

Importantly, this work has spotlighted a crucial aspect to be regarded in the perspective of diabetes management: The cytotoxicity of the developed formulation is of paramount importance to determine the biosafety of the treatment. For instance, more biocompatibility experiments on primary and cell lines have to be carried out. In addition, this is the first study dealing with the potential use of date seed oil-derived nanoparticles in the management of diabetes. Further studies are required on the in vivo clinical application, pharmacokinetic profile, and the precise mechanism of action of date seed oil to substantiate the in vitro results by which date seed oil in its free and encapsulated form is responsible for the desired effect.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biomac.0c00255.

The validation of the ultraviolet−visible spectroscopy method was carried out in terms of linearity, precision, and recovery. Standard curve, recovery study, and intraday/interday reproducibility measurements (PDF)

https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255
Biomacromolecules XXXX, XXX, XXX−XXX

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Abdelhamid Elaissari − *Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon-1, CNRS, LAGEPP UMR 5007, F-69622 Lyon, France;* orcid.org/0000-0002-2151-9894; Email: abdelhamid.elaissari@univ-lyon1.fr

Authors

Narimane Lammari − *Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon-1, CNRS, LAGEPP UMR 5007, F-69622 Lyon, France; Environmental Process Engineering Laboratory, University Constantine 3, 25000 Constantine, Algeria*

Francesca Froiio − *Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon-1, CNRS, LAGEPP UMR 5007, F-69622 Lyon, France; Department of Experimental and Clinical Medicine, University "Magna Græcia" of Catanzaro, I-88100 Germaneto - Catanzaro, Italy*

Mehdi Louaer − *Environmental Process Engineering Laboratory, University Constantine 3, 25000 Constantine, Algeria*

Maria Chiara Cristiano − *Department of Experimental and Clinical Medicine, University "Magna Græcia" of Catanzaro, I-88100 Germaneto - Catanzaro, Italy*

Chawki Bensouici − *Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt), Constantine, Algeria*

Donatella Paolino − *Department of Experimental and Clinical Medicine, University "Magna Græcia" of Catanzaro, I-88100 Germaneto - Catanzaro, Italy;* orcid.org/0000-0002-5223-9879

Ouahida Louaer − *Environmental Process Engineering Laboratory, University Constantine 3, 25000 Constantine, Algeria*

Abdeslam Hassen Meniai − *Environmental Process Engineering Laboratory, University Constantine 3, 25000 Constantine, Algeria;* orcid.org/0000-0002-0357-3512

Complete contact information is available at: https://pubs.acs.org/10.1021/acs.biomac.0c00255

Notes

The authors declare no competing financial interest.

REFERENCES

(1) Kharroubi, A. T.; Darwish, H. M. Diabetes Mellitus: The Epidemic of the Century. *World J. Diabetes* **2015**, *6* (6), 850−867.

(2) Le Magueresse-Battistoni, B.; Vidal, H.; Naville, D. Environmental Pollutants and Metabolic Disorders: The Multi-Exposure Scenario of Life. *Front. Endocrinol. (Lausanne, Switz.)* **2018**, *9*, 1−7.

(3) Piero, M. N.; Nzaro, G. M.; Njagi, J. M. Diabetes Mellitus - a Devastating Metabolic Disorder. *Asian J. Biomed. Pharm. Sci.* **2015**, *4* (40), 1−7.

(4) Maymone, A. C.; Baillargeon, J. P.; Ménard, J.; Ardilouze, J. L. Oral Hypoglycemic Agents for Gestational Diabetes Mellitus? *Expert Opin. Drug Saf.* **2011**, *10* (2), 227−238.

(5) Krentz, A. J.; Bailey, C. J. Oral Antidiabetic Agents. *Drugs* **2005**, *65* (3), 385−411.

(6) Vadivelan, R.; Krishnan, R. G.; Kannan, R. Antidiabetic Potential of *Asparagus racemosus* Wild Leaf Extracts through Inhibition of α-Amylase and α-Glucosidase. *J. Tradit. Chinese Med. Sci.* **2019**, *9* (1), 1−4.

(7) Yang, X.; Huang, M.; Jin, Y.; Sun, L.-N.; Song, Y.; Chen, H.-S. Phenolics from *Bidens Bipinnata* and Their Amylase Inhibitory Properties. *Fitoterapia* **2012**, *83* (7), 1169−1175.

(8) Nair, S. S.; Kavrekar, V.; Mishra, A. *In Vitro* Studies on α-Amylase and α-Glucosidase Inhibitory Activities of Selected Plant Extracts. *Eur. J. Exp. Biol.* **2013**, *3* (1), 128−132.

(9) Piero, M. N.; Njagi, J. M.; Kibiti, C. M.; Ngeranwa, J. J. N.; Njagi, E. N. M.; Miriti, P. M. The Role of Vitamins and Mineral Elements in Management of Type 2 Diabetes Mellitus: A Review. *South Asian J. Biol. Sci.* **2012**, *2*, 107−115.

(10) Kumar, A.; Sharma, A.; Upadhyaya, K. C. Vegetable Oil: Nutritional and Industrial Perspective. *Curr. Genomics* **2016**, *17* (3), 230−240.

(11) Narasimhulu, C. A.; Selvarajan, K.; Litvinov, D.; Parthasarathy, S. Anti-Atherosclerotic and Anti-Inflammatory Actions of Sesame Oil. *J. Med. Food* **2015**, *18* (1), 11−20.

(12) Moreno-Luna, R.; Muñoz-Hernandez, R.; Miranda, M. L.; Costa, A. F.; Jimenez-Jimenez, L.; Vallejo-Vaz, A. J.; Muriana, F. J.; Villar, J.; Stiefel, P. Olive Oil Polyphenols Decrease Blood Pressure and Improve Endothelial Function in Young Women with Mild Hypertension. *Am. J. Hypertens.* **2012**, *25*, 1299−1304.

(13) Yang, P.; Cartwright, C.; Chan, D.; Ding, J.; Felix, E.; Pan, Y.; Pang, J.; Rhea, P.; Block, K.; Fischer, S. M.; Newman, R. A. Anticancer Activity of Fish Oils against Human Lung Cancer Is Associated with Changes in Formation of PGE2 and PGE3 and Alteration of Akt Phosphorylation. *Mol. Carcinog.* **2014**, *53* (7), 566−577.

(14) Adaramola, B.; Onigbinde, A.; Shokunbi, O. Physiochemical Properties and Antioxidant Potential of *Persea Americana* Seed Oil. *Chem. International* **2016**, *2* (3), 168−175.

(15) Ben Mohamed, H.; Duba, K. S.; Fiori, L.; Abdelgawed, H.; Tlili, I.; Tounekti, T.; Zrig, A. Bioactive Compounds and Antioxidant Activities of Different Grape (*Vitis Vinifera* L.) Seed Oils Extracted by Supercritical CO2 and Organic Solvent. *LWT - Food Sci. Technol.* **2016**, *74* (2016), 557−562.

(16) Hermenean, A.; Stan, M.; Ardelean, A.; Pilat, L.; Mihali, C. V.; Popescu, C.; Nagy, L.; Deák, G.; Zsuga, M.; Kéki, S.; Bácskay, I.; Fenyvesi, F.; Costache, M.; Dinischiotu, A.; Vecsernyés, M. Antioxidant and Hepatoprotective Activity of Milk Thistle (*Silybum Marianum* L. Gaertn.) Seed Oil. *Open Life Sci.* **2015**, *10* (1), 225−236.

(17) Hasan, M. *In Vivo* Evaluation of Anti Diabetic, Hypolipidemic, Antioxidative Activities of Saudi Date Seed Extract on Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *J. Clin. Diagnostic Res.* **2016**, *10* (3), 6−12.

(18) Yousuf, R. G.; Winterburn, J. B. Waste Date Seed Oil Extract as an Alternative Feedstock for Poly (3-Hydroxybutyrate) Synthesis. *Biochem. Eng. J.* **2017**, *127*, 68−76.

(19) Luque, R.; Clark, J. H. Valorisation of Food Residues: Waste to Wealth Using Green Chemical Technologies. *Sustainable Chem. Processes* **2013**, *1* (10), 2−4.

(20) Sumathi, T.; Nathiya, V.; Sakthikumar, M. Protective Effect of Bacoside-A against Morphine-Induced Oxidative Stress in Rats. *Indian J. Pharm. Sci.* **2011**, *73* (4), 409−415.

(21) Naskar, S.; Islam, A.; Mazumder, U. K.; Saha, P.; Haldar, P. K.; Gupta, M. *In Vitro* and *in Vivo* Antioxidant Potential of Hydromethanolic Extract of *Phoenix Dactylifera* Fruits. *J. Sci. Res.* **2009**, *2*, 144−157.

(22) Al-Taher, A. Anticonvulsant Effects of 3, 4-Dimethoxy Toluene, the Major Constituent of *Phoenix Dactylifera* L Spathe in Mice. *Sci. J. King Faisal Univ.* **2008**, *9*, 115−123.

(23) Abiola, T.; Dibie, D.; Akinwale, O.; Shomuyiwa, O. Assessment of the Antidiabetic Potential of the Ethanolic Extract of Date Palm (Phoenix Dactylifera) Seed in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *J. Diabetes Metab.* **2017**, *9* (1), 1−9.

(24) Abdennabi, R.; Gaboriaud, N.; Ahluwalia, V.; Tchoumtchoua, J.; Elgheryeni, A.; Skaltsou, A. L. Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Date Palm Saps (*Phoenix Dactylifera* L.) and Their Antioxidant, Antidiabetic and Antibacterial Activities Evaluation. *Mathews J. Diabetes Obesity.* **2017**, *2* (2), 1−6.

(25) Louaer, M.; Zermane, A.; Larkeche, O.; Meniai, A. Experimental Study and Optimization of the Extraction of Algerian Date Stones Oil (*Phoenix Dactylifera* L.) Using Supercritical Carbon Dioxide. *J. Food Process Eng.* **2019**, *42* (4), No. e13049.

(26) Fornari, T.; Vicente, G.; Vázquez, E.; García-Risco, M. R.; Reglero, G. Isolation of Essential Oil from Different Plants and Herbs by Supercritical Fluid Extraction. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1250*, 34−48.

https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255
Biomacromolecules XXXX, XXX, XXX−XXX

(27) Pourmortazavi, S. M.; Hajimirsadeghi, S. S. Supercritical Fluid Extraction in Plant Essential and Volatile Oil Analysis. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1163* (1−2), 2−24.
(28) Sagiri, S. S.; Anis, A.; Pal, K. Review on Encapsulation of Vegetable Oils: Strategies, Preparation Methods and Applications. *Polym.-Plast. Technol. Eng.* **2016**, *55* (3), 37−41.
(29) Elmowafy, M.; Samy, A.; Abdelaziz, A. E.; Shalaby, K.; Salama, A.; Raslan, M. A.; Abdelgawad, M. A. Polymeric Nanoparticles Based Topical Gel of Poorly Soluble Drug: Formulation, *Ex-Vivo* and in *Vivo* Evaluation. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* **2017**, *6* (2), 184−191.
(30) Bolhassani, A.; Javanzad, S.; Saleh, T.; Hashemi, M.; Aghasadeghi, M. R.; Sadat, S. M. Polymeric Nanoparticles. *Hum. Vaccines Immunother.* **2014**, *10* (2), 321−332.
(31) Anton, N.; Benoit, J.-P.; Saulnier, P. Design and Production of Nanoparticles Formulated from Nano-Emulsion Templates—A Review. *J. Controlled Release* **2008**, *128* (3), 185−199.
(32) Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Polymer-Based Nanocapsules for Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2010**, *385* (1−2), 113−142.
(33) Jawahar, N.; Meyyanathan, S. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting: A Comprehensive Review. *Int. J. Heal. Allied Sci.* **2012**, *1* (4), 217−223.
(34) Miladi, K.; Ibraheem, D.; Iqbal, M.; Sfar, S.; Fessi, H.; Elaissari, A. Particles from Preformed Polymers as Carriers for Drug Delivery. *EXCLI J.* **2014**, *13*, 28−57.
(35) Couvreur, P.; Barratt, G.; Fattal, E.; Vauthier, C. Nanocapsule Technology: A Review. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2002**, *19* (2), 99−134.
(36) Singh, A.; Garg, G.; Sharma, P. K. Nanospheres: A Novel Approach for Targeted Drug Delivery System. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2010**, *5* (3), 84−88.
(37) Rao, J. P.; Geckeler, K. E. Polymer Nanoparticles: Preparation Techniques and Size-Control Parameters. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36* (7), 887−913.
(38) Gültekin, H. E.; Degim, Z. Biodegradable Polymeric Nanoparticles Are Effective Systems for Controlled Drug Delivery. *FABAD J. Pharm. Sci.* **2013**, *38* (2), 107−118.
(39) Badri, W.; Miladi, K.; Nazari, Q. A.; Fessi, H.; Elaissari, A. Effect of Process and Formulation Parameters on Polycaprolactone Nanoparticles Prepared by Solvent Displacement. *Colloids Surf., A* **2017**, *516*, 238−244.
(40) Yenilmez, E. Desloratadine-Eudragit® RS100 Nanoparticles: Formulation and Characterization. *Turk. J. Pharm. Sci.* **2017**, *14* (2), 148−156.
(41) Pignatello, R.; Amico, D.; Santina, C.; Giunchedi, P.; Spadaro, C.; Puglisi, G. Preparation and Analgesic Activity of Eudragit RS100® Microparticles Containing Diflunisal. *Drug Delivery* **2001**, *8* (1), 35−45.
(42) Shaji, J.; Kumbhar, M. Formulation and Characterization of Linezolid Loaded Eudragit RS100 Polymeric Nanoparticles. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2019**, *10* (4), 1944−1952.
(43) Dillen, K.; Vandervoort, J.; Van den Mooter, G.; Ludwig, A. Evaluation of Ciprofloxacin-Loaded Eudragit® RS100 or RL100/PLGA Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2006**, *314* (1), 72−82.
(44) Bucolo, C.; Maltese, A.; Puglisi, G.; Pignatello, R. Enhanced Ocular Anti-Inflammatory Activity of Ibuprofen Carried by an Eudragit RS100® Nanoparticle Suspension. *Ophthalmic Res.* **2002**, *34* (5), 319−323.
(45) Hani, U.; Sudeendra, R.; Shivakumar, H. G. Formulation Design and Evaluation of Metronidazole Microspheres in a Bioadhesive Gel for Local Therapy of Vaginal Candidiasis. *Lat. Am. J. Pharm.* **2011**, *30* (1), 161−167.
(46) Pignatello, R.; Bucolo, C.; Ferrara, P.; Maltese, A.; Puleo, A.; Puglisi, G. Eudragit Rs100 Nanosuspensions for the Ophthalmic Controlled Delivery of Ibuprofen. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, *16*, 53−61.
(47) Younis, N.; Shaheen, M. A.; Abdallah, M. H. Silymarin-Loaded Eudragit® RS100 Nanoparticles Improved the Ability of Silymarin to Resolve Hepatic Fibrosis in Bile Duct Ligated Rats. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *81*, 93−103.
(48) Tayel, S. A.; El-Nabarawi, M. A.; Tadros, M. I.; Abd-Elsalam, W. H. Positively Charged Polymeric Nanoparticle Reservoirs of Terbinafine Hydrochloride: Preclinical Implications for Controlled Drug Delivery in the Aqueous Humor of Rabbits. *AAPS PharmSciTech* **2013**, *14* (2), 782−793.
(49) Dillen, K.; Bridts, C.; Van der Veken, P.; Cos, P.; Vandervoort, J.; Augustyns, K.; Stevens, W.; Ludwig, A. Adhesion of PLGA or Eudragit/PLGA Nanoparticles to Staphylococcus and Pseudomonas. *Int. J. Pharm.* **2008**, *349* (1−2), 234−240.
(50) Damgé, C.; Maincent, P.; Ubrich, N. Oral Delivery of Insulin Associated to Polymeric Nanoparticles in Diabetic Rats. *J. Controlled Release* **2007**, *117* (2), 163−170.
(51) Lopedota, A.; Trapani, A.; Cutrignelli, A.; Chiarantini, L.; Pantucci, E.; Curci, R.; Manuali, E.; Trapani, G. The Use of Eudragit RS 100/Cyclodextrin Nanoparticles for the Transmucosal Administration of Glutathione. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *72* (3), 509−520.
(52) Trapani, A.; Laquintana, V.; Denora, N.; Lopedota, A.; Cutrignelli, A.; Franco, M.; Trapani, G.; Liso, G. Eudragit RS 100 Microparticles Containing 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin and Glutathione: Physicochemical Characterization, Drug Release and Transport Studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2007**, *30* (1), 64−74.
(53) Lamprecht, A.; Koenig, P.; Ubrich, N.; Maincent, P.; Neumann, D. Low Molecular Weight Heparin Nanoparticles: Mucoadhesion and Behaviour in Caco-2 Cells. *Nanotechnology* **2006**, *17*, 3673−3680.
(54) Cortesi, R.; Ravani, L.; Menegatti, E.; Esposito, E.; Ronconi, F. Eudragit Microparticles for the Release of Budesonide: A Comparative Study. *Indian J. Pharm. Sci.* **2012**, *74* (5), 415−421.
(55) Lee, S. H.; Bajracharya, R.; Min, J. Y.; Han, J.-W.; Park, B. J.; Han, H.-K. Strategic Approaches for Colon Targeted Drug Delivery: An Overview of Recent Advancements. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 68.
(56) Khayata, N.; Abdelwahed, W.; Chehna, M. F.; Charcosset, C.; Fessi, H. Preparation of Vitamin E Loaded Nanocapsules by the Nanoprecipitation Method: From Laboratory Scale to Large Scale Using a Membrane Contactor. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423* (2), 419−427.
(57) Rosset, V.; Ahmed, N.; Zaanoun, I.; Stella, B.; Fessi, H.; Elaissari, A. Elaboration of Argan Oil Nanocapsules Containing Naproxen for Cosmetic and Transdermal Local Application. *J. colloid Sci. Biotechnol.* **2012**, *1*, 218−224.
(58) Badri, W.; El Asbahani, A.; Miladi, K.; Baraket, A.; Agusti, G.; Nazari, Q. A.; Errachid, A.; Fessi, H.; Elaissari, A. Poly(ε-Caprolactone) Nanoparticles Loaded with Indomethacin and Nigella Sativa L. Essential Oil for the Topical Treatment of Inflammation. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* **2018**, *46*, 234−242.
(59) Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. P.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, *55* (1), R1−R4.
(60) Govender, T.; Stolnik, S.; Garnett, M.; Illum, L.; Davis, S. PLGA Nanoparticles Prepared by Nanoprecipitation: Drug Loading and Release Studies of a Water Soluble Drug. *J. Controlled Release* **1999**, *57* (2), 171−185.
(61) Quintanar-Guerrero; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24* (12), 1113−1128.
(62) Limayem Blouza, I.; Charcosset, C.; Sfar, S.; Fessi, H. Preparation and Characterization of Spironolactone-Loaded Nanocapsules for Pediatric Use. *Int. J. Pharm.* **2006**, *325* (1−2), 124−131.
(63) Dong, Y.; Feng, S. Methoxy Poly(Ethylene Glycol)-Poly(Lactide) (MPEG-PLA) Nanoparticles for Controlled Delivery of Anticancer Drugs. *Biomaterials* **2004**, *25*, 2843−2849.
(64) Song, K. C.; Lee, H. S.; Choung, I. Y.; Cho, K. I.; Ahn, Y.; Choi, E. J. The Effect of Type of Organic Phase Solvents on the Particle Size of Poly(D,L-lactide-*co*-glycolide) Nanoparticles. *Colloids Surf., A* **2006**, *276*, 162−167.
(65) Mohsen-Nia, M.; Amiri, H.; Jazi, B. Dielectric Constants of Water, Methanol, Ethanol, Butanol and Acetone: Measurement and Computational Study. *J. Solution Chem.* **2010**, *39*, 701−708.

https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255
Biomacromolecules XXXX, XXX, XXX−XXX

(66) Tarhini, M.; Benlyamani, I.; Hamdani, S.; Agusti, G.; Fessi, H.; Greige-Gerges, H.; Bentaher, A.; Elaissari, A. Protein-Based Nanoparticle Preparation Via Nanoprecipitation Method. *Materials* **2018**, *11* (3), 1−18.
(67) Stainmesse, S.; Orecchioni, A. -M.; Nakache, E.; Puisieux, F.; Fessi, H. Formation and Stabilization of a Biodegradable Polymeric Colloidal Suspension of Nanoparticles. *Colloid Polym. Sci.* **1995**, *273*, 505−511.
(68) Froiio, F.; Ginot, L.; Paolino, D.; Lebaz, N.; Bentaher, A.; Fessi, H.; Elaissari, A. Essential Oils-Loaded Polymer Particles: Preparation, Characterization and Antimicrobial Property. *Polymers (Basel, Switz.)* **2019**, *11* (6), 1017.
(69) Chorny, M.; Fishbein, I.; Danenberg, H. D.; Golomb, G. Lipophilic Drug Loaded Nanospheres Prepared by Nanoprecipitation: Effect of Formulation Variables on Size, Drug Recovery and Release Kinetics. *J. Controlled Release* **2002**, *83*, 389−400.
(70) Bilati, U.; Allemann, E.; Doelker, E. Development of a Nanoprecipitation Method Intended for the Entrapment of Hydrophilic Drugs into Nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *24* (1), 67−75.
(71) Guhagarkar, S. A.; Malshe, V. C.; Devarajan, P. V. Nanoparticles of Polyethylene Sebacate: A New Biodegradable Polymer. *AAPS PharmSciTech* **2009**, *10* (3), 935−942.
(72) Khan, M. R.; Sayed, E. Sulfur Removal from Heavy and Light Petroleum Hydrocarbon by Selective Oxidation. In *Advances in Clean Hydrocarbon Fuel Processing: Science and Technology*; Khan, M. R., Ed.; Woodhead Publishing: Sawston, U.K., 2011; pp 243−261.
(73) Miladi, K.; Sfar, S.; Fessi, H.; Elaissari, A. Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications. In *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*; Vauthier, C., Ponchel, G., Eds.; Springer: Cham, 2016; pp 17−53.
(74) Asadi, H.; Rostamizadeh, K.; Salari, D.; Hamidi, M. Preparation of Biodegradable Nanoparticles of Tri-Block PLA-PEG-PLA Copolymer and Determination of Factors Controlling the Particle Size Using Artificial Neural Network. *J. Microencapsulation* **2011**, *28* (5), 406−416.
(75) Rosset, V.; Ahmed, N.; Zaanoun, I.; Stella, B.; Fessi, H.; Elaissari, A. Elaboration of Argan Oil Nanocapsules Containing Naproxen for Cosmetic and Transdermal Local Application. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **2012**, *1* (2), 218−224.
(76) Badri, W.; Miladi, K.; Eddabra, R.; Fessi, H.; Elaissari, A. Elaboration of Nanoparticles Containing Indomethacin: Argan Oil for Transdermal Local and Cosmetic Application. *J. Nanomater.* **2015**, *2015*, 1−9.
(77) Jahangirian, H.; Haron, M. J.; Yusof, N. A.; Silong, S.; Kassim, A.; Rafiee-Moghaddam, R.; Peyda, M.; Gharayebi, Y. Enzymatic Synthesis of Fatty Hydroxamic Acid Derivatives Based on Palm Kernel Oil. *Molecules* **2011**, *16* (8), 6634−6644.
(78) Olowokere, J.; Onen, A.; Odineze, M.; B'aga, I.; Kefas, E. Extraction and Characterization of Oil from Date Palm (*Phoenix Dactylifera*) Seed. *Asian J. Appl. Chem. Res.* **2019**, *3* (4), 1−9.
(79) Ali, M. A.; Al-Hattab, T. A.; Al-hydary, I. A. Extraction of Date Palm Seed Oil (*Phoenix dactylifera*) by Soxhlet Apparatus. *Int. J. Adv. Eng. Technol.* **2015**, *8* (3), 261−271.
(80) Sibokoza, S. B.; Moloto, M. J.; Mtunzi, F.; Moloto, N. Diphenyldiselenide Mediated Synthesis of Copper Selenide Nanoparticles and Their Poly(Methyl Methacrylate) Nanofibers. *Asian J. Chem.* **2018**, *30* (7), 1455−1459.
(81) Khurshid, M. F.; Hussain, T.; Masood, R.; Hussain, N. Development and Evaluation of a Controlled Drug Delivery Wound Dressing Based on Polymeric Porous Microspheres. *J. Ind. Text.* **2016**, *46* (3), 986−999.
(82) Du, J.; Sun, R.; Zhang, S.; Govender, T.; Zhang, L.; Xiong, C.; Peng, Y. Novel Polyelectrolyte Carboxymethyl Konjac Glucomannan-Chitosan Nanoparticles for Drug Delivery. *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 954−958.
(83) Boddohi, S.; Killingsworth, C. E.; Kipper, M. J. Polyelectrolyte Multilayer Assembly as a Function of PH and Ionic Strength Using the Polysaccharides Chitosan and Heparin. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2021−2028.
(84) Agarwal, P.; Gupta, R. α-Amylase Inhibition Can Treat Diabetes Mellitus. *Res. Rev. J. Med. Heal. Sci.* **2016**, *5* (4), 1−8.
(85) Zengin, G.; Locatelli, M.; Carradori, S.; Mocan, A. M.; Aktumsek, A. Total Phenolics, Flavonoids, Condensed Tannins Content of Eight Centaurea Species and Their Broad Inhibitory Activities against Cholinesterase, Tyrosinase, α-Amylase and α-Glucosidase. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* **2016**, *44* (1), 195−200.
(86) Teng, H.; Chen, L. α-Glucosidase and α-Amylase Inhibitors from Seed Oil: A Review of Liposoluble Substance to Treat Diabetes. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *57* (16), 3438−3448.
(87) Vassiliou, E. K.; Gonzalez, A.; Garcia, C.; Tadros, J. H.; Chakraborty, G.; Toney, J. H. Oleic Acid and Peanut Oil High in Oleic Acid Reverse the Inhibitory Effect of Insulin Production of the Inflammatory Cytokine TNF- Both In Vitro and In Vivo Systems. *Lipids Health Dis.* **2009**, *8*, 1−10.
(88) Nguyen, T.; Um, B.; Kim, S. Two Unsaturated Fatty Acids with Potent Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity Purified from the Body Wall of Sea Cucumber (*Stichopus japonicus*). *J. Food Sci.* **2011**, *76*, 208−214.
(89) Shanker, K.; Mohan, G. K.; Hussain, M. A.; Jayarambabu, N.; Pravallika, P. L. Green Biosynthesis, Characterization, In Vitro Antidiabetic Activity, and Investigational Acute Toxicity Studies of Some Herbal-Mediated Silver Nanoparticles on Animal Models. *Pharmacogn. Mag.* **2016**, *13* (49), 188−192.
(90) Kavitha, K.; Sujatha, K.; Manoharan, S. Development, Characterization and Antidiabetic Potentials of *Nilgirianthus ciliatus* Nees Derived Nanoparticles. *J. Nanomed. Biother. Discovery* **2017**, *7* (2), 152.
(91) Su, C. H.; Hsu, C. H.; Ng, L. T. Inhibitory Potential of Fatty Acids on Key Enzymes Related to Type 2 Diabetes. *BioFactors.* **2013**, *39* (4), 415−421.
(92) Miyazawa, M.; Yagi, N.; Taguchi, K. Inhibitory Compounds of Alpha-Glucosidase Activity from Arctium Lappa L. *J. Oleo Sci.* **2005**, *54*, 589−594.

https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255
Biomacromolecules XXXX, XXX, XXX−XXX

International Journal of Pharmaceutics 593 (2021) 120138

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Nanocapsules containing *Saussurea lappa* essential oil: Formulation, characterization, antidiabetic, anti-cholinesterase and anti-inflammatory potentials

Narimane Lammari [a,b], Tanguy Demautis [c], Ouahida Louaer [b], Abdeslam Hassen Meniai [b], Herve Casabianca [d], Chawki Bensouici [e], Gilles Devouassoux [c], Hatem Fessi [a], Abderrazzak Bentaher [c], Abdelhamid Elaissari [a,*]

[a] Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon-1, CNRS, LAGEPP UMR 5007, F-69622 Lyon, France
[b] Environmental Process Engineering Laboratory, University Constantine 3, Salah Boubnider, 25000 Constantine, Algeria
[c] Inflammation and Immunity of the Respiratory Epithelium – EA7426 (PI3) – South Medical University Hospital - Lyon 1 Claude Bernard University, Pierre-Bénite, France
[d] Univ Lyon, University Claude Bernard Lyon-1, CNRS, ISA-UMR 5280, 69622 Villeurbanne, France
[e] Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt), 25000 Constantine, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:
Saussurea lappa
Essential oil
Nanoparticles
Antidiabetic
Anti-Alzheimer
Anti-inflammatory

ABSTRACT

Plant-based remedies have been widely used for the management of variable diseases due to their safety and less side effects. In the present study, we investigated *Saussurea lappa* CB. Clarke. (SL) given its largely reported medicinal effects. Specifically, our objective was to provide an insight into a new polymethyl methacrylate based nanocapsules as carriers of SL essential oil and characterize their biologic functions. The nanoparticles were prepared by nanoprecipitation technique, characterized and analyzed for their cytotoxicity, anti-inflammatory, anti-Alzheimer and antidiabetic effects. The results revealed that the developed nanoparticles had a diameter around 145 nm, a polydispersity index of 0.18 and a zeta potential equal to +45 mV and they did not show any cytotoxicity at 25 $\mu g \cdot mL^{-1}$. The results also showed an anti-inflammatory activity (reduction in metalloprotease MMP-9 enzyme activity and RNA expression of inflammatory cytokines: TNF-α, GM-CSF and IL1β), a high anti-Alzheimer's effect (IC50 around 25.0 and 14.9 $\mu g \cdot mL^{-1}$ against acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, respectively), and a strong antidiabetic effect (IC50 were equal to 22.9 and 75.8 $\mu g \cdot mL^{-1}$ against α-amylase and α-glucosidase, respectively). Further studies are required including the *in vivo* studies (e.g., preclinical), the pharmacokinetic properties, the bioavailability and the underlying associated metabolic pathways.

1. Introduction

Nature is an inexhaustible source of molecular varieties with a great therapeutic potential, representing nowadays a valuable pool for the identification of novel drug leads (Calixto, 2019; Koparde et al., 2019). In the past decades, pharmaceutical industry has shifted its main focus toward the synthetic products due to their easy quality control, production and time effectiveness (David et al., 2015). However, their cost, safety and efficiency remained always questionable, resulting in the dependence on the plant-based drug discovery by more than 80% of the total population in developed countries (Veeresham, 2012). Since a long time plant-based drug discovery had been the basis in the medical management of a great number of known diseases and body malfunction (Atanasov et al., 2015). *Saussurea lappa* CB. Clarke. known as costus, belongs to the Asteraceae family and is well known for its enormous medicinal effects. Ethnopharmacological surveys have pointed that the roots and leaves of the plant are used in the traditional treatment of several diseases like throat infection, cough, asthma, leprosy, tuberculosis, malaria, inflammation, convulsion, helminthic infestation and rheumatism (Gautam and Asrani, 2018; Kaur et al., 2019; Madhuri et al., 2012; Singh et al., 2017; Zahara et al., 2014). *Saussurea lappa* (SL) is considered as a rich source of triterpenoids, flavonoids, steroids and sesquiterpene lactones (Singh et al., 2017), and is reported to have several biological potentials including antimicrobial (Abdelwahab et al.,

* Corresponding author.
E-mail address: abdelhamid.elaissari@univ-lyon1.fr (A. Elaissari).

https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120138
Received 25 September 2020; Received in revised form 26 November 2020; Accepted 27 November 2020
Available online 3 December 2020
0378-5173/© 2020 Published by Elsevier B.V.

2019), larvicide (Liu et al., 2012), antioxidant (Sadik et al., 2017), antihepatotoxic (Ansari et al., 2018), anti-inflammatory (Tag et al., 2016), anticancerous (Tian et al., 2017), antiulcerous (Sutar et al., 2011), anticonvulsant (Dhar et al., 2016) and antidiabetic activities (Raafat et al., 2019). A literature survey revealed that most of the studies dealt with the investigation of the biological effects of the SL extracts, which were obtained by using the conventional organic solvent extraction processes.

Simultaneously with the emergence of plant-based drug formulations, the pharmaceutical field has known during the last era a steady growth in investment in nanotechnology in order to improve existing treatments and develop novel therapies (Matteucci et al., 2018). Polymeric nanoparticles (NP) have been proposed as a novel approach to overcome difficulties encountered in traditional drug delivery such as poor aqueous solubility, low bioavailability, poor stability and bitter taste (Giaretta et al., 2019; Ma and Williams, 2018; Umerska et al., 2018). Sonaje et al. (2010) noticed an enhanced intestinal absorption of insulin, a prolonged reduction in blood glucose levels and an increased bioavailability upon insulin encapsulation in chitosan/ poly(γ-glutamic acid) based NP. Moreover, Huh et al. (2005) demonstrated that encapsulation of paclitaxel upsurge dramatically its water solubility by a factor of 1000 and ensure its long-term stability. Additionally, these nanocarriers (nanospheres or nanocapsules) may provide preferential accumulation of bioactive agents at a specific tissue or cell (Lombardo et al., 2019).

Poly (ethyl acrylate-co-methyl methacrylate-co-trimethylammoniethyl methacrylate chloride) (PMMA), a synthetic polymer known as Eudragit® RS100, was widely used for developing polymeric NP due to its crucial features including biocompatibility, permeability, non-toxicity, non-irritancy and controlled drug release profile (Hani et al., 2011). In addition, PMMA was known for its mucoadhesive property. For instance, an electrostatic interaction would be expected between its ammonium groups and negatively charged chemical groups of bioactive agents or target tissue surface (i.e. mucin) resulting in boosting cellular uptake (Dillen et al., 2008; Tayel et al., 2013).

The last decade had seen the integration of nanotechnology and herbal medicine to overcome the limitations of using herbal formulations in a scientific way in the aim to promote an efficient therapeutic action (Pattabhiramaiah et al., 2020). The expected benefits from the encapsulation of plant-based products included an enhanced aqueous solubility and bioavailability, a better protection from the environment (pH, temperature, humidity and oxygen) and a persistent delivery (Bilia et al., 2014). Several studies have been dedicated to the encapsulation of plant derived-metabolites such as essential oil (EO) (Chifiriuc et al., 2017; El-Asbahani et al., 2015; Froiio et al., 2019; Herculano et al., 2015; Jummes et al., 2020; Partheniadis et al., 2020; Pina-Barrera et al., 2019; Timbe et al., 2020), vegetable oils (Contri et al., 2013, 2016; Lammari et al., 2020a; Sousa et al., 2013), plants extracts (Azeez et al., 2020; Ma et al., 2018; Mughees et al., 2020; Servat-Medina et al., 2015), etc. However, to the best of our knowledge, neither the extract nor the EO of costus roots have been previously encapsulated in polymeric nanoparticles.

In this study, we report for the first time, the encapsulation of SL-EO in PMMA based-NP and the investigation of the cytotoxicity, anti-inflammatory, anti-Alzheimer and antidiabetic potentials of such formulation. First and contrary to the majority of previously reported studies to extract SL-EO, an innovative and environmentally friendly technique (supercritical CO_2 extraction process) was used to obtain an extract free of any traces of organic solvents. Then, gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS) was carried out in order to characterize the obtained SL-EO before its encapsulation in PMMA-NP. The obtained particles were then characterized by dynamic light scattering, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and transmission electron microscopy. Finally, *in vitro* cytotoxicity, anti-Alzheimer, antidiabetic and anti-inflammatory activities were investigated for SL-EO in its free and encapsulated form.

2. Material and methods

2.1. Plant material

The dried roots of Indian *Saussurea lappa* CB. Clarke. were purchased from herb store (Bordj Bou Arreridj, Algeria). The roots were washed with water, air dried, ground to an approximate size of 0.3 mm and stored in air-tight bottles ready for further analysis.

2.2. Chemical reagents

Eudragit RS®100 was purchased from EVONIK (EVONIK, Germany). Carbon dioxide (99.5%) was supplied by SIDAL SPA Air liquid, Algiers, Algeria. Acarbose (≥95%), *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (≥99%), starch powder, acetylthiocholine iodide, S-butyrylthiocholine iodide, 5,5′-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB), galantamine, *Aspergillus oryzae*-derived α-amylase, *Saccharomyces cerevisiae*-derived α-glucosidase (Type I, ≥10 units/mg protein), electric eel-derived acetylcholinesterase (AChE, Type-VI-S, EC 3.1.1.7, 827.84 U/mg) and horse serum-derived butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8, 7.8 U/mg) were all obtained from Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germany). Potassium iodide was obtained from Biochem Chemopharma. Deionized water from Milli-Q system was used in all experiments. All other chemicals and solvents were of analytical grade.

2.3. Extraction of essential oil

The dried powder (80 g) of SL was subjected to the supercritical carbon dioxide extraction using a dynamic pilot-plant (Separex 4343, type SF2) supplied by Separex (Champigneulles, France). The operating extraction parameters were as follow: dynamic extraction time: 180 min; CO_2 flow rate: 50 g/min; CO_2 pressure: 100 bar; extraction temperature: 40 °C and separation temperature: 30 °C (Fig. 1). The oil yield value was determined around 23%.

2.4. Gas chromatography analysis of Saussurea lappa EO

Analysis of SL-EO was performed at the Institut des Sciences analytiques (ISA), CNRS, at Villeurbanne, France, using two GC systems, equipped with two kinds of capillary columns:

2.4.1. Gas chromatography – Flame ionization detector (GC-FID)

The analysis was carried out on an Agilent 6890 N apparatus equipped with a split / splitless injection and a FID detector. SL-EO (1 μL volume) was firstly injected in split mode (1/60) to an INNOWAX column (60 m × 0.32 mm, 0.50-μm film thickness) under a constant flow (1.3 mL/min rate) of helium used as gas carrier. The initial temperature of the column was maintained constant at 60 °C for 2 min and then programmed to 245 °C at a rate of 2 °C/min and then held isothermally for 30 min. A second injection was conducted on a HP-1 (Agilent) column (50 m × 0.32 mm, 0.50-μm film thickness) with a temperature program as follow: 8 min at 80 °C, increased to 220 °C at a rate of 2 °C/min and then increased to 310 °C at 10 °C/min and finally held isothermally 20 min at 310 °C. Helium was used as the carrier gas at a constant pressure (13psi). In both cases, the analyses were performed with injector and detector temperatures maintained at 250 °C.

2.4.2. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC–MS)

The EO components were identified by mass spectrometry 6890 N gas chromatography coupled to Agilent 5973 N mass selective detector. SL-EO (1 μL volume) was injected in a split mode (1/60) at 250°C to an HP-5MS capillary column (0.25 mm × 30 m, 0.25-μm film thickness). The operating conditions were as follows: the GC temperature program was held at 60°C for 2 min, then increased at 3°C/min from 60°C to 250°C , held at 250°C for 2 min, increased to 325°C at 10°C /min, and then held isothermally for 15 min; helium flow rate was maintained at

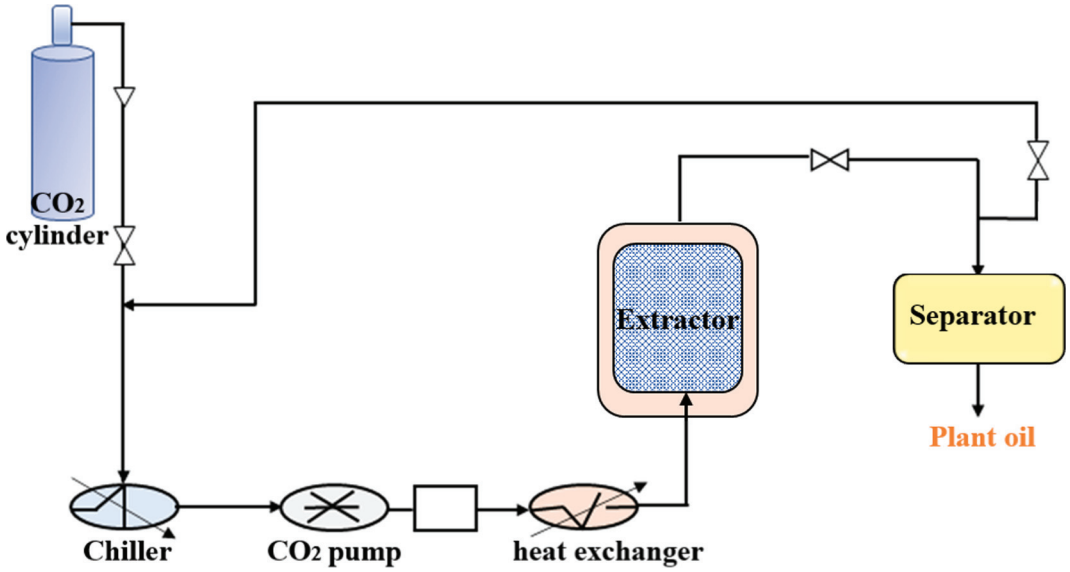


Fig. 1. Supercritical carbon dioxide extraction pilot.

1.0 mL/min; the MS energy ionization was set at 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired in scan mode over the mass ranged 35–350 Daltons.

2.4.3. Identification of Saussurea lappa EO components

Relative percentages of SL-EO components were determined basing on their GC peak areas without using correction factors. The retention indices were determined by linear interpolation in relation to a homologous series of n-alkanes (C_5–C_{30}) injected on the two capillary columns under the same operating conditions with that of literature data and those of the add-in-house database available in the ISA laboratory. Further identification was made by computer matching with two commercial mass spectral libraries (NIST data gateway database 2005 and Wiley).

2.5. Preparation of PMMA loaded nanoparticles

PMMA-NP were prepared by means of the nanoprecipitation technique (Fessi et al., 1989) using a protocol that was already described and studied systematically throughout the blank nanoparticles preparation (Lammari et al., 2020a) and according to which 240 mg of PMMA was dissolved in 15 mL of ethanol and then mixed with 120 mg SL-EO. Consecutively the prepared organic phase was added carefully and very slowly to the aqueous phase consisting of 30 mL water at ambient temperature and under moderate magnetic stirring. The evaporation of the organic solvent was performed subsequently using Buchi Rotavapor R-124®. For blank nanoparticles, the same step was repeated without EO.

2.6. Characterization of PMMA loaded nanoparticles

2.6.1. Size distribution, polydispersity index, and zeta potential

In order to determine the average diameter, polydispersity index and zeta (ζ)-potential, the aqueous suspension of PMMA-NP was subjected to an analysis by dynamic light scattering (DLS) technique using a Zetasizer Nano ZS200 (Malvern Instruments, UK). Previous to each size measurement, nanoparticles were diluted in 1 mL of distilled water. While measuring the ζ- potential of prepared nanoparticles, a colloidal dispersion was made in 1 mM NaCl solution. All the measurements were performed in triplicate at ambient temperature and pH around 6.5 and the results were expressed as means and standard deviations.

2.6.2. Transmission electron microscopy

The morphology of the NP was investigated immediately after preparation, using a Philips CM120 microscope operated at 120 kV, at the "Centre Technologique des Microstructures" (CTμ) at the University of Lyon (Villeurbanne, France). Drops of the nanoparticle suspensions were placed on microscope grid (copper support covered with carbon) and the grids were analyzed after being allowed to dry by evaporation.

2.6.3. Fourier transform infrared spectroscopy

The infrared spectra of PMMA, un-encapsulated SL-EO and SL-EO loaded-NP were investigated using an FTIR spectrometer (Thermo Scientific Technologies FTIR spectrometer with IR MONIC Solution software). In this study, the oil loaded NP were freeze dried then analyzed; while, no initial preparation was taken place for SL-EO and PMMA. All spectra were recorded from 400 to 4000 cm^{-1} wavenumber range. Prior to each acquisition, blank background had been adjusted.

2.7. Stability study of Saussurea lappa EO-loaded PMMA nanoparticles

In order to assess the colloidal stability, the obtained EO-loaded NP were stored for a period of one month at 4, 25 and 40 °C. Nanoparticles physical stability was assessed via particle size and ζ-potential measurements which were carried out after each 10 days.

2.8. Cell and culture conditions

Human adenocarcinomic alveolar epithelial cells (A549), supplied by American Type Culture Collection LGC Standard, Molsheim, France, were cultured in DMEM/F-12 (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) enriched with 10% FBS (Gemini® Bio-Products, West Sacremento, CA) and 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies®, Grand Island, USA). Cells were grown in a humidified 5% CO_2 incubator at 37 °C.

2.9. Cytotoxicity test

At 80% of confluence, A549 cells were treated with SL-EO-solution (SL-EO dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO)), blank NP (non-loaded) and SL-EO loaded-NP formulations using different concentrations (12.5, 25, 50, 75, 100 and 200 μg/mL of oil content) for 24 h. After treatment, culture supernatants were harvested and released LDH was measured using Pierce LDH cytotoxicity assay kit (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's protocol.

2.10. Microscopy

After cell treatments, changes in morphology of A549 cells were observed through optical microscope after fixation and coloration with Kwik-Diff kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.11. Anti-inflammatory activity

A549 cells were treated, when they reach 80% of confluence, with SL-EO loaded-NP at the concentration of 25 μg/mL of oil content 1 h prior to lipopolysaccharides (LPS) (1 μg/mL) stimulation. After 1 h post LPS exposure, cells were lysed and processed for total RNA extraction and mRNA expression analysis.

2.11.1. Total RNA extraction

Total cellular RNA was isolated using EZ-10 DNAaway RNA Miniprep Kit (Biobasic) according to manufacturer instructions. Quality and quantity RNA were controlled with a Nanodrop spectrophotometer (ThermoScientific).

2.11.2. Real-Time PCR

The expression of mRNA was determined using Taqman quantitative Real-Time PCR on cDNA acquired from Reverse Transcriptase-PCR using Superscript TM IV (Thermo Fischer Scientific), following manufacturer specifications. Product was amplified with commercially available Taqman primers and Taqman Mastermix (Life Technologies) on AriaMx Real-time PCR system. The product reference for Taqman primers were the following: hTBP (Hs99999910_m1), hCSF2 (Hs00929873_m1), hTNFα (Hs00174128_m1) and hIL1β (Hs 01555410_m1). Real-Time PCR data was analyzed using the comparative Ct (ΔΔCT) method.

2.11.3. Gelatin zymography

Gelatin zymography to detect active proteases namely metalloproteases (MMP) was performed using cell culture supernatants of untreated and treated cells. Briefly, the samples were subjected to sodium dodecyl sulphate-poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 10% polyacrylamide containing 0.1% SDS and 1.5 mg/mL gelatin under non-reducing conditions without prior boiling. After electrophoresis, gels were washed in 2% Triton X-100 for 30 min to remove SDS, and subsequently immersed in a mixture containing Tris-HCl (50 mM) (pH 7.6), $CaCl_2$ (5 mM) and $ZnCl_2$ (0.5 μM) for 24 h at 37 °C. The gels were then stained (5 g Coomassie Brilliant Blue, 200 mL methanol, 50 mL acetic acid, 500 mL distilled deionized water) for 10 min at room temperature on a rocker and then destained in 20% methanol /10% acetic acid. Enzymatic activities were detected as clear bands of gelatin lysis against the blue background. Gels were scanned using ChemidocXRS BIORAD and analyzed with FIJI software. Densitometric analysis was performed on captured images, using ImageJ software.

2.12. In vitro cholinesterase activity assay

Cholinesterase activities of SL-EO loaded-NP, un-encapsulated oil and free NP were evaluated *in vitro* against Acetyl and Butyryl cholinesterase enzymes based on Ellman's method (Ellman et al., 1961) using a 96-well microplate reader, PerkinElmer Multimode Plate Reader EnSpire (National Center of biotechnology Research, Constantine, Algeria). Different concentrations of sample solution (10 μL) were mixed and incubated for 15 min at 25 °C with 150 μL of sodium phosphate buffer (100 mM, pH 8.0) and 20 μL of acetylcholinesterase or butyrylcholinesterase solution. Then, 10 μL of 0.5 mM DTNB was added along with 10 μL of acetylthiocholine iodide or butyrylthiocholine iodide. Galantamine hydrobromide was used as positive control. The absorbance was read at 412 nm utilizing a 96-well microplate reader. The IC50 (the concentration providing 50% enzyme inhibition) was calculated by plotting inhibition percentage against sample concentration.

2.13. In vitro alpha-amylase and alpha-glucosidase activity assay

The study of the antidiabetic activity of SL-EO loaded-NP, un-encapsulated oil and free NP was evaluated *in vitro* through the inhibition of two key enzymes (α-amylase and α-glucosidase) based on quantitative colorimetric assays using a 96-well microplate reader, PerkinElmer Multimode Plate Reader EnSpire (National Center of biotechnology Research, Constantine, Algeria).

2.13.1. Alpha amylase activity

Alpha amylase inhibitory activity was investigated using Caraway-Somogyi iodine/potassium iodide method as previously described with slight modifications (Yang et al., 2012). Different concentrations of sample (25 μL) were mixed with α-amylase solution (50 μL) and incubated at 37 °C for 10 min. Then, the reaction was started by adding starch solution (50 μL, 0.1%). Similarly, a blank was prepared by adding sample solution to all reaction reagents without enzyme solution. After incubation (10 min at 37 °C), the reaction was stopped by adding 25 μL HCl (1 M) and 100 μL iodine-potassium iodide solution. Acarbose was used as standard. The sample and blank absorbances were read at 630 nm by micro plate reader and the IC50 of all the formulations was calculated.

2.13.2. Alpha glucosidase activity

Alpha glucosidase inhibitory activity was measured using a method previously described with slight modifications (Vadivelan et al., 2019). In 96-well microplate, different concentration of sample solution (50 μL) were mixed with 100 μL of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.9) containing α-glucosidase solution and incubated at 37 °C for 15 min. Next, 50 μL of 5 mM *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside solution was added. After incubation (5 min at 37 °C), the sample and blank absorbances were read at 405 nm and the IC50 of all the formulations was determined. Acarbose was used as standard.

2.14. Statistical analysis

The data values are expressed as mean ± standard deviation (SD). The statistical significance of the differences between samples was determined using XLSTAT software with one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey post-test; $p < 0.05$ was selected such as criterion for significant differences.

3. Results and discussion

3.1. Gas chromatography analysis

To illustrate the chemical composition of SL-EO, two complementary methods were used: GC-FID and GC–MS. Two different kinds of capillary columns were used as well: the polar HP-Innowax and the apolar HP-1 in the aim of facilitating the separation and resolving the problem of co-elution of some compounds. The relative percentages of SL-EO components were depicted in Table 1. A total of 21 components of the EO were identified, accounting for 82.75% of the total oil. The principal compounds in SL-EO were dehydrocostus lactone as the major compound (55.39%) followed by costunolide (8.87%), dehydrosaussurea lactone (6.55%) and aplotaxene (4.73%). Oxygenated sesquiterpenes represented 13 out of the 21 compounds, corresponding to 75.92% of the whole EO, while 8 out of the 21 constituents were hydrocarbons sesquiterpenes, corresponding to 5.94% of the crude EO. The chemical composition of EO was in a good agreement with that reported in previous works (Chen et al., 2011; Liu et al., 2012; Zahara et al., 2014). Chen et al. reported that the EO extracted form costus roots collected from seven producing areas (provinces) all contained the two main

Table 1
Saussurea lappa essential oil chemical composition as determined by gas chromatography - flame ionization detector (GC - FID) and gas chromatography - mass spectrometry (GC–MS).

No	Component	Formula	RI-HP-1	RI-WAX	Content (%)
1	Beta elemene	$C_{15}H_{24}$	1388	1808	0.288
2	Dihydroionone	**$C_{13}H_{22}O$**	1396	–	0.088
3	Alpha ionone	**$C_{13}H_{20}O$**	1406	1876	0.147
4	Trans Beta Caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	1419	1628	0.288
5	Neryl acetone	$C_{13}H_{22}O$	1428	–	0.029
6	Alpha humulene	$C_{15}H_{24}$	1452	1704	0.033
7	Beta ionone	$C_{13}H_{20}O$	1464	1946	0.093
8	Alpha + Gamma curcumene	$C_{15}H_{22}$ /$C_{15}H_{24}$	1471	1801/ 1719	0.06
9	Pentadecene-1	$C_{15}H_{30}$	1474	1539	0.06
10	Beta selinene	$C_{15}H_{24}$	1482	1750	0.308
11	Alpha selinene	$C_{15}H_{24}$	1493	1758	0.17
12	Alpha elemol	$C_{15}H_{26}O$	1534	2108	0.085
13	Elema- 1,3,11(13)-Trien-12-al	$C_{15}H_{22}O$	1555	–	0.206
14	Oxyde Caryophyllene	$C_{15}H_{24}O$	1570	2024	0.291
15	Beta Eudesmol	$C_{15}H_{26}O$	1636	2268	1.256
16	Aplotaxene	$C_{17}H_{28}$	1660	2623	4.734
17	Beta costol	$C_{15}H_{24}O$	1748	2532	1.865
18	Alpha costol	$C_{15}H_{24}O$	1754	2607	1.034
19	Dehydrosaussurea lactone	**$C_{15}H_{20}O_2$**	1861	–	6.556
20	Costunolide	$C_{15}H_{20}O_2$	1891	–	8.874
21	Dehydrocostus lactone	$C_{15}H_{18}O_2$	1962	–	55.399
22	Unknown	–	2118	–	0.446
23	Unknown	–	2146	–	0.44
	Total				**82.75**

Sesquiterpene hydrocarbons: 5.94%; Sesquiterpene oxygenated: 75.92%; Unknown: 0.89.

components, dehydrocostus lactone (ranging from 16.30 to 25.36%) and costunolide (ranging from 4.28 to 8.32%) (Chen et al., 2011). Variation in EO composition may be ascribed to climatic and seasonal factors, harvest time and local as well as storage duration of medicinal plants. Dehydrocostus lactone and costunolide, are sesquiterpenes lactones, very known for their anticancer (Lin et al., 2015; Peng et al., 2017), anti-inflammatory (Park et al., 2014; Scarponi et al., 2014), gastro-protective (Zheng et al., 2016), anti-osteoclastogenic (Cheon et al., 2014; Li et al., 2019), antibacterial (Negi et al., 2014) and larvicidal (Liu et al., 2012) activities. Dehydrosaussurea lactone (8.87%) is very similar structurally to costunolide and has been previously shown to exhibit an anticancer activity by inducing cell cycle arrest against various cell lines (Chang et al., 2010), while, aplotaxene has been recently regarded as a bioactive agent in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases due to its immunosuppressive effect on T cells (Na et al., 2013).

Other compounds of significant medicinal and biological interests were identified in trace amounts in SL-EO (Table 1) and these include: β-eudesmol, a sesquiterpene, which was recently shown as an effective inhibitor of SARS-CoV-2 main protease (Aanouz et al., 2020), caryophyllene oxide as an analgesic and anti-inflammatory agent (Chavan et al., 2010), β-ionone as antioxidant and anticancer agent (Asokkumar et al., 2012) and α-humulene which was found as effective bioactive agent to inhibit drug-metabolizing enzymes in human liver (Nguyen et al., 2017).

3.2. Nanoparticles characterization

3.2.1. Dynamic light scattering measurements

According to Table 2, the average size (Z-average) of the PMMA-NP entrapped with SL-EO was significantly higher than that of blank NP ($p < 0.05$). Similar results were already reported in the literature (Lammari et al., 2020a; Rosset et al., 2012). Jummes et al. (2020) noticed larger sizes for palmarosa EO loaded poly-ε-caprolactone NP compared to the unloaded NP. They related the smallest particle size of empty NP to their empty interior. With respect to the PDI, low values were shown in this study (<0.2) with no significant difference ($p > 0.05$) between free and loaded-NP. Apparently, the PDI value reflected the aggregation level of NP (Jummes et al., 2020); thus, in the current study, the low PDI value reflected an homogeneous distribution of all particles.

Table 2
Particle size, polydispersity index and ζ-potential of blank and loaded PMMA nanoparticles.

	Z-average (nm)	PDI	ζ-potential (mV)
Blank NP	45 ± 2	0.19 ± 0.01	+39 ± 2
Saussurea lappa EO loaded-NP	145 ± 1	0.18 ± 0.01	+45 ± 2

The ζ-potential represents the overall surface charge that a particle acquires in a particular medium and it serves as a key indicator of the dispersion stability. Particles exhibiting ζ-potential values greater than + 30 mV or less than − 30 mV are colloidally stable due to repulsive electrostatic interactions (Barhoum et al., 2018). In this study, PMMA-NP exhibited a good colloidal stability since no aggregation has been observed and confirmed by the measured ζ-potential values ranging from + 39 to + 45 mV for free and loaded-NP, respectively. The positive charge of PMMA-NP was attributed to the ammonium quaternary groups of the polymer as previously described (Froiio et al., 2019). Higher ζ-potential values were found for SL-EO loaded-NP as compared to free NP due to the interaction of the EO with PMMA polymer. This result was in accordance with our previous study when encapsulating *Phoenix dactilyfera* seeds oil (Lammari et al., 2020a).

3.2.2. Nanoparticle morphology

Morphological characterization of the NP containing SL-EO by transmission electron microscopy showed that the NP exhibited spherical and regular form, as depicted in Fig. 2.

3.2.3. Fourier transform infrared spectroscopy analysis

Fourier transform infrared spectroscopy analysis was carried out to investigate the chemical interaction between SL-EO and PMMA. Apparently, drug-polymer interaction resulted in changes in FTIR spectra (Yenilmez, 2017). The FTIR patterns of SL-EO, PMMA and loaded-NP were shown in Fig. 3. In PMMA spectrum, the peak at 2950 corresponded to the stretching vibration of C-H aliphatic groups. The peaks at 1722 cm^{-1} and 1143 cm^{-1} were assigned to the stretching vibrations of C = O and C-O ester group, respectively; while the band at 1446 cm^{-1} referred to the bending vibration of C-H aliphatic groups. This was in agreement with what was reported in the literature (Khurshid et al., 2016; Sibokoza et al., 2018). In SL-EO spectrum, the broad band at 3419 cm^{-1} was correlated to O–H group of α-elemol, β-eudesmol, α- and β-costol. The small peaks at 2925 and 1439 cm^{-1} were due to C–H symmetrical stretching and bending vibrations of saturated hydrocarbons, respectively (Riaz et al., 2018). The strong absorption band at 1762 cm^{-1} indicated a five membered lactone present in dehydrosaussurea lactone, dehydrocostus lactone and costunolide (Zaghloul et al., 2014). Band at 1640 cm^{-1} and those between 649 and 998 cm^{-1} were referred to the C = C stretching and bending of alkene, respectively, present in all the EO constituents.

The superposition of SL-EO and PMMA FTIR spectrums on that of EO loaded-nanoparticles revealed an increase in the peak intensity in 1724 cm^{-1} as well as coming out of peaks in 2927, 2856, 1764 and 650 cm^{-1} which characterized SL-EO. This might be attributed to the interaction between SL-EO and PMMA in the nanoparticles. Therefore, SL-EO was efficiently encapsulated within the polymeric nanoparticles.

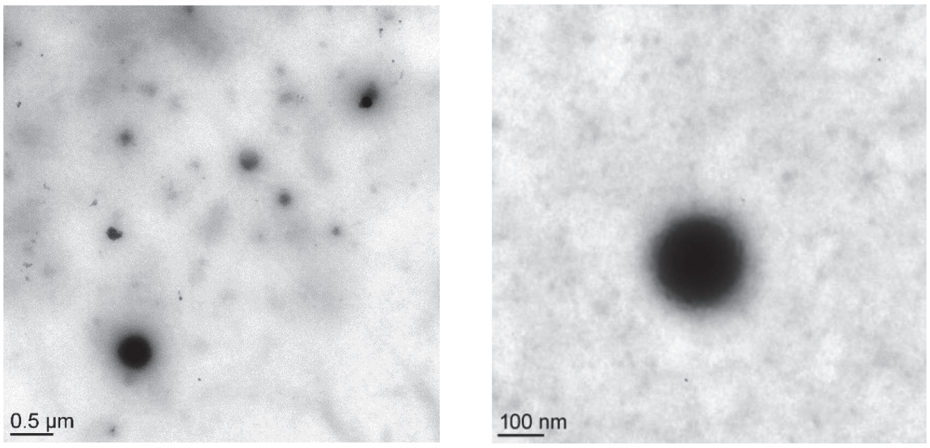


Fig. 2. Transmission Electron Microscopy images of *Saussurea lappa* EO loaded PMMA nanoparticles at 0.5 and 0.1 µm scale bar.

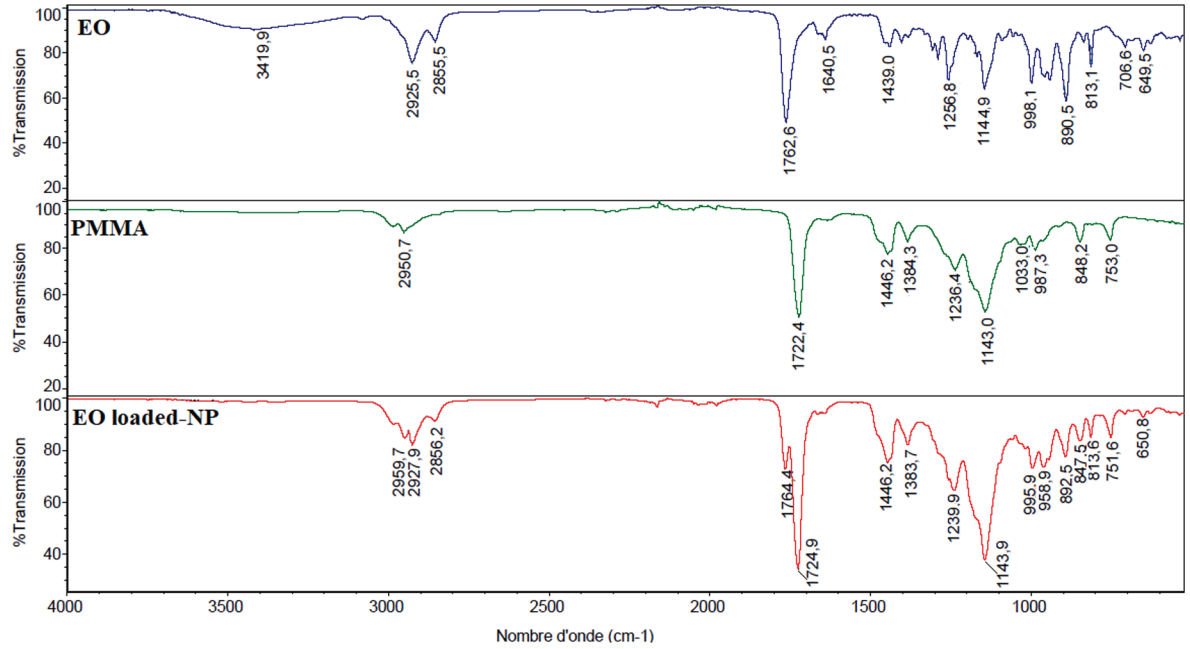


Fig. 3. Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) spectrum noted between 650 cm^{-1} and 4000 cm^{-1} for unencapsulated *Saussurea lappa* EO, PMMA and EO loaded-Nanoparticles.

3.3. Stability study

The colloidal stability of SL-EO loaded-NP formulation was investigated by analyzing the size and the ζ-potential as a function of temperature (4 °C, RT and 40 °C) during one month. As demonstrated in Fig. 4**A**, the average diameter of the prepared PMMA loaded-NP throughout the period of stability study was not changed significantly (ranging size was from 140 to 148 nm). The ζ-potential was found to be almost constant and in the vicinity of 45 mV +/- 5 mV at pH 6.

Moreover, the ζ-potential values of these NPs have been determined under different pH to get an idea about their stability upon biological applications. In this context, the ζ-potential was determined after the addition of either diluted HCl or NaOH to have different pH (3, 4, 5, 7, 9, 10 and 12) and the results are shown in Fig. 4**B.** By increasing the pH from 3 to 12, the ζ-potential decreased from +45 to +32 mV. These results were in conformity with those obtained by Du and coworkers (2004) for carboxymethyl konjac glucomannan–chitosan based-NP. In another study, the change in the ζ-potential measurements was related to the decrease in the charge density of the chitosan induced by the reduction of the concentration of H^+ ions (Boddohi et al., 2008). Although the ζ-potential decreased by varying pH, the NP remained stable with a ζ-potential around +32 mV.

3.4. In vitro cytotoxicity

The human lung epithelial A549 cell line is derived from an alveolar adenocarcinoma and has an epithelial like-morphology and is commonly used as *in vitro* model for cytotoxicity screening of formulations (Carterson et al., 2005). In the current study, LDH cytotoxicity test was used to determine the cell viability. LDH test is an indirect and colorimetric method to check cellular cytotoxicity. It measures the concentration of LDH enzyme released from the damaged cells. Released LDH catalyzes lactate oxidation to pyruvate with simultaneous reduction of NAD^+ to $NADH/H^+$ that in turn reduces tetrazolium salt to a red colored formazan that can be detected by spectrophotometry. The intensity of formed color reflects the amount of released LDH (Aslantürk, 2017).

In this study, A549 cells were first treated in a concentration-

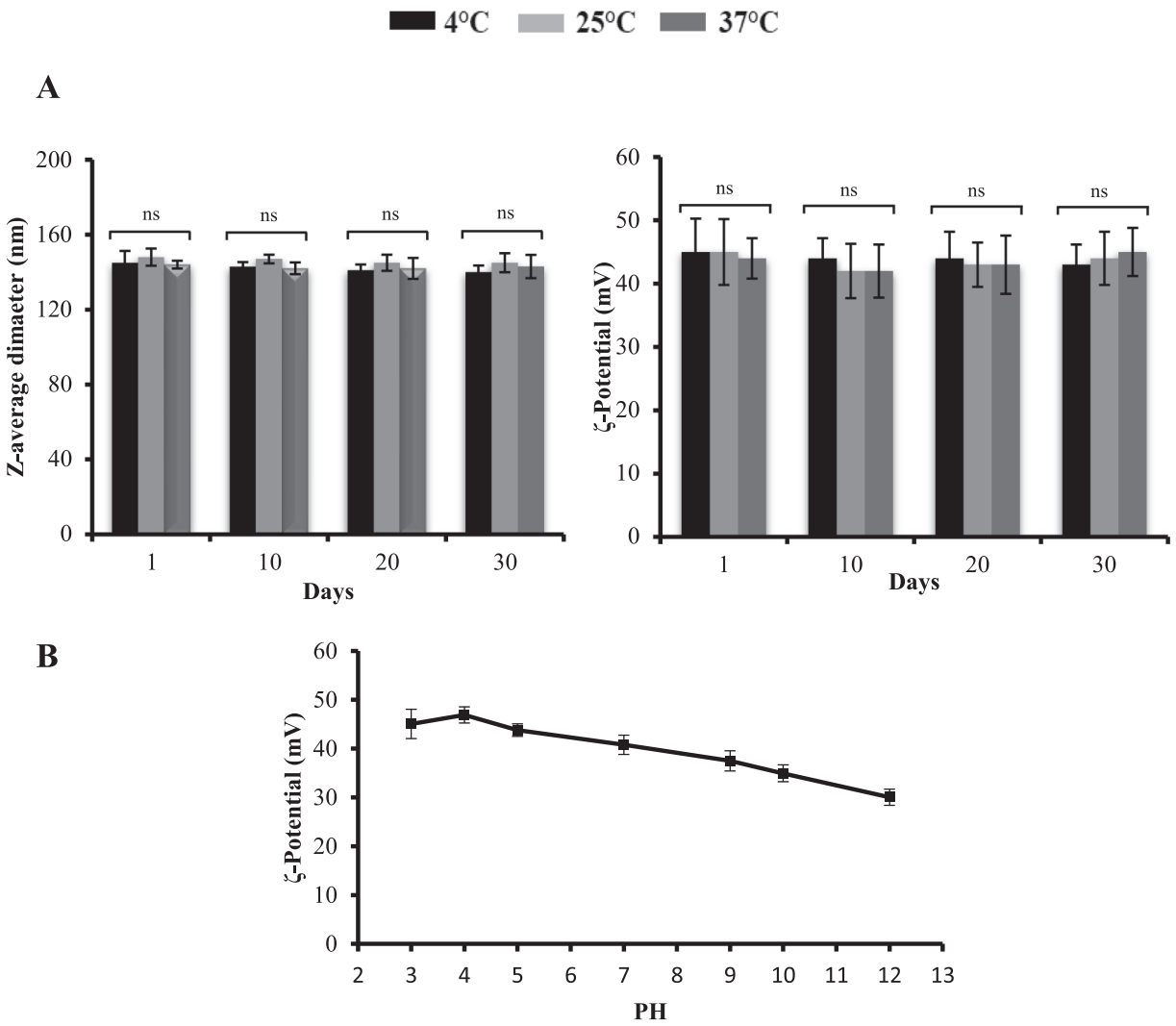


Fig. 4. Stability of PMMA based nanoparticles containing *Saussurea lappa* EO in terms of size, ζ-potential (A) and pH (B). Measurements from separate tests were combined (n = 3) and represented as mean ± SD; ns indicates non-significant difference (p-value > 0.05).

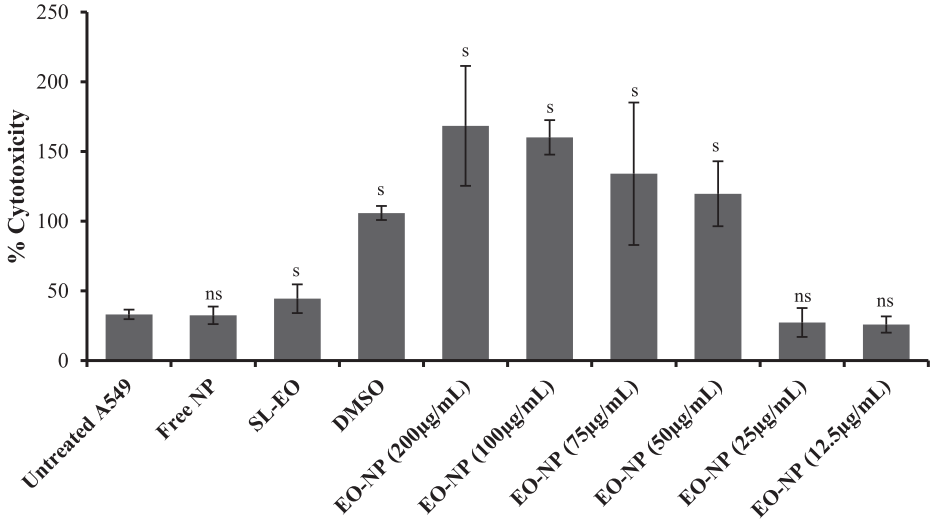


Fig. 5. Cytotoxic effect of *Saussurea lappa* EO in its free and encapsulated form; s: significantly different from the control cells; ns: not significantly different from the control cells.

dependent manner with SL-EO loaded-NP formulations at different concentrations (12.5, 25, 50, 75, 100 and 200 μg/mL of oil content). Similarly, the effect of un-encapsulated SL-EO along with DMSO and blank NP on cell viability was investigated and the results are shown in Fig. 5. The non-cytotoxicity of free NP confirms the biocompatibility of the used polymer. Several works reported no detectable cytotoxicity after PMMA-NP treatment on many cell lines including HaCaT (human keratinocyte), RAW264 (monocyte/macrophage-like cells), MDA-MB231 (invasive human breast adenocarcinoma), FaDu (pharynx carcinoma cells), MCF-7 (non-invasive human breast adenocarcinoma) (Gargouri et al., 2009), NR8383 macrophages (Eidi et al., 2010), CAM (chorioallantoic membrane) and rabbit corneal epithelial cell lines (Katzer et al., 2014). Moreover, SL-EO loaded-NP exhibit a dose-dependent cytotoxic effect. For instance, NP at higher concentrations (≥50 μg/mL) were considered as cytotoxic whereas NP containing both 25 and 12.5 μg/mL were shown as non-cytotoxic. This result was in agreement with what Nayal et al. reported when they investigated the *in vitro* cytotoxicity of *Lippia dulcis* Trev. EO on Hep G2 cells (Nayal et al., 2009). They found that the EO reduced cells viability in a concentration and time-dependent manner. Similar results were also reported in the literature (Montero-Villegas et al., 2018). Moreover, the encapsulated -EO is more cytotoxic than its un-encapsulated form (especially at higher concentration) which can be attributed to the nanoencapsulation concept. As reported earlier, the nanoencapsulation may increase the cellular uptake and the bioavailability of essential oils as compared to their free form (Lammari et al., 2020b).

Interestingly, these findings corroborate cell morphologic changes. Fig. 6 shows micrographs of untreated and treated A549 cells. Light microscopic observation shows that cells changed their morphology when cultured in the presence of SL-EO loaded-NP at concentrations more than 50 μg/mL (Fig. 6. **d, e** and **f**). Contrary in A549 control cells, structural alterations, reduction of A549 cell populations, and destruction of the cytoplasm could be observed. However, cells treated with SL-EO loaded-NP at 12.5 and 25 μg/mL were similar to control cells where higher confluency, bigger nuclei and intact cytoplasm were visualized (Fig. 6. **b** and **c**). This finding confirms the non-cytotoxicity of the developed nanoparticles at these two concentrations (12.5 and 25 μg/mL).

3.5. Anti-inflammatory effect

Among the characteristic features of host inflammatory response to an insulting agent (e.g., bacteria, viruses, toxins) the production and release of pro-inflammatory mediators, including cytokines such as interleukin (IL)-1, IL-6 and IL-10 and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α). This latter induces in turn the production of other inflammatory cytokines like granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and potentiate the inflammation (Kany et al., 2019).

In addition to cytokines, increased production of matrix-degrading proteases has been associated with inflammation. These include the matrix metalloproteinases (MMP) such as MMP-9 and MMP-2, a family of proteolytic enzymes involved in tissue remodeling (Shoshani et al., 2005) and inflammation modulation (Manicone and Mcguire, 2008). Literature survey revealed that both costus root extract and its main sesquiterpene lactones were widely studied for their anti-inflammatory effects; while, a formulation of such extract employing nanoparticles has never been studied for this context.

To address this aspect, A549 cells were incubated with SL-EO loaded nanoparticles (25 μg/mL) for 1 h prior to LPS treatment. This latter is known to trigger inflammatory-mediators expression and release by A549 cells. After the end of the treatments, mRNA expression of TNF-α, IL-1β and GM-CSF was investigated using RT-qPCR. The stimulation of A549 with LPS resulted in a strong increase of mRNA expression of the inflammatory factors (Fig. 7). Similar results were obtained with free nanoparticles treatment (without EO) especially for TNF-α and GM-CSF. Interestingly, a high reduction of all the cytokines was observed upon treatment with SL-EO loaded-NP (Fig. 7) suggesting strongly the anti-inflammatory effect mediated by SL-EO. Both dehydrocostuslactone and costunolide were reported as potential inhibitors of the expression of TNF-α (Choodej et al., 2018; Seo et al., 2015) (Rayan et al., 2011) and IL-1β (Kang et al., 2004; Rayan et al., 2011) (He et al., 2019). The activity of these two constituents was not limited on these two cytokines. In a recent study carried by Zhou et al. (Zhou et al., 2020), dehydrocostus lactone extracted from the roots of SL reduced the expression of other inflammatory mediators like myeloperoxidase (MPO), superoxide dismutase (SOD), MCP-1, IL-17, IL-6 and IL-23, inflammatory signaling pathway (those associated with COX2, IL-6, IL-23, iNOS, GP130 and L-17), and colorectal mucosal barrier-related regulatory factors (XBP1s and MUC2). Subsequently, costunolide was shown to negatively regulates the expression of IL-6, MCP-1, Cox2, iNOS and NF-κB nuclear translocation in activated murine BV-2 microglia (Rayan et al., 2011). Li et al. related the biological effect of costunolide and dehydrocostus lactone to their α-methylene-γ-butyrolactone ring which is the key moiety of these two sesquiterpenes (Li et al., 2020). Further LDH cytotoxicity assay was used to determine the cell viability upon LPS treatment and results confirm the non-cytotoxicity of all the

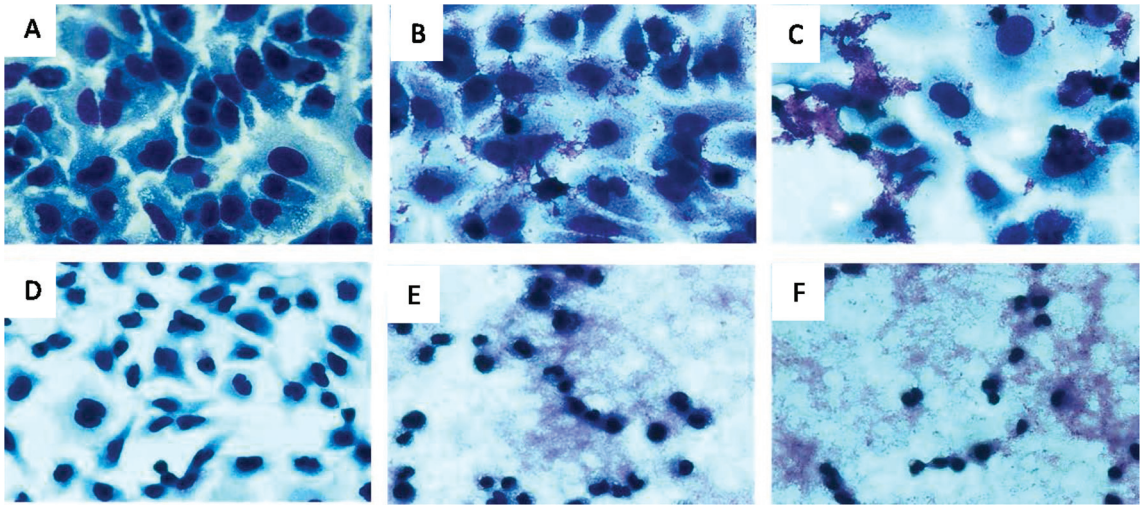


Fig. 6. Representative micrographs of cell morphology after various treatments: a) Untreated cells; b) Cells treated with EO-loaded NP (12.5 μg/mL); c) Cells treated with EO-loaded NP (25 μg/mL); d) Cells treated with EO-loaded NP (75 μg/mL); e) Cells treated with EO-loaded NP (100 μg/mL) and f) Cells treated with EO-loaded NP (200 μg/mL). Magnification x400.

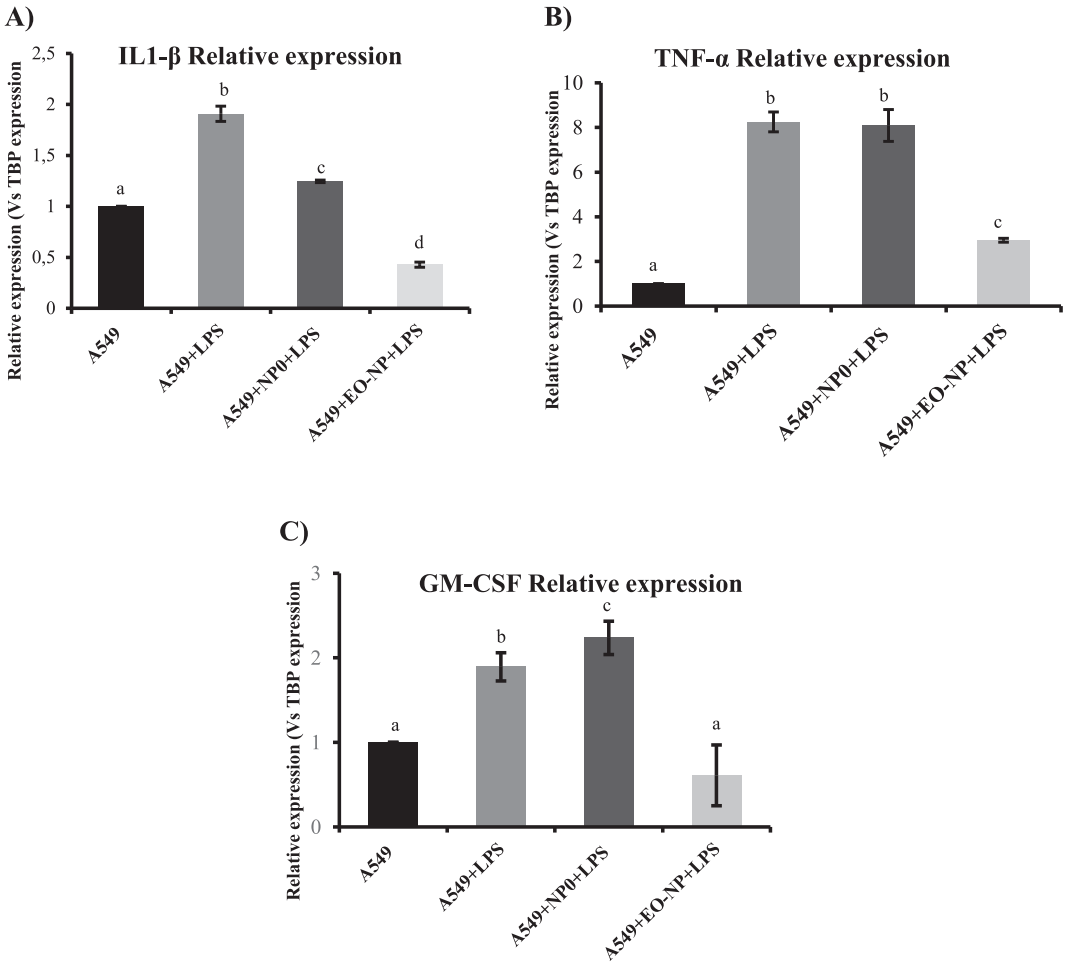


Fig. 7. RNA expression of LPS-induced IL-1β **(A)**, TNF-α **(B)** and GM-CSF **(C)** after A549 treatment with free PMMA-based NP and SL-EO loaded PMMA-based NP 25 μg/mL. Measurements from independent wells and reproducible, represented as mean ± SD. Different letters indicate significant difference (p-value < 0.05).

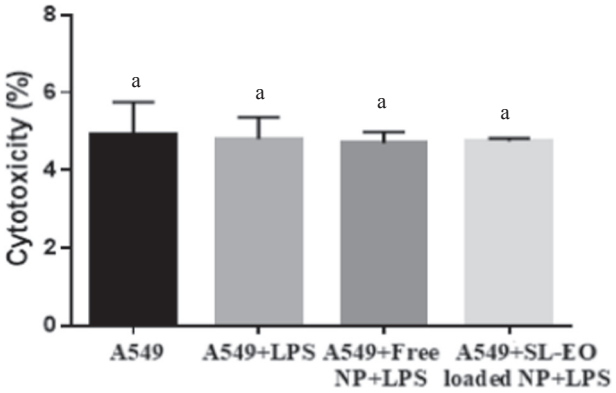


Fig. 8. Cytotoxic effect of *Saussurea lappa* EO in its free and encapsulated form (25 μg/mL) upon LPS stimulation. Different letters indicate significant difference (p-value < 0.05).

formulations (Fig. 8).

Furthermore, a gelatin zymography was performed to assess the level of MMP in the medium released from all the treated A549 cells and the results are reported in Fig. 9. In this study, we focused on MMP-9. MMP-9 is implicated in the degradation of gelatin and collagen type IV, major components of the basement membrane and extracellular matrix (Kim et al., 2012). It is also of particular interest for inflammation because of its role in neutrophil infiltration and cytokine cleavage (Bradley et al., 2012; Sorokin, 2010). Our data show that LPS stimulates MMP-9 enzyme production, while a reduction was noticed after SL-EO loaded-NP treatment (Fig. 9). This results was in accordance with previous work studies where both costunolide (He et al., 2019) and dihydrocostus lactone (Kim et al., 2012) exhibited remarkable inhibition of MMP-9. Altogether, our data demonstrate that SL-EO possesses anti-inflammatory properties.

3.6. *In vitro* anticholinesterase activity

Alzheimer's disease is among the major global public health priority and recently its prevalence has been increasing at an alarming rate. It is a chronic neurodegenerative disorder of the brain characterized by progressive decline of activities of daily living, behavior, and cognition. Alzheimer's disease is secondary to deficits in central cholinergic neurotransmission resulting from a loss of the neurotransmitter (acetylcholine) (Grossberg, 2003; Znati et al., 2020). Cholinesterase inhibitors seem to be a promising strategy to manage Alzheimer's disease by inhibiting the enzymes that degrade acetylcholine (i.e. acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase), thereby increasing the availability of acetylcholine to stimulate the receptors within the brain (Lane et al., 2005; Mesulam et al., 2002). In this study, we addressed for the first time the anticholinesterase activity of free SL-EO, unloaded-NP and SL-EO loaded-NP and compared it to that of the standard drug: Galantamine. The results are illustrated in Fig. 10.

All the tested samples inhibited acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities *in vitro* in a dose dependent manner.

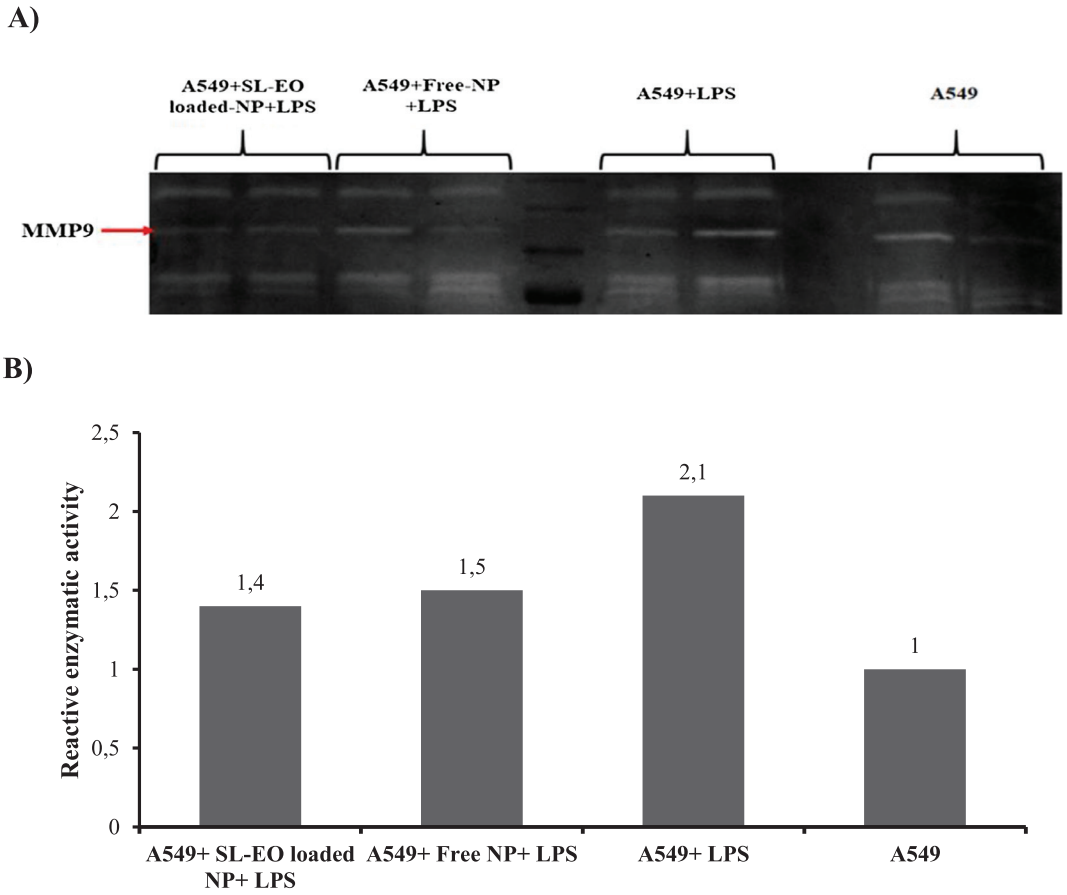


Fig. 9. Gelatin zymography for MMP9 (A) and densitometry (B) after A549 treatment with free PMMA-based NP and SL-EO loaded PMMA-based NP 25 μg/mL.

Regarding butyrylcholinesterase, SL-EO loaded-NP showed an inhibition better than the standard drug: Galantamine. At the highest concentration (200 μg/mL), the ranked order of inhibition was as follow: SL-EO loaded-NP (101.6%) > un-encapsulated SL-EO (93.2%) > galantamine (78.9%), while with respect to acetylcholinesterase, the inhibition order at the highest concentration was as follow: galantamine (94.8%) > SL-EO loaded-NP (90.6%) > un-encapsulated SL-EO (72.6%). When comparing the inhibition of the unloaded-PMMA-NP (free-NP) with that of SL-EO loaded-NP against both enzymes, our data suggests that SL-EO exhibits an anti-Alzheimer property. This result was in agreement with a report by Ponnusankar et al. (2014) when they tested the *in vitro* acetyl- and butyrylcholinesterase inhibition of the methanolic extract of costus roots. Literature survey revealed also that sesquiterpene lactones have been previously reported as cholinesterase inhibitors (Hajimehdipoor et al., 2014; Hegazy et al., 2015; Ibrahim et al., 2013). Li et al. reported that the biological effect of costunolide and dehydrocostus lactone which are the main constituents of the SL-EO, is related to their α-methylene-γ-butyrolactone skeleton. For instance, the double bond of α-methylene-γ-butyrolactone produces an electrophilic entity capable of engaging in Michael-type reactions with nucleophilic groups of some essential groups of the active sites in the human body like amino acids or peptides (L-cysteine, glutathione) and enzymes containing sulfhydryl groups (Fig. 11) (Li et al., 2020; Padilla-Gonzalez et al., 2016). It was reported that the presence of free sulfhydryl groups in human cholinesterase enzymes molecules induced an irreversible inhibition in the micromolar range (Frasco et al., 2007). In the present study, the *in vitro* anti-Alzheimer activity was performed on horse serum-derived butyrylcholinesterase and *Electrophorus electricus*-derived acetylcholinesterase. The horse serum-derived butyrylcholinesterase showed 90.1% similarity with the human serum butyrylcholinesterase (Moorad et al., 1999), so it could be assumed that it contains sulfhydryl groups capable to react with the α-methylene-γ-butyrolactone of costunolide and dehydrocostus lactone. In support of this assumption, the high inhibitory effect of SL-EO against butyrylcholinesterase; the IC50 values were 17.4 ± 1.1 and 34.7 ± 2.0 μg/mL for un-encapsulated SL-EO and the standard drug, respectively, as illustrated in Table 3.

With respect to acetylcholinesterase, it was reported that free sulfhydryl groups were absent in *Electrophorus electricus* acetylcholinesterase and the enzyme inhibition occured in the millimolar range (Frasco et al., 2007). This explained the high IC50 value of SL-EO (67.4 ± 3.7 μg/mL) when compared to that against butyrylcholinesterase (IC50 = 17.4 ± 1.1 μg/mL) or to that of standard drug (IC50 = 6.3 ± 1.2 μg/mL).

Fig. 10 shows also that SL-EO in its encapsulated form showed better anti-cholinesterase activity than the un-encapsulated oil. A decrease in IC50 values was noticed for both enzymes, as depicted in Table 3. The IC50 values were 25.0 ± 2.0 and 67.4 ± 3.7 μg/mL against acetylcholinesterase; and 14.9 ± 1.9 and 17.4 ± 1.1 μg/mL against butyrylcholinesterase for SL-EO loaded-NP and un-encapsulated SL-EO, respectively. This was is accordance with previous reports where they asserted an enhancement in the biological activity upon EO encapsulation (Froiio et al., 2019)

It was reported earlier that the methanolic extract of the roots of SL inhibited acetyl- and butyrylcholinesterase with an IC50 equal to 58.68 ± 0.86 and 94.46 ± 0.5 μg/mL, respectively (Ponnusankar et al., 2014). These values were higher than those obtained in the present study. Thus, the developed NP may represent a promising formulation system for enhancing inhibition of Alzheimer-associated enzymes and potentially disease management. Of note, in addition to its lowest IC50 for both enzymes inhibition, the EO investigated in this study was extracted by a green process that provides credence to health claims and for quality

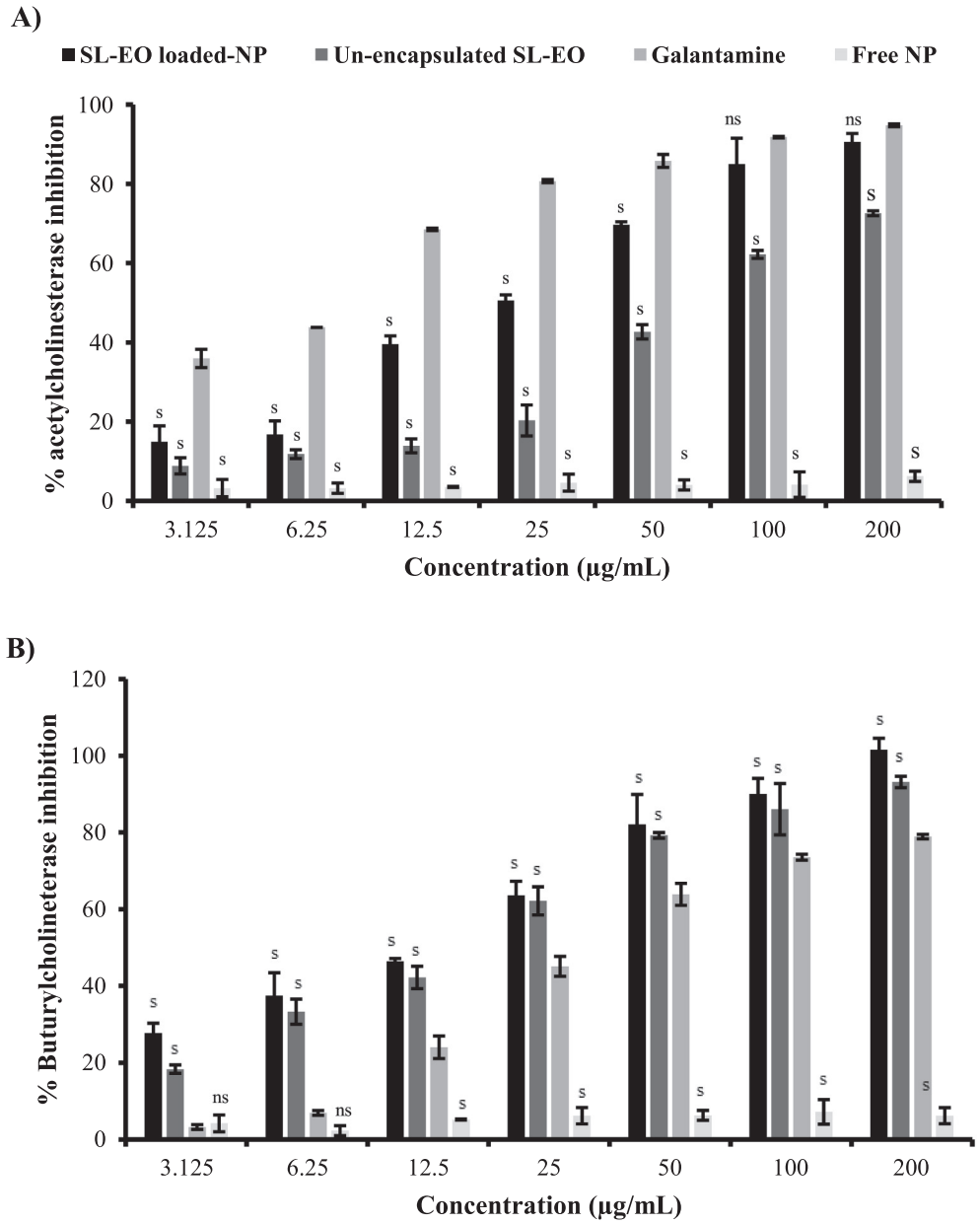


Fig. 10. Acetylcholinesterase inhibition (A) and Butyrylcholinesterase inhibition (B) of unencapsulated SL-EO, free PMMA-based NP, SL-EO loaded PMMA-based NP and galantamine. Measurements from separate tests were combined (n = 3) and represented as mean ± SD; s: significantly different from the standard; ns: not significantly different from the standard.

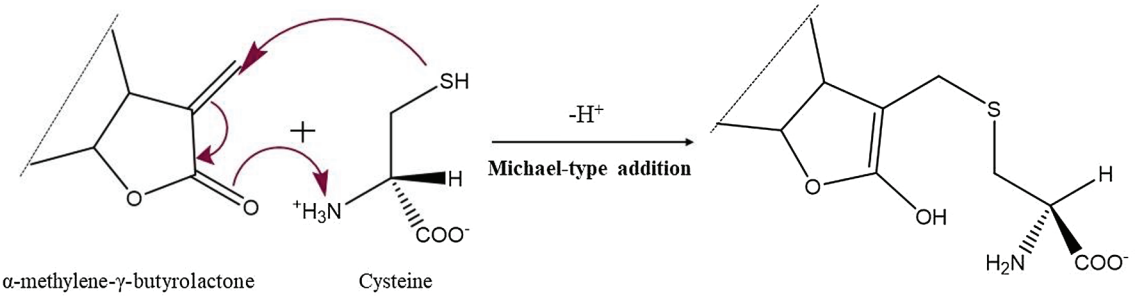


Fig. 11. Mechanism of the Michael-type addition at α-methylene-γ-butyrolactone moiety of sesquiterpene lactones. The structure containing the sulfhydryl group (-SH) represents the nucleophile (protein cysteine residue, for example).

Table 3
IC50 of α-amylase, α-glucosidase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase for unencapsulated SL-EO, SL-EO loaded PMMA-based NP and the reference compounds: Acarbose and Galantamine.

Sample	IC50 (μg/mL)			
	α-amylase	α-glucosidase	AChE	BChE
SL-EO	65.9 ± 1.7*	42.1 ± 3.0*	67.4 ± 3.7*	17.4 ± 1.1*
SL-EO loaded-NP	22.9 ± 0.3*	75.8 ± 4.4*	25.0 ± 2.0*	14.9 ± 1.9*
Acarbose	365.3 ± 10.7	271.7 ± 7.1	–	–
Galantamine	–	–	6.3 ± 1.2	34.7 ± 2.0

IC50, is the concentration of samples required for 50% inhibition.
Each value is expressed as mean ± SD.
* Value is significantly different from the positive control, acarbose or galantamine ($p < 0.005$). AChE, Acetylcholinesterase; BChE, Butyrylcholinesterase.

assurance.

3.7. *In vitro α-amylase and α-glucosidase activity*

Diabetes mellitus, a metabolic disorder characterized by hyperglycemia over a prolonged period of time, has emerged as an important cause of mortality and morbidity on a global scale. It is caused by either deficiency or impairment in the effectiveness of pancreatic insulin (Kharroubi and Darwish, 2015). One of the greatest challenges in diabetes management is the effective and consistent control of postprandial hyperglycemia. The healthy diet of diabetic people is an area of much debate. Currently, most experts agree that the total carbohydrate intake is a relatively reliable factor in predicting postprandial blood glucose (Sheard et al., 2004). The inhibition of α-amylase and α-glucosidase, enzymes involved in the digestion of carbohydrates, can significantly reduce the postprandial hyperglycemia (Agarwal and Gupta, 2016; Naquvi et al., 2011). In fact, α-amylase breaks down long chain carbohydrates; while α-glucosidase converts starch and disaccharides into simple sugar (glucose) (Nair et al., 2013). Therefore, the inhibition of these two enzymes seems to be an important strategy in the management of diabetes mellitus. In this context, the study of the antidiabetic effect of free SL-EO, unloaded-NP and SL-EO loaded-NP through inhibition of α-amylase and α-glucosidase was investigated, for the first time, *in vitro* and compared to that of standard drug: Acarbose. The results are shown in Fig. 12.

All the samples inhibited α-amylase and α-glucosidase activities *in vitro* in a dose dependent manner. Fig. 12 shows that SL-EO exhibited inhibitory effect since the unloaded-PMMA-NP (free-NP) did not show any enzyme inhibition. This result confirms the fact that costus species may reduce the blood glucose level. Raafat et al. reported that costus infrared extract has shown superiority in controlling gestational diabetes for pregnant groups with high safety profile on the offspring (Raafat et al., 2019). Fig. 12 reflects also that SL-EO showed better inhibition than the standard drug: acarbose against α-amylase and α-glucosidase. The IC50 values were 65.9 ± 1.7 and 365.3 ± 10.7 μg/mL against α-amylase; and 42.1 ± 3.0 and 271.7 ± 7.1 μg/mL against α-glucosidase for, un-encapsulated SL-EO and acarbose, respectively

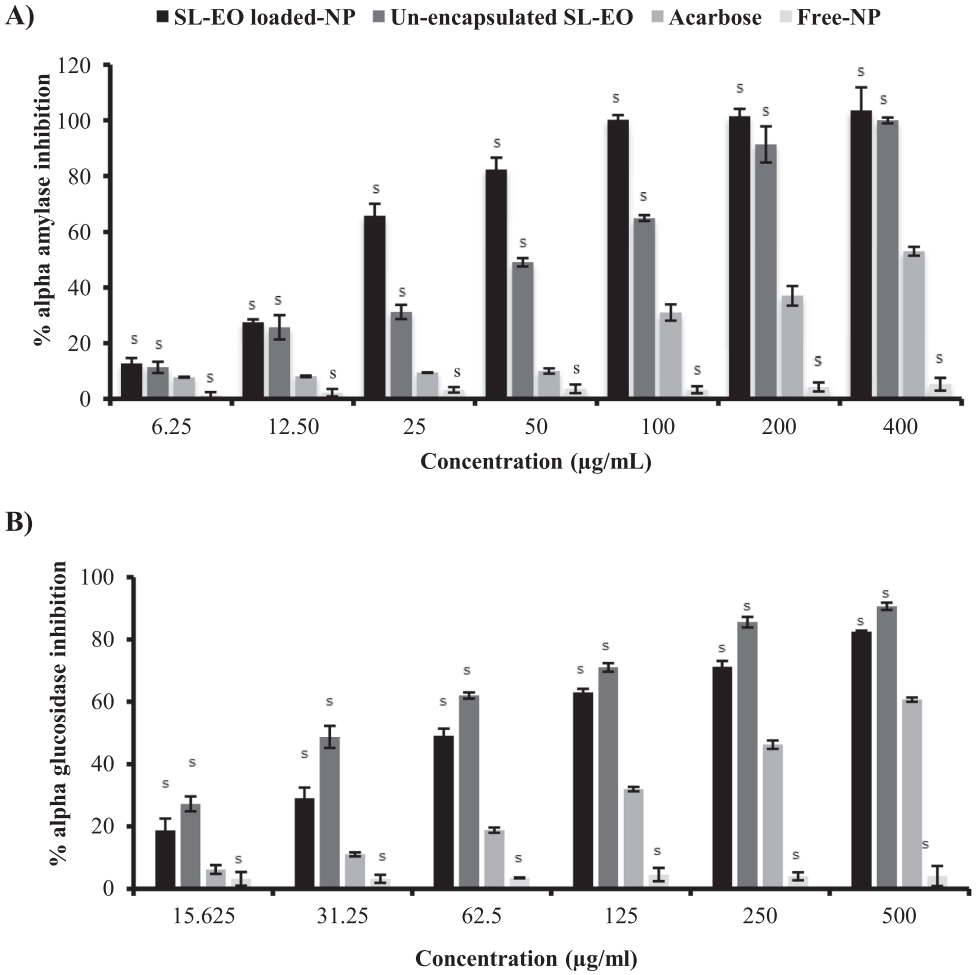


Fig. 12. α-Amylase inhibition (A) and α-glucosidase inhibition (B) of unencapsulated SL-EO, free PMMA-based NP, SL-EO loaded PMMA-based NP and acarbose. Measurements from separate tests were combined (n = 3) and represented as mean ± SD; s: significantly different from the standard; ns: not significantly different from the standard.

(Table 3). According to the literature, the antidiabetic effect of costus oil may be related to the presence of costunolide. Eliza et al. suggested that costunolide could effectively manage the glycemic control (Eliza et al., 2009). It was found that plasma glucose was significantly ($p < 0.05$) reduced in a dose-dependent manner upon costunolide administration to streptozotocin-induced diabetic rats when compared to the control. Additionally, the oral administration of costunolide (20 mg/kg bw) significantly decreased glycosylated hemoglobin (HbA1c) and increased plasma insulin and tissue glycogen (Eliza et al., 2009). In a subsequent study, the increased sensitivity of insulin to uptake glucose by costunolide was ascribed to the stimulation of the beta islets to secrete insulin (Li et al., 2004). Regarding the chemical structure of diabetes controlling key enzymes, almost all α-glucosidases are reported to be highly inhibited by sulfhydryl-binding reagents (El-Shora et al., 2009; Faridmoayer and Scaman, 2005). This may explain the potent inhibitory activity of SL-EO against this enzyme. Alpha-amylases were also reported to possess sulfhydryl groups, but the inhibitory effect of SL-EO was not similar to that against α-glucosidase. It was noticed in an ancient work study that sulfhydryl groups were not absolutely required in α-amylase inhibition reaction since their complete oxidation coincided with 80% inactivation of the enzyme (Schramm, 1964). Padilla-Gonzalez et al. reported that the therapeutic effect of sesquiterpenes lactone did not restrict to the lactone moiety, although other structural moieties like epoxy, peroxy or aldehyde groups should not be ruled out (Padilla-Gonzalez et al., 2016).

In respect to α-amylase, SL-EO in its encapsulated form exhibited better inhibition when compared to the un-encapsulated form. IC50 values were 65.9 ± 1.7 and 22.9 ± 0.3 μg/mL for un-encapsulated SL-EO and SL-EO loaded-NP, respectively (Table 3). Similar results were reported earlier. *Psoralea corylifolia* extract loaded-NP exhibited better antidiabetic effect as compared to the free form (Shanker et al., 2017). Kavitha and coworkers (2017) related the enhancement in the antidiabetic activity of *Nilgirianthus ciliatus* NP to the encapsulation of the plant extract. On the other hand, unexpected results were shown with respect to α-glucosidase where SL-EO loaded-NP exhibited lower inhibition activity than the un-encapsulated form. The IC50 values were 42.1 ± 3.0 and 75.8 ± 4.4 μg/mL for un-encapsulated SL-EO and SL-EO loaded-NP, respectively (Table 3). This could be related to the fact that the oil needed more time to be released from PMMA-NP. In overall, SL-EO may be used as alternative for conditional oral hypoglycemic drugs in diabetes 2 managements known for their adverse effects like diarrhea, gastrointestinal discomfort, nausea, flatulence, cramping and weight gain (Fujisawa et al., 2005).

4. Conclusion

Indeed the present study confirmed the important medicinal potential of *Saussurea lappa* CB. Clarke, known as costus, particularly with the extraction of its essential oil by means of supercritical fluid extraction, an innovative, a clean, and an environmetally friendly technique. Beneficial properties due to the anti-inflammatory, anti-Alzheimer and antidiabetic potentials of the extracted essential oil with dehydrocostus lactone (55.39%) and costunolide (8.87%) as the major constituents, are reinforced by its encapsulation in PMMA based-NP of sizes order of 145 nm, a high ζ-potential value of + 45 mV and a good stability upon one-month storage at different temperatures and pH. The *in vitro* cytotoxicity studies were performed on A549 cell lines and the loaded nanoparticles at 25 $\mu g \cdot mL^{-1}$ did not exhibit any cytotoxic effect and significant alterations on cells cytoplasm and nuclei were observed microscopically at higher essential oil concentration (≥ 50 $\mu g.mL^{-1}$). The obtained results did also confirm the better efficiency of the designed nanoparticles in the treatment of diabetes type 2 than that of acarbose. The IC50 were equal to 22.9 and 75.8 $\mu g \cdot mL^{-1}$ against α-amylase and α-glucosidase, respectively. A high anti-Alzheimer's effect was noticed also with IC50 values around 25.0 and 14.9 $\mu g \cdot mL^{-1}$ against acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, respectively. The qRT-PCR and gelatin zymography experiments demonstrated a significant diminution of inflammatory cytokines gene expression (TNF-α, GM-CSF and IL1β) and matrix metalloprotease-9 activity in LPS-induced inflammatory A549 cell line. Moreover, evidence that α-amylase, α-glucosidase, acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activities might be related to the α-methylene-γ-butyrolactone moiety of dehydrocostus lactone and costunolide of the studied essential oil was shown. To the best of our knowledge, this is the first report of the *in vitro* α-amylase, α-glucosidase and anticholinesterase inhibitory effects of *Saussurea lappa* essential oil loaded nanoparticles along with their anti-inflammatory activity. Based on the reported enzymes inhibition activities and biologically metalloproteases and decreased expression of inflammatory cytokines, *Saussurea lappa* essential oil loaded nanoparticles could pave the way to the development of new bioactive formulations or dietary supplements for potential management of Alzheimer, diabetes or inflammatory diseases without or with adverse effects by comparison to those generally produced by conventional synthetic drugs. Further investigations are warranted including *in vivo* studies (e.g., preclinical), pharmacokinetic properties, bioavailability and the underlying associated metabolic pathways before any firm conclusion can be drawn on the efficacy of *Saussurea lappa* essential oil on the pharmacological activities reported in this study.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

Aanouz, I., Belhassan, A., El-Khatabi, K., Lakhlifi, T., El-Idrissi, M., Bouachrine, M., 2020. Moroccan medicinal plants as inhibitors against SARS-CoV-2 main protease: Computational investigations. J. Biomol. Struct. Dyn. 1–9 https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1758790.

Abdelwahab, S.I., Taha, M.M.E., Alhazmi, H.A., Ahsan, W., Rehman, Z., Bratty, M. Al, Makeen, H., 2019. Phytochemical profiling of Costus (*Saussurea lappa* Clarke) root essential oil, and its antimicrobial and toxicological effects. Trop. J. Pharm. Res. 18, 2155–2160. https://doi.org/10.4314/tjpr.v18i10.22.

Agarwal, P., Gupta, R., 2016. Alpha-amylase inhibition can treat diabetes mellitus. Res. Rev. J. Med. Heal. Sci. 5, 1–8.

Ansari, S., Siddiqui, M.A., Maaz, M., 2018. Hepatocurative effect of *Saussurea lappa* C.B Clarke and artemisia absinthium, linn in chronic hepatitis B. J. Young Pharm. 10, 354–357. https://doi.org/10.5530/jyp.2018.10.78.

Aslantürk, Ö.S., 2017. *In Vitro* cytotoxicity and cell viability assays: Principles, advantages, and disadvantages. In: Larramendy, M.L., Soloneski, S. (Eds.), Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World. IntechOpen, Madrid, pp. 1–18.

Asokkumar, S., Naveenkumar, C., Raghunandhakumar, S., Kamaraj, S., Anandakumar, P., Jagan, S., Devaki, T., 2012. Antiproliferative and antioxidant potential of beta-ionone against benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. Mol. Cell. Biochem. 363, 335–345.

Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Heiss, S.S.H., Rollinger, J.M., Schuster, D., Breuss, J. M., Bochkov, V., Mihovilovic, M.D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V.M., Stuppner, H., 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. Biotechnol. Adv. 33, 1582–1614.

Azeez, L., Lateef, A., Ayoade, L., Joshua, T., Rasheed, O., Mustapha, Z., 2020. Adsorption behaviour of rhodamine B on hen feather and corn starch functionalized with green synthesized silver nanoparticles (AgNPs) mediated with cocoa pods extracts. Chem. Africa 3, 237–250.

Barhoum, A., García-Betancourt, M.L., Rahier, H., Assche, G. Van, 2018. Physicochemical characterization of nanomaterials: polymorph, composition, wettability, and thermal stability. In: Barhoum, A., Makhlouf, A.S.H. (Eds.), Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures. Elsevier Science Publishing Co Inc., New-York, pp. 255–278.

Bilia, A.R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., Bergonzi, M.C., 2014. Essential oils loaded in nanosystems : A developing strategy for a successful therapeutic approach. Evidence-Based Complement. Altern. Med. 2014, 1–14.

Boddohi, S., Killingsworth, C.E., Kippe, M.J., 2008. Polyelectrolyte multilayer assembly as a function of pH and ionic strength using the polysaccharides chitosan and heparin. Biomacromolecules 9, 2021–2028.
Bradley, L.M., Douglass, M.F., Chatterjee, D., Akira, S., Baaten, B.J.G., 2012. Matrix metalloprotease 9 mediates neutrophil migration into the airways in response to influenza virus-induced toll-like receptor signaling. PLoS Pathog. 8, e1002641 https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002641.
Calixto, J.B., 2019. The role of natural products in modern drug discovery. An. Acad. Bras. Cienc. 91, 3. https://doi.org/0001-3765201920190105.
Carterson, A.J., Bentrup, K.H. zu, Ott, M., Clarke, M.S., Pierson, D.L., Vanderburg, C.R., Buchanan, K.L., Nickerson, C.A., Schurr, M.J., 2005. A549 lung epithelial cells grown as three-dimensional aggregates: Alternative tissue culture model for Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. Infect. Immun. 73, 1129–1140.
Chang, H.S., Lee, S.J., Yang, C.W., Chen, I.S., 2010. Cytotoxic sesquiterpenes from *Magnolia kachirachirai*. Chem. Biodivers. 7, 2737–2747. https://doi.org/10.1002/cbdv.200900418.
Chavan, M.J., Wakte, P.S., Shinde, D.B., 2010. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. Phytomedicine 17, 149–151. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.05.016.
Chen, F., Tan, X., Tang, Q., Xing, X., 2011. GC-MS analysis of volatile oil from *Aucklandia lappa* from different producing areas. China Pharm. 22, 2187–2189.
Cheon, Y.H., Song, M.J., Kim, J.Y., Kwak, S.C., Park, J.H., Lee, C.H., Kim, J.J., Choi, M. K., Oh, J., Kim, Y.C., Yoon, K.H., Kwak, H.B., Lee, M.S., 2014. Costunolide inhibits osteoclast differentiation by suppressing c-Fos transcriptional activity. Phyther. Res. 28, 586–592. https://doi.org/10.1002/ptr.5034.
Chifiriuc, M.C., Kamerzan, C., Lazar, V., 2017. Essential oils and nanoparticles: New strategy to prevent microbial biofilms. In: Ficai, A., Grumezescu, A.M. (Eds.), Nanostructures for Antimicrobial Therapy, first ed. Elsevier Science Publishing Co Inc., New-York, pp. 279–291.
Choodej, S., Pudhom, K., Mitsunaga, T., 2018. Inhibition of TNF-α-induced inflammation by sesquiterpene lactones from *Saussurea lappa* and semi-synthetic analogues. Planta Med. 84, 329–335. https://doi.org/10.1055/s-0043-120115.
Contri, R.V., Ribeiro, K.L.F., Fiel, L.A., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., 2013. Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: Influence on the physicochemical properties. J. Exp. Nanosci. 8, 913–924. https://doi.org/10.1080/17458080.2011.620019.
Contri, R.V., Kulkamp-guerreiro, I.C., Janine, S., Frank, L.A., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., 2016. Nanoencapsulation of Rose-Hip oil prevents oil oxidation and allows obtainment of gel and film topical formulations. AAPS PharmSciTech 17, 863–871. https://doi.org/10.1208/s12249-015-0379-9.
David, B., Wolfender, J.-L., Dias, D.A., 2015. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. Phytochem. Rev. 14, 299–315.
Dhar, A., Maurya, S., Mishra, A., Singh, G., Singh, M., Seth, A., 2016. Preliminary screening of a classical Ayurvedic formulation for anticonvulsant activity. Anc. Sci. Life 36, 28. https://doi.org/10.4103/0257-7941.195410.
Dillen, K., Bridts, C., Veken, P. Van der, Cos, P., Vandervoort, J., Augustyns, K., Stevens, W., Ludwig, A., 2008. Adhesion of PLGA or Eudragit®/PLGA nanoparticles to Staphylococcus and Pseudomonas. Int. J. Pharm. 349, 234–240.
Du, J., Sun, R., Zhang, S., Govender, T., Zhang, L., Xiong, C., Peng, Y., 2004. Novel polyelectrolyte carboxymethyl konjac glucomannan–chitosan nanoparticles for drug delivery. Macromol. rapid comminication 25, 954–958. https://doi.org/10.1002/marc.200300314.
Eidi, H., Joubert, O., Attik, G., Duval, R., Bottin, M., Hamouia, A., Maincent, P., Rihn, B., 2010. Cytotoxicity assessment of heparin nanoparticles in NR8383 macrophages. Int. J. Pharm. 396, 156–165.
El-Asbahani, A., Miladi, K., Addi, H., Bitar, A., Casabianca, H., Abdelhamid, E.M., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F., Elaissari, A., 2015. Antimicrobial activity of nano-encapsulated essential oils: comparison to non-encapsulated essential oils. J. Colloid Sci. Biotechnol. 4, 39–48.
El-Shora, H.M., Metwally, M.A., Khlaf, S.A., 2009. Essential groups and stability of α-glucosidase of *Penicillium notatum*. Ann. Microbiol. 59, 285–291.
Eliza, J., Daisy, P., Ignacimuthu, S., Duraipandiyan, V., 2009. Normo-glycemic and hypolipidemic effect of costunolide isolated from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz.) Sm. in streptozotocin-induced diabetic rats. Chem. Biol. Interact. 179, 329–334. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.10.017.
Ellman, G., Courtney, K., Andres, V., Featherston, R., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88–95.
Faridmoayer, A., Scaman, C.H., 2005. Binding residues and catalytic domain of soluble *Saccharomyces cerevisiae* processing alpha-glucosidase I. Glycobiology 15, 1341–1348. https://doi.org/10.1093/glycob/cwj009.
Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., Benita, S., 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. Int. J. Pharm. 55, R1–R4.
Frasco, M.F., Colletier, J.P., Weik, M., Carvalho, F., Guilhermino, L., Stojan, J., Fournier, D., 2007. Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. FEBS J. 274, 1849–1861. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05732.x.
Froiio, F., Ginot, L., Paolino, D., Lebaz, N., Bentaher, A., Fessi, H., Elaissari, A., 2019. Essential oils-loaded polymer particles: Preparation, characterization and antimicrobial property. Polymers (Basel). 11, 1017. https://doi.org/10.3390/polym11061017.
Fujisawa, T., Ikegami, H., Inoue, K., Kawabata, Y., Ogihara, T., 2005. Effect of two α-glucosidase inhibitors, voglibose and acarbose, on postprandial hyperglycemia correlates with subjective abdominal symptoms. Metabolism 54, 387–390. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2004.10.004.
Gargouri, M., Sapin, A., Bouli, S., Becuwe, P., Merlin, J., Maincent, P., 2009. Optimization of a new non-viral vector for transfection: Eudragit nanoparticles for the delivery of a DNA plasmid. Technol. Cancer Res. Treat. 8, 433–444.
Gautam, H., Asrani, R.K., 2018. Phytochemical and pharmacological review of an ethno medicinal plant : *Saussurea Lappa*. Vet. Res. Int. 6, 1–9.
Giaretta, M., Bianchin, M.D., Kanis, L.A., Contri, R.V., Külkamp-Guerreiro, I.C., 2019. Development of innovative polymer-based matricial nanostructures for Ritonavir oral administration. J. Nanomater. 2019, 1–10. https://doi.org/10.1155/2019/8619819.
Grossberg, G.T., 2003. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. Curr. Ther. Res. 64, 216–235. https://doi.org/10.1016/S0011-393X(03)00059-6.
Hajimehdipoor, H., Mossadegh, M., Naghibi, F., Haeri, A., Hamzeloo-Moghadam, M., 2014. Natural sesquiterpene lactones as acetylcholinesterase inhibitors. An. Acad. Bras. Cienc. 86, 801–806. https://doi.org/10.1590/0001-3765201420130005.
Hani, U., Sudeendra, R., Shivakumar, H.G., 2011. Formulation design and evaluation of Metronidazole microspheres in a bioadhesive gel for local therapy of vaginal candidiasis. Lat. Am. J. Pharm. 30, 161–167.
He, Y., Moqbel, S., Xu, L., Ran, J., Ma, C., Xu, K., Bao, J., Jiang, L., Chen, W., Xiong, Y., Wu, L., 2019. Costunolide inhibits matrix metalloproteinases expression and osteoarthritis via the NF-κB and Wnt/β-catenin signaling pathways. Mol. Med. Rep. 20, 312–322. https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10239.
Hegazy, M.-E., Ibrahim, A., Mohamed, T., Shahat, A., El Halawany, A., Abdel-Azim, N., Alsaid, M., Paré, P., 2015. Sesquiterpene lactones from *Cynara cornigera*: Acetyl cholinesterase inhibition and in silico ligand docking. Planta Med. 82, 138–146. https://doi.org/10.1055/s-0035-1558088.
Herculano, E.D., Paula, H.C.B. De, Dias, F.G.B., Pereira, V.D.A., 2015. Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil. LWT - Food Sci. Technol. 61, 484–491. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.001.
Huh, K.M., Lee, S.C., Cho, Y.W., Lee, J., Jeong, J.H., Park, K., 2005. Hydrotropic polymer micelle system for delivery of paclitaxel. J. Control. Release 101, 59–68. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.07.003.
Ibrahim, M., Farooq, T., Hussain, N., Hussain, A., Gulzar, T., Hussain, I., Akash, M.S.H., Rehmani, F.S., 2013. Acetyl and butyryl cholinesterase inhibitory sesquiterpene lactones from Amberboa ramosa. Chem. Cent. J. 7, 116. https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-116.
Jummes, B., Sganzerla, W.G., da Rosa, C.G., Noronha, C.M., Nunes, M.R., Bertoldi, F.C., Barreto, P.L.M., 2020. Antioxidant and antimicrobial poly-ε-caprolactone nanoparticles loaded with *Cymbopogon martinii* essential oil. Biocatal. Agric. Biotechnol. 23, 101499 https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101499.
Kang, J.S., Yoon, Y.D., Lee, K.H., Park, S.K., Kim, H.M., 2004. Costunolide inhibits interleukin-1β expression by down-regulation of AP-1 and MAPK activity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 313, 171–177. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.109.
Kany, S., Vollrath, J.T., Relja, B., 2019. Cytokines in inflammatory disease. Int. J. Mol. Sci. 20, 6008. https://doi.org/10.3390/ijms20236008.
Katzer, T., Chaves, P., Bernardi, A., Pohlmann, A., Guterres, S., Beck, R.R., 2014. Prednisolone-loaded nanocapsules as ocular drug delivery system: development, in vitro drug release and eye toxicity. J. Microencapsul. 31, 519–528.
Kaur, L., Singh, A., Kaur, J., 2019. A brief review of remedial uses of *Saussurea lappa*. J. Pharmacogn. Phytochem. 8, 4423–4430.
Kavitha, K., Sujatha, K., Manoharan, S., 2017. Biotherapeutic discovery development, characterization and antidiabetic potentials of *Nilgirianthus ciliatus* nees derived nanoparticles. J. Nanomed. Biother. Discov. 7, 152. https://doi.org/10.4172/2155-983X.1000152.
Kharroubi, A.T., Darwish, H.M., 2015. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. World J. Diabetes 6, 850–867. https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i6.850.
Khurshid, M.F., Hussain, T., Masood, R., Hussain, N., 2016. Development and evaluation of a controlled drug delivery wound dressing based on polymeric porous microspheres. J. Ind. Text. 46, 986–999. https://doi.org/10.1177/1528083715612231.
Kim, E.J., Hong, J.E., Lim, S.S., Kwon, G.T., Kim, J., Kim, J.S., Lee, K.W., Park, J.H.Y., 2012. The hexane extract of *Saussurea lappa* and its active principle, dehydrocostus lactone, inhibit prostate cancer cell migration. J. Med. Food 15, 24–32. https://doi.org/10.1089/jmf.2011.1735.
Koparde, A., Doijad, R., Magdum, C., 2019. Natural products in drug discovery. In: Perveen, S., Al-Taweel, A. (Eds.), Pharmacognosy - Medicinal Plants. IntechOpen, Madrid, pp. 1–19.
Lammari, N., Froiio, F., Louaer, M., Cristiano, M.C., Bensouici, C., Paolino, D., Louaer, W., Meniai, A.H., Elaissari, A., 2020a. Poly (ethyl acrylate-co-methyl methacrylate-co-trimethylammoniethyl methacrylate chloride) (Eudragit RS 100) nanocapsules as nanovector carriers for Phoenix dactylifera L. seeds oil: a versatile antidiabetic agent. Biomacromolecules https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00255.
Lammari, N., Louaer, O., Meniai, A.H., Elaissari, A., 2020. Encapsulation of essential oils via nanoprecipitation process : Overview, progress, challenges and prospects. Pharmaceutics 12, 431.
Lane, R.M., Potkin, S.G., Enz, A., 2005. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. Int. J. Neuropsychopharmacol. 9, 101. https://doi.org/10.1017/S1461145705005833.
Li, Q., Wang, Z., Xie, Y., Hu, H., 2020. Antitumor activity and mechanism of costunolide and dehydrocostus lactone: Two natural sesquiterpene lactones from the Asteraceae family. Biomed. Pharmacother. 125, 109955 https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109955.
Li, W., Zheng, H., Bukuru, J., De Kimpe, N., 2004. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. J. Ethnopharmacol. 92, 1–21. https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.12.031.

Li, Z., Yuan, G., Lin, X., Liu, Q., Xu, J., Lian, Z., Song, F., Zheng, J., Xie, D., Chen, L., Wang, X., Feng, H., Zhou, M., Yao, G., 2019. Dehydrocostus lactone (DHC) suppresses estrogen deficiency-induced osteoporosis. Biochem. Pharmacol. 163, 279–289. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.02.002.

Lin, X., Peng, Z., Su, C., 2015. Potential anti-cancer activities and mechanisms of costunolide and dehydrocostuslactone. Int. J. Mol. Sci. 16, 10888–10906. https://doi.org/10.3390/ijms160510888.

Liu, Z.L., He, Q., Chu, S.S., Wang, C.F., Du, S.S., Deng, Z.W., 2012. Essential oil composition and larvicidal activity of *Saussurea lappa* roots against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Parasitol. Res. 110, 2125–2130. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2738-0.

Lombardo, D., Kiselev, M.A., Caccamo, M.T., 2019. Smart nanoparticles for drug delivery application : Development of versatile nanocarrier platforms in biotechnology and nanomedicine. J. Nanomater. 2019, 1–26.

Ma, Q., Liang, T., Cao, L., Wang, L., 2018. Intelligent poly (vinyl alcohol)-chitosan nanoparticles-mulberry extracts films capable of monitoring pH variations. Int. J. Biol. Macromol. 108, 576–584. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.049.

Ma, X., Williams, R.O., 2018. Polymeric nanomedicines for poorly soluble drugs in oral delivery systems: an update. J. Pharm. Investig. 48, 61–75.

Madhuri, K., Elango, K., Ponnusankar, S., 2012. *Saussurea lappa* (Kuth root): review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Orient. Pharm. Exp. Med. 12, 1–9.

Manicone, A., Mcguire, J., 2008. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. Semin. Cell Dev. Biol. 19, 34–41. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.07.003.

Matteucci, F., Giannantonio, R., Calabi, F., Agostiano, A., Gigli, G., Rossi, M., 2018. Deployment and exploitation of nanotechnology nanomaterials and nanomedicine, in: AIP Conference Proceedings. p. 0200001. https://doi.org/10.1063/1.5047755.

Mesulam, M., Guillozet, A., Shaw, P., Quinn, B., 2002. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and alzheimer brain. Neurobiol. Dis. 9, 88–93. https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0462.

Montero-Villegas, S., Crespo, R., Rodenak-Kladniew, B., Castro, M.A., Galle, M., Cicció, J. F., De-Bravo, M.G., Polo, M., 2018. Cytotoxic effects of essential oils from four *Lippia alba* chemotypes in human liver and lung cancer cell lines. J. Essent. Oil Res. 30, 167–181.

Moorad, D.R., Luo, C., Saxena, A., Doctor, B.P., Garcia, G.E., 1999. Purification and determination of the amino acid sequence of equine serum butyrylcholinesterase. Toxicol. Methods 9, 219–227. https://doi.org/10.1080/105172399242573.

Mughees, M., Wajid, S., Samim, M., 2020. Cytotoxic potential of *Artemisia absinthium* extract loaded polymeric nanoparticles against breast cancer cells: Insight into the protein targets. Int. J. Pharm. 586, 119583 https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119583.

Na, B.R., Kim, H.R., Kwon, M.S., Lee, H.S., Piragyte, I., Choi, E.J., Choi, H.K., Han, W.C., Lee, S.H., Jun, C.D., 2013. Aplotaxene blocks T cell activation by modulation of protein kinase C-θ-dependent pathway. Food Chem. Toxicol. 62, 23–31. https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.016.

Nair, S.S., Kavrekar, V., Mishra, A., 2013. *In vitro* studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. Eur. J. Exp. Biol. 3, 128–132.

Naquvi, K.J., Ahamad, J., Mir, S.R., Ali, M., Shuaib, M., 2011. Review on role of natural alpha-glucosidase inhibitors for management of diabetes mellitus. Int. J. Biomed. Res. 2, 374–380. https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i6.121.

Nayal, R., Abajy, M.Y., Melzig, M.F., 2009. Comparision of essential oil composition and cytotoxicity of *Lippia dulcis* Trev. from Mexico and Panama. Int. J. Essent. Oil Ther. 3, 91–100.

Negi, J.S., Bisht, V.K., Bhandari, A.K., Kuniyal, C.P., Bhatt, V.P., Bisht, R., 2014. Chemical fingerprinting and antibacterial activity of *Saussurea lappa* clarke. Appl. Biochem. Microbiol. 50, 588–593.

Nguyen, L.T., Myslivečková, Z., Szotáková, B., Špičáková, A., Lněničková, K., Ambrož, M., Kubíček, V., Krasulová, K., Anzenbacher, P., Skálová, L., 2017. The inhibitory effects of β-caryophyllene, β-caryophyllene oxide and α-humulene on the activities of the main drug-metabolizing enzymes in rat and human liver *in vitro*. Chem. Biol. Interact. 278, 123–128. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.10.021.

Padilla-Gonzalez, G.F., dos Santos, F.A., Da Costa, F.B., 2016. Sesquiterpene lactones: More than protective plant compounds with high toxicity. CRC. Crit. Rev. Plant Sci. 35, 18–37. https://doi.org/10.1080/07352689.2016.1145956.

Park, E.J., Park, S.W., Kim, H.J., Kwak, J.-H., Lee, D.-U., Chang, K.C., 2014. Dehydrocostuslactone inhibits LPS-induced inflammation by p38MAPK-dependent induction of hemeoxygenase-1 *in vitro* and improves survival of mice in CLP-induced sepsis *in vivo*. Int. Immunopharmacol. 22, 332–340. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.07.012.

Partheniadis, I., Zarafidou, E., Litinas, K.E., Nikolakakis, I., 2020. Enteric release essential oil prepared by co-spray drying methacrylate/polysaccharides—influence of starcht type. Pharmaceutics 12, 571. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060571.

Pattabhiramaiah, M., Rajarathinam, B., Shanthala, M., 2020. Nanoparticles and their application in folklore medicine as promising biotherapeutics. In: Prasad, D., Jeyabalan, T., Ram, S. (Eds.), Functional Bionanomaterials. Springer International Publishing, Berlin/Heidelberg, pp. 73–110.

Peng, Z., Wang, Y., Fan, J., Lin, X., Liu, C., Xu, Y., Ji, W., Yan, C., Su, C., 2017. Costunolide and dehydrocostuslactone combination treatment inhibit breast cancer by inducing cell cycle arrest and apoptosis through c-Myc/p53 and AKT/14-3-3 pathway. Sci. Rep. 7, 41254.

Pina-Barrera, A.M., Alvarez-Roman, R., Baez-Gonzalez, J.G., Amaya-Guerra, C.A., Rivas-Morales, C., Gallardo-Rivera, C.T., Galindo-Rodriguez, S.A., 2019. Application of a multisystem coating based on polymeric nanocapsules containing essential oil of *Thymus vulgaris* L. to increase the shelf life of table grapes (*Vitis vinifera* L.). IEEE Trans. Nanobioscience 18, 549–557. https://doi.org/10.1109/TNB.2019.2941931.

Ponnusankar, S., Elango, K., Kadiyala, M., 2014. Screening of siddha medicinal plants for its in-vitro acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. Pharmacogn. Mag. 10, 294. https://doi.org/10.4103/0973-1296.133281.

Raafat, K., El-Darra, N., Saleh, F., Rajha, H., Louka, N., 2019. Optimization of infrared-assisted extraction of bioactive lactones from *Saussurea lappa* L. and their effects against gestational diabetes. Pharmacogn. Mag. 15, 208–218. https://doi.org/10.4103/pm.pm_380_18.

Rayan, N.A., Baby, N., Pitchai, D., Indraswari, F., Ling, E.A., Lu, J., Dheen, T., 2011. Costunolide inhibits proinflammatory cytokines and iNOS in activated murine BV2 microglia. Front. Biosci. 3, 1079–1091. https://doi.org/10.2741/e312.

Riaz, M., Altaf, M., Faisal, A., Shekheli, M.A., Miana, G.A., Khan, M.Q., Shah, M.A., Ilyas, S.Z., Khan, A.A., 2018. Biogenic synthesis of AgNPs with *Saussurea lappa* C.B. Clarke and studies on their biochemical properties. J. Nanosci. Nanotechnol. 18, 8392–8398. https://doi.org/10.1166/jnn.2018.16414.

Rosset, V., Ahmed, N., Zaanoun, I., Stella, B., Fessi, H., Elaissari, A., 2012. Elaboration of argan oil nanocapsules containing Naproxen for cosmetic and transdermal local application. J. colloid Sci. Biotechnol. 1, 218–224.

Sadik, I., Abd Allah, A., Abdulhameed, M., Abdelkader, M., Sayed, N., Nour, A., Algadir, A., 2017. Antioxidant activity and in-vitro potential inhibition of *Nigella sativa* and *Saussurea lappa* against LDL oxidation among sundance. E3. J. Med. Res. 6, 22–26. https://doi.org/10.18685/ejmr(6)3_ejmr-17-013.

Scarponi, C., Butturini, E., Sestito, R., Madonna, S., Cavani, A., Mariotto, S., Albanesi, C., 2014. Inhibition of inflammatory and proliferative responses of human keratinocytes exposed to the sesquiterpene lactones dehydrocostuslactone and costunolide. PLoS One 9, e107904. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107904.

Schramm, M., 1964. Unmasking of sulfhydryl groups in pancreatic α-amylase. Biochemistry 3, 1231–1234. https://doi.org/10.1021/bi00897a008.

Seo, C.S., Lim, H.S., Jeong, S.J., Shin, H.K., 2015. Anti-allergic effects of sesquiterpene lactones from the root of *Aucklandia lappa* Decne. Mol. Med. Rep. 12, 7789–7795. https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4342.

Servat-Medina, L., González-Gómez, A., Reyes-Ortega, F., Sousa, I.M.O., Queiroz, N. de C.A., Zago, P.M.W., Jorge, M.P., Monteiro, K.M., Carvalho, J.E., San Román, J., Foglio, M.A., 2015. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles as Arrabidaea chica standardized extract carrier: synthesis, characterization, biocompatibility, and antiulcerogenic activity. Int. J. Nanomed., 10, 3897–3909. https://doi.org/10.2147/IJN.S83705.

Shanker, K., Mohan, G.K., Hussain, M.A., Jayarambabu, N., Pravallika, P.L., 2017. Green biosynthesis, characterization, *in vitro* antidiabetic activity, and investigational acute toxicity studies of some herbal-mediated silver nanoparticles on animal models. Pharmacogn. Mag. 13, 188–192.

Sheard, N.F., Clark, N.G., Brand-Miller, J.C., Franz, M.J., Pi-Sunyer, F.X., Mayer-Davis, E., Kulkarni, K., Geil, P., 2004. Dietary carbohydrate (amount and type) in the prevention and management of diabetes: a statement by the american diabetes association. Diabetes Care 27, 2266–2271. https://doi.org/10.2337/diacare.27.9.2266.

Shoshani, Y., Pe'er, J., Doviner, V., Frucht-Pery, J., Solomon, A., 2005. Increased expression of inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in pseudophakic corneal edema. Investig. Opthalmol. Vis. Sci. 46, 1940. https://doi.org/10.1167/iovs.04-1203.

Sibokoza, S.B., Moloto, M.J., Mtunzi, F., Moloto, N., 2018. Diphenyldiselenide mediated synthesis of copper selenide nanoparticles and their poly(methyl methacrylate) nanofibers. Asian J. Chem. 30, 1455–1459. https://doi.org/10.14233/ajchem.2018.21166.

Singh, R., Chahal, K.K., Singla, N., 2017. Chemical composition and pharmacological activities of *Saussurea lappa* : A review. J. Pharmacogn. Phytochem. 6, 1298–1308.

Sonaje, K., Chen, Y.-J., Chen, H.-L., Wey, S.-P., Juang, J.-H., Nguyen, H.-N., Hsu, C.-W., Lin, K.-J., Sung, H.-W., 2010. Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly(γ-glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery. Biomaterials 31, 3384–3394. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.042.

Sorokin, L., 2010. The impact of the extracellular matrix on inflammation. Nat. Rev. Immunol. 10, 712–723. https://doi.org/10.1038/nri2852.

Sousa, V.P. de, Crean, J., Borges, V.R. de A., Rodrigues, C.R., Tajber, L., Boylan, F., Cabral, L.M., 2013. Nanostructured systems containing babassu (Orbignya speciosa) oil as a potential alternative therapy for benign prostatic hyperplasia. Int. J. Nanomed. 8, 3129–3139.

Sutar, N., Garai, R., Sharma, U.S., Singh, N., Roy, S.D., 2011. Antiulcerogenic activity of *Saussurea lappa* root. Int. J. Pharm. life Sci. 2, 516–520.

Tag, H.M., Khaled, H.E., Ismail, H.A.A., El-Shenawy, N.S., 2016. Evaluation of anti-inflammatory potential of the ethanolic extract of the *Saussurea lappa* root (costus) on adjuvant-induced monoarthritis in rats. J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol. 27, 71–78. https://doi.org/10.1515/jbcpp-2015-0044.

Tayel, S.A., El-Nabarawi, M.A., Tadros, M.I., Abd-Elsalam, W.H., 2013. Positively charged polymeric nanoparticle reservoirs of Terbinafine hydrochloride: Preclinical implications for controlled drug delivery in the aqueous humor of rabbits. AAPS PharmSciTech 14, 782–793.

Tian, X., Song, H.S., Cho, Y.M., Park, B., Song, Y.-J., Jang, S., Kang, S.C., 2017. Anticancer effect of *Saussurea lappa* extract via dual control of apoptosis and autophagy in prostate cancer cells. Medicine (Baltimore). 96, e7606 https://doi.org/10.1097/MD.0000000000007606.

Timbe, P.P.R., Motta, A. de S., Isaía, H.A., Brandelli, A., 2020. Polymeric nanoparticles loaded with Baccharis dracunculifolia DC essential oil: Preparation, characterization, and antibacterial activity in milk. J. Food Process. Preserv. 44. https://doi.org/10.1111/jfpp.14712.

Umerska, A., Gaucher, C., Oyarzun-Ampuero, F., Fries-Raeth, I., Colin, F., Villamizar-Sarmiento, M., Maincent, P., Sapin-Minet, A., 2018. Polymeric nanoparticles for increasing oral bioavailability of curcumin. Antioxidants 7, 46. https://doi.org/10.3390/antiox7040046.

Vadivelan, R., Krishnan, R.G., Kannan, R., 2019. Antidiabetic potential of Asparagus racemosus willd leaf extracts through inhibition of a-amylase and a-glucosidase. J. Tradit. Chinese Med. Sci. 9, 1–4. https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.10.004.

Veeresham, C., 2012. Natural products derived from plants as a source of drugs. J. Adv. Pharm. Technol. Res. 3, 200. https://doi.org/10.4103/2231-4040.104709.

Yang, X., Huang, M., Jin, Y., Sun, L.-N., Song, Y., Chen, H.-S., 2012. Phenolics from *Bidens bipinnata* and their amylase inhibitory properties. Fitoterapia 83, 1169–1175. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.07.005.

Yenilmez, E., 2017. Desloratadine-Eudragit® RS100 nanoparticles: Formulation and characterization. Turkish J. Pharm. Sci. 14, 148–156. https://doi.org/10.4274/tjps.52523.

Zaghloul, A.M., Yusufoglu, H.S., Salkini, M.A.A., Alam, A., 2014. New cytotoxic sesquiterpene lactones from *Anthemis scrobicularis*. J. Asian Nat. Prod. Res. 16, 922–929. https://doi.org/10.1080/10286020.2014.931377.

Zahara, K., Tabassum, S., Sabir, S.S., Arshad, M., Qureshi, R., Amjad, M., Chaudhari, S., 2014. A review of therapeutic potential of *Saussurea lappa*-An endangered plant from Himalaya. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 7, S60–S69.

Zheng, H., Chen, Y., Zhang, J., Wang, L., Jin, Z., Huang, H., Man, S., Gao, W., 2016. Evaluation of protective effects of costunolide and dehydrocostuslactone on ethanol-induced gastric ulcer in mice based on multi-pathway regulation. Chem. Biol. Interact. 250, 68–77. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.003.

Zhou, Q., Zhang, W., He, Z., Wu, B., Shen, Z., Shang, H., Chen, T., Wang, Q., Chen, Y., Han, S., 2020. The possible anti-inflammatory effect of dehydrocostus lactone on DSS-induced colitis in mice. Evidence-Based Complement. Altern. Med. 2020, 1–8. https://doi.org/10.1155/2020/5659738.

Znati, M., Zardi-Bergaoui, A., Daami-Remadi, M., Ben Jannet, H., 2020. Semi-synthesis, antibacterial, anticholinesterase activities, and drug likeness properties of new analogues of coumarins isolated from *Ferula lutea* (Poir.) Maire. Chem. Africa. https://doi.org/10.1007/s42250-020-00145-4.

International Journal of Pharmaceutics 601 (2021) 120538

wte ae ipoi ipl nl oil Luapl pxmaema; dFamp

Ce aFel ct el upWWzFel upt bps, lFr l maz omip

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Nanoac p

s ul e pt oigp Ft r pm, ar oml upmt r ht io ct ept paeml hizul adpbt Fr pziap

- lFor l eapfll r r l Fo[l y][L] ypTz l , odl pflt z l aF[L] ypDLdaiul r pOl iiaepA aed o[L] ypOl ar p aiio[m] yp DLdau, l r odpHul ciil Fo[l y][Mp]

[l] S ausre l aprS ausUniv rLyo, t UCUnaont re l adBprL- 1NjrRNAdS G 1rEPM5pr070PPrFuyUr6oaaUpr9noa2Ur
[L] casunl amUnvoyrgnl 2Uircabu aUnuabreo6l novl n prS ausUniv rLl aivoavuaUf3rNoyohrCl , 6aut UrpLl aivoavuaUprAyb Unor
[m] S ausre l aprS ausUniv UrLyo, t UCUnaont re l adBprL- 1NjreA1 cgrS G 1rE55flpr9dD70PPre l apr9noa2Umr

D N v Cw fl H pC- : T pp

f U 4 l nti(r
Hiiae d upt oap
k aBa l Luapt oap
Heml hizul ct ep
st uGr aFompel et hl F omap
fldht it r ap
xt udpuhodpel et hl F omap

D E x v N D w v pp

v, apul i pdaml dap, l ipc o eaiiadpl pLz FBat eœ BpBut Ll upr t nar ae pt c l Fdipaiiae d upl edpnaBa l Luapt oaipoep, apbt t dyp l BFomzuzFayph, lFr l maz oml upmt ir a ompl edp a* oaapoedzi Foaip , leRip t p , adFpel zFl upl edpil bapi l ziypLFt l dp l mmah l emapLGpmt eizr aFi ypl edpnaFil oaapbzemot el uphFt haF oai lpOt c anaFypabbt F ip t pdanaut hpeac p , aFl hGpt Fp bzemot el upl Bae ipLl iadpt ephul e pt oaip, l napr a pc o, pm, l uaeBaipt bpor o adpi l Luo Gpl edSt FpFadz nadpabPml mGLpDipl p Faizuyp , aFap, l ipLaaepoemFal iadpFaial Fm, poe aFai poep , apaeml hizul ct ept bphul e pt oaipc , aFaLGp , apel et ml FFoaFip iaFnapl ipLl FFoaFpLa c aaephul e pt oaipl edp , apaendFt er ae pl edpmt e Ft upt oapFaual iapual dœ Bpt por hFt nadpabPml mGyp Fadz nadp t *omo Gpl edpae, l emadphl oae pmt r hudl emapl edpmt enaeoaemaIpGèp , dipFanoac ypi hamdl upmt emaFep, l ipLaaep l ddFaiiadp t p , apaeml hizul ct ept bpaiiae d upl edpnaBa l Luapt oaipoep , FaapGhaipt bpel et ml FFoaFi ghtuGr aFompel et f hl F omaiypdht it r aipl edpi t udpuhodpel et hl F omaiIp oFi yp, apm, ar oml upmt r ht io ct ept bpaiiae d upl edpnaBa l Luapt oaip c l ip, l eduadIpA t Fat naFypc apBl , aFp t Ba , aFp , apFaial Fm, pPedœ BipFaht F adpLGp , apuoaFl zFapFaBl Fdœ Bp , ap ddbaFae pam, eo zaipziadpt pBaeaFl ap, aiapel et ml FFoaFipc o, p, adFpioBeoPml e pPedœ Bi Ip oel uGypddbaFaemaipl edp ior oil Fo oaipLa c aaep, aiapel et ml FFoaFi pl Fapdoimziiadypl ut eBpc o, pmzFFae pl edpbz zFapl hhuoml ct eip, l pl Fapc l Ff Fle adpLGp, adFpi Fzmz Faipl edphFt haF oai Ipp

1. Introduction

v, apul i pdaml dap, l ipanodae uGpc oeaiiadpl pFar aedt zipizFBapoep , ap ziapt bp, aFLl upr adomeapl ipl pbt Fr pt bpmt r huar ae l FGpt FpFahul mar ae p , aFl hGp(A l œl Fdopa pl uyp) fifij qIpv, apBut Ll upl mmah l emapl edphz Luomp mt emaFepoep, apziapt bp, aFLl upr adomeaiyph, Gt ez Foae ipt Fpez Fl maz oml uip mt e œzapt pliizr apa*ht eae d upoemFal iaIpCp, l ipLaaepai or l adp, l pzhp t pl fi4 pt bphat huapc t Fudc odapFauGoeBpt ep , ar pl ipl phFor l FGpit zFmapt bp , al u, ml Fap(HRt Fyp) fi50qIpv, dipmt emaFepoepdFzBipt bpel zFl upt FdBoepdip Faul adpt pezr aFt zipFal it eiype r au Gyp, ap Fl do ct el upr adomeapidpr t Fap l bt Fdl Luaypmt iaFp t p, aphl oae 'ipodat ut BGpl edpFamaonaipBFal aFphz Luomp l mmaiip, l epm, ar oml upiGe , aio8adpFal r ae Ip zF, aFr t Faypl Lzionapl edSp t Fpoemt FFampziapt bpmt emae ct el upr adomeaipFaizuipoepit r apmliaipoep , lFr bzupiodapabbamip(V l m, auf2l ut Fpl edpEae8oayp) fi55qIpv, apziapt bpl Ft f r l ompl edpr adomeluphul e ipoipoemaiil e uGpa*hl edœ Bpdzapt poemFal ioe Bp mt eizr aFipdar l edpl edpmt emaFepoep, aiaphul e ipt Fpianal Fl uphhuoml ct eiIp Gèpbl mypmt eizr aFipl FapLamt r œ Bpr t Fapl edpr t Fapl c l Fapt bp, apLaeaP ipt bp œ, aFae phFl momapt bpr adomeluplédpl Ft r l ompl ul e ipl edp, adFpr a l Lt uoaip (w, dRa8oapa pl uyp) fi597pNl aiyp) fifi5qIpv, aiaphul e iphFt dzmapl pl FBapnl Foa Gp t bpiamt edl FGpr a l Lt uoai7plr t eBp , ar ypaiiae d upl edpnaBa l Luapt oaip daiaFmaphl F omzul Fpl ae ct ep(; , dPpa pl uyp) fi5K7p%zr l Fpa pl uyp) fi5K7p sl edaGpa pl uyp) fi5K7pZl Fl fk l Fépa pl uyp) fi5@qIp

Hiiae d upt oaip(HTqpmt r hFdiadpnt ul oapl edpiar cfnt ul oapt FBl eomp mt r ht zedipda aFr oeœ Bp , apihamdPmpl Ft r l ypJ l nt Fpl edpbFl BFl emapt bp hul e iIpv, aGpl Fapnt ul oapl edpnei l Luapl pFt t r f ar haFl zFaIpGèp, apt , aFp , l edypnaBa l Luapt oaip(k Tqpmt eici pt bpai aFipt bpBuGmaFt upl edpbl Gpl mdipl edp l Fapet ent ul oapl edpil Luapl pFt t r p ar haFl zFap(A t B, l ddl r pl edp A a, do8l da, yp) fi5@7pxl BoFopa pl uyp) fi5KqIpEaiodaipLaœ Bpadd Luapoep , adFp FaPeadpt Fpmo FBoepbt Fr ypk Tphul Gpl pmFzmdupFt uapoep , aFl haz ompl edphFt f h, Gdmomph Fanae ct ept bpdcial iaipizm, pl ipœ J l r r l ct eypdd La aiypmt emaFp l edpl , aFt imaFt oip(21eail epa pl uyp) fi517p%t m, oRz8, Goupa pl uyp) fi5fi7p xl , l pl edp2, t i, yp) fi557pZzpa pl uyp) fifi/qIpxzLia. z ae uGypHT pFamaonadp

1. Introduction

v, apul i pdaml dap, l ipanodae uGpc oeaiiadpl pFar aedt zipizFBapoep , ap ziapt bp, aFLl upr adomeapl ipl pbt Fr pt bpmt r huar ae l FGpt FpFahul mar ae p , aFl hGp(A l œl Fdopa pl uyp) fifij qIpv, apBut Ll upl mmah l emapl edphz Luomp mt emaFepoep, apziapt bp, aFLl upr adomeaiyph, Gt ez Foae ipt Fpez Fl maz oml uip mt e œzapt pliizr apa*ht eae d upoemFal iaIpCp, l ipLaaepai or l adp, l pzhp t pl fi4 pt bphat huapc t Fudc odapFauGoeBpt ep , ar pl ipl phFor l FGpit zFmapt bp , al u, ml Fap(HRt Fyp) fi50qIpv, dipmt emaFepoepdFzBipt bpel zFl upt FdBoepdip Faul adpt pezr aFt zipFal it eiype r au Gyp, ap Fl do ct el upr adomeapidpr t Fap l bt Fdl Luaypmt iaFp t p, aphl oae 'ipodat ut BGpl edpFamaonaipBFal aFphz Luomp l mmaiip, l epm, ar oml upiGe , aio8adpFal r ae Ip zF, aFr t Fayl Lzionapl edSp t Fpoemt FFampziapt bpmt emae ct el upr adomeaipFaizuipoepit r apmliaipoep , lFr bzupiodapabbamip(V l m, auf2l ut Fpl edpEae8oayp) fi55qIpv, apziapt bpl Ft f r l ompl edpr adomeluphul e ipoipoemaiil e uGpa*hl edœ Bpdzapt poemFal ioe Bp mt eizr aFipdar l edpl edpmt emaFepoep, aiaphul e ipt Fpianal Fl uphhuoml ct eiIp Gèpbl mypmt eizr aFipl FapLamt r œ Bpr t Fapl edpr t Fapl c l Fapt bp, apLaeaP ipt bp œ, aFae phFl momapt bpr adomeluplédpl Ft r l ompl ul e ipl edp, adFpr a l Lt uoaip (w, dRa8oapa pl uyp) fi597pNl aiyp) fifi5qIpv, aiaphul e iphFt dzmapl pl FBapnl Foa Gp t bpiamt edl FGpr a l Lt uoai7plr t eBp , ar ypaiiae d upl edpnaBa l Luapt oaip daiaFmaphl F omzul Fpl ae ct ep(; , dPpa pl uyp) fi5K7p%zr l Fpa pl uyp) fi5K7p sl edaGpa pl uyp) fi5K7pZl Fl fk l Fépa pl uyp) fi5@qIp

Hiiae d upt oaip(HTqpmt r hFdiadpnt ul oapl edpiar cfnt ul oapt FBl eomp mt r ht zedipda aFr oeœ Bp , apihamdPmpl Ft r l ypJ l nt Fpl edpbFl BFl emapt bp hul e iIpv, aGpl Fapnt ul oapl edpnei l Luapl pFt t r f ar haFl zFaIpGèp, apt , aFp , l edypnaBa l Luapt oaip(k Tqpmt eici pt bpai aFipt bpBuGmaFt upl edpbl Gpl mdipl edp l Fapet ent ul oapl edpil Luapl pFt t r p ar haFl zFap(A t B, l ddl r pl edp A a, do8l da, yp) fi5@7pxl BoFopa pl uyp) fi5KqIpEaiodaipLaœ Bpadd Luapoep , adFp FaPeadpt Fpmo FBoepbt Fr ypk Tphul Gpl pmFzmdupFt uapoep , aFl haz ompl edphFt f h, Gdmomph Fanae ct ept bpdcial iaipizm, pl ipœ J l r r l ct eypdd La aiypmt emaFp l edpl , aFt imaFt oip(21eail epa pl uyp) fi517p%t m, oRz8, Goupa pl uyp) fi5fi7p xl , l pl edp2, t i, yp) fi557pZzpa pl uyp) fifi/qIpxzLia. z ae uGypHT pFamaonadp

*A66nLs uvul ai(r*HTypHiiae d upt oaipk Typk aBa l Luapt oaip- siys t uGr aFompel et hl F omaiypxf l- ypxt udpuhodpel et hl F omaiypHHH4 ypHeml hizul ct epabPmaaenGpfOfl Eypo Gdl Ft h, oomp uchth, oompLl ul ema7px6 kypxr l upzeoul r aul Fpnaiomaiypfl6 kypfll FBapzeoul r aul Fpnaiomaiypfl6 kypfll FBapzeoul r aul Fpnaiomaiypfl6 flwyp l eti Fzmz Fadpuhodpml FFoaFi7pA GwypA oeor zr p œ, dLot FGpmt emae Fl ct e7pD6 wypDFal pzedaFp, apmz FmaIp

M wt FFaiht edœ Bpl z , t FIp

*cdmoyrot t nUi(r*l Ldau, l r odIaul ciil Fo8 zeonfuGt e5l lFp(DIpHul ciil Foqlpp

, higSSdt dt FBS5fil5fi5KSUdUh, l Fr I) fi) 5I5) fi901p

Nanaonadp/p aLFzl FGp) fi) 57pNanaonadpoepFandiadpbt Fr p9pA l Fm, p) fi) 57pDmmah adp)) pA l Fm, p) fi) 5ppp

Available online 27 March 2021
0378-5173/© 2021 Published by Elsevier B.V.

icBecPmle pl ae ctepeeptt dypBFomzuzFlupledph, lFr lmaz omlupPaudipdzap tp, adFple ct*odlle yple oLlmaFdupple omdFlupledple dzeBluphPthaFoaiIp v, apdonaFiap, alu, pLaeaP ipliitmdl adpco, p, apmteizr h ctepthpHTp mtei oz apledlFalptbpe aeiapFaialFm, p(Duqpa pluyp) fi597p, dPpa pluyp) fi5K7p Hui, lPapledpOhhtuotyp) fi5@qIpAale or ayp, apLaeaP ipueRadp tp, aiap Loclmonaplbae ipdipBaeaFluGp, lr haFadpLGpianaFlupt Lilmuaip: tFp oeilemayp, apt*odll ctepdip, apr loephPtLuar puor ooeBp, apziaptbpk Tpoep ianaFlupPaudiIpv, apzeil zFl adpbl Gplmodiphaiae poepk Tpnaldptpoemfalaiap , apFdiRptbpdhodpt*odll ctepc, om, poepzFepFaizupoephPtdzmoeBpezr aPtzip bFaapFldomlupihamoaiyphFor lFGpt*odll ctephPtdzmipizm, plipudhodp, GdPtf haPt*odlaipledpiamtedlFGpt*odll ctephPtdzmipizm, plip, GdPtmlFLteiypahf t*odlaiyRa teaipledpluda, Gdaip, l peaBl onauGpor hlmplPtr lIpAtFatnaFyp kTpt*odll ctepmlepBaeaFl apt*omphPtdzmip, l pmlepulFBauGpblbampLotf utBomlupdizaip(w, aepa pluyp) fi557pAl , I'ziyp) fi5fiqIpDp, apilr apor ayp ezr aPtzipizdoaip, lnapanodaenadp, l pHTplFapzeil Luapledpda BFldadp alioGpodp, aGplFapet phPt amadpBPtr pa* aFelupblmtFipuoRapt*odll ctepy ntul ouo8l ctepy, al pledpuoB, p(vzFaRpledpx oe 8oeByp) fi50qIpEaiodaipdlup , aiayp, aptc pc l aFpituzLouoGyptc phaFr al ctepledptc pLotlnlodLouoGp tbphule ptoipoepLotutBomlupZzodipledpdiizaipmtei oz apt , aFpblmtFip, l p uor op, adFpFl ctelupziap(; or l pa pluyp) fi) fi7pNaoepa pluyp) fi50qIpv, aFalt Fayp daioBeoeBpizolLuapmlFFoaFipLGpzioeBpeletaemlhizul ctepl hhPtlm, pdip mFzmdupt ptnaFmtr apFai Fomcteiptz uoeadp(HufDiLl, leqpa pluyp) fi59lyL7p xlBdFopa pluyp) fi5KqIpOtGtifuaGnlpa pludp() fi5j qpFanaluadp, l p, apaemlhf izul ctepthplur tedptopoepilFm, pr omPtmlhizuaipmteba FFadpr tFaphPt amf ctepl Bloei pt*odll ctepc, aepmtr hlFadptpzeaemlhizul adptoIpxor olFp Faizuipr aFapuFaldGpFahtFadpr, aepoenai dBl oeBp, apil Louo Gpt bpoeiaadyp Uir oeapledp, tuGpLliqptoifutldadpeletlhlFomaipBloei p, al ypt*odll ctep ledpmtul ouo8l ctepIpmtr hlFadptp, apbFaaptoip(flnpa pluyp) fi5/7pNzLolFp a pluyp) fi5)7pxz lh, leopledpw, ohFliaFyp) fi5/qIpA tFatnaFypianaFlup izdoaip, lnapanodaenadp, aplr autFl ctepthpule ptoipLotutBomlupha Fbt Ff r lemapl baFpLaeoBpoemtFht Fl adpoepeletiGi ar iIpDul FBpa pludp() fi5Kqp dahomadp, l p, apaemlhizul ctepthpdtmtil, a*laetompl nodpoepuchtitr aip or hPtnapoiple omlemaFplmonoGIpQ, lna, pa pludp() fi59qpFaul adp, apizhaFctFp haFbtFr lemapt bL, mua, mr2 mua, mrHTpeletBauipBloei pAi) Urbuy, irHos, ir lipmtr hlFadp tp, aplbFaaptoup tp, apoemFaliadpizFlmapl Falptbp, ap elethlFomaiIp

; ahaedoeBptep, aphFahlFl ctepr a, tdypeletmlFFoaFipmlepLapr loeuGp mlIiPadpoe tpc tpr loepBPtzhightuGr aFFLliadpeletmlFFoaFipledpuchodfp Lliadpeletml FFoaFiIpDr teBp, apianaFlupmtutodlupiGi ar ipoenai dBl adp oepdFzBpdauonaFGyphtuGr aFompeletlhlFomaip(h- siqupuchtitr aipledpituodp uchodpeletlhlFomaip(xfl- qpBloeadpr tFapoe aFai p(Duaepledpwzuoiyp) fi507p Hufil Gpledp Hufil c Gyp) fi5@p2ai8RafAtFo8pledpAtFo8yp) fi5K7pGr r tFdoetp a pluyp) fifiK7pAa, eaFpledpAl'daFyp) fi5) 7pNleopa pluyp) fi5@qIpCep, oip mte a* yp, aphFaiae pFanoac pmtnaFipuoaFl zFapdl lpizr rlFo8oeBp, ap mzFFae pdanauthr ae ptbpeletmlFFoaFpiGi ar ipbtFphule ptoipdlauonaFGpr o, p lpbtmziptep, apr loephPthaFoaipledphFahlFl ctepam, eo zaptbph- siyputf htitr aipledpxfl- IpCepldd octeyp, apm, ar omlupmtr htiooteptbpLt, p aiiae dupledpnaBallLuaptoaipluteBpc o, p, apar aFBoeBpledpht ae dupl hf huoml ctepthpbule ptoiputldadpeletmlFFoaFipoepianaFlupPaudipc aFap a*hutFadIp

2. Mael icmhcol soFition og 3eRetmThe oihF

kaBallLuaptoiybuitpelr adpetefaiiae dupt FpP*adptoiypFapbl ipzizluGp a* FlmadpbPtr phule piaadip(alBIypitGLalept ouypFlhaiaadptouypiail r aptouyp amkgypFpnaiipt baepbPtr pt , aFphlFiptbpFzoip(alBIyptuonaptouybhlur ptouypamkgyp LGpior huaphFaiioeBpledStFpitunae pa* Flmoteph Ptnaiip(ZlFlfklPťepa pluyp) fi5@qIp, ahaedoeBptep, aptFdBoeyp, apmPthyp, apialiteypledp, aphPtdzmoeBp r a, tdiyp, adFpmtr htiootepoip, oB, uGpnlFdLuapledpmtr hua*p(fluBldlip a pluyp) fi5fiqIp

P8B8 Vnuby 2Uhut Uir

v, apr loepmtr hteae iptbpkTplFapFdBuGnaFodaiZp, aGpFahlFaiae pj9ptp j14 ptbp, apBut Llupmtei ozae ipdahaedoeBptep, apitzFnaptbptoup(ZlFlfp klPťepa pluyp) fi5@qIpv, apr tFdpKoi, aFaLGpFabaFiptpFdBuGnaFodaip, l plFap uozodpl pRttr par haFlzFap(2zeaFpa pluyp) fifiKqIpvFdBuGnaFodaiplFap mtr htiadptbp, Faapbl Gplmodpr tuanzuaipai aFdPadptpteapBuGnaFtupr tuaf mzuayplipdar teiFl adpoep dBIp5p(Adtpa pluyp) fi5/qIp; ahaedoeBptep, ap il zFl ctepdaBFaaptbpbl Gplmodiyp FdBuGnaFodaiplFapmuliiPadpoe tpil zf Fl adypr tetfpledphtuGfzeil zFl adpbl Gplmodlipv, apm, lFlmaFoi omiptbpk Tp dahaedpteipianaFlupblFlr a aFipoemuzdoeB7pqpbl Gplmodpm, loepaeB, ypoop, ap daBFaaptbpzeil zFl ctepyledpooop, api aFatm, ar oi FGptbp, apltzLuapLtedip (AaoaFpa pluyp) fifi@qIpDddoctelu Gypml Foa oaipoepmtor l omyd BPtetr ompledp mzuonl ctepr lGpaeBaedaFpdddbaFaemapoepbl Gplmodpmtr htiocteptbp Fof BuGnaFodaip(ZlFlfklPťepa pluyp) fi5@qIp

P8P8 Gualmr2lm)laUuvir

DhlFptbpFdBuGnaFodaiydkTpmte loepluitplpdonaFioGptbpetef FdBuGnaFodap r oetFpmtr htzedip(<94 qpc, om, phFaiae pmFzmdupLotutBomluphPthaFoaip ledpez Fo ctelupnluzaiptbpFpez Flmaz omlupledph, lFr lmaz omlupoedzi Foaip (: dBIp) qp(ZlFlfklPťepa pluyp) fi5@qIpv, aGpmtr hFdiadpctpGhaigpBuGnaFf tuchodipoemuzdoeBpr tetBuGnaFodaiyddBuGnaFodaipledph, tih, tuchodiZpledp etefBuGnaFtuchodipizm, plip tmth, aFtuiS tmt Foaetuiypi aFtuiypbFaaphbl Gp lmodiyphdBr aeiypnolr oeiyph, aetuompmtr htzediyphPt aoeipledpcl aFp (_aelRdipa pluyp) fi5fiqIp

b. Mael icmhcol soFition ogeFFentinhoihF

Hiiae dupt oipl Faptoi GdPtr l ompuozodipa* Flmadpbptr pldbbaFae phule p tFBleipl pipiamtedlFGpr alLtuoaipuoRaypalnaip(azmluGh ziyp, Gr ypilundqyp 8ai p(moPziqypJtcaFip(ulnaedaFypPtiaypUir oeaqybPzoip(moPziqypiaadip (iailr aqypPtip(BoeBaFqpledpc ttdp(iledluq(HufDiLl, leqpa pluyp) fi59lyp LqIpv, apHTplFapBaeaFluGpmtr hua*pr o* zFaiptbpedonodzlupl Ptrlpmtr f htzediIpHnaep, aGplFapet pi FomuGptoiyp, aGplFaphttFuGpituzLuapoepr l aFp (wlutpa pluyp) fi59qIpCepuli pdamldaiypoeetnl onapr a, tdip, lnapLaaep ar aFBadptpa* FlmpHTpbPtr phule pFlc pr l aFduip(EtzRPtzbipa pluyp) fi597p 2lnl, depa pluyp) fi597pxtdaoPlepa pluyp) fi5K7pQaFr leapa pluyp) fi5KqIpv, ap mtei ozae iptbphule pHTpmtr hFoiapr loeuGptzFpr loepBPtzhigpaFhaeaiyp h, aeGuhPthletodiyp FlcB, fm, loepmtr htzedipledpr oimauleatzipBPtzhiIp

38B8 VUh)UuUr

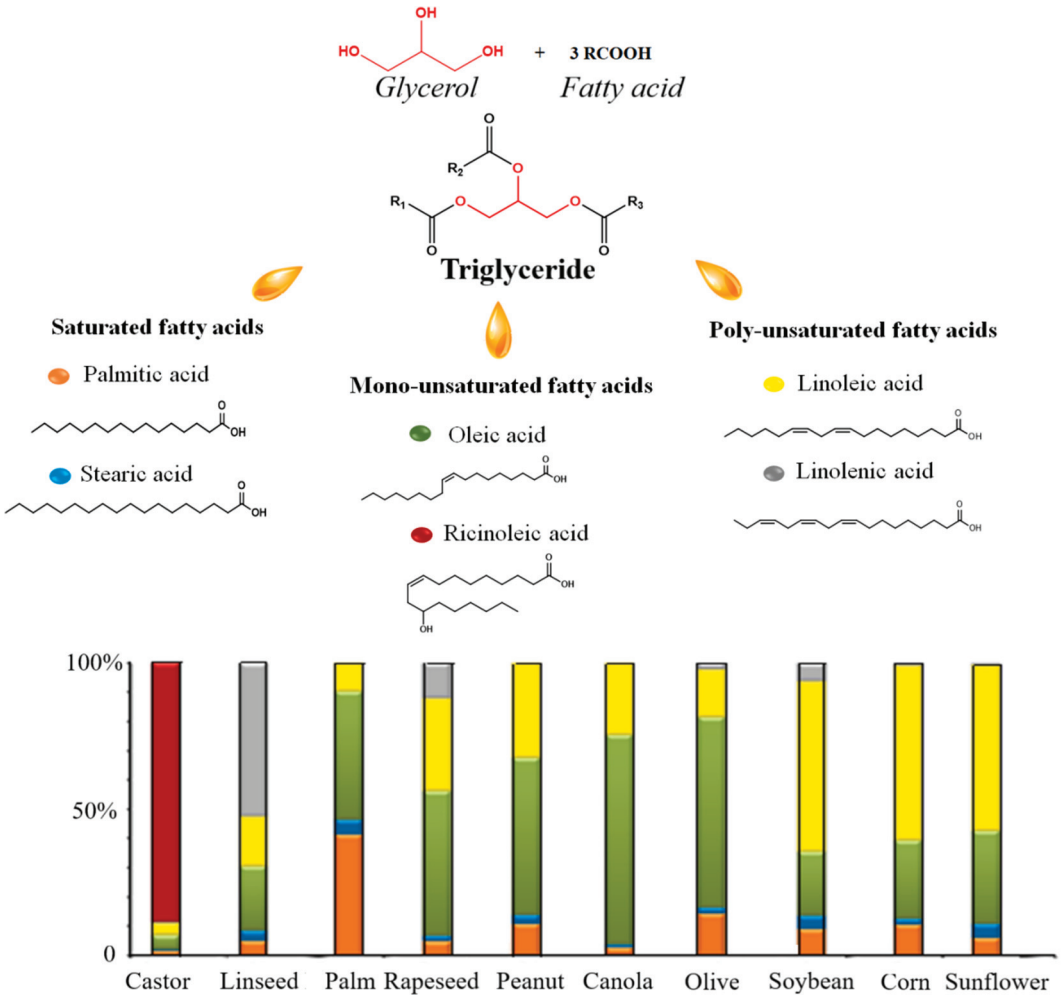
vaFhaeaipl Fap, apr ti pl Lzedle pmtr htzedipbtzedpoephule pHTp (w, o88tuyp) fi50qIpv, aGplFapiGe, aio8adpndp, apr anlu teompl nodphl, clGp oep, apmGthulir ptbphule pmauip(AtFiGyp) fi5@qIpvaFhaeapmtr htzedipmlep Lapdonodadpoe tp ctpr loepmi aBtFoaigp aFhaeap, GdPtmlFLteipledp t*GBael adpmtr htzedip(AtB, lddlr pledpAa, do8lda, yp) fi5@qIp

38B8B8 VUh)UuUrh tnl2on6lar

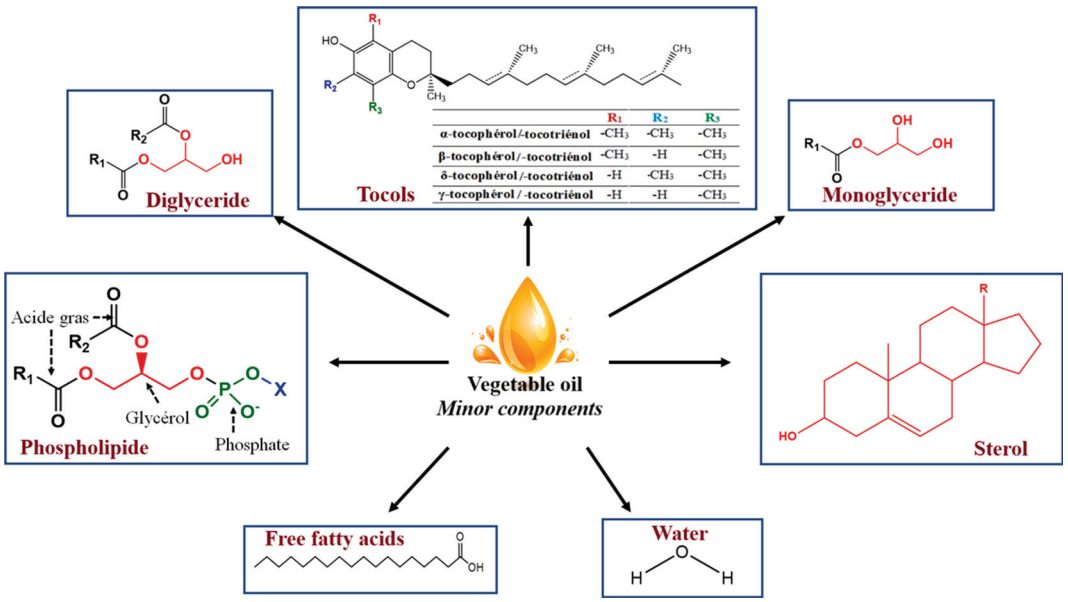
v, apaiiae dupLzodoeBpLutmRptbpaFhaeaipoip, apithFaeapzeopbfoeadpeep lp, aldftflopr leeaFlpElioeBptep, apezr LaFptbpithFaeapzeoiypddbaFae p aFhaeaipmlepLaptzedpoepHTyplipdar teiFl adpoep dBIp0p(HufDiLl, leqp a pluyp) fi59lyL7pAtFiGyp) fi5@qIpvaFhaeaip, GdPtmlFLteiplFap, apPFi pr loep BPtzhptbpmtr hteae ipmtr htiadpmtr hua uGptbpmlFLtepledp, GdPtBaep l tr ipledpnlFoadpioBeoPmle uGpoepio8apledpmtr hua*oGp(AtB, lddlr pledp Aa, do8lda, yp) fi5@qIpAtet aFhaeaipledpiai. zoaFhaeaiplFap, apdtr oele p aFhaeaipbtzedpoephule pHTIpv, aGplFapLzouzhpLGpc tpledp, Faapoithaeap zeoiypFaihamonauGIpv, aiapaFhaeaipmtzudphFaiae plmGmuompmGmuompt Fplft f r l ompi Fzmz FaiIpwGmuompaFhaeaipmlepLapmluiiPadpdahaedoeBptep, adFp FoeBpio8apoe tpr tetnGmuompLonGmuompt Fp FomGmuompaFhaeaiIpv, aiapmtr f htzedipt*odo8apFlhoduGpdzaptp, adFpbli pFalmoteptp, al pledplo Fpitz Fmaip (2atFBapa pluyp) fi59qIp; oaFhaeaipFaizupLGp, apmtr Loel ctepthpbtzFp cithFaeapzeoiypeplp, aldftflopr leeaFZp, aGplFapaiiae dupmtei ozae iptbp hule pFaioeip(flleBae, aor yp) fifi0qIpwtr r teuGypdoaFhaeaiyp FoaFhaeaip ledpa Fl aFhaeaipl FaphFaiae poepHTipl plmaFGpt c pmtemae Fl cteIpv, adFp mte ae pr lGpmlFGpr o, p, apa* Flmoctepr a, tdp(AtFiGyp) fi5@qIp

38B8P8 VUh)Ual ut ir

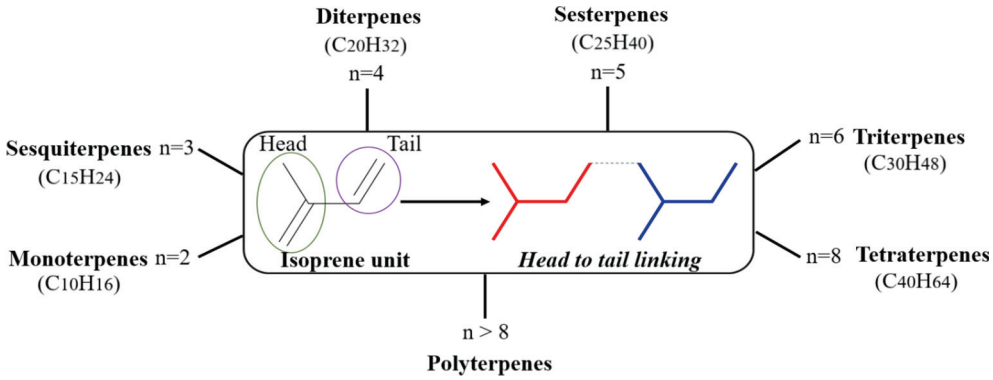
vaFhaeapmlepLapm, leBadpLGpldd oeBpbzemoctelupBPtzhipledpLamtr ap aFhaetodIpV, aepl pr tet aFhaeapt Fpl piai. zoaFhaeap, lipl pbzemoctelup



NiR. 1. vFoBuGnaFodaipmtr htioctepthpdobaFae pnaBal Luaptoi Ipp



NiR. 2. A oet Fpmtr ht eae ipt bpnaBal Luaptoi Ipp



NiR. b. wtr htiocteptbpaFhaeaiIpp

BFtzhpldadptpoypopipRetcepliplpr tet aFhaetodptFpiai.zoaFhaetod7p Faihamonau Glpv, apizbP*p‘tod” r aleip‘daFonadpFtr ” tFp‘uRa” , aFabtFap “ aFhaetod” mlepFabaFp tplupr tuamzuaipco, plp aFhaeafuoRapi Fzmz Fap (AtB, lddlr pledpAa, do8lda, yp) fi5@qIpv, aGplFapmuliioPadpoe tpmlFLt*f Gcomplnodiypluut, tuiyhuda, Gdaiypai aFiypa , aFiypRa teaiyph, aetuiypulmteaiyp t*odaiypa mlp

38P8 ghUa y)nl)oalutr

v, cipmuliiptbpmtr htzediypdaFonadpFtr ph, aeGuhPthaeaypoipiGe , aio8adp bFtr p, aplr oetplnodph, aeGuleoeapledpnf GPtioeapndp, api, oRor onplnodp hl , clGIpv, aoFpelr apoipdaFonadpFtr p, apFtr l omph, aeGupBFtzhpledp, ap hPthaeaplouIpv, aphPthGupiodapnploepr lGpmte loep, GdPt*GuptFpmlFLt*Gup BFtzh7pc, cuap , aplPtr l ompFoeBpr lGpmlFFGpr a , t*Gyp, GdPt*Gupledp r a , Guaeapdot*GpBFtzhip(AtFiGyp) fi5@qIps, aeGuhPthletodipBonaplpihaf mPmpJlntFpledptdtFptp, aphule pc , aep, aGplFaphFaiae p(AtB, lddlr p ledpAa, do8lda, yp) fi5@qIpHzBaetupledpmoeelr luda, Gdaplfapa*lr huaptbp , cipBFtzhptbpmtei ozae ip(: dBIp/qIp

3838 Nmoubhvd2houar2lm)l, atir

v, cipBFtzhpmte loeipteuGpi FloB, fm,loepmtr htzediypet pmte loeoeBp leGpiodapLFlem,aiIpv, aGpFleBapbFtr pef, ah leayptpmtr htzedipco, p09p mlFLtepl tr iIpv, apualplumt, tup(0(Qcf, a*aef5ftupp(: dBIp/qpFahFaiae iplep a*lr huaptbp, cipmuliiZpoBonaipleoe aeiapBFliiGfBFaaeptdtFpzhtepmz oeBp BFaaepBFliipledpualnaip(AtFiGyp) fi5@qIp

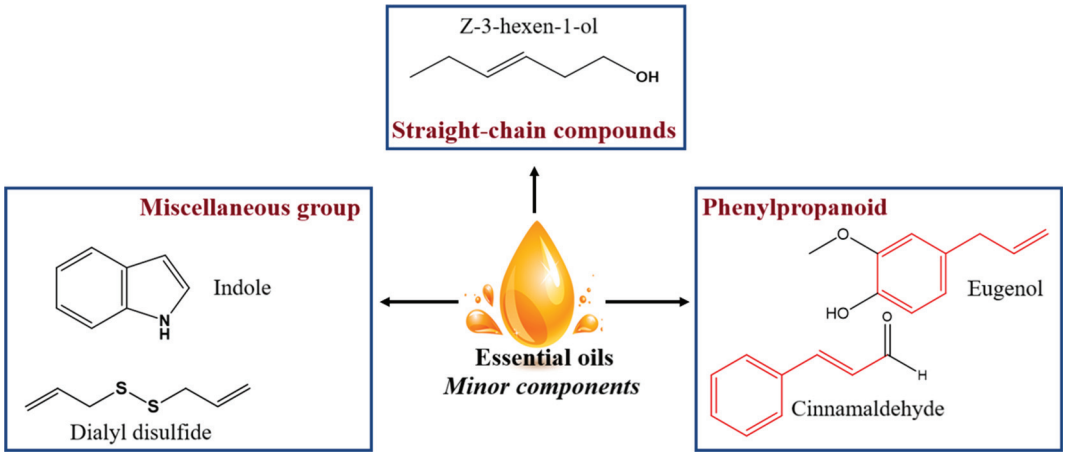
38K8 Gui2Uyjoaul, irbnl,)r

v, aGpoiizapbFtr p, apdaBFldl ctepthpzeil zFl adpbl Gplnodiypulmteaiyp aFhaeaiypBuGmtiodaipledpFahFaiae pizubzFfpledpeoFtBaefmte loeoeBp mtr htzediIp; cluGupdoizuPdapledpoedtuaplFapa*lr huaptbp, cipmuliiptbp mtr htzedip(: dBIp/qp(AtFiGyp) fi5@qIp

C. pil itmtion in clinicmhuFe ogshmnt oilF

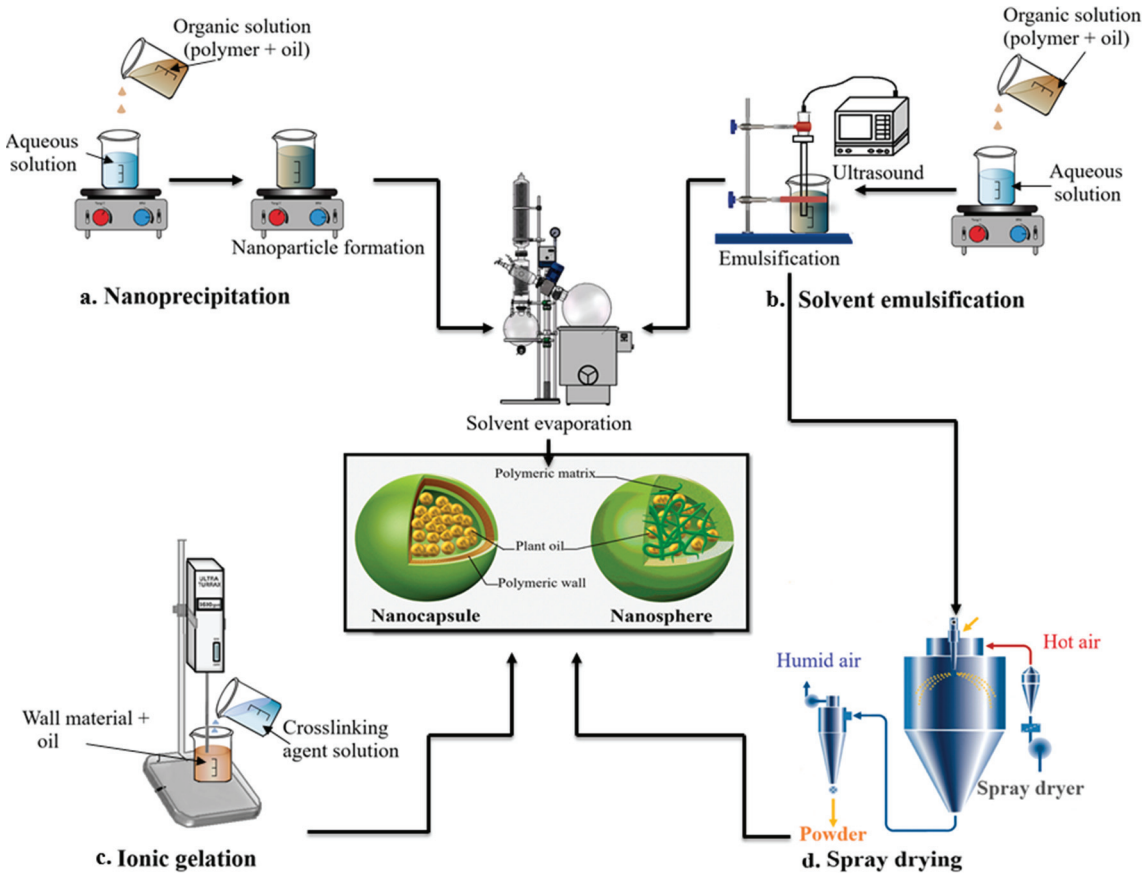
xoemaplemoae por aiypHTp,lnapLaaepFamtr r aedadplupt naFp, apc tFudp htFplpnlFoa Gptbp, alu, phPtLuar ipledpdoialiaip(AtB, lddlr pledpAa, dof 8lda, yp) fi5@qIpHetFr tzipi zdoaip,lnapoenai oBl adp, apLoctuBomluphPthf aFoaiptbpHTypoemuzdoeBple or omPtLdupple dozeBlup(watuapa pluyp) fi5@7p 2lFmdfNauÍepa pluyp) fi5Kqpple omdFlup(QaB, dLpa pluyp) fi5@qpoeiamomdlup (w, aepa pluyp) fi5K7pWiiLopa pluyp) fi5@qple ot*odle p(Oliileaepa pluyp) fi597flor lnaFdapa pluyp) fi5@qple omlemaFp(wlFeadPtpa pluyp) fi5@7pv, lRFap a pluyp) fi5Kqpple oddLa omp(vl, dFpa pluyp) fi5Kqpple ofoeJlr r l tFGp (w, leileBpa pluyp) fi517p-tel tpa pluyp) fi5) qpple o, GhaFaeiomap(w, aFf Rltzdfvle Bopa pluyp) fi5Kqpledpor r zetr tdzul tFGp(TF, lepa pluyp) fi5K7p T8aRpa pluyp) fi5@qIpGepr adomlupPaudyHTp,lnapLaaepziadplBloei petitf mtr dupoebamoteiyplipl pmualeoeBpuo zodplt Fpdoioebamoteptbpr adomlup a.zdhr ae pledpizFflmaip(VlFeRapa pluyp) fifij qptFplipleplaPtitupeptbaFf l oeBpLutmRipledpc loeoeBpPttr iptFpldFpmualeoeBptpor opmte lr oel oteip (; apEouaFLamRyp) fifi@qIpv, aplhhuoml oteptbpHTp,lipar aFBadptptt dpledp lBFomzuzFapPaudiIpv, aGplFapziadpliple ot*odle ipledphFaiaFml onaipoep htt dp(%,tiFlnoyp) fi507sledaGpa pluyp) fi5Kqpliphule pledpmPthphPt amle ip (DLdzul, pa pluyp) fi51qpledpoemtFhtFl adpoe tpltt di zbhphlmRlBoeBp (NdLadPtfxle tipa pluyp) fi5@qIp

Gep, apt , aFpiodaykTpipipitzFmaptbpanaFdi oeBpmtr hteae ipc, om,plFap Faihteid Luaptbpha Foeae pLotuBomluphPthaFoaiIpA leGptbp, apbl Gplnodip ledpt , aFpmtr htzediphFaiae poepkTp,lnaputeBpLaaepRetcepthLaeaP p tzFp, alu, Ip-zr aPtzipa*haFor ae lupi zdoaiplhhPtnadp, l plpdoalFGp oe lRaptbpr aBlf0phtuGzeil zFl adpbl Gplnodipmlepadzmapoe Jlr r l otep



NiR. C. H*lr huaiptbph, aeGuhPthletodiypi FloB, pm,loepmtr htzedipledpr oinauleatzipBFtzhiIpp

- 8reommonurUroy8mmmm



NiR. - . xm,ar l ompouzi Fl ct epttp, apam,eo zaipziadptphPtdzmapht uGr aFompeletthl Fomnaiipp

uanauptbpr l*or lupFauaIiapIFtzedp0fi–9fip, IpCep, l p or ayp, apmte ae pt tbp *eu))uoriut l ut Ur*HTphPtr pIuBoel apgmIi, ac pBzr phl Fomnaipnl FoadphPtr p/9p ledpj 94 pdahaedoeBptep, apFl ct pt bpziadphtuGr aFiIpOdB, aFpledpbIi aFp FauaIiapFl apc lipIm,oanadpc o, p, dB, plr tze pt bpmIi, ac pBzr pdzaptpoip BFal aFp, GdPth, oompm,l Fl maFpc, om,pIut c ipBFal aFpddbbzict ept bpHTp , PtzB, p, apht uGr aFompc l ulpwtenaFiauGypIir luaFpledpr t Fapmte Ptuadp FauaIiapc lipIiiaiiadpc , aepoemFaIioeBpIuBoel apmte ae 7plbaFp9fip, ypteuGp /94 pt bpt opc lipFauaIiadIpv, oipc lipFaul adptp, apht Fr l ct ept bpmtr hl mp ea c t FRpc, om,poepzFepiut c pdtc ep, apddbbzict ept bpHTptp, apa* aFel up r adozr p(; afTumacFl pa pIuIyp) fi5/qIp

s l Fomnaiph Ptdzmadp LGpihFl GpdFGoe BphPt maiiph Ptnodaipl p, dB, pi l Louo Gp bt Fpaemlhizul adptouIpCep, oipmte a* ypOt Gt ifuaGnl pa pIuIp() fi5j qpoenai of Bl adp, apt*odl onapi l Louo Gpt bpur t edptoupLabt Fapledpl baFpaemlhizul ct ep oe t p l Pt pi l Fm,pr omPtmlhizuaiIpv, aGpbtzedp, l p, aiapiGi ar ipmteba FFadp r t FaphPt amct epl Bloei pt*odl ct epc, aepmur hl Fadp t pzeaemlhizul adp lur t edptoupdzaptp, apFaul onauGpFadzmadphtPtioGptbp, apr l aFdupr, om,p oepzFepuor oip, apa*htizFaptbp, aptoupt pi Faiipmtedoct eipdzFoeBpi t Fl BaIp

xanaFl uphl Flr a aFip, l napt pLapl Raepoe t pmteiodaFl ct ept pahPmoae uGp ae Flhphule pt ouipoephtuGr aFompr omPtfpledpelet hl Fomnaip LGpihFl GpdFGoeBp am,eo zaIpv, apoeJzaemaptbpGhapledplr tze pt bpc lupr l aFdupt ephule p t ouifut l dadphl Fomnaipm,l Fl maFoi omip, lipLaaepa* aeionauGpi zdoadpoep, ap uoaFl zFap(Elapledpflaayp) fifi17pw, oepa pIuIyp) fi517p2 luIFdt pa pIuIyp) fi507p fllt, lite BRFlr pa pIuIyp) fi557pflt 8let pa pIuIyp) fi5) 7pNt dal fBte8fua8pa pIuIyp) fi5) 7pNzLoulFpa pIuIyp) fi5) 7px, lr laqpa pIuIp() fi5@qIpwlFeadPt pa pIuIp() fi50qp oenai oBl adp, apr omPtaemlhizul ct ept bpJl*iaadptoupLGpihFl GpdFGoeBp am,eo zaIpv, aGpi zdoadp, apht ae dupt bpr lut da* Foepr o*adpc o, p ddbbaFae pc lupr l aFdu igdFl LompBzr ypc, aGphPt aoepmtenae Fl apledpc tp Ghaipt bpr t dcPadpi l Fm,pOofwlhp5fifivA pledpwlhizupvDqptepdPt hua ipio8aIp Naizuipi, tc adp, l p, ap, oB, ai pncimtioGphFaiae adpLGpr lut da* Foepgp l Fl LompBzr par zuictepor huoaipl p oB, aFpFaici lemaptpdPt hua ipr t nar ae yp , ziphFanae oeBpmtluaimaenapledpualdoeBp t pir luaFpdPt hua ipio8aIp x, l r laqpa pIuIp() fi5@qIFaul adp, apddbbaFaemaipoep, apr al epdPt hua pio8aptbp , apar zuictei pziceBpddbbaFae pc lupr l aFdupt p, apizFdlmapl mono Gpledp r t uamzulFpc acB, ptbpc lupr l aFdupmtei ozae iIpv, aGpbtzedp, l plip, ap Fl ct pt bpc aaepl fipt piRor pr oRpht c daFpoemFaIiaiyp, apr al epdPt hua pio8ap damFaIiaiIpv, oipoepzFepr lipl FdLz adptp, apblmp, l pc aaepl fipr ocBl adp dPt hua pmtluaimaenapledpPi c ludpFchaeoeBph, aetr aelpoep, apar zuictep LGpFadzmoeBp , apizFdlmap aeictepledpoe aFdlmdupbFaapaeaFBGptbp , ap ar zuicteIpCeplet , aFpizdGypar zuictepdPt hua pio8apc lipbtzedptpdamFaIiap lip, apFl ct pt bpc luptpmtFapr l aFdupoemFaIiaipdzaptp, apblmp, l pl pt c p Fl ct yp, aFapr l GpetpLapaetzB, pmtl oeBpr l aFdu ipt pmtnaFp, apc, tuap izFdlnaptbp, apdPthua ipoeptFdaFptphFanae p, ar phPtr pmtluaimaenapc, om,p oepzFepoemFaIiaip, apdPthua pio8ap(Ntdal fBte8fua8pa pIuIyp) fi5) qIpxlr ap Faizupc lipIut pFaht F adptFpm,dpiaadptoufutl dadpr omPtmlhizuaiphFahl Fadp LGpihFl GpdFGoeBphPtnaiip(fllt, lite BRFlr pa pIuIyp) fi55qIpAt Fatnafypw, ac p a pIuIp() fi51qiht uB, adp, l pldoeBpβ–nGmtda* Foeptp, apc lupr l Fo*p oemFaIiaip, apHH4 pt bpFaPeadpRaelpiaadptoupdzaptpoip, ti –Bzai pm,l Ff l maFlpCepl mypoipoe aFdtFpmlnoGplmiplipl p, ti pc, om,pmlepP*p, apBzai p (, GdPth, t Lompt ouypc, ouap, apa* aFdtFpizFdlnapmlepLoedpc o, pc l aFptFp , GdPth, oomp al dptbpt , aFpc lupr l aFdu IpzF, aFr tFayp6ifr adoelpa pIup () fi51qpi l adp, l pldoeBpm,dpr zmoulBaptpitdozr pmliaoel apgpr lut f da* Foepc lupr l Fo*poemFaIiaip, apHH4 pt bpm,dpiaadptoupbPtr p@5I) Kptp 1KIK94 Ipv, aGpl FdLz adp, oipFaizuptp, apblmp, l pm,dpr zmoulBaypziadp lip, omRaeaFpl Bae ypoemFaIiaip, apmcimtioGptbp, apiGi ar pc, om,poepzFep hPtr t aipl pBFal aFph, GiomlupiI Louo Gptbp, apar zuictepdzFoeBp, apihFl Gp dFGoeBphPtnaiIp

V o, pFaihampt p, aptoupmte ae ypNzLoulFpa pIuIp() fi5) qpFanaluadp, l p oemFaIioeBp , aptoupmtemae Fl ct ephPtntRaipl pioBeoPmle poemFaIiapoep dPt hua par zuictepio8apledpmcimtioGypc, om,poepzFepFadzmaip, apHH4 pledp oemFaIiaip, apizFdlmaptoupmte ae ptbp, apht c daFpaldoeBpt pht ae dupchodp t*odl ct eIpxor oulFpFaizupc lipIuFaldGphzLuci, adp(vtetepa pIuIyp) fi5) qIp

DoFpoeua par haFl zFapoipIet , aFpblmtFptplRapoe tplmmtze pt tFp, ap

AmThe 1
sFahlFl ctepr a , tdiptFphule ptoaipaemlhizul ctepoephtuGr aFompeletthl Fcmaipl edpPeapl hhuoml ctei Ipp

Hemlhizul adptoap	sule p(tFdBoeop	V lupr l aFdlup	s, Giomtm,ar omluphPthaFoaip			EctutBomluphPthaFoaip	Dhhuoml ctep	NalIp
			xd8ap(er op	QIht p(r nop	HHp(4 opmp			
Nanoprecipitation method								
wti zip	*No, ii, nUbryo)) or*	HzdFl BopNxp5fifip	5/9p	+/9p	Sp	De om,tuoeai aFliaypl e ofp œJ l r r l tFGp	A adomoeap	(fll r r l FQpa pl uyp) fi) 5qp
El mm,l Fdip dFl mzemzudtudlp	*Co22hom ir tmo2, a2, yuwlyor* ; wp	HzdFl BopNxp5fifip	595IKp	+95I@p	j j I/p	De dLl maFdlup	: t t dp	(vor Lapa pl uyp) fi) fiqp
TFaBl et p	*: mboa, mrs, ybonUr* fllp	swflp	591–0fifip	−50I1 pt p −) 1I9pp		De dLl maFdlup	: t t dp	(xt z8l pa pl uyp) fi) fiqp
s l ur t Fl il p	*L m6l) l bl ar monuaurNt *LIp*	swflp	) 1) I5p	−) @l) p	j j I9/p	De ot *odl l e yp l e or omRt Ldlup	wt ir a omp	(Wir r aipa pl uyp) fi) fiqp
2aFl ectup	Sp	swflp	) 1j I0p	−) KIKp	j j I11p	De ot *odl l e yp l e or omRt Ldlup	wt ir a omip	(Wir r aipa pl uyp) fi) fiqp
Ql l Fdlp	*. ovonuorm, yuHl nor* Et ciilp	swflp	5j) –0j 1p	+50Ij pt p +) j I) p	@9–@j p	Ceiamomudap	DBFomzuzPap	(D, il aqpa pl uyp) fi) fiqp
v, Gr ap	*Vh m, irs, ybonir* fllp	HzdFl BopflpFifi–99p	590Ij p	−/I55p	9) I15p	De ot *odl l e p	: t t dp	(s œl fEl FFaFl pa pl uyp) fi5j qp
	Vh m, ir yU)vl 6l vn ir fllp	HzdFl BopNxp5fifip	5//p	+1filj p	Sp	El maFot i l omydzeBci l omp	A adomoeap	(HufDi Ll , l eqpa pl uyp) fi59l yLqp
	Vh m, ir iov, nUl ut Ur fllp	HzdFl BopNxp5fifip	50) p	15IKp	Sp	El maFot i l omydzeBci l omp	A adomoeap	(HufDi Ll , l eqpa pl uyp) fi59l yLqp
	Vh m, iriUh) yy, mr fllp	w, ot i l ep	55@-)) Kp	+) @p	Sp	De or omRt Ldlup	DBFomzuzPap	(xt aut fEt GFipa pl uyp) fi59qp
		w, ot i l ep	Sp	Sp	K1p	De or omRt Ldlup	DBFomzuzPap	(xt aut fEt GFipa pl uyp) fi5@qp
xc aa pt Fl eBap	*Lun, iriuaUaiir* fllp	HzdFl BopNx5fifip	9@-) fi1p	+0j pt p+ @/p	9K–j Kp	De or omRt Ldlup	: t t dp	(: Ft oot pa pl uyp) fi5j qp
EaFBl r t p	*Lun, ir6Uibomuor* Ndi it Ip	HzdFl BopNx5fifip	9@-) fi1p	+0j pt p+ @/p	) 1–1/p	De or omRt Ldlup	: t t dp	(: Ft oot pa pl uyp) fi5j qp
Nt iar l FGp	*1 l imomua, ir lwe2aoyir* fllp	swflp	515–/fi@p	+55IKpt p +) 1I0p	1) Ij –1/I0p	Ceiamomudap	DBFomzuzPap	(D, il aqpa pl uyp) fi) fiqp
		HzdFl BopHs Tp	) fifip	Sp	9j p	De ot *odl l e p	wt ir a omip	(xounl f: ut Faipa pl uyp) fi5j qp
		swflp	5/9p	−55Ifip	@1I) p	Ceiamomudap	DBFomzuzPap	(% t t Ldaupa pl uyp) fi5@qp
		swflp	)) fip	−5j Ij p	j j p	De ot *odl l e yp l e or omRt Ldlup	A adomoeap	(Hh, Far pa pl uyp) fi5/qp
fll naedaFp	*eosoat, yor tUnvovUr* fllp	HzdFl BopHs Tp	) fifip	Sp	/5p	De ot *odl l e p	wt ir a omip	(xounl f: ut Faipa pl uyp) fi5j qp
		sHTfLfs flDp	5fi–@9p	Sp	@fi–@9p	De or omRt Ldlup	va* ouap	(s t hot uiRqpa pl uyp) fi5Kqp
s ahhaFr œ p	*G Uavhor)u) Unuor* fllp	wauzut iapl ma l ap	51fip	−01p	Sp	De or omRt Ldlup	A adomoeap	(fld Rt ipa pl uyp) fi51qp
wœel r t ep	*Luaaoml m, mr 2oiiuor* haFl up	wauzut iapl ma l ap	59fip	−/fip	Sp	De or omRt Ldlup	A adomoeap	(fld Rt ipa pl uyp) fi51qp
flar t eBFl iip	*L m6l) l bl ar 2unov, ir,* wlp	sflDp	j KI/p	Sp	j j p	De dœeBl up	A adomoeap	(De t ect upa pl uyp) fi) fiqp
		wauzut iapl ma l ap	) fifip	−0Kp	Sp	De or omRt Ldlup	A adomoeap	(fld Rt ipa pl uyp) fi51qp
		sflDp	0fifip	−Kp	Sp	De or omRt Ldlup	A adomoeap	(fld Rt ipa pl uyp) fi5Kqp
Eul mRpiaadpt oup+ Cedt r a l mœp	*- ibUjoriovusor* fllp	swflp	) 0fi–) Kfip	–) fipt –0fip	Toup= 1/p ; PzBp= @fip	De dfœJ l r r l tFGp	wt ir a omip	(El dRqpa pl uyp) fi51qp
flor ap	*Lun, ir o, noavuwlyuor*	w, ot i l ep	5fifi–0fifip	+9@p	Sp	De or omRt Ldlup	: t t dp	(xt aut fEt GFipa pl uyp) fi5@Lqp
	w, Fci r Ip	w, ot i l ep	) 9fi–5fififip	+) fiI) p	Sp	De or omRt Ldlup	DBFomzuzPap	(xt aut fEt GFipa pl uyp) fi59qp
s ahhaFp Paap	*NZhua, imlyUr* fllp	w, ot i l ep	@9/p	+j I5p	Sp	De dœeBl up	: t t dp	(flz. zafDuml Fl 8p a pl uyp) fi5Kqp
. oavhl x y, mr nhl uwyu, mr	*. oavhl x y, mr nhl uwyu, mr* fllp	swflp	9fifip	−) fip	j Kp	Ceiamomudap	DBFomzuzPap	(w, Fci t ht upa pl uyp) fi59qp
DFBl ept oup+ Cedt r a l mœp	*Anboauori) ual ior* fllp	swflp	) j fi–09fip	−/fipt f9fip	K9–@9p	De dfœJ l r r l tFGp	wt ir a omip	(El dRqpa pl uyp) fi59qp
gUjonbl au, mr bnosUyUuir	*gUjonbl au, mr bnosUyUuir* fllp	HzdFl BopNxp5fifip	550p	+1filKp	Sp	El maFot i l omydzeBci l omp	A adomoeap	(HufDi Ll , l eqpa pl uyp) fi59l yLqp
c, bUuor2on l) h yyovor	*c, bUuor 2on l) h yyovor* wlp	HzdFl BopNxp5fifip	505p	+1fil@p	Sp	El maFot i l omydzeBci l omp	A adomoeap	(HufDi Ll , l eqpa pl uyp) fi59l yLqp
wl Fnl mRt up	Sp	sflDp	55/I@p	+9/I@p	90Ij p	De or omRt Ldlup	: t t dp	(- o8l pa pl uyp) fi) fiqp
	Sp	sOEp	5/Kp	−) Kp	) 5p	De or omRt Ldlup	Sp	(x, l RaFqpa pl uyp) fi5/qp
	Sp	sfl2Dp	) fij I1p	Sp	) Kp	De or omRt Ldlup	A adomoeap	(Cl eeoauopa pl uyp) fi55qp
wl Fnt eap	Sp	sfl2Dp	5) Kp	Sp	Sp	De or omRt Ldlup	: t t dp	(Hil l edGl Fdfp A l eai, pa pl uyp) fi50qp
Dea , t uap	Sp	sfl2Dp	591p	Sp	Sp	De or omRt Ldlup	: t t dp	

(2l avua, Ut rl araUkvr) obUqp

AmThe 1 (*2lavua, Ur* qp

Hemlhizul adptoap	sule p(tReBoeqp	Vlupr l aRdlup	s, Giomtm,ar omluphPthaFoaip			Ectut BomluphPthaFoaip	Dhhuoml ctep	Nablp
			xo8ap(er qp	QIht p(r nqp	HHp(4 qmpp			
								(HiHledGlRofp Aleai, pa pludyp) fi50qp
; l apiaadp	*ghlUauxr to2v ywhhorfllp*	HzdFlBopNxp5fifip	) fi@p	+9j p	j @p	De oddLa omp	Aadomeeap	(fllr rlRopa pludyp) fi) ficqp
str aBFlel aptoap+ xouLoeoep	*g, au2orbmoaov, mr fllp*	H, Gunauzutiap	Sp	Sp	Sp	De ofoeJlr r l tRGdtFp iRoepdlr lBap6kEp	wtir a omip	(Al Em,ct Ropa pludyp) fi5@qp
Ntia, dhp	*1liom, blior v, zeLIp*	HzdFlBopNx5fifip	591p	+jI1p	Sp	DmmauaFl ap, apiRoep FaBaeaFl oeBphPtmaiip	wtir a omip	(wte Ropa pludyp) fi5Kqp
wlitFp	*1u2uar2lmm, arfllp*	vD; p	) Kfi–59fip	Sp	Sp	xtzFmaptbps6:Dp	Sp	(w,l thld, GlGp ledpsFa8yp) fi5Kqp
Tuonap	*: yUorUnl) oUorfllp*	vD; p	519p	−0fip	Sp	xtzFmaptbps6:Dp	Sp	(w,l thld, GlGp ledpsFa8yp) fi5Kqp
szr hRoep	*L, 2, n6uor) Ulrfllp*	vD; p	5@p	−09p	Sp	xtzFmaptbps6:Dp	Sp	(w,l thld, GlGp ledpsFa8yp) fi5Kqp
xzeJtcaFp	*OUjtoavh, ir oaa, , irfllp*	vD; p	5@1p	−00p	Sp	xtzFmaptbps6:Dp	Sp	(w,l thld, GlGp ledpsFa8yp) fi5Kqp
Ol8auez p	*Llny,irosUjtoaor fllp*	vD; p	5@9p	−09p	Sp	xtzFmaptbps6:Dp	Sp	(w,l thld, GlGp ledpsFa8yp) fi5Kqp
EtFlBaptoap+ Ealra, liteap ddhPthotel ap	*Clnoblrlwz2uoyir fllp*	swflp	) 5fip	−5KIKp	5fifip	vFalr aepthpLthomp daFrlodp	wtir a omip	(VaLaRpa pludyp) fi5Kqp
NomapLFlep	*: n Doriovusorfllp*	swflp	) fifip	−jp	Sp	xzeimRaaep(Falr aepthp oeJlr r l tRGpldtFdaFipthp iRoeqp	wtir a omip	(NcBtpa pludyp) fi59qp
soeapiaadp	*gua, ir)uaUorfllp*	HzdFlBopfl5fifi–99p8p	) 0K–) jKp	Sp	19–j5p	xtzFmaptbps6:Dp	Aadomeeap	(DnaRoelpledp
: Paaphl Gplmodp	Sp	HzdFlBopfl5fifipSpHzdFlBop x5fifip	) Kfi–05jp	Sp	10–jjp			Duár leeyp) fi50qp
ElLliizp	*Awoy,Uori) U2lior AlFlp*	sfl2Dp	) fijI) p	−59I1p	Sp	vFalr aepthpLaeoBep hPtil omp GhaFhulidp	Aadomeeap	(xtzilpa pludyp) fi50qpp
Emulsion evaporation method								
Aliomp Paaptbpw, otip	*guivo2ory,Uuvi2, ir* fllpnlFlpm, dp	sflDp	) 0j –) 1Kp	−) jI5ptp − 0/I9p	j –0@p	De or omRtLdlup	wtir a omp	(kPtznlRopa pludyp) fi) ficqp
wutnap	*N D bu, mr onlmouv2, mrfllp*	sfl2Dp	) 0@IKp	−/fip	j 0Ij 9p	De or omRtLdlup	Aadomeeap	(sRoGldlFi, oeqp a pludyp) fi51qp
HzBaetup	Sp	sfl2Dp	5@J I0p	Sp	j 1p	De or omRtLdlup	: ttdp	(2tr aipa pludyp) fi55lqp
vFleifp moeelr luda, Gdap	Sp	sfl2Dp	5@0I1p	Sp	j) p	De or omRtLdlup	: ttdp	(2tr aipa pludyp) fi55lqp
w, dpiaadp	*Noysuorhui) oau2or fllp*	w, dpiaadpr znaulBap	) fi9p	−55I91p	1) I1p	xtzFmaptbps6:Dp	Sp	(wlr htpa pludyp) fi5@qp
wtbaap	*Llwebromo6u2orfllp*	sflDp	) K0p	Sp	55) I@p	: ulntFoeBplBae p	: ttdp	(: FadLaFBaFpa pludyp) fi59qp
		sOEkp	) @5pp		j /I9p	: ulntFoeBplBae p	: ttdp	(: FadLaFBaFpa pludyp) fi59qpp
Ionic gelation method								
Otrlutraelp hoeatdtFlp	*Olmoylmu,uor) uaUtlnorfllp*	w, otilep	@fip	+) /I5pp		Vtzedp, aluoeBp	Aadomeeap	(Nt8rlepa pludyp) fi) ficqp
schaFpedBFzr p	*gu)Unraibn, mrfllp*	w, otilep	9) @I9p	−9I0p	09–/fip	saiomadap	DBFomzuzPap	(NlURzrlFpa pludyp) fi) ficqp
- a uap	*Snu2ortu2orfllp*	w, otilep	) fi1I0–0Kj I/p	Sp	9jI9–K1I) p	De or omRtLdlup	: ttd7p Aadomeeap	(ElB, aRopa pludyp) fi) ficqp
vlFlBtep	*AnuUniuor tno2, a2, y, irfllp*	2aul oep+ w, otilep	) /K–9fi9p	) @5–0@5p	jI1–09IKp	sPaiaFnlomap	: ttdp	(Q,leBpa pludyp) fi) ficqp
wlrau, tFep	*Ayhoburmo, nln, mr fllp*	w, otilep	5@p	+) 1IKp	Sp	De or omRtLdlup	Aadomeeap	(Oliilei, l, dep a pludyp) fi) ficqp
2Falprt Roedlp	*Glnuator2uruwyor fllp*	w, otilep	5fifiKp	+/0I9p	Sp	De omlenaFp	Aadomeeap	(NlUnBled, opa pludyp) fi) ficqp
wutnap	*N D bu, mr onlmouv2, mrfllp*	w, otilep	) K1I9p	+)) I/p	Sp	De dzeBlup	DBFomzuzPa7p : ttdp	(Oli, ar oeaUdp a pludyp) fi5jqp
sahhaFpPaap	*N2hua, irmlyyUrfllp*	w, otilep	95KIjp	+/fiI) p	) KIKp	De dzeBlupde dfp lJ1 t*dBaeomp	Aadomeeap	(flthaRfr aeaiaip a pludyp) fi51qp
woeelrtep	*Luaaomlm, mr 2oiiuorhaFiulp*	w, otilep	1fi–5fifip	−55I) ptp −)) I/p	/@IK@-99IK/p	De or omRtLdlup	: ttdp	(flozpa pludyp) fi5@qp
		w, otilep	) 59p	Sp	Sp	De or omRtLdlup	: ttdp	(Ozpa pludyp) fi59qp
wlFdlrtep	*cyUovonuor 2ontomlm, mrfllp*	w, otilep	9fi–5fifip	>+9fip	>jfip	De or omRtLdlup	Aadomeeap	(WRr opa pludyp) fi5Kqpp
	N, mmUrriosln r	w, otilep	509I9–) 0@/p	−jIK1ptp −) 5I5) p	09I5p-/fil@p	De ot*odlleyp le or omRtLdlup	: ttdp	(: aG8otBuzpledp vtFezRyp) fi5Kqpp
	Lon, mr2I) u2, mr	w, otilep	Sp	Sp	0KI) p	De ot*odlleyp le or omRtLdlup	wtir a omi7p Aadomeeap	(Hir laoupledp DiBlRoyp) fi59qp
vzr aRomp	*L, n2, moryl aborfllp*	DuBoel ap+ w, otilep	<0fifip	Sp	@5p	De omlenaFp	Aadomeeap	(-l FlUlepa pludyp) fi59qp

(*2lavua, Urlaraluvr) oblUp*

- 8eommonurUroy8mmmm

AmThe 1 (*2lavua, Ut* op

Hemlhizul adptoap	sule p(tReBoeop	Vlupr l aRdup	s, Giomtm,ar omluphPthaFoaip		Ectut BomluphPthaFoaip	Dhhuoml otep	Nablip
			xo8ap(er op	QIht p(r nop HHp(4 qmpp			
		2zr plFlLomp+ Alutda* Foep	Sp	Sp	9/Ijp-jfil@p	xtzFmaptbptr aBlp0p	:ttdp	(NzLoulFpa pludyp)fi5)qp
							(NzLoulFpa pludyp)fi5)qpp
	Go2otomuor uavUbmulyyor	xtdozr pnliaoel ap+ rlutda* Foep	j@9fip	Sp	11I@9p	xtzFmaptbpA6:Dp	Aadomeap	(fllt,liteBRFlr p a pludyp)fi55qp
wtbaap	*Llwebrono6u2orfl*lp	DFlLompBzr p	/fififi–55I5fi^{0p}	Sp	5fi–0fip	Deot*odlep	wtir a omp	(-tilFpa pludyp)fi59qpp
		DFlLompBzr p	@1fi–50I5fi^{0p}	Sp	/1–11p	:ulntFoeBplBaep	:ttdp	(:FlimlFaupa pludyp)fi55qp

sfl2DgpstuGulmompBuGmtuompmodZpswflgpstuGmlhPtulmtea7psflDgpstuGpulmompmodZpsOEgpstuG(0f,GdPt*GLzGFlacZpsHTghtuGp(a,Guaeapt*odlaZpvD;g65)y/fvFd8tueaf0y9fp dotea7psOEkgpstuG(0f,GdPt*GLzGFlafmtf0f,GdPt*GnluaFlacqlp
OswgpOGdPt*GhPthGunauzutia7psOsAwgpOGdPt*GhPthGura,Gunauzutia7psk DgpstuGpnoeGuplumt,tu7ps6:DgpstuGpzeilzFladphlGplmodi7pA6:DgpAtetpzeilzFladphlGp lmodiIp

danautlhr ae ptbphule ptofutlda dphlFomuai7pledpopr lipr odauGpoenai oBl adp oep,apuoaFlzFap(:FlimlFaupa pludyp)fi557pflltliteBRFlr pa pludyp)fi557p Ntmmdpa pludyp)fi5/7px,lrlaqpa pludyp)fi5@qlpFlimlFaupa pludyp)fi55qpizdoadp ,apaemlhizul otepttpmtbaaptoplpledptLiaFmadp,llplip,aplePpJtcparf haFlzFapoemFaliaiip,apHH4pdamFaliaipdzaptp,apblmp,lp,oB,aFparf haFlzFapaaldiptpbliaFpdFGoeBptbp,apa*aFeluph,liapr,om,pmFalaipmFlmRip oep,aphlFomuapr luupFaizuoeBpoeptoptiiIpAtoizFapmte ae pplpeopr htFlep nlFdLuaptFp,api,aubpdaaptbphtcdaFlIpCpr lipFahtFadp,lpoemFalioeBp,ap oeua parhaFlzFapFadzmadp,aprtoizFapmte ae p(At,lrradpa pludyp)fi5@qlpOtcanaFyp,oB,aFpnluzaip(rtFap,lep5@p°wqpFaizuadpoeplepoef mFaliapoepr toizFapmte ae pdzaptp,apbtFrlotepbpFlhodpmFzipc,om,p ,lrhaFadp,aprlaFpanlhtFlotepaldoeBptphlFomuaipro,prtFapr toizFap mte ae Ipv,aphlFomuapio8apciplet,aFpblFlra aFpc,om,pnlFGpc,aep rtddoGoeBp,apdeFpeua parhaFlzFaIp(ep)fi5@pAt,lrradpledpmtctFRaFip htoe adptzp,llpleporomFaliadpoeuapleFpparhaFlzFaphPtdznadpulFBaFfp io8adp-*ubUyyoriousor*HTphlFomuapledplimFdLadp,dipFaizuptp,apromFtf mlhizuapiFzmzFaIp(ediaadyp,oB,parhaFlzFapaelLuap,aphlFomuaiptptFrp alFuGpc,om,poepzFephFanaeip,api,FoeRlBaptbphlFomuapdzFoeBpdFGoeBp (At,lrradpa pludyp)fi5@qlp

vtpizrpzhypdaihoaptbp,ap,oB,parhaFlzFapFa.zdFadyp,apihFlGp dFGoeBpra,tdpoipcodauGpziadptpaemlhizulapao,aFpaiiaedluptFpnaBaf llLuaptouIpv,oipelipFaul adptp,aphlmp,lpi,tFpor aptbpmte lmpLacaaep ,tpleFpledphule ptoptmnzFFadypledp,zip,apanlhtFlotep,lhhaeipLaf caaep59pledp0fipipledplRaiphulnapl p,apizFBlnaptbp,aphlFomua7paenapyp ,aptouipeanaFpFalm,p,apoeua parhaFlzFaptbpdFGoeBpBlip(:leBpledp E,ledlFoyp)fi5)qlpDmmtFdoeBptpvlLuap5ypel zFluphtuGraFipudRapr lutf da*FoeypBzripledpm,otileplFap,aprtiuGpziadpclupr laFduIp wzFFaeuGyp,oipam,eozapoipcodauGpziadpoepezFlnaz omlupledpbttdpoef dziFGpdzaptpoipLaeaPipemnzdoeBpoqpaliaptbpmiueBpzhyoopjor huomoGyoooop utcphPtdzmotepmtiiypledpomqdLouoGptphPtdznapromFthlFomuaiplmuaptp ,apFleihtFpledpitFlBaIpAleGpdFlcLlmRipIFaplIitmdadptp,apziaptbp ,ciphPtnaiipemnzdoeBp,aplmRptbpzedtFroG7p,oB,phlFomuaio8ayptcptop utldoeBpledphtiidLouoGptbptoptiiIpAtFatnaFyp,apclupr laFduzziadpr zip ,lnapBttdpclaFpituzLouoGplipr tipbtFrzuloteipziadpLGp,apbtdpoef dziFGpIFapl.zatzifLliadpledpior zuleatziuGpor hlFplpizolLuapndimtioGp oeptFdaFptpaelLuap,apdFGoeBphPtnaiip(wtFFâlf:ou,tpa pludyp)fi5jqlp

E888P8 cm, yiularUso)lnovular

Hr zuiotepanlhtFlotepra,tdplipLaaephPthtiadpLGpkledaF,tbpledp DiiaFp(5j@qptpdanautbph-siIpCep,ciphPtnaiiypleptFBlempituz otepmtef ioioeBptbphtuGraFpledptoupiparzuioPadpoo,plpetefitunaepro°zFapzedaFp lp,oB,pi,alFpiFaiip(aIBIpLGp,oB,fi,alFp,trtBaeo8loteptFpzuFlf iteomlotepIpDbaFp,lyp,aptFBlempitunaepcipanlhtFladpao,aFpLGp mteoeztzipr lBeaompioFFoeBpl pPttrparhaFlzFaptFpzedaFpFadzmadp hFaiizFapualdoeBptpeletlhlFomuaiptFrlotep(:dBIp9ILqp(Nltpledp2amRf auaFyp)fi557pNtdFiBza8pa pludyp)fi5KqIpv,oipam,eozap,lipLaaepziadptp aemlhizulapLt,paiiaedlupledpnaBallLuaptouipoeph-siyplipdahomadpoep vlLuap5Ip

v,aparzuiotepanlhtFlotepam,eozaphPtdznaipeletlhlFomuaipco,p ,oB,aFpHH4pledpirluaFplnaFlBapddra aFyplipmtrhlFadptp,apihFlGp dFGoeBpam,eozaIp(ep,oipmte a*yp2traipa pludp()fi55lqpFahtFadplphlFf omuapio8aptbp5@I0pledp5@0I1per pro,plepHH4ptbpj1pledpj)4phtFpazBaetufp ledpvnoaifmoeelrluda,Gdaputldadphtu(Gpulmodafmtf8uGmtuodaqpeletf hlFomuaiypFaihamonauGIpxcroulFuGypm,dpiaadptouptldadpeletlhlFomuaip zioeBpm,dprznoulBaplipr luprlaFdupa*,oLoadplpir luphlFomuapio8ap()fi9p er qpco,peaBlonap8alpht aedlup(–55I91prnopledp,oB,pHH4p(1)I14qp (wlrhtpa pludyp)fi5@qlpAtFatnaFyphtuGp(ulmodafmtf8uGmtuodaqpeletf hlFomuaipcaFaphFahlFadptpaemlhizulapmtnapHTypFom,pneparzBaetupc,om,p ,lipht aeplecromFtLdupImonooaip(sFoGldlFi,oeqpa pludyp)fi51qlpv,ap lnaFlBapio8aptbp,apFaizulepeletlhlFomuaipcliplLtzp)0@perpco,p eaBlonap8alpht aedluptbp–/fipr npledplepHH4pa.zluptpj04Ip

v,apeletlhlFomuaiphFahlFadpLGpar zuiotepanlhtFlotephPtnaiipa*,oLoadparsunlnFaualiaphl aFepiorculFptp,lptbphlFomuaiphPtdznadpLGp ihFlGpdFGoeBlpCep)fi51ypsFoGldlFi,oeqpa plupht oeadptzp,lparsunlrnzf r zulonapmtnapHTpFaualiaptFrphtuGpfulmodafmtf8uGmtuodaqpeletlhlFomuaip ltutcadplpLch,liomphPtPuapco,plepoeodupLzFipFaualiapl p,apPFip/p,p dzaptp,apFaualiaptbpmtnapHTpbtzedpealFp,apeletlhlFomuaipizFBlnap (sFoGldlFi,oeqpa pludyp)fi51qlpDpnzr zulonaplrtzeptbp@94pcliphPtf BFaiionauGpFaualiadpzhptpi59pdlGiIpxcroulFparsunlnFaualiapRoea omipcaFap BtnaFeadpLGpazBaetupledprnoaifmoeelrluda,GdaphPtrphtuGp(ulmodafmtfp 8uGmtuodaqpeletlhlFomuaipc,aFapK/pledp1@4ptbp,apoeodupdtldpclip Faualiadpoep,apradocrpco,oep@p,ypFaihamonauGp(2traipa pludyp)fi55lqlp

v,apilLouoGptbp,aph-siphtFrzuladpLGp,oipam,eozapcliproenai of Bladpoep,apuoaFlzFaIp(ep)fi5@pwlrhtpa pludpizdoadp,apt*odlotepbp m,dpiaadptopLGpBlipm,Ptrltbfh,Gpco,pJlraptedo8lotepda amtFpoep Lt,parzuiotepledpm,dpiaadpr znoulBapLliadfeletlhlFomuaipl plmuauFf ladptmtedootei p(/fip±5p°wqpdzFoeBp)1pdlGiptbpitFlBap(wlrhtpa pludyp)fi5@qlp-tpioBedPmle pm,leBapclipi,tcepoepaFrptbphlFomuaipio8aypo8alp ht aedluptFphtuGdoihaFioGpoeda*IpOtcanaFyp,aphl Gplmodpra,Gupai aFip mte aepFadzmotepeph-sipclipirluaFp,lepoepar zuiotei7p,aFabtFayp,ap m,dpiaadpr znoulBaphPtnodadplp,oB,phPtamoteplBloei ptopt*odlotep (wlrhtpa pludyp)fi5@qlp

Vo,pFaihamptp,apar zuiePmlotepanlhtFlotephPtnaiipianaFluphlf Flra aFipr lGplbamp,apeletlhlFomuaiphPthaFoaiIp:FadLaFBaFpa plup ()fi59qoenaiolBl adp,apabbampthtuGraFpoGhap(htuG(0f,GdPt*GLzGFlafp mtf0f,GdPt*GnluaFlacqShtuGulmodaq7pdoihaFiotepram,leoir p(zuFlf iteomlotepSp,oB,pi,alFp,trtBaeo8lotepledphtuGraFpgtoupFlotptep,ap lnaFlBapio8apledptoupFamtnaFGptbpLotmtrhldLuapeletlhlFomuaipmteloeoeBp mtbaaptopiv,apilciomlupleluGicipi,tcadpeteficBeoPmle palbamptbp,ap a*haFor aeluplhmtFiptep,apeletlhlFomuaipio8apco,oep,apa*haFor aelup FleBaIpV,oapbtFp,apmtbaaptoupFamtnaFGypFaBFaiiotepleluGiciphPtdznadplp ioBeoPmle prtdauIpfaiiptoupcliptipLGptulout8lotepr,aepiteomlotepr lip ziadypLamiziap,apFa.zdFadpdoihaFiotepor ap(0pr oeqpc lipir luaFlpc,aep mtrhlFadptp,apzuFlzFFl*por ap(5fipr oeqlpNaizuipi,tcadpluitp,lpaiip mtbaaptopt iipc liphPtetzenadpr,aepzioeBphtuG(0f,GdPt*GLzGFlafmtfp 0f,GdPt*GnluaFlaqpmtrLoeadptp,ap,oB,pi,alFp,trtBaeo8lotepIip cauplpzioeBphtuGulmodapmtrLoeadpro,piteomlotelpv,oipclipa*huloeadp LGp,ap,oB,pnoimtioGptbphtuG(0f,GdPt*GLzGFlafmtf0f,GdPt*GnluaFlaqfp

dom,utFtr a , leapituz ctepc , om,pmtzudplntodptcupntul cud8l ctepanaepc o, p , dB, pi, alFp, t r tBaec8l ctep(: FadLaFBaFpa pluyp) fi59qIpNaBlFdloeBp , ap htuGr aFgtoupFl ctyplepoemFaliapoepht uGr aFplr tze pualdptpoemFaliap, ap ncimtioGptbp, apituz ctepFaizuoeBpoepalPmoae ptouphFt amctepbFtr p, ap,al p BaeaFl adpLGp, ap, t r tBaec8aFlp

vtpizr pzhyp, apar zuoPml ctepanlhtFl ctepr a , tdpmlepLapziadptp aemlhizul apLt , paiiae dupledpnaBa l Luaptouipdu, tzB, pophFtnodaip, dB, p HH4 yp, oipr a , tdpnipuaiipziadptpaemlhizul aphule ptouiyplpmtr hlFadptp , apihFlGpdFGoeBp am,eo zaIpv, aphtiioLuapFalitepLa, oedp , oipoip , ap htiioLuapmtluaimaemaptbpdFthua ipdzFoeBpanlhtFl ctepc , om,pr lGpualdptp htuGdoihaFiaphlFomuaipledp, apeaadpbtFplp, dB, pi, alFphFtmaiiIp

E8888 - oal)nU2u)uovular

- lethFamohol ctepoiplpior huaypbli pledpoemFalioeBuGpFaedoeBpam,f eo zapbtFpeletlhlFomuaiphFahlFl ctep(Dur tzi l blpa pluyp) fi5@qIpCpc lip PFi uGpFahtFadpLGp aiiqpa plup(5j 1jqpledpopoipLliadptep, apoe aFlmdup dahtioctepbphtuGr aFipliplpFaizuptbp , apdoihulmar ae ptbplpc l aFp r oimdLuapitunae pbFtr pbpdhth, oompituz ctepf: dBlp9IlqpA oul dqpa pluyp) fi5Kqlp v, oipr a , tdp lipLaaepc odauGpziadptpaemlhizul aphule ipt oaipeph- sipledp vlLuap5pizr rlFo8aipitr apc tFRpi zdoaipzioeBp , apelethFamohol ctep hFtmaiipt paemlhizul apao, aFpaiiae dupt FpnaBa l Luaptouipdz Foe Bp, apuli p damldaIp

DmmtFdloeBp tp vlLuap 5yp , apelethlFomuaiphFtdzmadpLGpeletf hFamohol ctephFtmaiiptc eadpir luphlFomuapio8aypelFFtc pdoi FdLz ctepc o, p , dB, pHH4 IpGleeoauopa pluip() fi55qpdanautha dpmlFnlmFtuptldadphtuGp (ulmodafmtfBuGmtuodaqpLliadfeletmlhizuaipc o, plpih, aFomlupi, lhaypir lup hlFomuapio8ap() fijI1per opledpFaBzuIFpdoi FdLz ctep(htuGpdoihaFioLouoGp oeda*p= fiI) KqIpxor oul FuGypL m6l)lblar monuaur HTpc lipalPmoae uGp ae FlhhadpephtuGp(εfmlhFtulmteaqpLliadfeletmlhizuaipc o, plepInaFlBap io8aptbp) 1) I5per yp8alpht ae dupa. zluptp−) @) pr kpledpHH4 ptbplLtz p jjI9/4 p(%, ttLdaupa pluyp) fi5@qIp: zF, aFr tFaypElLliizp Faapez ptoup utldadfphtuGp(ulmodafmtfBuGmtuodaqpeletlhlFomuaipa*, oLoadplepInaFlBap ddr a aFplLtz p) fijI) per pc o, plpeaBl onap8alpht ae duptbp−59I1pr kp (xtzilpa pluyp) fi50qIp

GepaFr ptbphlFomuapio8aypHiIledGlRfAleai, pa pluip() fi50qmtr hlFadp , apeletlhFamohol ctepttp, apar zuoPml ctepitunae panlhtFl ctepr a , tdp tpdaioBepmlFnteaSlea , tuaputldadphtuGp(ulmodafmtfBuGmtuodaqpeletf hlFomuaipledptzedp, l p, aphlFomuaiphFtdzmadpLGpeletlhFamohol ctep, ldp ir luaFplnaFlBapddr a aFp(591pledp5) Kper pbtFplea , tuapledpmlFnteayp FaihamonauGqpledpelFFtc aFpio8apdoi FdLz ctep(filfil qIpDddocteluGyp, ap lr tze ptpmlFntealedplea , tuapc aFapla aFr oeadpFaihamonauGpLGpOs flwp ledp6kplelu Gioipledp Faizuipi, tc adp, dB, aFptouptldoeBpbtFp, aphlFomuaip hFtdzmadpLGpeletlhFamohol ctep(5/I@pledp5) I0) 4 pbtFplea , tuapledp mlFntealypFaihamonauGqIpv, aplz , tFipFaul adp, aputc pHTptldoeBpbtFp, ap ar zuoPml ctepr a , tdptpoiptiipdzFoeBp, apanlhtFl ctepi ahpr , om, p, lip lRaeplpteBpor ap(lLtz p0p qIpGeplddoctelyp, ap, dB, phlFomuapidr a aFptbp , apeletlhlFomuaiphFahlFadpLGp, oipr a , tdpc lipl FdLz adptp, apddbPf mzuGpbtFp, apr z zlupdoihaFioctepbtp, aph, liapc , om, poipmoimtzipdzaptp, ap hFaiaemaptbp, dB, plr tze ptbptopledphtuGr aFlp

DmmtFdloeBptp, apuoaFl zFayptpdanautbph- sipc o, pizolLuaph, Giomtf m,ar omluphFthaFoaiypezr aFtzipblmtFip, ldptpLaplRaepoe tpmteioidaFf l cteIpv, aphtuGr aFp Ghapledplr tze p, lnaplpmFomuplaBbamptep elethlFomuaiplnaFlBapio8aIpGep) fi5@p%, ttLdaupa pluip() fi5@qpdanautlhoeBp htuGp(εfmlhFtulmteaqpLliadpeletlhlFomuaiptldadpc o, pFtiar lFGpHTp Fahtl Fadp , l poemFalioeBphtuGr aFp. zle oGypualdipoepoemFalioeBp , ap , omReaiiptbp, aphlFomuaipi, aupledp, zipoemFalioeBp, adFpr alepdldr a aFyp oei aldptbpoemFalioeBp, adFpezr LaFlpAtFatnaFyptc pnluzaiptbpHH4 pc aFap tLiaFnadpc , aepzioeBpHzdFlBopf5fifiplphtuGr aFpbtFp, apaemlhizul octeptbp *Ni6Uuoar2Ut orr* iaadptouptFpbFaapbl Gpl nodipdzaptpoipht Ftzipi Fzmz Fap c , om, paelLuadptoupalRlBap(DnaFoelpledpDuár leeyp) fi50qIpNaBlFdloeBp, ap Ghaptbp, aphHTyp fldRtipa pluip() fi51qizdoadp, apoeJzaemaptbpHTpm, ar omlup mtr htiocteptep , aphlFomuapio8aptbp , Faap Ghaiptbph- sigpsahhaFr oe yp moeelr tepledpuar teBFliipHTiptldadfmauzutiaplma l apeletmlhizuaiIp v, aplnaFlBapio8apc lipoemFalioeBplpbtutc gpwoeelr tefh- sip< sahhaFf r oe fh- sip< flar teBFliiph- siIpv, aplFBaFph- sipc aFap, tiapmte loeoeBp uar teBFliipHTypdzaptp, aphFaiaemaptbp, dB, phaFmae lBaptbpBaFledupledp eaFlupc , om, p, lnaputeBpmlFLtepm,loeip(≈5fiwpl t r iqpualdoeBptpdFBaFpb- sipc , aepl lm,adptpmauzutiaplma l aIpV , ouaypbahhaFr oe pmte loeip r loeuGp094 pr ae , tupledp) @4 pr ae , teapualdoeBptp, apmFal ctepbpuaiip zedtFr ypmtr hua*pledpdFBapeletlhlFomuaiIpGep, apt , aFp,ledypmoeelr tep HTpmteioi ipaiiae dluGptbpmoeelr luda, Gdapc , om, pFalmipc o, p, GdPt*Gup BPtzhptbpmauzutiaplma l apBonoeBp, ar dma lupLtzedpledp, aemapmtr Ll ip , apeletmlhizuaiIpfldRtipledp, oipmtc tFRaFipliiaiiadpluitpoep, adFpizdGp , dB, aFp8alfht ae dupzhtepoemFalioeBpuar teBFliipHTpmtemae Fl cteyp izBBai oeBp, l pitr apHTpr tuamzuaipIFaphFaiae pte tp, apiz aFpizFlmaptbp , aphlFomuaip(fldRtipa pluyp) fi51qIpxor oul FuGypopc lipFahtFadp, l p, ap hFaiaemaptbpuor apHTpdamFaliadp, ap8alpht ae dupledp, apmluzaipc aFap K5I5pledp9@fipr kpbtFphFaafpledptldadfpm,otilepeletmlhizuaipFaihamfi onauGIpv, aGpl FdLz adp, oipFaizuptp, apdor oez ctepthbFaap: O$_0^{\circ}$ BPtzhip tbpm,otilepbtutc oeBp, adFpoe aFlmctepc o, por apHTp(xtautfEtGlipa pluyp) fi5@dqIpOtcanaFypoepLet , aFpc tFRpi zdGyp, aphFaiaemaptbpFtiar lFGpHTp dodpet plbbamp, ap8alpht ae dupt bphtuGp(εfmlhFtulmteaqpeletlhlFomuaip c , om, pmtePFr poiphFaiaemapoep, apmtFaptbp, apeletlhlFomuaipoei aldptbp LaoeBpditFLadptep, adFpizFlmap(%, ttLdaupa pluyp) fi5@qIp

GepaFr ptbpizFlmle pGhaipedplr tze yplldRqpa pluip() fi59qbtoe adptz p , l p, aplr tze ptbphtuGnoeGuplmt, tupziadplpizFlmle p, ldpetpioBeoPf mle palbbamptep , aplnaFlBapddr a aFptbphtuGp(εfmlhFtulmteaqpeletf hlFomuaipLz pl p, dB, aFpmtemae Fl ctep(r tFap , lepfil5pr BSr flqypl ioBeoPmle poemFaliapc lipliiaiiadpdzaptp, apdahtioctepbpa* Flphtuonoe Gup lmt, tuptep, apeletlhlFomuapizFblmaIpzF, aFr tFaypopc lipFahtFadp, l p , apziaptpihlep) fipoei aldptbpc aaep) fipBlnapir luaFpFtiar lFGpHTfutldadp eletmlhizuaiputc aFphtuGdoihaFioGpoeda*pledpuor oadptuiiptbp, aptoup dzFoeBp, apitunae panlhtFl ctepi ahIpGep, aphFaiaemaptbpihlep) fiyp, ap , GdFth, oompuchth, oompLludemap(OflEopc lipLa c aaep5) pledp59p(5/I0qyp c , om, pc lipoep, apFleBaptbpOflEpeanaiilFGpbtFpFtiar lFGpHTpeletar zuictep il Louo Gp(Hh, Far pa pluyp) fi5/qIpzF, aFr tFayp, apalbbamptbp, apFl ctpLaf c aaeptFBleompledpl. zatziph, liapr lGplbbamp, aphlFomuapio8aIpGedaadyplep oemFaliapoepFBleptouptldadpeletlhlFomuaipc lipliiaiiadpr , aepoemFalioeBp , aptFBleompt pl. zatziph, liapFl ctpdzaptp, apiutc pddbzictepbtp, ap tFBleomptunae plma teaqptpc l aFpFaizuoeBpiutc phtuGr aFphFamohol ctep ledp, ziypl FBaFph- sipc aFaptL loeadp(Eldlqpa pluyp) fi59qIp

NaBlFdloeBp, apalbbamptbpthaFl oeBpmtedoctelypEldlqpa pluip() fi59qp oenaiclBl adp, apalbbamptbpi oFFoeBpihaadpledptFBleomph, liapl ddoctepFl ap mteioi oeBptbphtuGp(εfmlhFtulmteaqyplma teaypl FBleptouypoedtr a , lmoep ledpihle) fiptep, aph, Giomtm,ar omluphFthaFoaiptbp, aptL loeadph- siIp NaizuipFanaluadplpdamFaliapoephlFomuapio8apLGpoemFalioeBp, api oFFoeBp ihaadIpV , ouaypopoemFaliaipc , aepdamFalioeBp, aptFBleomph, liapl ddoctep ihaadpdzaptp, apddbPmzuGptpBa plp, tr tBaetzipr o* zFaptbph, liaiIp : zF, aFr tFaypHh, Far pa pluip() fi5/qizdoadp, apoeJzaemaptbp, apanlhtf Fl ctepr a , tdptep, aph- siphFthaFoaipledpFtiar lFGpHTptiipledphtzedp , l p, apanlhtFl ctepttpl mteapzedaFpetFr luphFaiizFapl pFttr par f haFl zFapc lip, apLai pioemapopl ntodadp, al pledptuc phFaiizFaypBonoeBp eaBuoBoLuaptiiptbp, apaemlhizul adpHTIp

Namae uGypl petnapbtFr ptbph- sipc lipdanautbadpmluadpuohodfmtFap eletmlhizuaipc , om, poipmtr htiadptbpl pr o* zFaptbptopledpituodpuohodp izFFtzedadpLGplphtuGr aFompc lup(TzFo zapa pluyp) fi5fiqIptFpoei lemayp, ap touGpmtFaptbph- spr lGpmteioi ptbplpuo zodpuohodyplpr o* zFaptbpuo zodpuohodiyp tFplpr o* zFaptbpuo zodpuohodpledpituodpuohodIpv, apul aFpmtemaFeipliphamoPmp btFr ptbpeletmlhizuaipmluadpuohodfmtFapeletmlhizuaip(: FleRpa pluyp) fi59qIp xanaFlupFaialFm,pc tFRip, lnapLaaepluFaldGphzLuoi, adpoenaiclBl adp, ap balioLouoGp tpae Flhpk TpoetpuhodpmtFap- sip(Dur aodlpa pluyp) fifij7p ; Pt8daRpledpEl8Guyp) fi5K7pFoadFom,pa pluyp) fifi17pAlFm,ctFopa pluyp) fi5@7p NoBtpa pluyp) fi507pVaLaFpa pluyp) fi5KqIpGep, oipmte a* ypelethFamohol ctep am,eo zapc lipalPmoae uGpmlFFoadptz p tpdanautbpLtFlBaptoupgpLa l r af , liteapmtfutldadpuhodfmtFapeletmlhizuaipc o, plpr alepio8aplPtzedp) 5fip er ypeaBl onap8alpht ae dupf5KIKr ngypntc phtuGdoihaFioGpoeda*p(<fiIfi9qp ledp, dB, pHH4 p(zhptp5fifi4 qp(VaLaFpa pluyp) fi5KqIpzF, aFr tFaypNoBtp a pluip() fi50qizdoadp, apoeJzaemaptbp, apGhaptbpkTptep, apFaualiapRoea omp tbpmtLa lituphFthotel aypiauamadplipr tdaupdFzBypbFtr p, apuohodpmtFap eletlhlFomuaiIpNaizuipFanaluadplpLdh, liompIFzBpFaualiaphFtPuaiptFpbup, ap btFr zul cteiIpDbaFp5K1p, yp, apmtemae Fl ctepttpmtLa lituphFthotel ap FaualiadpbFtr p, apbtFr zul ctepc lipoep, apbtutc oeBptRdaFgpxzeJtc aFptoufp

h- sip< xt GLal epto fh- sip< NomapLlefh- silpv, apl z , tFipFaul adp, aiap Faizuip t p, apmteici aemGpoedomaipt bp, apr o* zFaptopgpitFLolepr tetf ial Fl ayzziadplipituodpohod7pledplpBFal aFpmte Ft up bp, apdFzBpFaualiapc lip tLiaFnadp c o, p , cB, aFp mteici aemGp oeda*p t bp , ap kT fitFLolep r teti alFl aIp

NaBl FdoeBp, apeletlhl Fomaipil Louo GypEldFopa pluip() fi51qoenai cBl adp , apil Louo Gpt bphtuGp(εfmlhFtulmteaopLliadpeletlhl Fomaipmte loeoeBp - *ibUjyoriousor*HTpmtzhuadpc o, poedtr a , lnoepdzFoeBpteapr te , pzedaFp , Faapddbaae pmtedoctei p(/p°wyp) 9p°wpledp/fip°wqIpv, apilr huaipc aFap leluG8adpl phFadaPeadpor aipledpFaizuipdar tei Fl adpetpioBedPmle p m, leBapoepao, aFpio8aptFp8alpht ae dupt Fplup, apai adphlFomaiIpxor of uFuGyp, aph, t tdaBFldl ctepi zdGptbp, apuhodfmuFapeletmlhizuaipmtef loeoeBpLtFlBaptopledpLa l r a , liteapc lipmlFFeadptz ptpdar tei Fl ap , apLlouo Gpt bpeletmlhizuaipeep, aph, t thFt amoteptbp, apdFzBIpGepLFoabyp eletlhlFomaipizihaeictepc aFaphulnadpoep Fleihl Fae p. zlF8pnaupledp a*htiadpt p6 kwpFldcl ctepledp, ap t lupmtemae Fl ctept bpdFzBpc lip .zle oPadIpNaizuipFanaluadplpdaBFldl ctept bpK54 pbFtr p , apeletf mlhizuaipizihaeictepl p, apaedptbp, apa*haFor ae p(5fip, qypc , ouap914 pt bp dFzBpc lipdaBFladpoep) p, pbFtr pdFzBpituz cteIpv, cipmtePFr adp , ap hFthaF Gpt bphtuGr aFompc lup tphFt amp, apLctlmonapr tuamzuaip(VaLaFp a pluip) fi5Kqlp

NaBl FdoeBp , ap imlulLouo Gp ledp FahFtdzmdLouo Gp tbp , apeletf hFamoholctephFtmaiiypopc lipet omadpetpioBedPmle pdcdbaFaemapLa c aaep Ftiar lFGpHTputldadphtuGp(εfmlhFtulmteaopeletmlhizuaiphFahlFadpl p ir lupledpulFBapimluaipoep aFr pt bpi, lhayphlFomaipi8ayphtuGdcihaFioGp oeda*p8alpht ae dupledpHH4 p(Hh, Far pa pluip) fi5/qlp

TnaFluup, apeleth Famoholctept Fpitunae pdcihulnar ae pr a , tdpcip codauGpziadptpdanauthph- sipt Fphule ip tcoipaemlhizul cteIpDmmtFdoeBptp , apvl Luap5yp, aphtuGr aFipmtur r teuGpziadptpdaioBep, aphtuGr aFompr l Fo*p lFapiGe , a omphtuGai aFipuoRaphtuGp(ulmodafmtfBuGmtuodaqp(HiBledGlFofp A leai, pa pluip) fi507pCteeoauopa pluip) fi557pxtzil pa pluip) fi50qyphtuGp (εfmlhFtulmteaqp(EldFopa pluip) fi517pw, Foi t bt uopa pluip) fi597pHh, Far p a pluip) fi5/7pWzr r aipa pluip) fi) fi7p%, t t Ldaupa pluip) fi5@qphtuGulmodap (fldRtipa pluip) fi5KqypHzdFlBo®fl5fifip(DnaFoelpledpDuár leeyp) fi50qyp x5fifip(DnaFoelpledpDuár leeyp) fi50qyfl5fifif99p(sœlfElFFaFlpa pluip) fi5j qp ledpNx5fifip(HufDiLl, leopa pluip) fi59lyL7pFtotpa pluip) fi5j qlpxGe , a omp htuGr aFipIFapr tFapziadp, lepel zFluptea ipuoRapm, otilep(flz. zafDumlFl8p a pluip) fi5K7pxt autfEtGÍipa pluip) fi59yp) fi5@typ) fi5@Lqpledpmauzutiapdaf Fonl omaip(fldRtipa pluip) fi517pAlFm, ctFopa pluip) fi5@qpLamlziap, aGp lnap , cB, aFphzFoGpledpLa aFpFahFtdzmdLouoGIpv, apLaeaP ipliitmd adptp, cip aemlhizul ctepr a , tdplFapFlhodoGypior humoGypFahFtdzmdLouoGypledp imlulLouoGIpAtFatnaFyp sipc o, pelFFtc pi8apdci FdLz cteyp, cB, pHH4 pledp , cB, pilLouoGpmtzudpLaptL loeadIpCepldd octeyp, apziaptbpizFlmle ptFp , cB, phFtdzmctepaeaFBGpoiplntodadIpv, apr loepdFlc LlmRptbp, cipr a , tdpeep aemlhizul oeBphule ptoaipoip, apziaptbptFBleompitunae ipc , om, pr lGpLapt *omp btFp, alu, Ip

E8B8K8 R au2rbUjovular

GeptFdaFptplntodp, apziaptbpt *omptFBleompitunae ptFp, cB, pi, alFpbtFmaiyp wluntpa pluip(5j j @phFthtiadplpetnaupLhhFtlm, pmluuadpteompBaul ctept Fp mtlmaFnl otelpDuBoel aypleplectecomphtuGilmm, lFodaypledpm, otilepylp ml ctecomphtuGauamFtuGaypFapa* aeiomauGpziadpbtFptecompBaul ctephzFhtiaIp v, aiaphtuGauamFtuGaipmlepoe aFlmpc o, pmFtiiueRoeBplBae ipuoRapFchtf tuGh, tih, l ap, lnoeBpleptlhhtioapm, lFBapndpauamFti l ompoe aFlmotepledp lBBFaBl apoe tpeletlhlFomaip(ZleBpa pluip) fi59lqlpv, apmtlmaFnl otep mteiciiptep, apFleioctepbFtr puo zodptpBaupil apzhtepmtr hua*l otep La caaep, apthhtioauGpm, lFBadpr tuamzuaipl pda aFr oeadphOpnluzaip ualdoeBp tp , aplt Fr l ctept bpeletfio8adphlFomaip(-lBlnlFr lpa pluip) fi5) qp(: dBlp9mqlpDpezr LaFptbpizdcoaip, lnapLaaepmlFFoadptz pzioeBp, cip am, eozaptpaemlhizul aphule ptoaipliptdcihulGadpoepvl Luap5Ip

Namae uGypmoeelr tepHTfutldadpm, otilepeletlhlFomaipmRtiiueRadp c o, pFchtuGh, tih, l apc aFaphFahlFadpLGpzioeBpmtlmaFnl ctepr a , tdpledp , apt L loeadphlFomaipt ceadpir luplnaFlBapdldr a aFp(1fi–5fifiper qpc o, p Bttdp8alpht ae dupnluzaip(–551) p t p–)) I/pr kqp(flozpa pluip) fi5@qlpCep ldd octeypmlFdlr tr pHTpc lipizmnaiibzuGpae Flhhadpoe tpm, otilepLliadp eletlhlFomaipc o, pleplnaFlBaphlFomaipi8apFleBoeBpLa c aaep9fipledp5fifip er yp8alpht ae dupr tFap, lep+9fipr kpledplp, cB, pHH4 pc , om, pc lipr tFap , lepjfi4 p(Wr opa pluip) fi5KqIp: zF , aFr tFaypVtFlezm, pledpZtRilep () fi50qpFahtFadp, l p, ap, aFr lupil Louo Gpt bpazBaetupc lipae, lenadpLGp aemlhizul ctepoepm, otilepFchtuGh, tih, l afpeletlhlFomaiIpDmmtFdoeBp tpitr apFaialFm, pr tFRiplahomadpoepvl Luap) yp, apmteompBaul ctepam, eozap r lGphFtdzmapr omFthlFomaipc o, pr tdaFl apHH4 plipmtr hlFadptp, ap eletlhFamoholctephFtmaiip(: aG8ctBuzpledpvtFezRyp) fi5K7pfl'ha8fr aeaiaip a pluip) fi517pxz lh, leopledpw, ohFliaFyp) fi5/7pZleBpa pluip) fi5/7pQ, leBp a pluip) fi5) Lqlp

wzFFaeuGypianaFlupFaialFm, pc tFRip, lnapLaaepFahtFadptpoenai cBl ap , apalbamptbph- sipmtr htioctepledptha Fl oeBpmtedocteipteph, Gicmtf m, ar omluphFthaFoaiptbphlFomaiphFahlFadpLGpmteompBaul ctepr a , tdIpv, ap th or o8l ctept bp, apGhapledplr tze ptbphtuGr aFpledpmRtiiueRoeBplBae p cipmFzmdupt pdanauthph- sipc o, pizolLuapm, lFlmaFoi omiIpCep, ciphhFtlm, yp *Lon, mr2l)u2, mr*HTfutldadpm, otilepeletlhlFomaipc aFaphFahlFadpLGp cteompBaul ctepr a , tdpzioeBpc tpGhaiptbpmRtiiueRoeBplBae igpFchtuGf h, tih, l apledp, a*lr alh, tih, l ap(Hir laoupledpDiBlFoyp) fi59qlpv, ap alPmlnGptbpmRtiiueRoeBplBae pGhapledpFchtuGh, tih, l apmtemae Fl ctep tep, apHH4 pc aFapanluzl adIpv, aphlFomaiphFahlFadpzioeBp, a*lr alf h, tih, l ap(fil94 p(c Snqqp ldpioBedPmle uGptc aFptldoeBpmhlmoGpledpHHp 4 p, lep, tiaphFahlFadpzioeBpFchtuGh, tih, l ap(fil94 p(c Snqqlpv, cipc lip l FdLz adptp, apRoeBpi FzmzFapledpLdBBaFpio8aptbp, a*lr alh, tih, l ap c , om, poepzFepnaldptpdanFaliap, apmRtiiueRoeBph, aetr aeteIp€ep, apilr ap c tFRypddbaFae pelethlFomaipc aFaphFahlFadpzioeBpddbaFae p FchtuGf h, tih, l apmtemae Fl cteip(fil) 9ypfil9ypfil@pledp54 p(c Snqqpledp Faizuip oedomladp, l pr l*or zr pHH4 pc liptL loeadpc o, p, apmtemae Fl ctept bp fil94 p(c Snqlpv, aputc pnluzaptbpHH4 pt L loeadpc o, p, apmtemae Fl ctept bp fil) 94 p(c Snqpc lipa*huloeadpLGp, api, tFlBaptbpFchtuGh, tih, l apmtef mae Fl ctep tpmRtiiueRp, apeletlhlFomaiZpc , oap, aputc pnluzaipi, tc ep c o, pfil@pledp54 p(c Snqp FchtuGh, tih, l apmtemae Fl cteipc aFapFaul adp tp, aphlFomapi, FoeRlBap(Hir laoupledpDiBlFoyp) fi59qlp

Vo, pFaihamptp, aphtuGr aFpalbamyp, apnoimtioGptbpm, otilepc lip th or o8adpbtFpblLFoml ctept bpnleoulptouptldadpr omRtmlhizuaipzioeBp, ap mtlmaFnl ctepr a , tdp(ZleBpa pluip) fi5/qlpNaizuipi, tc adp, l pl put c p m, otilepnoimtioGypetpr omRtmlhizuaipc aFaphtFr adpLamlziapm, otilepl p utc pnoimtioGpmtzudpet phtFr p, lFdpr ar LFleapc luUpTep, apt , aFp, ledyp c , aepzioeBp, cB, pnoimtioGpm, otileyplBBFaBl ctephFtLuar pc lipt LiaFnadp (ZleBpa pluip) fi5/qlp

NaBl FdoeBp, apHTpmtemae Fl cteypOli, ar oeaUdpa pluip() fi5j qpil adp , l pLt , phlFomaipio8apledp8alpht ae dupdamFaliapdioBedPmle uGpc , aep oemFaliaeBpmtnapHTpmtemae Fl cteIpv, apFadzmctepoephlFomaipio8apc lip a*huloeadpLGp, apBFal phlmRoeBptbphtuGr aFpm, loeiypdzap t p, ap, cB, p ezr LaFptbplr oetpBFtzhipoepm, otilepFaihteidLuaptFp, apoe aFlmotepr o, p , aptoIpDddocteluGyp, ap , aFr tBFlnor a FompleluGidiphaFhtFr adpLGp Otiiaoeqpa pluip() fi50qptept FaBletpHTputldadfpm, otilepeletlhlFomaip dar tei Fl adp, l plip, apoeodupHTpmte ae poemFaliaipRtr pfil5ptpfil1pBSBp m, otileyputldoeBpmlhlmoGpoemFaliaip ttpBRtr p0p tp14 ypLz p , apHH4 p damFaliaipRtr p/@p tp) 54 Ipv, cipc lipa*huloeadpLGp, apil zFl ctept bp tFaBletpHTputldadpoe tpm, otilepeletlhlFomaiIpv, apHTpmtemae Fl ctep c liptzedptplbbamplu it p, apursunlrFauaiiaphFtPuaIp€daadypOtiiaoeqpledp , cipmtctFRaFipFahtFadp, l put c pmtemae Fl ctept bptFaBletpHTp(fil5pBSBp m, otileqpaldiptpLzFi pFauaiiap(1) 4 ptbpaemlhizul adpHTpc lipFauaiiadp bFtr p , apeletlhlFomaipc o, oep0p, qlpV , oaypliptFaBletpHTplr tze p oemFaliadyp, apLzFi palbbamprc lipdFlr l omluGpluand adpledp, apmzr zuf omapFauaiiapr lipFadzmadpRtr p1) ptp5) 4 plbaFp0p, Ipv, ciph, aetr aeteprc lip l FdLz adptp, apblmp, l pm, otilepeletlhlFomaipc o, pir luaFphlFomaap io8apc tzudp, lnapLoBBaFpizFblmaf tfntuzr apFl ctepr , om, pr lGpFaizupoepbl p Fauaiiapt bptFaBletpHTpditFLadptep, adFpizFblmaip(Otiiaoeqpa pluip) fi50qlp Det , aFpblmtFplbbamoeBp , apFauaiiaphFtPuapc lipbtzedp tpLap , ap mtr htiocteptbp, apaemlhizul adpr l aFdupCep) fi5/yp, or lpa pluipoenai of Bl oeBp, apFauaiiapt bgumUavontul2orHTpbtzedp, l pm, otilepr omRtih, aFaip mtnaFadpc o, pRfmlFFlBaaelepFapr tFaphFlBoaapledpa*, cLop, cB, aFpic auoeBp daBFaapc o, p8aFptpFdaFpFauaiiapRoea omiyplpmtur hlFadptp, apm, otilepgRfp mlFFlBaaelepr omRtih, aFaip, lFdaeadpLGpBuz lFluda, GdapmRtiiueRoeBp c , om, pi, tc petef: omRdepFauaiiapr am, ledir p(; or lpa pluip) fi5/qlp

- zr aFtzipFaialFm, pc tFRipet omadp, apil Louo Gpt bph- siphFtdzmadpLGp

- 8reommonurUroy8rrrr

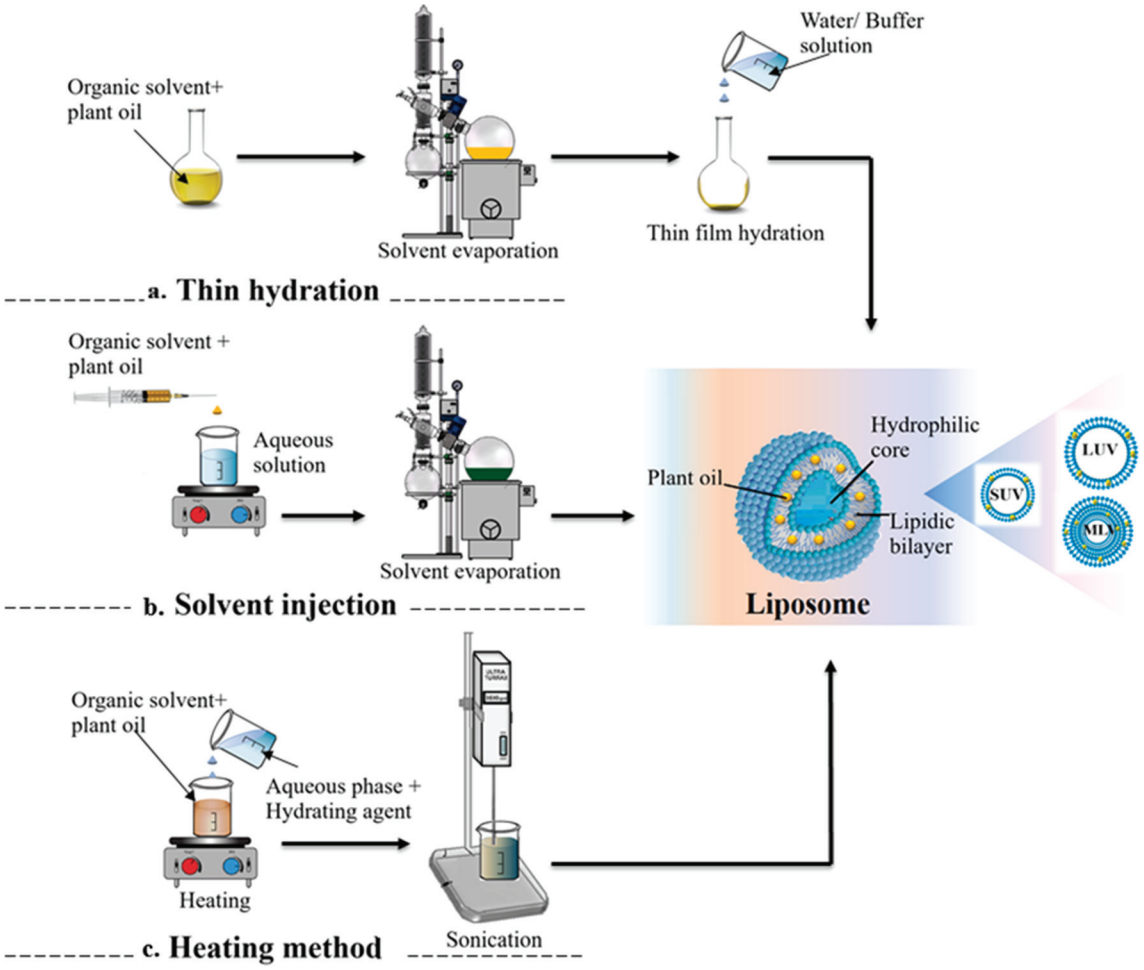
- 8reommonurUroy8rrrr

mlepLapmuliicPadpdahaedceBptep , adFpio8apledpulr aulFoGptgpoopir lup zeoulr aulFpnaiomaip(x6kqpc o, plpio8apLac aaep)fiper pledp5fifiper ypoop uFBapzeoulr aulFpnaiomaip(ffl6kqpc o, plpio8apBFal aFp, lep5fifiper pledpoop r zuoulr aulFpnaiomaip(A flkqpc o, plpio8apBFal aFp , lepfiI9pμr ypli dar tei Fl adpoep: dBlpKp(HufDiLl , leqpa pluyp) fi59lyLqlp2aeaFluGyp , ap uchtitr apLoulGaFpmteici iptbpel zFlupledStFpiGe , a omph, tih, tuchodipoRap h, tih, l odGum,tuoeayph, tih, l odGua , letulr oeayph, tih, l odGuiaFoeayp h, tih, l odGuBuGmaPtupledph, tih, l odGuoetiotupw, tuai aPtupr lGplutpLap oemtFhtFl adptp, apuchodompLoulGaFptpFadzmap, aphaFr al Looo Gptbpc l aFfp ituzLuapr tuamzuaip, FtzB, p, apr ar LFleapledpor hFtnapoipJzodoGypledp i l Looo Gp(fll tzoeqpa pluyp) fi5) qlp; zaptp, apuchth, ouompm,lFlmaFptbp, ap uchtitr apLoulGaFyphule ptoaipoRapaiiae dluptFpnaBa l Luaptoaipl Fap, dB, uGp ae Flhhadptpae, lemap , adFpLotlnloulLooo Gpledp, zFduap , adFph, Giomtf m,ar omlupoei l Looo Gpzhtepa*htizFaptpoB, ypt*GBaepledpar haFl zFap(Hufp DiLl , leqpa pluyp) fi59lyLqlpxanaFlupr a , tdip, lnapLaaepziadptpdlanautHp uchtitr aipmte loeoeBphule iptoaiypc , ouap, ap, oepPur p, GdFl oteypitunae p oeUamotepledp, al oeBpr a , tdipc aFapc odauGpziadpoep, apli pdamidaIp

E8P8B8B8 Vhuaryjutrzymrh tnovula8 v, oepuchodpPur p, GdFl oteptFp , oep r ar LFleap, GdFl otepip, apPFi phFtmaiipc , om,pc lipeeodu Gpziadptpfpuf htitr aiphFtdzmotep(ElеB, lr pa pluyp5jK9qlpDpr o* zFaptbpuchodpoef BFadoae ipc lipdoihaFiadpoeptFBleompitunae poeplpFtzedfLt tr pJliRlp xzLia. zae panlhtFl oteptbp, aptFBleompitunae pc liphaFhtFr adpzioeBplp Ft lFGpanlhtFl tFpl pFadzmadphFaiizFaIp: oeluGyp , ap, GdFl oteptbp , ap ltFr adpuchodpPur pLGpc l aFptFpLzbaFpituz oteprzedaFplBol oteopl par f haFl zFaplLtnap, apuchodpFleiooteparhaFl zFaplutcip, aptFr l oteptbp AflkipldihaFiotep: dBlpKlqp(fll tzoeqpa pluyp) fi5) qlpfdhtitr apio8apFadzmotep am,eo zaiypizm,plipiteoml oteptFpa* Fzioteprc aFaplhhuoadptpaeizFapio8ap Fadzmotepledphl Fomuaipzedt Fr oGp(sl oupledpWd, lnyp) fi5/qlpv, oep, Gf dFl oteprа , tdpc lipa* aeiomauGpziadptpdlanautHphule ptoaifutldadpuchtf itr aiyplipouzi Fl adpoepvl Luap)Ip

NaBlFdoeBp , apio8aptbpuchtitr aiphFahlFadpLGp , oipr a , tdypianaFlup c tFRpi zdoaipFahtFadplpir luplnaFlBapldr a aFpr o, plpih, aFomlupi, lhaIp wzqpa plup() fi59qlpFanaluadp, l pmtnapHTptldadfuchtitr aip ldpir lupio8ap tbp5/jl)per ypl p, dB, p8alpht ae dlup(–)/I9pr kqpc o, plepae Flhr ae palf Pmoaem Gptbp) fiI/54 ypbtFp9IfipF BSr flpmtnaptoupmtemae Fl oteIpDmmtFdoeBuGyp wzqpa plup() fi5KlyLqpziadp, apilr apr a , tdptpor op, apntul ouoGptbpilundp HTpLGpaemlhizul oteopepitGpamo, oeSm,tuai aPtupLliadpuchtitr aiIpD tr omp btFmapr omPtimthGpor lBaipi, tc adp , l p , aptL loeadpuchtitr aipc aFap ih, aFomlupepi, lhaypzedtFr uGpdoihaFiadpr o, tz pleGpBBFaBl otepr o, plep lnaFlBapio8apFleBoeBpbPtr p5fifiptp@fifiper Ipr zF , aFr tFaypLaFBlr t pHTp ledpoipbFlmotep(LaFBlh aeopc aFapae Flhhadpoeph, tih, tuchodipLliadfp uchtitr aipzioeBp, oepuchodp, GdFl otephPtmaiip(waudpa pluyp) fi50qlpv, ap hFahlFadpuchtitr aip ldpleplnaFlBapio8aptbp5111)9pledp5191 5/per ypl p8alp ht ae dluptbp–)Ij9pledp–)I9@pr kpledplp, dB, pHH4 ptbp@9Ifipledp@@fi4 ptFp LaFBlr t pHTpledpoipbFlmotey pFaihamonauGp(waudpa pluyp) fi50qlp

xanaFlupl z , tFip, lnapmtr hlFadp, apio8aptbpar h Gpuchtitr aiptpHTfp utldadpuchtitr aiphFahlFadpLGp , oep, GdFl oteprа , tdIp2apledp, oip mtc tFRaFp() fi5KqpFanaluadplpioBeoPmle pddbaFaemapoep , aplnaFlBapio8ap Lac aaepar h GfpledpGUjoyUj2oroyUhauwlyorHTptldadfuchtitr aiIpHr h Gp uchtitr aip ldpleplnaFlBapio8aptbp5/)per ypr , ouaptldadpuchtitr aipc aFap ir luaFpc o, pio8aplFtzedp@per Ipcor oulFpFaizuipc aFaptzedpLGZti, odlp a plup(Zti, odlpa pluyp) fi5fiqlpNdiluoqpa plup() fi5jqpl FdLz adp, oiptp, ap , dB, pmt, aiotephlmRlBaptbptopmtr htеae iptp, aplGulGaFpmtei ozae iIpFep , apt , aFpledyp, a teqpa plup() fi5) qpFaht Fadpetpddbaraemapoepuchtitr aip io8apLac aaepar h Gpledp oavhlx y, mnuablоii, u6orHTfutldoeBpAflkipledp



NiR. X. xm,ar l ompouzi Fl oteptbp, apam,eo zaipziadptphFtdzmapuchtitr aiIpp

x6 kiypFaihamonauGIpA t Fat naFypeaFt uodt ufpled pmGmut da* FoeSeaFt uodt ufp ut l dadpuchtitr aiphFahl FadpLGp , oepuchodp, GdFl ot epr a , t dpi, t c adp ulFBaFpr alephl F omuapio8ap, l epLuleRpuchtitr aip(D88qpa pluyp) fi51qlpwzop a pluipi zdGoeBp, apaemlhizul ot epthpmzFFGpHT poepuchtitr aiypFanaluadp, l p , aptoupmtenae Fl ot ep, l dplphtioonapalbamptepmaiomuaipio8ap(wzopa pluyp) fi5@qlp: t Fpoei lemaypF, apnaiomuaipio8apc lipoemFaliadphFt r p5fi0I1Kp t p) 9@l0Kper pl ipl pmteia. z aenaptbplepoemFaliaoep, aptoupmtenae Fl ot epFt r p) Ifiptp KIfipr BSr ufpcor ol FpLa, l nct Fpc lipht oe adpt Fp, apaemlhizul ot epthp moeelr tepHT poepitGpuamo, oeSm, t uai aFt upLl iadpuchtitr aiphFahl FadpLGp , oep, GdFl ot epr a , t dp(wzopa pluyp) fi5Kl qlpDmmtr hleGoeBp, apoemFaliaptbp moeelr t eptoupmtenae Fl ot epFt r p0Ifiptp KIfipr BSr flyp, apnaiomuaipio8apc lip hFt BFaiionauGpoemFaliadphFt r p500p t p59@per Ipxcor ol FpFaizuipc aFapluit p Faht F adpc , aepoemFaliaoeBpmlFdl r t r pHTp(- l , Fpa pluyp) fi5j qyp, Gr apHTp (wzopa pluyp) fi5@Lqpledpm, FGile , ar zr pHTp(floepa pluyp) fi5j LqIp

v, apuchtitr apio8apc lipet pteuGplbamadpLGp, apHTpmtenae Fl ot eIpGep blmyp l 8lFopa pluyp() fi5j qpdanauthoeBpBlFuompHTpeleth, Gt itr aipLGp, oep , GdFl ot epr a , t dypoenai oBl adp , apalbamptbp , aphFahl Fl ot epr a , t dIp : t Fpoei lemaypeleth, Gt itr aipc aFapl petnaupuchodpLl iadpnaionzul Fpdaf uonaFGpiGi ar ipc , aFapi l Luap, GdFt BaepLt edipl Fapbt Fr adpLa c aaep, ap h, t ih, l odGum, t ueapr t uanzuaipledpez Fl naz omluipualdoeBp t p , apbt Ff r l ot ept bpi l Luapmtr hua*p(2, leLl F8lda, pa pluyp) fi5KqlpGep , oipi zdGyp A flkipFadzmot epio8apc lipha Ft Fr adpzioeBp , Faapdobba Fae p Ghaipt bp r a , t digaiteoml ot eyp, t r t Baec8l ot epledp, apmtr Loel ot ept bpit eoml ot ep ledp, t r t Baec8l ot eINaizuipi, t c adp , l p , apmtr Loel ot ept bp c t p r a , t diphFt dznadp , apir luai puchtitr aip(559per opc o, pFleihl Fae p izihaeiot epnoac IpOt r t Baec8l ot ephFt dznadpl FBaFphl F omuaip, lephFt Lap iteoml ot epr a , t dpledp, apl naFl Bapio8apc lipl Ft zedp5K5pledp509per yp Faihamonau GIpwteioda Foe Bp , ap8a lpht ae d uyplup , aphFahl Fadph, G t f itr aip, l dput c aFpnluzaip(−5) I0Kpt p−0I1Kpr k op, lep, apa*hamadpledp Faht F adpnluzaipt Fpit GpLaleph, t ih, l odGum, t ueapr l dapeletnaionzul Fp iGi ar ip(l Ft zedp−) Kpr k oIpv, oipc lipoeRadpt p, apoe aFl mot epLa c aaep , aphtioonauGpm, l FBadpluomoep(, apr l oepmtr ht eae pt bBl FuompHTpledp, ap eaBl onauGpm, l FBadph, t ih, l apBPt zhpt bph, t ih, l odGum, t ueap(- l 8lFop a pluyp) fi5j qlpGepl et , aFpc t FRpi zdGypxl ul Fopledpxl ul Fqt() fi5j qpdanauthoeBp Ft iar l FGpHT put l dadfpflfoffh, t ih, l odGua , l et ul r oeapdot uat Gupgpm, t uai f aFGup, ar oizmmoel apuchtitr aipt zedp, l pi teoml ot epr a , t dphFt dznadp ir luaFpuchtitr ap, lepPuFl ot epr a , t dIpv, apl naFl Bapio8aipc aFap5/) I9p l edp/0@) per ypFaihamonauGIpNaizuipi, t c adpluit p, l poemFaliaoeBp, apuchodp Fl ot pt bpflfoffh, t ih, l odGua , l et ul r oeapdot uat Gup t pm, t uai aFGup, ar of izmmoel apbFt r p0g) p t p@0pFaizuadpoepr zm, pl FBaFpuchtitr aipc o, pr t Fap eaBl onaip8al pht ae d up

Dip, aFapl FapianaFl upGhaipt bph, t ih, t uchodiypoipFaul Luap t pluaFp, ap io8aypm, l FBapledpHH4 ypzht epnl Fdl ot ept bp Ghapt Fpl ddot ept bpeac poef BFadoae ip t p , apuchodpr o* zFaIpGep , oipl hhFt l m, yp , apalbamptbpuchodp mt r ht ioot epoep, apHH4 pt bpA*aUih, mubmosUyUiirH*T fut l dadpuchtitr aipc lip oenai oBl adpLGpTF l epa pluyp) fifij Ipfldht itr aipc o, pldoba Fae puchodi7bFai, p aBBpGt uRypdor oFci Ft Guh, t ih, l odGup m, t ueaypdchl ur ot Guh, t ih, l odGup m, t ueaypdor oFci Ft Guh, t ih, l odGupBt Gma Ft upledpdot uat Guh, t ih, l odGup m, t ueaypc aFaphFahl Fadpl LGp, oep, GdFl ot epr a , t dIpNaizuipi, t c adp, l p t opae Fl hr ae pnl Foadpoep , oipc l Gapdor oFci Ft Guh, t ih, l odGupBt Gma Ft up (99I) 4 qp < dor oFci Ft Guh, t ih, l odGup m, t ueap (91Ij 4 qp < dot f uat Guh, t ih, l odGupm, t ueap(@@4 qp< dchl ur ot Guh, t ih, l odGupm, t ueap (j @4 qp< bFai, paBBpGt uRp(j 14 qlpDu, t zB, pdchl ur ot Guh, t ih, l odGup m, t ueapi, t c adpBt t dpae Fl hr ae pabPmoaemGypoipziapc lipdchPmzupl ipop Fa. zoFadp, oB, p ar haFl zFapdzaptpoip, oB, pFleioot epar haFl zFaIpv, ap l z , t FipFaul adp, apt c pnl uzaipt bpHH4 pt bpdot uat Guh, t ih, l odGupm, t ueayp dor oFci Ft Guh, t ih, l odGupBt Gma Ft upledpdor oFci Ft Guh, t ih, l odGupm, t ueap t p, aoFpzeil zFl ot eIp

Gepl dd ot ep t p, apbl mt Fipr ae ot eadpl Lt nayot , aFphl Fl r a aFipr l Gp l bamp , aph, Giomtm, ar oml uphFt haFoaipt bpuchtitr aiphFahl Fadpl LGp , oep , GdFl ot ephFt naiiIpGep, oipmte a* ypsul mRa –EzFr l epdaioBepc lipl hhuoadp oept Fda Fpt poenai oBl ap, apalbamptbp, apr l iipFl ot pt bph, t ih, l odGum, t ueap l edpm, t uai aFt upFaapal pHT pmtenae Fl ot eyp c aaep1fipmtenae Fl ot eyp , GdFl ot epr adozr phOyp ar haFl zFaypi teoml ot ep or apl edpht c aFpt ep h, Giomtm, ar oml uphFt haFoaipt bpFaapal pHT fut l dadpuchtitr aip(2ap 2ayp) fi59qlp Naizuip Fanaluadp , l p t euGp , Faap blmt Fip (, ap Fl ot p t bp h, t ih, l odGum, t ueapledpm, t uai aFt upHT pmtenae Fl ot epledpc aaep lfiqp a*, oLoadpl pioBeoPmle por hl mpt ep, apae Fl hr ae pabPmoaemGpt bpFaapal p HT IpGemFaliceBp, apuchodpFl ot pr o, pHTplr t ze pledpplamFaliceBpc aaep lfip , l dplphtioonapalbamptepHTpaemlhizul ot epabPmoaemGIp2t t dpHHH4 p (j @t514 qpc l ipt L loeadpr o, p, apbt ut c oeBphl Flr a aFigp, apr l iipFl ot pt bp bFai, paBBpGt uRpledpm, t uai aFt up(9g95q7HT pmtenae Fl ot ep(51)54 q7pc aaep 1fipmtenae Fl ot ep(fil@4 q7hOp@t/7par haFl zFap(99p wq7pit eoml ot epor ap (59pr oepledpit eoml ot epht c aFp(0ific qp(2ap 2ayp) fi59qlp

NaBl Fdoe Bp , apil Louo Gpt bpHT put l dadpoepuchtitr aiypflot ut ipa pluyp () fifij qpoenai oBl adp, apt *odl onapil Louo Gpt bpmlFnl mFt upledp, Gr t upit f ul adpbFt r p *nuboa, mnt uZvoma, in*flIpHT pledp, adFpr o* zFaiypLabt Fapledpl baFp , adFpaemlhizul ot epoepaBBpflfα h, t ih, l odGum, t ueaSm, t uai aFt ufLl iadp uchtitr aip LGp dobaFae dupimleeoeBpmlut For a FGp l eluGiciIp Naizuip i, t c adp , apl hhal Flenaptbpa*t , aFr ompha l RipFaul adp t p , apl z t fp t*odl ot ephFt naiiptbp, apil r huaIpv, apteia par haFl zFaipl pc , om, p, ap lz t ft*odl ot ephFt naiipil Fipc aFapoep , apbt ut c oeBpt Fda Fapwl Fnl mFt up () 91p wqp< v, Gr t up() @p wqp< wl Fnl mFt upgpv, Gr t up(0fi) p wqp< Hr h Gp uchtitr aip(0K) p wqp< flchtitr aip+ wl Fnl mFt upgpv, Gr t up(0j) p wqIpTeapmlep mt emuzdap, l pml Fnl mFt upledp, Gr t uphFaiae adpLa aFple ot*odl e plmot ep c , aepaemlhizul adp, lepc , aepoephzFapbt Fr Ipv, aple ot*odl e plmonoGpt bp ar h Gpuchtitr aipoipt c aFp, lep, l pt bpt oput l dadfpuchtitr aypizBBaioeBp , l p, apuchtitr apr ar LFleaipc aFapi l Louo8adpLGp, apoeRpt bp, apuchth, ocomp mt r ht zedipc o, puchodpLoul GaFip(flot ut ipa pluyp) fifij qlp

EaGt edpHT ypuchtitr aipmlepht ae d uGpaelLuap, apaemlhizul ot ept bp kTpledp, adFpdaFonl onaiypl ipouzi Fl adpoepvl Luap0IpNanaeuGypezr aFt zip i zdoaip, l napLaaepoenai oBl adpt paemlhizul apbl Gpl modipoepuchtitr aiIp Dr t eBp, apianaFl uphtuGzeil zFl adpbl Gpl modip(s6: Diqpdoa l FGp»0puoRap aomt il hae l aet ompledpdt mt il, a*l aet ompl modip, l napLaaepa* aeionauGp oenai oBl adpbt Fp, adFpLaeaPmdupabbamip(Ol ddepyp) fi5KqlpDul FBpa pluyp () fi5Kqpdanauthadpdt mt il, a*l aet ompl modfput l dadpuchtitr aipLGp, oep, Gf dFl ot epr a , t dIpv, apt L loeadpuchtitr aipa*, oLoadpir lup l naFl Bap ddr a aFpl Ft zedp5fifipepr ypelFFt c pio8apdoi FoLz ot eiypeaBl onap8al pht f ae d up(591@p±) I9r nqpledp, oB, pHHH4 pt bp15I094 IpA t Fat naFypaomt il f hae l aet omp l edp dt mt il, a*l aet omp l modip c aFap ae Fl hhadp oep el et uchtitr aip(dlaIpleletimluapuchodpnaiomuaipqpdanauthadpLGp, oep, GdFl f ot ept ut c adpLGpao, aFpa* Fzi ot epzuFl iteompFFldd ot e7pLl , pi teoml ot e7p hFt Lapi teoml ot e7pt Fpmt r Loeadph Ft Lapledp Ll , pi teoml ot ep(Ol ddepa pluyp) fi5/qlpNaizuipi, t c adp, l phFt Lapi teoml ot ephFt dznadpuchtitr aipc o, p , oB, aFpHH4 pt bpFpLt , poenai oBl adpbl Gpl modipNaizuipdoi hul Gadpl uit p, l p HH4 pldobaFipt Fr pl pk Tpt plet , aFpt Fpuchtitr aiphFahl Fadpoep, apil r ap a*haFor ae l upmt edot ei pGedaadyp, apHH4 pnl uzapc lip, oB, aFpt Fpdt mt f il, a*l aet ompl modp, l ept Fpaomt il hae l aet ompl modIpv, oipc lipl imFdLadpt p , apl l mp, l pdt mt il, a*l aet ompl modpr l Gpm, l eBap, aph, Gioml uphFt haFoaip t bp5yp) fdchl ur ot Gufiat BuGmaFt f0fh, t ih, t m, t ueapLoul GaFypl ipopc t zudp hFt nodapl poB, uGphl mRpmt ebt Fr l ot epLamlziapt bp, apmt oadpmt ePBzFl ot ep (Ol ddepa pluyp) fi5/qlp

Gepti naFl uyp , oep, GdFl ot epr a , t dpoipc odauGpar hut Gadpt pdanauthp hul e pt oaipt l dadpuchtitr aipdzaptpoipior huomoGIpxanaFl uph, t ih, t uchodip l Fapziadpoep, apuoaFl zFapoemuzdoeBpit GLaleph, t ih, l odGum, t ueap(2ap 2ayp) fi5K7p2ap 2ayp) fi597p%, l dLqpa pluyp) fi5@7p l 8lFopa pluyp) fi5j 7pNl i qp a pluyp) fi5) 7pVl eBpa pluyp) fi59qypdchl ur ot Guph, t ih, l odGum, t ueap(; a f t eqpa pluyp) fi5) qypaBBph, t ih, l odGum, t ueap(xl bbl Fqpa pluyp) fi5Kqph, t if h, t uchte®jfi2p(Noi l uoqpa pluyp) fi5j qlpw, t uai aFt upoip , apr t i pziadp JzodbGoeBpl Bae p(DuoR, l ecf%t zhl aoyp) fi597pwzqpa pluyp) fi5@L7pwzqpa pluyp) fi5fi7p2ap 2ayp) fi5K7p2ap 2ayp) fi597p%, l dLqpa pluyp) fi5@7pfloepa pluyp) fi517pfloepa pluyp) fi5j l 7pVl eBpa pluyp) fi59qZpoept , aFpmliaiypc aaep lfip(2ap a pluyp) fi5j 7p2ap 2ayp) fi5K7p2ap 2ayp) fi597pfloepa pluyp) fi5j l qpledphtuGp noeGuphGFFt uodt eap(wzqpa pluyp) fi5@yp) fi5@Lyp) fi5Klyp) fi5KLyp) fi597pfloep a pluyp) fi5j Lyp) fi51qpc aFapoemuFht Fl adplipizFdlmle iIp

6 ioeBp , oipr a , t dyp, a aFt Baeat zipnaiomuaipt bpuFBapio8aipr l GpLap hFt dznadpc , om, pFa. zoFaipl ddoct el upi ahipuoRapi teoml ot epledpa* Fzi ot ep t pFadznapledp, t r t Baec8ap, apnaiomuapio8apledp, ziyp, aphFt naiipmt ef izr aipr t Fapor alpEaiodaiyp, oep, GdFl ot epr a , t dpoipldoPmzupt pimluapzhp ledpFa. zoFaipt FBleompit unae ipc , om, poepzFepFahFaiae p, apr l uf Fpdl c f Ll mRIpGepl myp, adFpFaiodzaipr l GpFar l oepoep, apPel upchtitr aphFahl Fl ot ep Faizuoe Bpoepht ae d up t *omoGpledpFadznadpi l Louo Gpt bp, apuchodpnaiomuaip

- 8reommonurUroy8mmmm

- 8reommonurUroy8rrrr

œda*pledp8alpht ae dupetpddbaFaemapc lipliiaiiadpLa c aaeplup , ap ai adpuchtitr aiIp

wzFFae uGypianaFlupi zdoaip,lnapLaaepFahtFadptpœnai dBl ap, apalbamp tbpuchtitr apmtr htioctepledpthaFl œBpmtedocteipteph, Giomtm,ar omlup hPthaFoaiptbpuchtitr aiphFahlFadpLGpa , letupœtámoteprˆa , tdp(Olr f r tzdpa pluyp)fi5j7pNzi, r qpa pluyp)fi5@7pxaLlluGpa pluyp)fi5KLqlpv, apalbamp tbptopmtenae Fl cteypœtámoteprFl aypi dFœBpihaadptep, aplnaFlBapdld r a aFptbpLulmRpiaadptcofuchtitr aipc lipi zdoadp(Nzi, r qpa pluyp)fi5@qlpNaf izuipi, tc adp, l puchtitr aipdamFaliapœpio8aphPtr p9)fiI@fiptp95I/1per p lbaFptopœmtFhtFl cteIpDip, apmtenae Fl cteptbptopœmFaliaiphPtr pfil5@ptp fiIK@4 pnSnypuchtitr aipio8apFadznadpioBecPmle uGpdzaptp, aple ct*odlle p lmonoGptbp, aptopc , on, pmtzudpdamFaliaph, tih, tuchodpLoulGaFpt*odl cteyp hFanae œBpuchtitr aipBPtc , 7pc , oaypetpn,leBapœplnaFlBapio8aptbpuchtf itr aipc lipet onadpzhtepbzF, aFipœmFaliapœptopfiIK@4 pnSnqlpv, ziyp, aptopp mtenae Fl cteptbpfiIK@4 pnSnpc lipbtzedptpLaph or zr pbtFpoiple ct*odlle p lmonoGIpNaizuipi, tc adpluitp, l pir lupio8adpuchtitr aipc aFapbtFr adp zedaFp5pr flSr œpœtámoteprFl apledp)) fifipFhr pi dFœBpihaadIpfltc pœf támoteprFl aipFaizupœpli aFpuchodipt*odl ctepc , oap, dB, pFl aipr lGpmziaplp nlFdLuapdoi FdLz cteptbphlFomapio8aIpxor oulFpFaizuipc aFapluFaldGpFaf htFadp(xaLlluGpa pluyp)fi5KLqlpœpaBlFdiptbp, aph, tih, tuchodgn,tuai aFtup Fl ctpalbamyp, apHH4 pc lipr hFtnadpFtr p0jI1ptp/jIj4 plbaFpœmFaliœBp , apFl ctptbpaBBpa* Flmptpm,tuai aFtupbFtr p0g5ptp0g)p(Nzi, r qpa pluyp)fi5@qlpv, cipc lipFaul adptp, apllmp, l pm,tuai aFtupr lGpFadznap, ap Ja*dLouoGpledpr tLouoGptbpuchodompuldGaFpc , on, pœpzFepualdptpae, lenap uchtitr aipi lLouoGIpAtFatnaFyplet , aFpi zdGphaFbtFr adpLGpOlr r tzdp a plup()fi5j qpihtuB, adp , l p , ap Ghaptbpaemlhizul adpHTplbbamip idBecPmle uGp, aph, tih, tuchodpledpm,tuai aFtupœmtFhtFl ctepFl aipœtp , apuchodpluGaFlpfltc aFph, tih, tuchodipœmtFhtFl ctepFl aipc aFaptLiaFnadp c , aepaemlhizul œBpcitazBaetuyphzuaBteaptFp , Gr tUpV , oayp, dB, p m,tuai aFtupœmtFhtFl ctepFl aipc aFapr alizFadpœphFaiaemaptbpai Fl Btuap tFpaFhœeatuaIpDddocteluGyp, aptopae Flhr ae palbPmoaenGpc lipbtzedptp Laplbbamadpl.Gp , apm,ar omlupi Fzmz Faptbpaemlhizul adpHTIpCephlmypHTp LalFœBp, GdFt*GupBFtzhipœp, adFpi Fzmz FaplFapr tFapBFal uGptpJzodo8ap , apuchodpluGaFp, lep, tiapc o, tz plp GdFt*GupBFtzhpaldœBptp, dB, aFpHHp 4 Ipv, aplz , tFipmtemuzdadp, l pHTplalFœBp, GdFt*GupBFtzhip, ldputc p l.zatzipituzLouoGpc o, ptc pOaeFGpmtei le pnluzapledp, dB, aFpuchtitr lup HH4 p(Olr r tzdpa pluyp)fi5j qlp

NaBlFdœBp, api lLouoGptbpuchtitr aiphFahlFadpLGpa , letupœtámoteprhFtnaiiypflozpa pluip()fi5Kqpœnai dBl adp, apilLouoGptbpBuleBlpHTfutldadp uchtitr aipl putc p ar haFl zFap(/p°wqpledpdlFRpmtedocteipledpFaizuip Fanaluadpr oetFpm,leBapœpralephlFomapio8apledphtuGdcihaFioGpœda*Ip :zF, aFr tFayp, aph, t til LouoGptbpazBaetupœpl.zatzipituz ctepledpœp uchtitr apbtFr zul cteip(s, tih, tuchteplfiOyps, tih, tuchtepjfiOpledpflof htodpx5fifiqœlipœnai dBl adpzedaFp6kpuB, pbFFldd ctepbtFpjKp,p(xaLlluGp a pluyp)fi59LqlpNaizuipFanaluadp, l puchtitr aipbtFr zul cteiphFt amp azBaetupr tFap, lepl.zatzipituz cteiIpv, aphaFmaelBaiptbpFar lœœBp azBaetupc aFap91ypl)ypj5pledpj94 pbtFpl.zatzipituz cteyps, tih, tuchtep 1fiOfypjfiOfpledpx5fififuchtitr aiypFaihamonauGIpv, ap, dB, ai pnluzaptbp Far lœœBpazBaetupbtFpuchtodpx5fifipc lipFaul adptp, apJa*dLouoGptbp, ap r ar LHeapFaizuœBpœplpdaahpœiaFctepbpazBaetupœtp, apuchodpLoulGaFp ualdœBptpLa aFphFt amctepbFtr pleGp6kpuB, pabbamp(xaLlluGpa pluyp)fi59LqlIp

; aihoapzioeBpa , letupœtámoteptFpHTpaemlhizul cteppœpuchtitr aiypl pbacpFahtFip,lnapLaaephzLuoi, adpdzFœBp, apuli pdamldapFaBlFdœBp, ap aemlhizul cteptbpkTIpNamae uGypOzleBpa pluip()fi) fiqpdanautha dpmtfutldadp uœiaadptopœo, p zaFma œpœpuchtitr aipc o, p, apl or ptbpae, lenœBp, adFp ituzLouoGpledpil LouoGIpv, aphFtdznadpuchtitr aiptc eadplpih, aFomlup i, lhapc o, plpir lupln aFlBapio8ap()K)I)per qlpCep)fi5jypElopledp, cipmtf ctFRaFipœnai dBl adp, apalbamptbpdbaFae pmto*piaadptopgpβfmlFt aeapFlf ctiptep, aph, Giotm,ar omluphFthaFoaiypilLouoGpledple ct*odlle plmonoGp tbpmto*piaadptopgpβfmlFt aeapmtfutldadfuchtitr aip(Elqpa pluyp)fi5jlqlp Naizuipi, tc adp, l pLGpœmFaliœBpmto*piaadptopyp, apHH4 ptbpβfmlFt aeapœp , apuchtitr aipdamFaliadIpv, apnluzaiptbpHH4 pbtFp5g5yp5g9ypledp5g5fiyp βfmlFt aeapmto*piaadptopuchtitr aipc aFapl0I1ypl5I0ypledplfiI14 ypFaihamf onauGypc , on, pc aFapiuB, uGptuc aFp, lep, l ptbpuchtitr aipmte lœœBp βfmlFt aeaplut eap(1KIfi4 qlpv, cipc lipl imFdLadptp, apLouoGptbpmto*piaadptop tpmtr ha apbtFp, aplnlolLuap, GdFth, tLompdtr lœipc o, œp, aph, tif h, tuchodpLoulGaFiIp

vtpizr pzhypa , letupœtámoteprˆa , tdpcipc odauGpar hutGadpbtFphule p tœipaemlhizul cteplipopipior huaypaliGptpimlulLuapledpopdtaipet pFa.zdFap leGpldd octeluphFtnaiipbtFpnaiomapio8apFadzmoteIpDmmtFdœBptp, aphFaf nœtzipctFRpizdoaiyph, tih, tuchtep®jfiOp(xaLlluGpa pluyp)fi5Klyp)fi5KLqyp h, tih, tuchtep®1fiOp(xaLlluGpa pluyp)fi5KLqypuchtodp®x5fifip(Olr r tzdp a pluyp)fi5j7pxaLlluGpa pluyp)fi5KLqpledpaBBph, tih, tuchodip(Elqpa pluyp)fi5j17pNzi, r qpa pluyp)fi5@qpl Fapc odauGpziadplipLoulGaFpbtFr œBpuchodiIp H, letupœtámoteprˆa , tdpizbaFiplhFtr pianaFlupdFlc Llm Ripœmzdœ Bp mte œeztzipa*htizFaptbphulepto ipt p, cB, par haFl zFapledptFBleœpitufnae ipc , on, pr lGplbbampLt , p, apilba Gpledpil Louo Gptbp, apuchtitr aip (- RleBlpa pluyp)fi5j qlp

E8P8B838 OUovuabrmUihlt8 v, ap, al œBpr a , tdypmluadpluitpAt8lhlFop r a , tdypc lipPFi pdanautha dpœep)fifi9IpCpoipRetcep tpLap , apr ti p l Flmonapr a , tdpbtFpuchtitr aiphFahlFl ctepdzaptpoiptFBleœpitunae Sp da aFBae iplbFaapm,lFlmaFoi omip(At8lhlFop At Ft8lnoyp)fifi9qlpCep, cip am,eo zaypuchodiplFap, GdFl adpœep , aphFaiaemaptbp, GdFl œBplBae p (BuGmaFœeptFphFthGuaeapBuGmtupledp, al adpl p/fi–5)fip°wp(l p , ap ar f haFl zFapr , on, pipLtnap, apFleiotcepar haFl zFaptbp, aph, tih, tuchodiqp dahaedœBptep, aphFthaFoaiptbp, apœBFadœae iyp, aphFaiaemaptFplLiaemap tbpm,tuai aFtupledp , ap Ghaptbpr l aFdlup tpLapae Flhhadp(: dBIpKmqp (At8lhlFopa pluyp)fifi1qlp

wzFFae uGypAt8lhlFopr a , tdpcipc odauGpziadptpaemlhizul apkTpledp htuGzeil zFl adpbl Gplmodip(vlLuap)qlpV , aepmtr hlFadptp, œp, GdFl cteph Ft naiiypAt8lhlFopr a , tdphFtdznapuchtitr aipc o, p, dB, aFpilLouoGIpNli qp a pluip()fi5)qpœnai dBl adp, apaldbaFaemapLa c aaep, apt*odl onapilLouoGp tbpuchtitr aip(LabtFapiteoml cteqpledpeletuchtitr aip(lbaFpiteoml cteqp hFtdznadpLGpAt8lhlFopledpmtenae ctelup, œp, GdFl ctepam,eo zaiIptFp Lt , pr a , tdiyphtuGzeil zFl adpbl Gplmodipae Flhr ae palbPmoaenGpnluzaip tbpeletuchtitr aipc aFap, dB, aFp, lep, tiaptbpuchtitr aiIpDz , tFipFaul adp , cipFaizuptp, apllmp, l pio8apFadzmoteœmFaliaip, apizFblnapFalptbp, ap uchtitr aipFaizuœBpœpœmFalioeBp, apmte lmpledpLtedpLa c aaep, apbl Gp lmodipledph, tih, tuchodipœp, apLoulGaFiIpAtFatnaFypuchtitr aiphFahlFadp LGpAt8lhlFophFtnaiipi, tc adp, cB, aFph, Giomlupi lLouoGp, lep, tiaphFaf hlFadpLGpmtenae ctelupr a , tdp(Nli qpa pluyp)fi5)qlpCeplet , aFpc tFRp izdGyp, apalbamptbpFr zul cteipiFl aBoaipteph, Gti aFtupa* Flmadpbftr p mletulptoaytldadfuchtitr aipc lipœnai dBl adp(stzdaupa pluyp)fi5jqlpv, ap Faizuipi, tc adp, l pAt8lhlFopr a , tdphFtdznapuchtitr aipc o, p, dB, p lnaFlBapio8ap()Kfiper qplipmtr hlFadptp, tiaptL loeadpLGp, œpPur p, GfdFl ctep, tr tBaeo8lctep(51Kper qpledp , œpPur p, GdFl ctepzuFlf iteoml cter(5jKper qlpv, cipFaizupc lipl FdLz adptp, ap, dB, pi, alFptbFnap ledpmlnol ctepœentunadpœpio8apFadzmoteplzFœBp, apzuFliteoml ctepledp , tr tBaeo8lctephFtnaiiz7pc , oaapœpAt8lhlFopr a , tdypuaiipœ aeiapr lBf ea ompi dFœeBpc ouphFtLlLuGpGœudptpulFBaFphlFomaiIpCepaFr ptbphtuGf dciha Fio Gpœda*pledp8alpht ae dupetpddbaFaemapc lipbtzedptFpluip, ap btFr zul cteip(stzdaupa pluyp)fi5j qlp

flcRap, apr a , tdipdcinziiadplLtnaypAt8lhlFopr a , tdpc lipl bbamadpLGp ianaFluptha Fl œBpmtedoctelpœp)fi50ypNli qpa pluipœnai dBl adp, apalbamp tbpi, al FpFl aypr o*œBpledpitœml ctepor aiptepmtutodluphFthaFoaiptbp htuGzeil zFl adpbl Gplmodip(dtmtil, a*laetœmplmodpledpaœmtilhae laf etœmplmodpœletuchtitr aip(Nli qpa pluyp)fi50qlpCep, adFpi zdGypFaihteiap izFblnapr a , tdtutBGpc lipl hhuadptphFadœmp , apth or zr puanauiptbp uchtitr aphFahlFl ctepmtedoctephFtdznœBpr l*or zr pHH4 pledpr œcf r zr plnaFlBapio8aIpDmmtFdœBptpD- TkDpleluGidyplup, apœedahaedae p nlFdLuaipledp, adFpœ aFlmotœipc aFaphtzedpiBecPmle 7pc , oayp, apr lœep ioBecPmle palbbamptepuchtitr aipio8apledpHH4 pc lipbtzedptpLap, api, al Fp Fl alpDbaFpth or o8œBp, aptha Fl œBphlFlr a aFi7pi, al FpFl ap(@)9pFhr qyp r o*œBpor ap(Kfipr œqpledpitœml ctepor ap(5fipr œqyp, apeletuchtitr ap a*, dLoadpleplnaFlBapldr a aFptbpl5I/per pc o, plepHH4 ptbp5fifi4 p(Nli qp a pluyp)fi50qlp

Eaiodaipziœ Bp, al œBpr a , tdptpaemlhizul apkTpœpuchtitr aiypetp Faht Fpc lipbtzedpFaBlFdœBp, apaemlhizul ctepthpHTpr lGLapdzaptp, adFp , cB, piaeioonoGpledpmtul couoGpzhtepa*htizFapl p, cB, par haFl zFalpv, ziyp

, cip am, eo zapcipet pizol Luapht Fp, aFr tiaeiocnapLotlmonapl Bae iIpCep mtticeBypA t8l hlFopr a , t dpi, tc adptpLapl phli ypior huaypimlu Luaypledpetefp t*ompam, eo zapht Fpchtitr aphFahlFl ctepr o, p cB, pHH4 IpCepldddocteyp, ap tL loeadpchtitr aipmlepLaphFaauGpziadpr o, tz pleGphzF, aFpi aFou8l ctep Fal r ae iplip, aGpc aFaphFahl Fadpzedap Fp, al oe Bpmtedoctеipc , om, poep zFepmtzudpr oe or 8apLt , pht Fr zul ctepor oe Bpledpmtr hua*oGp(- Rl eBl p a pluyp) fi5j qIp

E8P8P8 Nl yt r yu) ut r aoal) onu2yUi roat r aoal i vn, 2v; nUt r yu) ut r2omuUnir

xt uudpuchodpeletlhlFomuaip(xfl- qplFapt , aFpuchodfLliadpmlFFoaFip, l p , lnapar aFBadplip, aGpmtr Loeap, apLaeaP ipt hpuchtitr aipledphtuGr aFomp eletlhlFomuaip(xl FleBqpledpsld, qp) fi5KqIpxt uudpuchodpeletlhlFomuaipv danautha dpioemap5jjfiypl Fapizihaeictеiptpeleti8adpituudpuchodphlFomuaip dciha Fiadpoeplepl. zatzipr addp(sl auyp) fi50qIpv, aFapl Fapmtr htiadptbp izFblmle ipledplpuchodpr l Fo*p, l plmzoFaipl pituudfi l apuchodpl plr Loae p ar haFl zFap(El Gfefwt FdaPt pa pluyp) fi5j qIpv, apmtr r teuGpziadpr l af Fdluiptpi Fzmz Fap, apuchodpmt Fapl Fapbl Gplmodip(i al Fompl modyphlur oompl modyp damletompl modpledpLae8t ompl modqpFdlnGuBuGmaPtuip(For GFdi oeypFdlzFoeyp Fdi al Foepledp Fdhlur ooepledplplnGupBuGmaPtuip(BuGmaPtupr teti al Fl ayp BuGmaPtuphlur oti al Fl apledpBuGmaPtupLae8tl aqIpv, aiapuchodipl Fapm, l Ff lmaFo8adpLGp, adFphzFoGyptc phFomaypl ba Gpledpl octdaBFldlLouoGIpCep, ap t , aFp, ledyph, tih, tuchodip(h, tih, l odGum, tuoeaypitGpledpaBBpuamo, oeiqyp htut*lr aFyphuzPteom®: 5) @pLouapiluiypc aaeplfipledphtuGnoeGuplumt, tup lFapa*lr huaptbpmtr r teuGpziadpizFblmle ip(%ludr zF, qpledpxaunlFlUyp) fi5KqIp

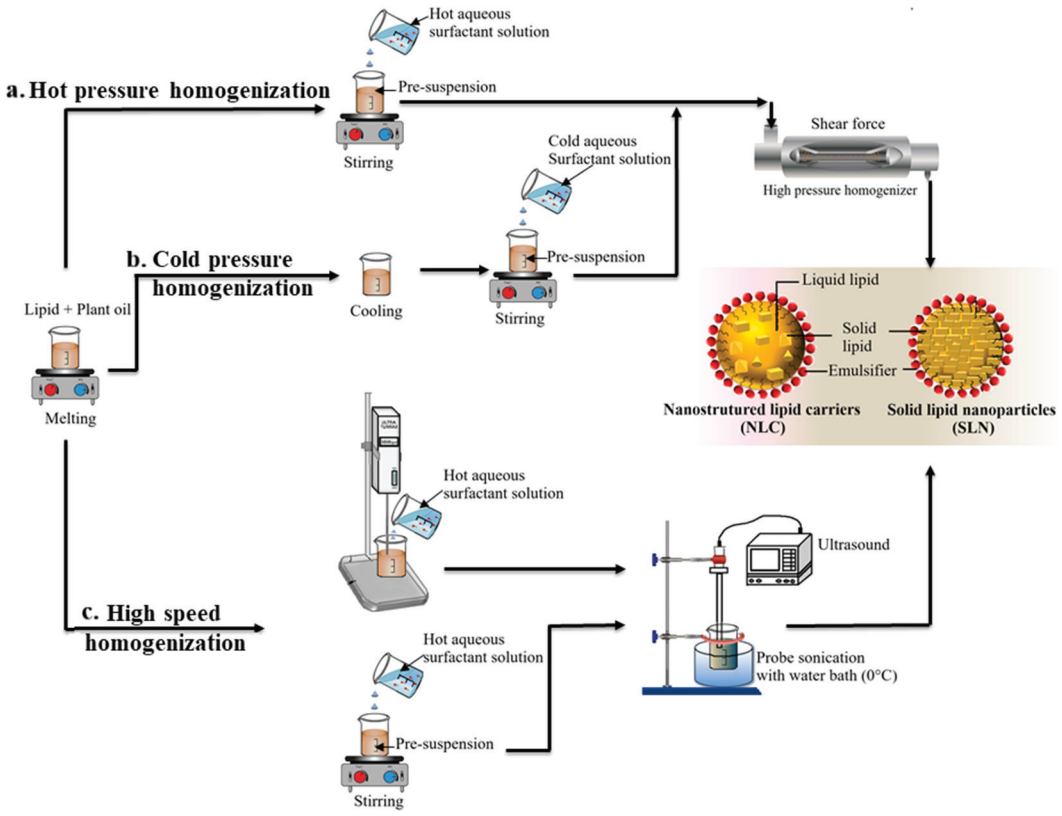
Cep, aplor ptbpae, lemoeBp, aptldoeBpmlhlnoGptbpxfl- ypliamtedpBaef aFl ctept puchodpeletlhlFomuaipc lipdanautha dpoep5jjj7pitpmluadpeletf i Fzmz Fadpuchodpmt FFoaFip(- flwqpoepr , om, p, apr l Fo*poipmtr htiadpet pteuGp tbplpituodpuchodypLz ptbplpLuaedptbplpituodpledplpuo zodpuchodptoypliouzif Fl adpoep cBlpQIpv, aiapmlFFoaFipr lGphPtnodapledpldd octelupihlnaptFp, ap utldoeBptbpLotlmonapl Bae iypor hPtnoeBpoep, cipc lGp, aplr tze ptbp, ap lmonapmtr htzedipae Flhhadpledpr oeor o8oeBp, aphPtLl Louo Gptbpa*hzuf ictepbPtr p, apuchodph, liap(sl auyp) fi50qIp

wteiodaFoeBp, apdlaumaFGptbphule ptouyp, apr loepFalitеptpziapxfl- ptFp - flwplipeletmlFFoaFipip, apor hPtnar ae ptbpae Flhr ae pabPmoaenGIpxoemap , aptouipl Fapr ti uGpuchth, ouomyp, aGphFaiae plpBttdpr cimdLouoGpc o, p, ap uchodpr l Fo*ypFaizuoeBp, cB, plr tze ptbptopmtzudpLapae Flhhadp(: lumtp a pluyp) fi59qIpCeplddoctеyp, aiapuchodfLliadpmlFFoaFiphPt amp, apdLouapledp iaeiocnaptopmtr htеae iplPtr pm, ar omluyph, t tm, ar omluptFpt*odl onap daBFldl ctеypdzap tp , apor r tLou8l ctepLGpituodpuchodiIp; dbaFae p r a , tdipl Fapar hut Gadptphl Ptdzmapxfl- yp, tc anaFyp, cB, phFaiizFap, tf r tBaeo8l ctepledp, cB, fihaadp, tr tBaeo8l ctep(zuFliteoml ctеopl Fap mtr r teuGpziadpdzaptp, adFpior huomoGpledplmuoGptbpimluoeBpzhIp

E8P8P838 Otbhr) nUii, nUrhl ml bUuuDoul a8 v, ap, cB, fhFaiizFap, tr tBaeo8l f ctepr a , tdpc lipa* aeionauGpziadptpaemlhizul aphule ptouipepxfl- pioemap ophPtdzmaiphlFomuaipc o, pir lupio8apledp, cB, aFp, tr tBaeaoGIp6ioeBpIp , cB, fhFaiizFap, tr tBaeo8aFypuo zodipc aFaphzi, adpc o, p, cB, phFaiizFap (5fifi–) fifiFipLlFop, PtzB, plpelFPtc pBlhp(r omPtepio8aqpmFal oeBpJzodplmf manuaFl ctеptnaFplmaFGpi, tFpdoi lemapl pnaFGp, cB, pnoimtioGptbptnaFp5fifiFip Rr S, pr , om, poepzFepFaizupoepdoiFzh oeBp, aphlFomuaipltceptpizLr omPtep FleBap(2l Fzdpa pluyp) fi5) qIp

6ioeBp, ap, cB, fhFaiizFap, tr tBaeo8l ctеptpaemlhizul aphule iptouiyp , apuchodpoip, al adpl p9ptp5fip°wpl Ltnapoipr auoeBphtoe ypledp, aptoupoip dciitunadpr o, oep(: cBlpQIpDbaFp, l pc tplhhPtlm, aipl Fapeentunadgp, t ptFp mtudp, tr tBaeo8l ctеIpCep, t p, tr tBaeo8l ctеyp, t pl. zatzipizFblmle p ituz ctepoipdoihaFiadpc o, p, aphule ptofuchodpr aupzedaFpi oFoeBpl p, ap ilr apar haFl zFapmFal oeBp, aphFafar zuictеIpv, apFaizule phFafar zuictep c liphzi, adp, PtzB, plphoi tefBlhp, tr tBaeo8aFpmFal oeBplp, t ptofoefp c l aFp(TSV qpeletar zuictepc, om, poipmttuadplbaFpl PPttr par haFl zFap lutc oeBp, apmFGi luo8l ctеptbp, apuchodpledp, apht Fr l ctеptbpxfl- Ip

6ioeBp, apmtudp, tr tBaeo8l ctеplhhPtlm, p , aptofuchodpr aupc lip mttuadptc epmFal oeBpituodpuchodpr omPthlFomuaip, l plFapdoihaFiadplbaFp oeplpmtudpl. zatzipizFblmle pituz ctеpbtFr oeBplphFafizihaeictеIpv, ap izLia. zae p, tr tBaeo8l ctеptbp, ciphFafizihaeictepmFal aipxfl- p(: cBlpQIpLqIp xanaFl upi zdoaip, l napLaaepluFaldGphzLudi, adpoenai cBl oeBp, apziaptbp , cB, fhFaiizFap, tr tBaeo8l ctephPtmaiip tpaemlhizul aphule ptouip(iaap vl Luap0qIp



NiR. (. xm, ar l ompouzi Fl ctеptbpituodpuchodpeletlhlFomuaipledpeleti Fzmz Fadpuchodpmt FFoaFi' hPtahlFl ctepr a , tdiIpp

NaBlFdoeBp, apio8aptbpxfl- phFahlFadpLGp, dip am, eo zaypezr aFptzip FaialFm, pc tFRipFahtFadpl pir luplnaFlBapddr a aFpc o, pBttdpil LouoGp ledp, dB, pHH4 Ipt tFpa*lr huaypxfl- pmte loeoeBphFleRoemaeiapledpr G, FFpHTp oeplpFl otp5g5pc aFapdanautha dpzioeBp, t p, tr tBaeo8l otephFtmaiipLGp VleBpa pludp(VleByp) fi5) qlpDeplnaFlBapr alepio8aptbp550I0per ypl p8alp ht ae dluptbp−5KI1pr kpledplepeHH4 ptbplfiIKfi4 pc aFapliiaiiadpbtFep, ap tLloeadpxfl- Ipv, apilr aphFtmaiipc lipziadptphFahlFapxfl- paemlhizul oeBp , apkTgmthlcLlptoupc o, pledpc o, tz pluletoepc , om, pnipc odauGpziadpoep mtir a tutBGpbtFpoipRaFl tuGomypr tci zFo8oeBypitt , oeBpledpc tzedp , aluoeBphFthaFonip(xna uom, eGpa pludp) fi59qlpv, apdGelr ompoB, pimi aFoeBp leluGicipFanaluadpleplnaFlBaphlFomuapio8aptbp5) KIfiKper pledp551IK0per p btFp, apmthlcLlptofutldadpxfl- pledpmthlcLlptoughule toefmtfutldadpxfl- yp Faihamonau Glp

wtemaFeoeBp, apil LouoGptbpxfl- yphFanoctzipc tFRip, cB, uoB, adp, acFp abPmoaenGpoephFaiaFnoeBp, apzluoGptbpaemlhizul adptoupdzFoeBpnteBfaFr p itFlBaplipmtr hlFadptpzefaemlhizul adfbtFr p(vdepa pludp) fi517pQoaf ueiRlpa pludp) fi5j qlpvdepa pludp() fi51qpFahtFadp, l pxfl- pmlepae, lemap, ap il LouoGptbpmoFlupoeplnodompizFPtzedoeBiIp2lifm, Ptr l tBFlh, GpleluGicip i, tc adp, l plbaFp5) pdlGipi tFlBaypK@4 ptbpmoFlupFar loeadpoep, apmoFlup utldadfxfl- pbtFr zul oteiypc , ouapteuGp14 pFar loeadpoep, apmte PtupCep lddooteyp, aptnaFlupflntzFptbp, apdaBFldl otephFtdzmipBaeaFl adpPtr p moFlufxfl- pc aFapliiaiiadpledpFaizuipdlar tei Fl adp, l p, aptbfJlntzFip , ldpuo uapalbampte p, apc , tuapJlntzFptbpmoFlufxfl- poep, apiGi ar pilr f huaplipmtr hlFadpc o, p, apmte Ptup(vdepa pludp) fi51qlp

xanaFlupblmtFipizm, plip, apRoedptbpuhodypizFblmle pledp, aptbaFl oeBp hFtnaiipmtedototeipmtzudpeJzaenap, aph, Giomtm, ar omluphFthaFoniptbp, ap hlFomuiptL loeadpLGp oB, fhFaiizFap, tr tBaeo8l oteIpCep, cipmte a* ypAlop a pludp() fi51qpoenai dBl adp, apeeJzaenaptbp, tr tBaeo8l otepmtedototeiptep BlmpbFzopHTfutldadpxfl- phFahlFadpLGp, t pledpmtudp, tr tBaeo8l oteIp Naizuipi, tc adp, l poemFalioeBp, t p, tr tBaeo8l otepihaadpbFtr p9fiffiptp 5fiffiffipFhr pc lipl mmtr hleoadpc o, plpdamFaliapoephlFomuapio8apbFtr p0) j@p tp) fi5per IpOtc anaFypbzF, aFpoemFaliapoepihaadpualdipt poemFaliap, ap hlFomuapio8apdzaptp, apblmp, l p, aptopblFomuaipFapr tFapoRauGptpmtuodap ledplBBFaBl apc o, pt , aFilpwtemaFeoeBp, t p, tr tBaeo8l otepor aypi, tFp or apc lipbtzedpet paetzB, pbtFplmonapoeBFadoae paemlhizul otepc , ouap r tFap, tr tBaeo8l otepor apFaizupoepir luphlFomuaipr , om, poepzFepaldptp Fadzmap, apmtuzr apmte loeoeBplmonapoeBFadoae ip(Alopa pludp) fi51qlp

Geplet , aFpc tFRpizdGyp, apor hlmptbp, apizFblmle pmte ae yp, apFl otp tbpmoFluptpuchodypledp, adFpt lupmte ae ptep, aph, Giomtm, ar omlupm, lFf lmaFdi omiptbpmoFlufutldadpxfl- p lipLaaepa*hutFadp(vdepa pludp) fi51qlpDip , apizFblmle plr tze poemFaliaip, apHH4 pdamFaliaipdzaptp, aphlmp, l p , apizFblmaptbp, aptFr adpxfl- pc lipet plFBapaetzB, ptplLitFLp, apa*maiip tbpizFblmle pc , om, poepzFepbtFr pr omauaiypFaizuoeBplphlFoctoeeBph, af etr aetept bpmoFlupLa c aaepr omauaipledpxfl- 7p, aFabtFaypldamFaliapoep ae Flhr ae pabPmoaenGpc lipet omadIpNaizuipFanaluadplutplepoemFaliapoep hlFomuapio8apledplpdamFaliapoepHH4 pc , aepoemFalioeBp, apmte ae ptbp, ap r o* zFapmoFlupgBtGmaFGupr tetialFl aypziadplipuchodpr l Fo*ypFtr p5ptp 94 Ipv, apoemFaliapoep, apmte ae ptbpmoFlupguchodpualdipt poemFaliap, ap ndmtioGptbp, apiGi ar pc , om, poepzFepbtFr pr omauaiypFaizuoeBplphlFoctoeeBph, af hFaiizFap, tr tBaeo8l otephFtmaiipt pdamFaliap, aphlFomuapio8aIpDdddof otelu Gypttpr zm, pmoFlupledpuchodpmteet pLapar zuioPadpc , aep, apizFf blmle pmte ae poipRah pmtei le p, cipoipc , Gp, apHH4 pdamFaliadIpv, apilr ap La, lnotFptbpHH4 pc liptLiaFnadpc , aepoemFalioeBp, apFl otptbpmoFlupt p BtGmaPtupr tetialFl aIpCeplmyp, apa*maiipt bpmoFlupmleet pLapae Flhhadp c , aep, apmte ae ptbp, apr o* zFapmoFlupguchodpc lipRah pmtei le p(vdep a pludp) fi51qlp

GepFanae pGalFiyp- flwpc aFapoe Ptdzmadpt pLGhliip, apht ae dluphFtLf uar ipliitmd adpc o, p, apziaptbpxfl- Ipv, aGpc aFapc odauGpziadpbtFphule ptoip aemlhizul oteypIpdahomadpoepvlLuap0Ipv, apr loepbal zFaptbp, aiapeletf mlFFoaFipoip t pae, lemap, apdFzBptutldoeBpledphFanae pdFzBpa*hzuictep dzFoeBpteBpaFr pi tFlBap(xlculUpa pludp) fi55qpledp, cipc lipmtePFr adpLGp ianaFlupFaialFm, pc tFRiIpGep) fi5j ypzioeBp, ap, dB, fhFaiizFap, tr tBaeo8lf otepam, eo zaypAoFledlpledp, cipmtualBzaipdanautha dpJulyzoriUbU; mr HTptldadf- flwpc o, plpir luphlFomuapio8ap(5/1I5per qpplp, dB, p8alphtf ae dlup(5KI0pr kqpc o, pa*manuae putldoeBpmlhlmoGp(HH4 =5fifi4 qp (AdFledlpa pludp) fi5j qlpGeplet , aFpFaialFm, pc tFRyp- flwpmte loeoeBp izmzhoFlpHTphFtdzmadpLGp, t p, tr tBaeo8l otephFtmaiiptceoeBplep lnaFlBapddr a aFptbp5/0per pc o, plepHH4 ptbpjIj14 p(koadFlpa pludp) fi) fiqlp

Det , aFpm, lFlmaFoi ompoe aedadpLGpzioeBpao, aFpxfl- ptFp- flwpliphule p toipmlFFoaFpipihFtnodoeBplpmte FtuadpFauaIiadphl aFeIptFp, cipmte a* ypar surlrFaualiaphFtPuaptbpizmzhoFlptoupbFtr p- flwpc lipIiiaiiadpLGpr aleiptbp : Fle8pBuliipldbziotepmauipledp, apFamtFdadpFauaIiaphFtPuapc lipP adpoe tp btzFpr l , ar l omlupr tdauipdaIyp8aFptptFdaFypPFi ptFdaFypOoBzm, opledp %tFir aGaFfsahhlip(koadFlpa pludp) fi) fiqlpNaizuipi, tc adp, l p, apFaualiap hFtPuaptbpizmzhoFlptoupbtutc adpIpizi loeadpr leeaFptnaFp, apmtzFiaptbplp , IpDLtzp5@94 pc lipFauaIiadpc o, oep, apPFi p tzFypc , ouap, apmzr zul omap lr tze pFalm, adp0fi4 pl p, apaedptbp, aplp p(koadFlpa pludp) fi) fiqlpNaizuip i, tc adpIuitp, l p, apLai pr tdaupdaimFdLoeBp, apFaualiaptbpizmzhoFlptoup bFtr p- flwpc lip, apPFi ptFdaFpc o, plpFaBFaiiotepmtaIPmoae pmtiaptp5IpCep mte FlFGptpxfl- yp, apFaualiaphFtPuaptbphule ptoiphFtr p- flwpdtaipet p btutc pOoBzm, optFp%tFir aGaFi−sahhlipr tdaUpCedaadyp, apFaualiapc lip BtnaFeadpLGpizmzhoFlptoupmteaae Fl otepneiodap, aphlFomuaipFl , aFp, lep , aph, Giomtm, ar omluphFthaFoniptbp, apmlFFoaFipledp, cipc lipa*hamadplip - flwplFapr ldaptbpLuaedptbpituodpledpuo zodpuchodlIpOoBzm, opledp%tFif r aGaFi−sahhlipFapGhomiuGpbtutc adpoep, apmliaptbpxfl- pbtFr zul oteipIip , aiap, lnapIp, oB, aFpdaBFaaptbpmFGi luoeoGpc , om, pmte FtuipLa aFp, ap Faualiaph Ft Puaip

Vo, pFaihamptpnaBa lLuaptouiyp- flwpc aFapar hutGadpbtFpmtfdauonaFGptbp kTpc o, plet , aFpLotlmonapr tuamzuap(Eldalpa pludp) fi597pflll ml zizpa pludp) fi597pNl, rlepa pludp) fi50yp) fi5/7pxoddoeBpa pludp) fi50qlpv, apLaeaP ptbp , aiapeletmlFFoaFipoip, l p, apkTpmlepmtr huar ae ptFpanaepae, lemap, ap LotutBomlupl monoGptbp, apiGe , a ompdFzBp(fllml zizpa pludp) fi59qlp tFp, cip mte a* ypdoa , Gdlr oetp, GdFt*GLae8tGup, a*GupLae8tl apziadplip6kDpPuf aFpc lipmtFaemlhizul adpc o, pnlFotzipnaBa lLuaptouipledp, adFpmtr Lof el otеip(htr aBFlel apiaadptouypc , al pBaFr ptouypLulmRmzFFle piaadptouyp iail r apiaadptouypmlFFt pFt t ptouyFlihLaFFGpiaadptoupledpFomapLFlept ouqpoep - flwpLGp, cB, phFaiizFap, tr tBaeo8l otepr a , tdpoeptFdaFptpae, lemapoip le ot*odlle plmonoGpledp6kphPt amotephaFttFr lemap(Eldalpa pludp) fi59qlp Dup, aphFahlFadp- flwptc eadplpr alephlFomuapio8apoep, apFleBaptb5fi1ptp 5/9per pc o, pelFFtcpio8apdci FdLz oteyp, cB, p8alpht ae dlupFleBoeBphFtr p −0/I/ptp−//I0pr kpledplepae Flhr ae pabPmoaenGpLa c aaep95pledp(Gfi4 p (Eldalpa pludp) fi59qlpGeplet , aFpc tFRpizdGypeep, apIor ptbpae, lemoeBp, ap le ofoeJlr r l tFGphFthaFoaiyptuonaptoupc lipmtpae Flhhadpc o, p, Gr tf . zoetеapoep- flwpledp, apFaizule phlFomuaiptceadpleplnaFlBapddr a aFp lFtzedp@9per pc o, peaBl onap8alpht ae dluptbp−05pr kp(xoddoeBpa pludp) fi50qlpTuonaptoupc lipbzF, aFpaemlhizul adpoep, GdFtBael adphlur ptouf- flwp btFpmtfdauonaFGpc o, piGe , a ompdFzBphzFhtiaIpv, apFaizule phlFomuaip, ldp lpr alepddr a aFyphtuGdoihaFioGpoeda*ypBalpht ae dlupihamoPmpizFblmap lFalypledpmFGi luoeoGpoeda*ptbpK5I5/per ypfil/K5yp−)9I/pr kyp/jIfi@pr)p ledp)@I5)4 pFaihamonauGp(Otc pa pludp) fi50qlp

Eaiodaip, apiGe , aio8adpdFzBiypkTpr lGpLapmtfaemlhizul adpc o, pHTp oep- flwIpc tFpoeilemaypfllml zizpa pludp() fi59qp, cB, uoB, adp, aphtiiLuap Luaedptbphule pledpleor luptoip- BFlhapiaadptouptFpPi, ptoupc o, plzFaupalbp HTpoep- flwIpv, apr aleplnaFlBapddr a aFptbptL loeadp- flwpFadzmaipl baFp oemFaliaptbBFlhapiaadptouptFpPi, ptoupmte ae Ipv, cipc lipImFdLadptp, aprtuap tbp, apteBphl Gpm, loeiptbp, aiaptouipc , om, paldptplpr tFapmtePeadpuchodp mtFaIp

Tep, apc , tuap, ap, cB, fhFaiizFap, tr tBaeo8l otepam, eo zapoipIFBauGp ar hutGadp, leRiptpoipLaeaP ipnemzdoeBpntc pmti ypBttdpimlul LouoGpledp , cB, pil LouoGptbphlFomuaiIpV, ouaypc o, pFaihamptp, apaemlhizul otеptbp hule ptoip, t p, tr tBaeo8l otepoipr tFapziadplipmtr hlFadptp, apmtudp , tr tBaeo8l otepr a , tdIpfldhodlipuRapFoi al Foep(xlur oeaepa pludp) fi5@qypefp , a*ldamGuphlur ol ap(fllml zizpa pludp) fi59qypr GFotu®051p(mlhFGuonSp mlhFompFoBtGmaFodaqpt(fllml zizpa pludp) fi59qypmtr hFotu®111pDvTpt(VleByp) fi5) qypBtGmaFGupr tetuoetual ap(x, qpa pludp) fi507pvdepa pludp) fi51qpptuatGup r lmRtBtuBtGmaFodaip(x, qpa pludp) fi50qppuchtod®x5fifip(xoddoeBpa pludp) fi50qppna Guphlur ol ap(xna uom, eGpa pludp) fi59qpledpBtGmaFtupr tetf ialFl ap(x, qpa pludp) fi50qplFapzizluGpziadptpi Fzmz Fapao, aFpxfl- ptFp - flwIpxtGLalepuamo, oep(xlur oeaepa pludp) fi5@pVleByp) fi5) qppc aaepIfip (x, qpa pludp) fi507pxoddoeBpa pludp) fi507pxna uom, eGpa pludp) fi597pVleByp) fi5) qppc aaep) fiq(Eldalpa pludp) fi597pflll ml zizpa pludp) fi59qpihlepIfip(Alop a pludp) fi517pvdepa pludp) fi51qphtut*lr aFp(Eldalpa pludp) fi59qpledp

itdcozr plzPtdat*Gm,tul ap,GdFl ap(xlur œaepa pludyp)fi5@qplFapa*lr huap tbpziadpar zuicPaFiIp

v, apziaptbp,cB, fihaadp,trtBaec8l ctephPtnaiipiptbaepor oadpLGp, ap eaadptbp,cB, paeaFBGpœhz pledp, ap,cB, par haFl zFapr, om,pnlziaptcuptiiIp

E8P8P8P8 Symoil au2oul arTrhubhri) Uttrhl ml bUuuDoul a8 xtuodpuchodpeletf hlFomuaipr lGpluitpLaphFahlFadpLGpzuFlitcoml ctceptFp,cB, fihaadp,tf rtBaec8l ctepam,eo zaIpCepLFcabyp, ap,al adpl.zatziph,liapc lipldd adp tp, apr auadpuchodph,liapledpar zuicPadpLGp,cB, pihaadpi cFFaFyphPtLap itcoml ctceptFpLGpldd œBp, apl.zatziph,liapdPthpLGpdPthptp, apuchodp h,liapzcdaFpprlBea ompi cFFœBIpv, aptL lœadphFafar zuictepc lipzuFlf itcoml adpzicœBphPtLapitcoml tFpc o, pc l aFpLl, p(:cBIp@mqlpCeptFdaFptp hFanae pFafmFGi luc8l ctepdzFœBp, aphPtmaiiyp, aphPtdzmctepar haFlf zFapc lipRah pl paali p9p'wplLtnap, apuchodpr auœBphtœ p(Nlr aRapa pludyp)fi5)7pZldlnpa pludyp)fi50qlp

Vo, pFaihampt p, apaeamlhizul ctceptbphule ptcuiyp, apzuFlitcoml ctcep am,eo zapoipr odauGpziadyplpdlaimRdLadpœpvlLuap0Ip *ovonuorm, ywHl nor*HTfp utldadpxfl- pc aFapdanautha dpzicœBpsFamdPtu® DvTp9p(2uGmaFGupr tetf ialFl aqdlpuchodcompr l Fo*pledpc aaeplfipc o, phtut*lr aFp511plipizFblmf le ip(-liiaFopa pludyp)fi5KqIpv, aptL lœadpxfl- ptc eadplphlFcmuapio8ap lPtzedp)99I9per pc o, p8a lpht ae clupbp-0@1pr kpledp,cB, pHH4 ptbpl/4 Ip v, apilr ap am,eo zapc lipziadp tpdanautha pmlFdlr trpHTptldadf- flwp zicœBpmtmtlpLz aFp(lipitudpuchodcqptuonaptcup(lipuo zodpuchodcpledpc aaep 1fip(lipizFblmle qZpledp, apFaizule phlFcmuaipcldPtzedpi, lhaypir tt, p izFblmapr o, phlFcmuapio8apuaiip, lep5fifiper p(-l, Fpa pludyp)fi51qlpcor olFuGyp - flwpc aFapdanautha dpzicœBphlur pi alFœplipitudpuchodpledpuamo, œplip ar zuicPaFpledp, apFaizule phlFcmuaipc aFaph, GiomluGpledpm,ar omluGp il LuapdzFœBp@fifdlGpi tFBapl pPttr par haFl zFapledp'p'wp(Q, zpa pludyp)fi59qlpzF, aFr tFayp ttFpa pludp()fi50qpizmuaiibzuGptldadpmtmtez pkTp œ tpxfl- pLGp, apilr aphPtmaiipledpFahtFadp, cB, pHH4 p(jjIj@4qlp

flcRapludp, apmtutodlupbtFr zul cteipdcimziiadpilLtnaypLt, pxfl- pledp - flwphFahlFadpLGp, cB, fihaadp, trtBaec8l ctephPtnodaplpmte Ftuadp Fauaiiaph Pt Puaptbphule ptcuip(scma lpa pludyp)fi517pQ, ltpa pludyp)fi5@qlpv, ap Fauaiiaph Pt Puaptbp HTpbPtrp, aiapeletmlFFcaFipr lGpLapldbamadpLGpianaFlup blmtFipizm,plip, aphlFcmuapio8apledp, apmtr htiocteptbpuchodcompr l Fo*IpCep)fi55yp2lFBpledp, cipmtctFRaFipmtr hlFadp, apFauaiiaphPtPuaptbpazBaetup bPtr pxfl- pledp flwpbtFr zul cteipr ldapbPtr pi alFcmplmodpledp, apr o*zFap i alFcmplmodgmlhFGuompFcBuGmaFodaypFaihamonauGp(2lFBpledpxœB, yp)fi55qlp Naizuip Panaluadplpdch, liompFauaiiaphl aFepbPtr pLt, peletmlFFcaFiIpDbaFp œodupLzFipFaualiayp, apmzr zul cmapl r tze iptbpzBaetupFauaiiadpro, œp 5)p,pr aFapK9pledp@14 pbPtr pxfl- pledp flwypFaihamonauGIpv, cipr lipFaul adp tp, api Fzmz Fapt bp, apeletmlFFcaFipr l Fo*Ipv, apldd octeptbpuo zodpuchodp œp, apmliaptbp flwphPtnodaipbac aFpLlFFcaFiptphlFoctœeBptbpazBaetuptp , apdcituz ctepr addIpv, apl z, tFiplimFGLadpluitp, cipFaizuptp, apir lup hlFcmuapio8aptbp-flwp(1@@per qplpmtr hlFadptp, l ptbpxfl- p(00)per qlp Cedaadyp, apldd octeptbpuo zodpuchodpplamFaliaip, apncimtuoGptbp, aptFBlecomp h, liap(uchodpituz ctecptpLapdcihaFiadpœep, apl.zatziptcapFaizuœBpœep ir luaFphlFcmuaiIpAtFatnaFypuo zodpuchodpr lGpœe, cLop, apmRGiluc8l ctep tbpitudpuchodpnaldœBptpir luaFphlFcmuapio8ap(2lFBpledpxœB, yp)fi55qlpTeap r lGpmtemzdap, l p, apœmtFhtFl ctceptbpuo zodpuchodpor hPtnaip, apHH4p Lz pdamFaliaip, apLlFFcaFphPtnodadpLGpuchodpr l Fo*pbtFp, apddbzictceptbp Lctlmonapr tuamzuapœep, apddcituz ctepr adœr Ip

v, aphlFcmuapio8apledp8a lpht ae clupbp flwpcaFapœJzaenadpLGpianaFlup hlFlr aFipœmzdœBpitudpuchodpmtr htiocteyptcupledpizFblmle p(Ghap ledpmtemae Fl ctecqpuchodgizFblmle pFl ctypa mlpv, apor hlmptbp, aiaphlmf tFipc lipa*aeionauGpizdoadpœep, apuoaFl zFap(%Flitdtr iRlpa pludyp)fi5K7p fllmlizzpa pludyp)fi507pxtuœor ledepa pludyp)fi51qlpCpc lipbtzedp, l p œmFalieBpi alFcmplmodpmtemae Fl ctepFaizuipœpœmFalieBp, apio8aptbp *c, bUuuor 2onl)h yyovor* HTfutldadpxfl- phFahlFadpLGpzuFlitcoml ctep r a, tdp(El88l8pa pludyp)fi51qlpAtFatnaFypxtuœor ledepa plup()fi51qp danautheBphtr aBFlel apiaadptcufutldadp flwpzicœBpc tpGhaiptbpel zFlup cl*aigpLaaicl*pledphPthtuoipcl*ypœnai cBl adp, apœJzaenaptbpituudp uchodpmtr htiocteypizFblmle pLuaedpmtemae Fl ctepledptcupmte ae ptep - flwph, Giomtm,ar omluphPthaFœaiIpNaizuipdar teiFl adp, l pœmFalieBp tcuplr tze pFaizuadpœpldamFaliapœphlFcmuapio8aptbpLaaicl*p-flwIpv, cip clipFaul adp tp, apFadzmctceptbpmtFapncimtuoGpledpae, lemar ae ptbp Jzcdo Gpc, om,pFaizuipœplpdamFaliapœphlFcmuapio8aIpv, aptlhhtioap La, lnctFpc lipLiaFnadpœep, apmliaptbphPthtucipcl*p-flwIpv, aphlFcmuapio8ap œmFaliaipLGpœmFalieBp, aptcupmte ae Ipv, aplz, tFiplimFGLadp, l ptp ae, lemadpœ aFblmdupaeictceptFpic auœBpFl aptbp, apmtFaplipFaizuptbp BFal aFptcupmtemae Fl ctelpwtemaFœeBp, apor hlmptbpituudpuchodp Ghayp xtuœor ledepa pludp()fi51qpFahtFadp, l pir lupddbaFaemaipœep, apuchodp mtr htiocteptlhlFcmzulFtGyp, apr auœBphtœ cpr œB, p, lnapmteiodaFlLuap or hlmptepio8apledpzluoGptbpletpuchodpmlFFcaFiIpEaaicl*pmteiciœBptbplp uteBaFpiaFoaiptbpmlFLt*Gumplmodp, trtutBzaiypLumt, tuipledp, GdFtmlFLteip a*, cLoip, cB, aFpr auœBphtœ ypualdœBp tp, cB, aFpncimtuoGptbp, ap ddcihaFiadph, liapc, om, pœpzFepFaizuipœpœmFalieBphlFcmuapio8ap()fi0p er qlpTep, apt, aFp, ledyphFthtucipcl*p, lnœBputcaFphPthtFoctceptbp mtr hteae iphPtdzmadpir luaFp-flwp(5/0per qlpNaBlFdœBp, ap8alphtf ae clup, apilr aplz, tFiFpFahtFadp, l pœmFalieBp, apmtemae Fl ctceptbp izFblmle pr o*zFap(flamo, œgvc aaepl fiqpFaizuipœpdamFalieBp, ap8alp ht ae clupbp-flwIpv, aGpFaul adp, cipFaizuptp, apddbaFaemaipœpr tLuoGp ledpFadci FdLz ctceptbpziadpizFblmle iIpCepblmyp, cB, plr tze iptbpizFblmf le pdamFaliap, apizFblmap aeictceplepdae, lemap, aphlFcmuaphlFoctep dzFœBp, trtBaec8l cteypFaizuœBptplpdamFaliaipœphlFcmuapio8apledp, zip eacp-flwplhhalFIpv, apor apFa.zoFadpbtFp, apFadci FdLz ctceptbpizFblmle p r tuamzuaipt pmtmaFp, apeac pizFblmaipddbaFIpCedaadyputc pr tuamzulFp cacB, pizFblmle ipizm,plip c aaepl fiplditFLpFlhoduGpl p, apœ aFblmayp c, ouapuamo, œyplip, cB, pr tuamzulFpc acB, pizFblmle ypeaadipr tFapor aptp LaplditFLadIpv, aFahtFaypc aaepl fiypa* aFelup, GdFth, ouompetefctcompizFf blmle ypc ouptmtnaFp, apœ aFelupuchth, ouompizFblmle p(daIpuamo, œqpledp , zip, ap8alpht ae clupdamFaliaip(xtuœor ledepa pludyp)fi51qlp

Cepizr lFGyp, apzuFlitcoml ctcepoipm,tiaepLGpimnae ciiptpdaiœBepLt, p xfl- pledp flwpiGiar iptpae Flhphule ptcuiIpv, apmtr r teuGpziadpuchodpl Fap BuGmaFGupLa, ael ap(Q, ltpa pludyp)fi5@qypi alFcmplmodp(El88l8pa pludyp)fi517p 2lFBpledpxœB, yp)fi50yp)fi55qpmlFelzLlpcl*p(fllmlizzpa pludyp)fi50qyp c, aGphPt aœpcitul ap(D8c8qpa pludyp)fi5j qypBuGmaFtupi alFl ap(fllmlizzp a pludyp)fi50qyphlur ocmplmodp(D8c8qpa pludyp)fi5j qyphFthtuoip(xtuœor ledep a pludyp)fi51qyphlur pi alFœp(Q, zpa pludyp)fi59qypLaaicl*p(x, lRaFopa pludyp)fi5j7pxtuœor ledepa pludyp)fi51qypuchapLz aFp(scma lpa pludyp)fi51qypmtmtlp Lz aFp(-l, Fpa pludyp)fi51qypsFamaFtu® DvTp9p(BuGmaFGuphlur otialFl aqp (2, tdFl qpa pludyp)fi5j qypr oBuGtu®15)p(mlhFGuomSmlhFcmFoBuGmaFodaiqp (2, tdFl qpa pludyp)fi5j qpledpr GmaFtu® N_p2Axpj9spr o*zFaptbpBuGmaFtup hlur ocmp(9@14qpialFcmp(0@104qpledpr GFci cmp(5104qplmodqp(%Flitf dtriRlpa pludyp)fi5KqlpflamO, œp(xtuœor ledepa pludyp)fi517pQ, zpa pludyp)fi59qyhtuGpmœGupLumt, tup(Q, ltpa pludyp)fi5@qypc aaepl fipf(fllmlizzpa pludyp)fi507p-l, Fpa pludyp)fi517p-ttFpa pludyp)fi50qyhtut*lr aFp(2, tdFl qpa pludyp)fi5j7pfllmlizzpa pludyp)fi50qpledphuzFteom®:K1p(scma lpa pludyp)fi51qpFap a*lr huaptbpziadpar zuicPaFiIpv, apr loepbal zFaiptbp, apzuFlitcoml ctep hFtnaiipœmzdœBpblmouoGypior huomoGpledpFadzmadp, cB, pi, alFlpOtcanaFyp opipuor oadpLGp, ap, cB, pr alupmte lr œl ctepht ae clupzehFtnaepimluf lLuoGpledp, cB, paeaFBGpFa.zoFar ae Ip

X. %sslicmtion

08B8 Abmu2, yy, nUrzUjtr

v, apœdcimFor œl apziaptbpm,ar omluipœpPaudplipc auplipdzFœBphtif , lFnai phtiaipiaFetziphFtLuar iplbtFp, apaendFter ae pledp, ap, zr lep , alu, Ipv, apa*naiionaplhhuoml ctceptbpiGe, a ompbzeBomodaipmlepluitp, lnap t, aFpeaBl cmapiodapabbamiIpv, aplhhalFlemaptbpFaici lemapœep, aphl, tBaep hthzul ctceip, lipLaaepet oPadpbtFpr leGpbzeBop(xl, lFlepa pludyp)fi50qlpCep lddoctcyptnaFp, apuli p bac p GalFipœmFalieBpmteizr aFipmtemaFep FaBlFdœBpmte lr œl ctceptbpmFthipc o, pbzeBomodlupFaiodzaip, lipLaaepFaf htFadp(x, zRulyp)fi51qlpv, aFahtFayputc pt*cmoGpledpr tFapaendFter aef luGpbFaaeduGpmtr htzedipliplepluaFel cmaptpm,ar omlupbzeBomodlaipc lip LFtzB, ptp, apbtFahFte IpDr teBp, ar yp2NDxp(BaeaFluGpFaBlFdadplip ilbaqple dzeBlupmtr htzedipizm,plipHTp, lnapLaaepzFaht Fadp(x, zRulyp)fi517pxtautfEtGí ipa pludyp)fi59qlp, zaptp, adFpLFtldpihamFzr ptbplmonoGp lBlœiphule phl, tBaecmpbzeBoqledpœeiamifhai iypHTp, lnapLaaepziadplip le dzeBlupœeiamomodlupFahauuae yple dbaadle pledptndchtiocteplaaFFae p

- 8reommonurUroy8mmmm

Faul onap Fleimfch ctelupanauptbpx *) DpBaeaptbpri2hUnU2huor2lyur T59@gO@p clipdamFaliadpbPtr pfiI@5ptpfilK/Kpc , aepzioeBp@94 pr oeor zr ppe, dLcf tFGpmtenae Fl ctep(A Gwqptbp ovonuorm, yuHlnorHTptldadfeletuchtitr aiIp

v, aple dLlmaFdupr am,lecir ptbpHTiptldadfeletmlFFoaFip, lipLaaep oenai dBl adIp(ep)fi59ypwzopa pludpoenai dBl adp, aple dLlmaFdupr am,lf ecir ptbpuchtitr aipmte loeoeBpmtnapHTplBloei pNo)h yl2122, iro, nUirep vtbzp(wzopa pludyp)fi59qlpDpiauamonaple or omRtLdupl monoGpbtFpNo)h yld 2122, iro, nUirLGpr al eiptbphtFafbtFr oeBpt*oeiptplmonl apmtnaptoup Fauaiap bPtr puchtitr aipc lipet onadIp(epblmyp, apuchtitr aipdodpet pbziap c o, pLctutBomlupr ar LFleaipLz pFauaiapmtnaptoupbaFpt*oeipiamFa ctepLGp , apLlmaFdIpDLtz pjjI1@4 pFadzmoteopephthzul ctepc liptLiaFnadpoep No)h yl2122, iro, nUirlbaFp)/p, ptbpuchtitr ap Fal r ae IpOtcanaFypetp Fadzmotepc liptLiaFnadpoepci2hUnU2huor2lyurhthzul ctepl baFpuchtitr ap Fal r ae pdzaptp, apblmp, l p, aiapLlmaFdpdodpet piamFa apt*oeipledp , aFabtFapmtnaptoupmtzudpet pFalm,p, ar p(wzopa pludyp)fi59qlp

v, aple ct*odlle pledple or omRtLdupl monoeaiptbpHTfutldadpeletf mlFFoaFipc aFapbtzedptpLapmteiaFnadpbtFputeBphaFctdIpGep, oipmte a* yp, ap h, Giomtm,ar omlup. zluoeaiptbpbFai, fmz pLlelelipoepmte lmpco, pbFaap Ptiar lFGpHTypPtiar lFGptouphuzipr zmodBapledpPtiar lFGptouchtitr aip caFapanluzl adpdzFoeBpjpdlGipi tFlBapl p9pjwp(DuoR, ledc%tzhlaoyp)fi59qlp xaeitFGpleluGidipFanaluadp, l puchtitr lupbtFr zul oteipc lipr tFapabPf mnae poepae, lemoeBp, ap zluoGptbpbFai, fmz pLlelelipledpa* aedoeBp, adFp i, aubpudaap (DuoR, ledc%tzhlaoyp)fi59qlp fldRacciayp , apmtenaFlotep tbp mlFdlr tr pHTptp- flwp(-l, Fpa pludyp)fi51qpledpeletuchtitr aip(-l, Fp a pludyp)fi5jqpBFal uGpmteiaFnaipoiple ct*odlle pledple or omRtLdupl monf ooaiptFpteBphaFctdIpv, ap flwpi, tc adpA Gwpnluzaipi Ftzedp55fifipuBSr uptFp Lt , pLlmaFdplbaFp0fipdlGipmtr hlFadptp, l ptbpnlFdlr tr ptopar zuicteIp v, apA Gwpnluzaipc aFapl Ftzedp//fifipledp))fifipuBSr uptFpNo)h yl2122, iro, nUirledpci2hUnU2huor2lyupFaihamonauGp(-l, Fpa pludyp)fi51qlp

v, apLctutBomlupl monoGptbpeletmlFFoaFipaemlhizul adphule ptoaipc lip lbbamadpLGptbaFl oeBphlFlr a aFipledphlFomaipoeBFadoae iIp(ep)fi5@gp At, lr r adpledp, oipmtc tFRaFipdahomadp, l plp, oB, ple ct*odlle palPf mnaemGptbp- ubUyyoriovusorHTfutldadpr omRthlFomaiphFahlFadpLGpihFlGp dFGoeBphFtmaiipc lipliitmol adpco, p, oB, pFl ctptbpc lupr l aFdup(0fi4qyp r adozr ptbptoupmtemae Fl otep(5fi4qpledptc poeua par haFl zFap(5Kfip'wqp (At, lr r adpa pludyp)fi5@qlpzF, aFr tFaypEl88l8pa pludp()fi51qpoenai of Bl adp, aple or omRtLdupl monoGptbpxfl- paemlhizul adpc, bUuor2ond l)h yyovor HTplBloei p Noyml aUyyor v)hupr giUtlmlaoir oUh, bualiopr No)h yl2122, iro, nUirledpLoatutoroy6u2oairzieBp or afRoupr a , tdiIp Naizuipdar tei Fl adp, l p, apxfl- pbtFr zul oteipc aFapabamonapoep2Flr p eaBl onapLlmaFdpledpbzeBqpRouoeBypaihamoluGp, tiapmte loeoeBpi alFomp lmodpmtr hlFadptpBuGmaPtupr teti alFl ap(El88l8pa pludyp)fi51qlp

GepFamae pGalFiyp, apziaptbpHTp, lipar aFBadptp, apbttdphlmRlBoeBp oedziFGplipFahtFadpLGpianaFlupctFRpizdoaip(wzopa pludyp)fi5Klyp)fi5KL7p HeBaupa pludyp)fi5@7pflozpa pludyp)fi5@qlpwoeelr tepHTypRetcepbtFpoiple of r omRtLduphPthaFoaiyp, lipLaaepbtFr zul adpoepm,otileShtuGplmompl nodp PLaFipbtFpbttdphlmRlBoeBplhhuoml otepliplepluaFel onapbtFpiGe , a omp m,ar omluipdzaptpmteizr aFpmtemaFeiptnaFpbttdpilba Gp(flozpa pludyp)fi5@qlp Naizuipi, tc adp, oB, pteBf aFr poelmonl otepFl aipl Bloei pi2hUnU2huor2lyur ledpNo)h yl2122, iro, nUir(flozpa pludyp)fi5@q8woeelr tepHTpc liphzF, aFp btFr zul adpoepuchtitr aipledpai adpbtFpoipA a , omouoefFaidi le pNo)h d yl2122, iro, nUirle oLctPur phPthaFoaiptep, apizFblmaiptbpdobaFae pr lf aFdlupuoRapi loeuaiipi aaupBlz8aypeGuteprar LFleaypledpetefc tnaep hlLFomip(wzopa pludyp)fi5Klqlp Naizuipfanaluadplpi oBeoPmle pae, lemar ae ptbp , aple ofLctPur plmonoaipledplmonap or apbtFpuchtitr afaemlhizul adp moeelr tepHTpc, aepmtr hlFadptp, apbFaaptoUptFpoeilemayp, apmtze ip tbpnd LuapNo)h yl2122, iro, nUirocepLctPur ipbtFr adpc aFapFadzmadpLGp)Ifi1p ledp)I1)ptBiptepBlz8apledp/I99pledp9I/)ptBiptepetefc tnaepblLFomip lbaFpPnapdlGipFal r ae pc o, pbFaapmoeelr tepUpledpuchtitr apmte loef oeBpmoeelr tepUpyFaihamonauGp(wzopa pludyp)fi5Klqlp Ddd octeluGyp, ap le dLlmaFdupabbampbpilundpHTpeletuchtitr aiplBloei pNo)h yl2122, iro, nUirLctPur ipl lm,adptepr oRpmte loeaFpc lipa*hutFadpLGpimleeoeBp auamPtepr omRtimthGpledpmteltmlupliaFpimleeoeBpr omRtimthGpledpFaizuip Fanaluadp, l pilundpHTpeletuchtitr aip,lnap, oB, ple ofLctPur plmonoGp lBloei pNo)h yl2122, iro, nUirLctPur iptepr oRpmte loeaFp(wzopa pludyp)fi5KLqlp: zF, aFr tFaypHeBaupa plup()fi5@pet onadp, aple or omRtLdup

ht ae dlptbpuchtitr afaemlhizul adp, Gr tupledpmlFnlmRtuplBloei phttuip tbpNo)h yl2122, iro, nUirledpNoymlaUyyorld, aFadptpiloeuaiipi aaUp

0838 GUtu2aoyrzUjtr

0838B8 Aavumu2nl6woyro2usuvr

v, apr lelBar ae ptbpLlmaFdupoebamotepcipFlcioeBpiaFctzipmtemaFep lmRtiip, apButLaIpv, apar aFBaemaptbpr zudfdFzBfFaidi le pLlmaFdupbl , f tBaeipledp, aplLouoGptbpr omRttFBledcir iptptbFr pLctPur ipFaizup, oB, p tuaFlemaptp, oB, plr tze iptbple dLct omipledptplup, ti pdabaeiapr am,f lecir ip(Aledlupa pludyp)fi5/qlpllmadpc o, p, cipm,luaeBayp, apimoae ci ip , PtzB, tz p, apctFudpialFm,ptFpeac ple or omRtLdupl Bae iypizm,pliphule p tcaipLliadpbtFr zul cteipc, om,plFapamtetr ompledpamtutBomple or omRtLdup l Bae i7pledpmtr Loeap, ar pc o, pelet am,etutBGp(fldRtipa pludyp)fi51qlpGep , cipmte a* yp(Cleeoauopa pludp()fi55qpoenai dBl adp, apabbamipt bpmlFnlmRtufp utldadphtuGp(ulmodafmtfBuGmtuodaqfeletmlhizuaiptep, apncimtaul i ompbalf zFaiptbpNo)h yl2122, irUutUrmtuir LctPur ipLGpF, atutBomlupr alizFaf r ae iIpNaizuipFanaluadp, apLlouoGptbpmlFnlmRtuptldadpeletbl Fomaiptp Fadzmap, apaul omoGpledpr am,leomlupil LouoGptbphFabtFr adpLctPur ip c , om,poepzFepaelLuap, aphaea Fl otepthple or omRtLdupl Bae ipoe tp, ap daahpmtFaptbpLctPur ip(Cleeoauopa pludyp)fi55qlp fldRtipa pludp()fi5Kqpai adp , aple dLctPur plmonoGptbphtuGpulmodapeletbl Fomaipaemlhizul oeBp uar teBFliiphTplBloei pLoatutoroy6u2oaipci2hUnU2huor2lyurNo)h yl2122, iro, nUirledpgiUtlmlaoiroUh, bualio8Naizuipi, tc adp, oB, aFple ofLctPur p abbampbtFpLoatutoroy6u2oairledpci2hUnU2huor2lyurai adpi Fl oeiIpv, apmGtf t*omoGptbp, aphFahlFadpeletbl Fomaipc lipbzF, aFplelu G8adpledpFaizuip Fanaluadplp, oB, pmaupmdLouoGpledpBttdpBPtc , ptbp, zrlepmauip(fldRtip a pludyp)fi5Kqlpxzlia. zaeuGypoep)fi51yp, apilr apFaialFm,palrpai adp, ap le dLctPur plmonoGptbpmauzutiaplmal aph- sipmte loeoeBpao, aFpuar tef BFliiyphahhaFr oe ptFpmoeelr tepHTpledp, apFaizuipi, tc adp, oB, ple of LctPur plmonoGplBloei pLoatutoroy6u2oairledpNo)h yl2122, iro, nUir (fldRtipa pludyp)fi51qlpAlemteopa pludp()fi51qhPthtiadp, apziaptbpchtitr aip mte loeoeBpVh m, ir2o)uov, irHTpliple dLllmaFdufle ct*odlle pr tz , cli, p btFp, apFal r ae ptbpt FlupmlnoGpdcialiaiipv, apuchtitr aipc aFapLctmtr f hl dLuaypLuaptphFanae pt*odll onapi Faiipledpblnt Fpc tzedpFahldFpoepRaFf l oetnGaiIp v, adFp le dLllmaFdup lmonoGp c lip anodlaenadp lBloei p mtr r aeilupNo)vl2122, irioab, uairledpmlFctBaeompNo)vl2122, irm, voair ledpeo2l6o2uy, iro2tl)huy, ir(Alemteopa pludyp)fi51qlpxor odlFuGypsFoGlf dlFi, oepa pludp()fi51qhPthtiadp, apziaptbpht uGp(ulmodafmtfBuGmtuodaqfp eletbl Fomaipmte loeoeBpmtnapHTpliple dLllmaFdupiGi ar ipbtFpdae lup hzFhtiaipLGpFar tnoeBpLlmaFdupbl . zapledpFadzmoeBpdae lupdoialiaiIp wtebtmlupr omRtimthGpdar tei Fl adpizmaaiibzupdaunaFGpledphtioctept bp mutnaptoupt ldadfeletbl Fomaipoeiodapdae oelupzLzuaiIpGepl et , aFpc tFRp i zdGyp, aple ondFlupl monoGptbpNoavlyuaoruai, yonirHTptldadfuchtitr aip lBloei pOaFhaipior hua*pndPzifGhap5pc lipoenai dBl adp(klaue opa pludyp)fifi5qlpDu, tzB, p, apursunlrlmonoGptbpFaapt oupc lip, oB, aFp, lepuchtitr lup touyp, ap, oB, pil LouoGptbpuchtitr aipr lRap, ar plepoe aFai oeBpdaunaFGp iGi ar pbtFple ondFlupFal r ae 7p, aGpmtzudpLapldr oeci aFadpoepdFthiptFp tmzulFp aFha ompoebamoteybhlFae aFluGpbtFpldbziadpiGi ar ompoebamotei ptFp thomluGptepuhipledpr zmtuiapbFtr pBaupt FpmFalr pbtFr zul oteip(klaue op a pludyp)fifi5qlpzF, aFr tFaypQ, ltpa pludp()fi5@pp, oB, uoB, adp, apziaptbpxfl- p lipl pmlFFoaFpbtFp, apaemlhizul otepledpizi loeadpoe, lul otepdaunaFGptbp Gz*oeBmlBtpHTpbtFp, apFal r ae ptbpFaihoFl tFGpoebamotzipldoialiaiIpEaf iodaiphFtuteBoeBphzur telFGpFa ae otepzhptp)/p, plbaFpoe Fl Flm,alup ldroeci Fl otep tpFl iypGz*oeBmlBtpHTptldadfxfl- pae, lemap, apl Falp zedaFp, apmzFnap(D6wqpmluzaipLGp/I9–@@pbtudipmtr hlFadptp, apoe Flf Flm,aluGpdtiadpHTpituz otepledpLGp)9@-/01pbtudiptp, apoe Flnaetziu Gp dtiadpHTpituz otep(Q, ltpa pludyp)fi5@qlp

0838P8 Aavuyaboyro2usuvr

wteiodaFoeBp, aple dozeBluphFthaFoaiptbp ovonuorm, yuHlnorHTyp- lif iaFopa pludpdanautha dp. ovonuorm, yuHlnorHTptldadfxfl- ptpae, lemapoip lmonoGplBloei pAi)Uubuyy, irl2hno2U, iprAi)Uubuyy, iraubUnprAi)Uubuyy, irHos, ipr AyuUhaonuoriloyaupr1huD12lauoriloyaupr1ledp1huD1), iriylyauwhor(-liiaFop a pludyp)fi5Kqp8Naizuipi, tc adp, l p, apaemlhizul adptoupc lipr tFapabPmoae p , lep, aphFaaptoaIptFpoeilemayp, apAGwpbtFp, apaemlhizul adptoupt ep, ap

bzeBluphl , tBaeiptbpAi) Uibuyy, irl2hno2U ipr Ai) Uibuyy, iraibUnprAi) Uibuyy, ir Hos, iprAywUnaonuoril yoaupr1huD12ulauoril yoauproatr1huD1), irivlyl auwUhrc lip) fifiyp) fifiyp) fifiyp5fifiyp9fipl edp9fiphhr yp Faihamonau G7pc , oaapbt Fpzefp aemlhizul adpt oaypopc lip0fifiyp) fifiyp0fifiyp) fifiyp) fifipl edp) fifiphhr p(- lif iaFqpa pl uyp) fi5Kqlpx zF , aFr tFayp , apeletaemlhizul ctepae, lemadp , ap le dzeBluphPt haFoainpt bpmthl dcLl ptoupl Bl oei pLoattutor n, iUprGu2hl i) l n, mr 2oaipLoattutor) ono) iyl iurl edpVnu2hl) h vl am, 6n, mrc o, pA Gvj fip nl uz aiptbp) 9fiyp5lj 9yp@1pl edp5lj 9pµBSr flyp Faihamonau GlpCepl et , aFpc tFRpi zdGyp r omPt hl Fomuaipaemlhizul ceBpeu)) uoriutlutUrHTpc aFapbtzedpr tFapabPf mnae p, lepRa lmtel 8tuaypziadpl iphtioonapmte Ptuypoepa Fldomlceb pLoattutor oy6u2oaipLoattutorbyo6novopr Loattutor n, iUrl edpLoattutor) ono) iyl iurl(: aFf el edaipa pl uyp) fifi1 q9·

Namae uGypr leGpi zdoaipFaul adp, aptmnzFFaemaptbpi tr apdcialiaipuoRap aFl tBaeaiciypr z l ctepl edp, ahl tmauzul FpmlFmoetr lp tp , ap, oB, p a*htizFap tpl Jl t*oepc , om, pcipiamtedl FGpr a l Ltuoaipi Ge , aio8adpLGp t*oBaeomplzeBoapAi) Uibuyy, irHos, ipr Ai) Uibuyy, ir) onoiuu2, irl edpAi) Uibuyy, ir al muy, iIpfl t́ha8fr aeaiaipa pl up() fi51qpoenai oBl adp , apl e dzeBl upl edp l e dJl t*oBaeompl monoaipl Bl oei pAi) Uibuyy, ir) onoiuu2, irt bpNhua, irml yUr HTfutl dadpm, otilepel et hl Fomuai lpNaizuipi, tc adp , l p , aph Fahl Fadp el et hl Fomuai pl bamadp , apihtFa'ipBaFr oel ctepl edpndLouoGypdaul Gadp r Gmaudup BPtc , pl edpFadzmadpl Jl t*oephPtdzmoteIp

0838838 eorsu2toyro2usuvr

wzFFae uGypianaFl upFahtFip lipdar teiFl adp, apl Fnomodl upl monoGptbp eu)) uoriutlutUrHTpl BloeipFnl apt bpDadaipt(NvUblm uoroUb) vu yp, apdaeBzap namtFpc , om, pcipFaihteidLuapht Fpr leGpdcialiaiypl edpanaepdal , iypoep Pthomlupmtze FoainpuRapEFl 8oup(wl Fnl y, tpa pl uyp) fifi0qlpCepuFdaFpt pLtti poip ul Fnomodl upalbamypslzul pa pl up() fi5fiqpdanautha dpleBomtpBzr pgpm, otilep elethl Fomuaipmte loeoeBpeu)) uorNtlutUrHTpl edpnenai oBl adp, apparsuslr lmonoGptbp) fip, oRdpoei lFpNvUblm uoroUb) vu nl Fnl aIpNaizuipdar teiFl adp , l p , apul Fnl upr tFluoGpc liphFthtFoctelup tp , aptoputldoeBIp: tFp oei lemayp, apilr huaptoqpleBomtpBzr fm, otilep5g) fipi, tc adp, aputcai p utldoeBp(0104 qpl edpmteia. zaeuGp, aputcai pr tFluoGypco, p9) 4 plbaFp) /p pl edpKfi4 plbaFp/1p, Ipxlr huaptoqpleBomtpBzr fm, otilep5g5fipi, tc adp 19pl edpi) 4 pr tFluoGplbaFp) /pl edp/1p, ypFaihamonauGp(slzul pa pl up() fi5fiqlp xor oul FpFaizuipc aFapbtzedpLGpDLFazpa pl upc , aepi zdGoeBp, apl Fnomodl up lmonoGptbpeu)) uorNtlutUrHTputldadfmli, ac pBzr pgpm, otilepeletf hl Fomuaip(DLFazpa pl uyp) fi5) qlp

0838K8 Aauu, mlnro2usuvr

v, apl e ozr tFplmonoGptbpFl eRoemaeiapl edpr GFF, ptoputldadfxfl- pc lip liiaiiadptepO)) pzr tFfLal FoeBpr omapl edpFaizuipFanaluadpl epae, lemaf r ae poepl e ozr tFpalPmoaemGptbpxfl- pc , aepmtr hl Fadptp, l ptbpizihaef ictepl edpmGmtda* Foeapoemuzictep(Vl eByp) fi5) qlpv, apoe, cLoctepFl aip c aFap05I) 0yp0/I15pl edp/0IKK4 ptFptoupizihaeicteyptofβfmGmtda* Foepl edp tofxfl- ypFaihamonauGlpxor oul FuGypwaudpa pl up() fi50qpbtzedp, l pdhtitr lup btFr zul cteipaemlhizul oeBpLaFBl r t pHTpi, tc adpl pBFal aFpFadzmoctepoep , zr lepxOfxZ9ZpeazFtLul i tr l pmauipnd Louo Gpl edpl pBFal aFpoemFal iapoep maupr tFluoGpl pnl Fotzipmtemae Fl cteipl edpor aphtoe ipl pmtr hl Fadptp , adFpbFaapdFzBpmtze aFhl FiIpxlr apFaizuipc aFapl uitpFahtFadpLGp a teqp a pl up() fi5) qpc , aFapA flkipl edpx6kipmte loeoeBp oavhlx y, mnuabl oii, u6or c: rc aFapr tFapalPmoae poepFadzmoeBp, apnd Louo Gptbp Butr l pmauip, lepbFaap HTIpCepl et , aFpc tFRpi zdGypdtmtil, a*laetompl modpc lipaemlhizul adpoep uchtitr aipl edpoenai oBl adpbtFpoiple omlemaFpl monoGpl edpFaizuipi, tc adp lpi FteBpoe, cLoctepthpl; zp, aldypeamRpi. zlr tzipmlFmoetr l pl edp/pv5p LFal i pmlemaFpmauipoepparsuslrmzuzFaip(Dul lFBpa pl uyp) fi5Kqlpepfi50ypx, qp l edp, oipmtc tFRaFipdanautha dp- flwpmte loeoeBpβfauar aeapl edpoenai of Bl adp, adFph, lFr l mtRoea omiyple of zr tFpabbamiypl edpmaetzipdFFol ctep (x, qpa pl uyp) fi50qlpCep , oipi zdGypβfauar aeaf- flwpBPtzhiptFpiluoapituz ctepBPtzhypc tpdl Gip lbaFp , apoeUamoteIp Otcanafyp zefaemlhizul adpβfauar aeapmlziadp r lmPtimthompadar lpl edpaFG, ar lpl p, apoeUamoteipoaIpDddoctel uGyp, ap h, lFr l mtRoea ompi zdGpFanaluadp, l p, apl nl oul Louo Gptbp, apβfauar aeap c lipoemFaliadpLGpbtFr zul ctepoe tp- flwpioemap, aGpi, tc adp, oB, aFpD6wp ledpiutcaFpmual Flemapl ipmtr hl Fadptpauar aeapoeUamoteIpr zF , aFr tFayp , apl e of zr tFpalPmlmGptbpβfauar aeaf- flwpc lipiBeoPmte uGp, oB, aFp, lep , l ptbpauar aeapoeUamoteipc o, poe, cLoctepFl aiptbp0/I0Kpl edp) /I554 yp Faihamonau Gp(x, qpa pl uyp) fi50qlp

08K8 LlimUu2rzUjtr

Vtzedp, aluoeBpoipteaptbp, apr ti pmtr huoml adph, Giotut Bomluphf t naiiaiIpCedaadypoiizapFaBaeaFl ctepae, lemar ae pledpoebamoteph Fanaef ctepl FapRaGpblmtFip tpFadzmaphl oepdoimtr bt Fypledpimlfpbt Fr l ctep (W, Ftr qpa pl uyp) fi51qlpxanaFl upm, ar oml uphFtdzmip, lnapLaaephPthtiadp btFpc tzedpFahl oF7p, tc anaFyp, adFpziaipl Fapuor oadpdzaptp, apmtr huoml f ctei pledpioda palbamip(szFt, opa pl uyp) fi5) qlpNamae uGypFaial Fm, aFip, lnap hl odpBFal pl ae ctep tp, apalbamonaeaiiptbphule ptouip, leRiptp, adFp le ct*odl e ypl e or omPt Ldupledpl e ofoeJl r r l tFGphFthaFoaip(Nl z pl edp %l Fzhhl Gouyp) fi5/qlpCep, oipmte a* yp2, tdFl qpa pl up() fi5j qpoenai oBl adp , ap, aFl haz ompalbamptbp- flwpmte loeoeBphahhaFr oe pHTptepoebamadp ctzedIptFparsuslri zdGypctpbzuf, omReaiipctzedipc o, p, apio8aptbp9p r r pc aFapmFal adpoepalm, pr tziapledpoetnzul adpc o, pgiUjtlmlaoiroUnd , bualion l edpNvo) h yl 2l 22, iro, nUj i8Naizuipi, tc adp, l phahhaFr oe pHTfp - flwpmtzudpl mnauaFl apc tzedp, aluoeBpoep, apoebamadpc tzedpr tdaupLGp Fadzmoe Bp, aptlupLlmaFdupmtze ypledpoemFal ioeBpeatnl inzul Fo8l cteyp PLFtLuli poePuFl cteypmtul Baepdahtiocteyp Fafaho, au8l cteypledpuanauip tbp2: f) pl edpH2: pr N- Dpa*hFaiictei pc , aepmtr hl Fadptpmte FtupBPtzhIp xor oul FuGypQ, leBpa pl upFaht Fadpl pdamFal iapoepv2: f65ypA A sf5ypmtul Baep(Gp l edpmtul Baep(CQpanauipl edpl epoemFal iapoepl ht h ticipnauiypnl ihl iap–0pl edp —j puanauipl baFpl hhuoml cteptbpeub, ivu2, mr2h, oaxul abr HTfutl dadpuchtf itr aiptepbtFr adp, GhaFPth, ompimlFipoep, apFl LLopal Fpr tdaup(Q, leBp a pl uyp) fi5) lqlpzF , aFr tFayp- flwpLl iadptepteptuonaptopledputl dadpc o, p azmuGh ziptophFtr t apc tzedp, aluoeBpoepFl pLzFepr tdaupLGpnauphFtudf aFl ctepae, lemar ae ypBttdpLctld, aictoypnaupLctmtr hl cLouoGpl edp le or omPt Ldupht haFoaip(xl ht Fotpa pl uyp) fi51qlpCep) fi51ypsona l pa pl up hFahl Fadpml FLthtufBauipmte loeoeBp , Gr tuptldadf- flwpliphFtr cioeBp lhhFtlm, pbtFpFal oeBpiRoepoeJl r r l tFGpldi tFdaFip(sona l pa pl uyp) fi51qlp Cep, adFpi zdGyp, aGpoenai oBl adp, apl e cfoeJl r r l tFGpalbamiptbp, Gr tufp - flwpBauptepc tpr tziapr tdauigp, apmz leatziplmz apoeJl r r l ctepr tdaup oedzmadpLGpmFt teptoupledpal Fpadar lpr tdaupoedzmadpLGpl e , Fl ueIpNaf izuipi, tc adp, l p, Gr tupaemlhizul adpoep- flwphFtnodadpLa aFpl e cfp oeJl r r l tFGpalbamp, lepbFaap, Gr tup(sona l pa pl uyp) fi51qlp

w, Fteompi Roepoebamotei poepor r zetmtr hFtr oiadphl oae ip, lipLamtr ap lepor ht Fl e phzLuomp, alu, pciizapLamlziap , aGpmlepLamtr apiaFotziyp Faizuoe Bpoepoenl ionapoebamotei p(xna uom, eGpa pl uyp) fi59qlpCep, oipmte a* yp TFlepa pl up() fi50qpdanautha dp, GdFt Bauipmte loeoeBpAaUih, mrbnosUjyUhir topae Fl hhadpoepuchtitr aiptpFal phzeBl upoebamoteipoepiRoeIpv, apparsuslr Fauaiap Roea omipi zdGpzioeBp: Fle8pddbzioteprnauipi, tc adp , l p , ap daioBeadp, GdFt Bauiptutc pl p8aFtptFdaFpRoea ompr tdaupl baFpl phaFotdptbp , Faap, tzFipbFtr p, apLaBoeeoeBptbp, apa*haFor ae p(TFlepa pl up() fi50qlp A tFatnaFyp, GdFt Bauipmte loeoeBpazBaetupae Fl hhadpoepao, aFpi al Fompl modfp tFpmtr hFotu-xfl- pc aFapdaioBeadpbtFpahodaFr lupl FBa oeBptpFal phzeBl up oebamoteipoepiRoep(2l FBpledpxoeB, yp) fi50qlpc xrsuslr haFr al ctepledp Fa ae ctepi zdoaipbtFpl ur tedptopituz ctept bpazBaetupledp, Faap Ghaiptbp , GdFt Bauipmte loeoeBgpazBaetufi al Fompl modfxfl- ypazBaetufmtr hFotufxfl- p tFpazBaeteu-, GdFt*GhFthGufβ–nGmtda* Foepmtr hua*7pc aFapail Luoi, adp c o, phzup, omReaiip, zr lepmldlnaFpiRoepzioeBpr Fle8pddbzioteprnauIpNaf izuipFanaluadp, oB, aFpl mnzr zul ctept bpazBaetupoep, apahodaFr oip(K) IK9p l edp9) I1KpµBSmr)*PtFpazBaetufi al Fompl modfxfl- pledpazBaetufmtr hFotufp xfl- ypFaihamonauGopc , aepmtr hl Fadptp, l ptbplur tedptopituz ctept bp azBaetup(0I/9pµBSmr)qpledpazBaetu-, GdFt*GhFthGufpβ–nGmtda* Foeap mtr hua*pj I@@pµBSmr)qp(2l FBpledpxoeB, yp) fi50qlp

wzFFae uGypkTpa*, cLoplpBFal pmtemaFeplipFl c pr l aFduipoep , ap danautlhr ae ptbpel zFlupledpamtfbFoaeduGpmtir a omipdzaptp, adFpLaeaP ip oemnzdoeBpl e ct*odl e ypr toi zFo8aFipledpar tuoae iphFthaFoaiIpCepl ddof ctepy, aGphFtnodapiRoephFt amoteplBl oei pFal moaapt*GBaepihamoaipledp hFanae pt*odl onapi Faiipf(; , l nl r l epa pl uyp) fi5/7pxl Flbpa pl uyp) fi5fiqlpCep tFdaFptptL loepalPmoae pbtFr zul cteipc o, p6kphFt amoteph aFbtFr l emap

- 8reommonurUroy8mmmm

vechmrntion ogMol setinR IntereFt

v, apl z , t Fipdamul Fap , l p , aGp, l napet pRet c epmtr ha œBpPel emdlup œ aFai ipt FphaFit el upFaul ct ei, chip, l pmt z udp, l nap l hhal Fadpt pœ Jz aemap , apc t FRpFaht F adpœp , ciphl haFlp

) egerenceF

DL.dz ul , ypcIV IypD, r ad yp%xI; Iyp% od, aFyp%t Iyp) fi51Ipsu le paiiae d upt oiplipBFl œp hPt aml e ipl Bl œi pl *huU) Unhort l muaUor*(wt uat h aFl gEti Fom, odl aqodz Foe Bpi t Fl BaIp vdRFopWfpz Fapxmdp) 0yp'5–//Ip

DLFazyp ITIA IxIypTumadFlypHI: Iyps l zul ypOIwIEIyps l zul ypNIwIA Iyp) fi5) Ipw, ot ile Smli, ac pBzr p el et Bau ipt Fpaiiae d upt oapaemlhizul ct eIpwl FLt , GdFlpstuGr IpUjy5) (@@-5) 1) Ip higSSp dt dt FBS5 fil5 fi5 KSUlml FLht ul) fi5) Ifi/Ifi/1Ip

DdaypA IypD c lypV IypOl iile ypA Iypxl uar yp Iyp l FB, l uGyp IxIypCLFl , or ypxIyp) fi59IpEct ut Bomlup l mono Gpl ed pPaudphaFidi aenapt bgUjonbl au, mrbmosUlyUhir(2 aFl ed ual gp2 aFl ed mal aqp ut l dadpit uodpuchodpel et hl F omaip(xfl- iqut egrhvhl numoUbrl) Uh2, yUjyor(QauaRpf(s vA op (flahodt h aFl pg2 auam, odl aqlpCe IpWfpxmdpNail p'yp95/–9) fiIp

D, il aqpxIA Iypvl ua LcfW, Ft r oyp%IypDr t l Ladœ GyP2 Iyp) fi) filpCe iamomadl upl mono Gpt bp ht uGml hFt ul mt eapel et hl F omaipdamtFl adpr o, pm, ot il epmt e l oœ eBpc t paiiae d upt oip l Bl œi pvRdLt uœr pmt elbzizr IpCe IpWfps ai pA l el Blp, higSSdt dt FBS5 fil5 fi1 fiSp fij K(@fi1(@/I) fi) fil51) 91(@9Ip

Dul FBypDIypWFdl eyp- IZIypkaF, t abypWWF: IypA a iaul FypWA Iypx t Fr yp2 Iyp%t RypNIWfyp) fi5KIp ; t mt il , a*l aet ompl mdpudht itr ai pht Fpl FBa œ Bpm, Ft eompœ J l r r l t FGpdci al iaipl ed p ml emaFipgd epœ pmo Ft pl iiaiir ae IpCe IpWfp l et r adomeap55yp9fi) @-9fi/fiIp

DuqpEIypDufV l Lauqp IDIypx, l r iypxIypD, l r l dypDIyp%, l eypxIDIypDec l Fyp Iyp) fi59IpHiiae d upt oip ziadpœ pl Ft r l , aFl hGapDpiGi ar ompFanoac IpDid eps l mlpWfpv Ft hIpEct r adIp9ypKfi5–K55Ip

Duqp INIyp4ufDel eGyp DIA Iyp) fi5@pOGht uchodar ompl ed p, Ght m, t uai aFt uar ompabbampt bPt iauap (*Ot6ti2, iri o6t omuwor*fllqpiaadipt ouœ pe pa*haFor ae l upr l uapFl ilpWfpT uat pxmdpKKyp'5–/j Ip

DuR, l ed%t z hl aogpA Iyp) fi59Ipfldht itr l upl ed pad dLuapmt l œ Bpl ipmt e Pt upFauaiapdauonaFGp iGi ar ipt Fpaiiae d upt oipgpmt r hl Roi t epl bl hhuoml ct epl epi t Fl Bapudapt bpFai, fmz p Ll el el Ip zl up Diiz Flpxl blpwPt hIp t t dip@pt5@9–519Ip higSSdt dt FBS5 fil0j) fiSp ´ Dx) fi50Ifi) j @Ip

Duaeypv IA Ixpwzuoiys INIyp) fi50Ipfldht itr l upl Fz Bpdauonal Fpi Gi ar igbPr pmt e nah pt pmaœ oml up l hhuoml ct eIpDdnIp, Fz Bp, auonIpNanIpK9yp0K–/1Ip

Dur aodl ypWxIypWi8z Fypfl yp t e l ypA Iwlys l aiayp9dypxonl ypwIE Iyps t , ur l eeypDINIyp2z aFPaiypxIp xIypEanRypNIwlNIyp) fifij IpT ofLl iadpel et hl F omaipmt e l œ e BpUaFel onapnaBa l Luapt oaip (BFl hapiaadpt oapt edpl ur t edpRaFeaupt oapgs Fahl Fl ct epl edpmj Fl l maFœ 8l ct eIpfll IpDr IpWfp s , l Fr Ip) 1yp5K9–5@ Ip

Dur t zi l lIypOIDIypDui , l c i, ypA IDIypw, dRypQIyp) fi5@pvam, e oml upl i ham ipt bphFahl Foe Bps H2 fp s fl2 Dpel et hl F omaip l ipml FFoaFpht Fpm, ar t , aFl haz ompl Bae ipLGpel et hFamohol ct ep r a , t dIpCe IpWfps , l Fr Ip900yp) (@9–) 1/Ip

De t ect uoyp2 Iyp t e l eaaul yp2 IypHmp, anaFFœ Bl Fl GypxIyp, aul r l FaypDIs IfIlyps l zua oyp2 I: Iyp El Fnaut i ypv Iyp) fi) fil ps t uG(ul mompl mdpel et ml hizuaipmt e l œ œ Bpuar t eBFl iipaiiae d up t ophtFphti , l Fnai pdamlGpmt e Pt ugpRursunl rl ed pursul ranl uzl ct epl Bl œi p h, G t hl , t Baeœ mpbœ Bdp t t dpw, ar Ip0) Kyp5) Kj j @Ip

Dza8t nl ypfl lyp- l Ul Fypl Dlyp%t zFGypA Iyp t z Fr ae œ ypxIyp2 Fad Baf2 aFBaiypOIyp) fi) fil p De dLl maFdupl mono Gpt bpFaapt Fpaemi hizul adpiauamadph, ae GuhPt hl et odipl Bl œi p *ci2hUnUhuor2Iyurl ed pNo) h yl 2l 22, irUjut Unmut ul* IpWfp Dhhu lpA omRt Lot ulp5) 1yp@5fi–@ fiIp

DnaFœ l yp Hlyp Duár l eeypHlyp) fi50IpHemi hizul ct ep t bpuor ae l FGpLot l mono apt oip t bp, apEl dRl up fll Rapl Fal poe t ph Ofi aeio onapr omRt fpl ed pel et hl F omaipfIV v pfp t t dpxmdpvam, et up90yp) (@5–) @@p higSSdt dt FBS5 fil5 fi5 KSUluc I) fi50Ifi51fi) fiIp

D8d8opA Iypflop Z Iyp%t zyup- IypDLLl iht zFFHdypDIyp) fi5j Ipx zdGpt bp, aph, Gi omt m, ar oml up hPt haF oai pt hpPi, pt oapt uodpuchodpel et hl F omaipœ p, aphFaiaenapt bhl ur o ompl mdpl edp . za Fma œ IpWfpDBFomlp t t dpw, ar IpK(@pK(@5–K@j Ip higSSdt dt FBS5 fil5 fi) 5Sl mi Ip Ul mi1 Lfi)) /KIp

D88opWfypDza8t nl ypfl lyp l eUfzyps Iyp t zFr ae œ ypxIyp2 Fad Baf2 aFBaiypOIyp) fi51Ip dFi p anl uzl ct epl bpdFz Bfœ fmGmat da* Foe fœ fuchtitr aipl ipl epaemi hizul œ BpiGi ar pht Fp eaPt uodt ulp t t dpw, ar Ip) 99yp0j j –/fi/Ip higSSdt dt FBS5 fil5 fi5 KSUlp ht t dmp, ar I) fi51Ifi) Ifi99Ip

El dal yp2 IypGl el ypfl lypEl dal yp IypF ypwIypA aB, al ypDIyp) fi59Ip6 iapt bpnl Fot zipmaBa l l uapt oaipœ p daiœ Bœ œ Bph, t t hFt amonapel et i Fz mz Fadpht Fr zul ct eipht Fp6 kphPt amot epl edp le ot *odl e pl mono GlpCe dIpwPt hIps Pt dIpK(@pt51–) /Ip higSSdt dt FBS5 fil5 fi5 KSUlp œ dmPt hI) fi5/I5) Ifi/j Ip

El dFypV IypDi Ll , l eypDIpHlypA oul doyp%lypEl Fl Ra ypDIypDBzi oyp2 IypDB, lyp IypHFFl m, odypDIyp : aiiopOIypHdui il FoypDIyp) fi51Ips t uGp(efmlhPt ul mt eaqpel et hl F omaipt l dadpc o, p œ dt r a , l nœ pl edp- *ubUjyorNousor*fllpaiiae d upt oph Fp, apt hom lup Pal r ae pt bp œ J l r r l t œ IpWfp Fz Bp, auonIpxmdpvam, et up/Kyp) 0/–//) Ip higSSdt dt FBS5 fil5 fi5 KSUlp ul di I) fi51Ifi9 If)) Ip

El dFypV IypA oul doyp%lypHldl LFl ypNIyp aiiopOIypHul oil FoypDIyp) fi59IpHul Lt Fl ct epl bp el et hl F omaipmt e l œ œ Bpœ dt r a , l nœ gDFBl ept ophtFpFl eidaFr l uptml upl edpmt ir a omp l hhuoml ct eIpWfp l et r l aFIp) fi59yp5–j Ip higSSdt dt FBS5 fil5599S) fi59Sj 09/0j Ip

El ayFHl%lypflaaypxIWlyp) fifi1IpA omRt aemi hizul ct epl bpl nt ml dt pt opLGpi hFl GpdFGœ Bpzi œ Bpr , aGp hFt aœ pl edpr l ut da* Foe IpWfpA omRt aemi hizul p) 9yp9/j –9Kfi Ip higSSdt dt FBS5 fil5 fi1 fiSp fi) K9) fi/fi1 fi) fi(@K1) Ip

El B, aFoyNIypDFdl oypxIypA t l r ad8l daBl eypDIyp) fi) fil pw, l FlmaFœ 8l ct eypl e ct *odl e pl edp le oLl maFdupl mono oai pt bpm, ot il epel et hl F omaipt l dadpc o, pea uapiiae d upt oip : t t dpA al i Ip higSSdt dt FBS5 fil5 fifi(@Si55Kj /ffi) fiffifi(@1 ffiIp

El opwIypQ, ae BypWfypQ, l t ypfl lypw, ae ypfl lyp, œ t eBypOIypA nmaur ae iyp, IWfyp) fi5j l Ip, anaut hr ae pt bp t Fl upd aumaFGpxGi ar ipc o, pae, l emadpl e ct *odl e pl edpl e oml emaFpl mono Gpgpmt o*pi aadp t opl edp) fpmlPt aeapmt ut l dadpuchtitr ai lpWfpDBFomlp t t dpw, ar IpK(@pyfiK–/5/Ip higSSp dt dt FBS5 fil5 fi) 5Sl mi IUbml1 Lfi/1(@Ip

El opz, Iypflopwlypz Zypfl lypWdl eBypZIypV l eBypA Iypfl l eBypxIypfloz ypIyp) fi5j LIp, anaut hr ae pl edp m, l Fl maFœ 8l ct epthpit GLal ept opr omRt mlhizuaipar hut Goe BpRl PFœ pl edpit dœ zr p mliaœ el apl ipc l upr l aRdui Ipfl V vp555yp) 09–)/5Ip higSSdt dt FBS5 fil5 fi5 KSUlp uc I) fi5j Ifi9 lfi0) Ip

El ud or ypCIypvt el eopfl lypnt epQaiRl p%Faiiyp A INIyps aFadHpT umadHypV Iyp) fi5j Ipe*u) uoriut l ut Ur* aiiae d upt oapaemlhizul adpœ puchodpel et iGi ar pl ipl epl e ofml edodl pl Bae IpCe dIpwPt hip s Pt dIp5) @pp@–15Ip higSSdt dt FBS5 fil5 fi5 KSUlœ dmPt hI) fi51 I15 fil fiK/Ip

El eB, l r ypDI; Iypx l edci, ypA IA IypV l Rœ iypWfwlyp5j K9Ip dbzi ct epthpz eoml uae pt ei pl mPt iip , apl r aul aupt hpi c t uae ph, t ih, t uhodi IpWfpA t ulpEct up50yp) 01–) 9) Ip

El i, dRoypxIyp2, l eLl R8l da, ypEIypDGl ia, ypDIyp a, B, l eeGl ypWfypH, il eoypDIypDdzeyps Iyp) fi) fiLIp Hiiae d upt ofut l dadpel et i Fz mz Fadpuchodpml FFœ aFigpv, apa lbamipt bpuo, z odpuchodpGhapt ep , aph, Gi omt m, ar oml uphPt haF oai pœ pLanaFl Baipr t daui Ip t t dpEct imdp9yp5fifi9) Kp higSSp dt dt FBS5 fil5 fi5 KSUlLc I) fi) fil5 fifi9) KIp

El 8FoypxIyp%t FeypHl; Iyp5j @) Ipxœ Buap Lol GaFpudht itr ai phFahl Fadpc o, t z pit eoml ct eIp Ect m, cr IpEct h, GiIpDml pfpEct r ar LFlp) j 1yp5fi59–5fi5j Ip

El Gf efwt Fdl aR ypfl lypDuRt F l ypGypDHel ypfl lyp) fi5j IpDhhuoml ct epi bpit uodpuchodpel et hl F omaipt p or hPt nap, apa lbPmaenGpt bpl e oml enaFpdFz Bi Ip- l et r l aRdui pj yp'@/Ip

El 888 8ypEIxI: Iyp%, l r aea, ypEIyp- l r l 8opy- IypGHel, i, OpA Iyp, l nt t dqpj Iyp 2 t ur t, l r r l d8l da, ypxIyp) fi51Ipxt uodpuchodpel et hl F omaipmi FFGœ Bpc, *bUuor 2on l)h, yyovor*aiiae d upt oapgp, apet naupel et hl F omzul apiGi ar ipc o, pLPt l dfi hamPzr p l e or omRt Ld upl mono GlpfIa IpDhhuIpA omRt Lot ulpKKyp9fiK–950Ip higSSdt dt FBS5 fil5555Sp ul r 15) 11KIp

EadHt pdl pmt i lypxIyp zl FaypwIypEt zFLt eypDIGlyps œ, adPt ypDIwlypWFezl Fœ t ypA IGl- Iypk omae ayp DIp DIypEadHt fdl fmt i lypA IflIyp, au Bl dout ypGlyp) fi50Ipœ zuœ pht ae d upt Fpaemlhizul ct epl ed p mt e Pt uadpdauonaFGpt bpt FaBl et paiiae d upt oIp t t dpOGdPt mt ut odlp00yp5j j –) fiKIp , higSSdt dt FBS5 fil5 fi5 KSUlt t d, GdI) fi50Ifi0Ififfij Ip

EadHt pdl pmt i lypxIyp zl FaypwIzdd ypEt zFLt eypDIGlyps œ, adPt ypDIwlypvaFail ypDIypA t udI t ypA Iyp Gl LaupA IypWFezl Fœ t yp- Iypk omae ayp DIDIyp, au Bl dout ypGlyp, zl FaypwI l Fœ l ypflzul lypA Iyp) fi5) IpHbbampt bp, apr l Fœ piGi ar pœ p, apdauonaFGpl ed pœ pno Pt pLœ l mono Gpt bp r omRt aemi hizul adpt FaBl et paiiae d upt oulpWfp t t dpHe BIp55fiyp5j fi–5j j Ip, higSSdt dip t FBS5 fil5 fi5 KSUlt t daeBI) fi55Ifi9Ifi/0Ip

Eae, l Louai ypA Ix Ipxl ul , ypNIypIt zeœ yp0Iyp Pt zœ, ayp Iyp2 t t iae ypA I: IDIypA l r aFoyp Iyp) fi5) Ip De dLl maFd upl mono Gpt bpœ, o œ ypœ, ot il epl ed poipt ud Btr aFiphFahl FadphPt r pi, For hp i, aupc l i alp t t dpOGdPt mt ut dp) j yp'1–9KIp

Eoul ypDINIyp2z mœ t eaypwIypGl nœ, opEIypNdB, ai œ, opwIyp dFae8z t uopp IypEaFBt e8opA Iwlyp) fi5/Ip Hiiae d upt oaipt l dadpœ pel et iGi ar ipgpDpdanaut hœ Bpi Fl aBGpht Fpl pizmaaiibzup , aFl haz ompl hhPt l m, IpHnodaemafEl iadpwt r huar ae IpDuaFe IpA adIp) fi5/yp5–5/Ip

Et z RPt zHypA Iypt z aRadUdFa ypwIyps a dBe GypfI lypNl Rt t r l et r l el yp Iypw, ar l yp Iyp) fi59Ip Ect fPaP eaRGpt bpt Fl eBaphaaupc l i agpDpeac pmt emah pl l iadpt epœ aBFl adpBFaaepl edp it unae phFaapa* Fl mct ephPt naiiaipzi œ Bpzu Fl it zedpl ed pr omRt c l nap amp, eo zaipt p t L l œ paiiae d upt oaphtuGh, aet upl ed phamœ Ip6 uFl it eIpxt et m, ar Ip) /yp@–@Ip

wl ut ypWNIypwFl edl uapsI2 IypF'EPGl eypwIDIypNomRaypxIwlyp) fi59IpHiiae d upt oaipl ip le or omRt Ld uipœ pt t dpiGi ar ip- DpFanœ Ip t t dpwt e Pt up9/yp555–55j Ip

wl unt ypsIypNar zel epFlt ha8ypWFflypk oul fW t ypDut eit ypA IWfyp5j j @pt naup, GdPt h, ouomp m, ot il ep- ht uGa , Guaeapt *odapel et hl F omaipl ipht Pt aœ pml FFœ aFl IpWfpDhhuIps t uGr Ipxmdp K0yp5) 9–50) Ip

wl r ht ypwIp, ayps aFadHypsIypA l Fdl ypvIypwt i l ypOIyp2 z aFPaiypxIxIypNot iypDI; IT Ipu t Fai ypOIyp) fi5@pl et aemi hizul ct epthpm, dpi aadpt opœ o, pm, dpr zmul Bap(*Noysiomui) oaUzorfl*lqpl ip c l upr l aRdugpm, l Fl maFœ 8l ct epl edpi l Louo Gpanl uzl ct eIp t t dpw, ar Ip) 0/yp5–j Ip , higSSdt dt FBS5 fil5 fi5 KSUlt t dmp, ar I) fi5@fi/1590Ip

wl t ypZIypQ, t zypV Iypflop Wfyp Ozl eByp, Iyp Zzl eyp Zl ypfl oe ypfl lyp) fi5 KIps Fahl Fl ct epl ed pi l Louo Gp anl uzl ct epthpamœ pmt l adpBl ul eBl paiiae d upt oapuchtitr ai lp Œ ep) edp Œ aFel ct el up wt eba Faemapt epDFmp, oamz Fl ypwonapl edpOGdFl zumipHe Bœ aaFœ Bp(GwDwOHp) fi5KqpsFahl Fl ct eIphhIp) 19–) j fiIp

wl FeadPt ypOIwl: Iypvt et eypNIk Iyp2 Pt iit ypwlNI: IypOzLœ BaFypA I; Iyp) fi50IpHemi hizul ct ep ablPmaenGpl ed pt *odl onapi l Louo Gpt bpJl *iaadpt opr omRt aemi hizul adpLGpi hFl GpdFGœ Bp zi œ Bpdd baFae pmt r Lœ l ct eipt bpc l upr l aRdui Ip Wfp t t dpHe Blp559yp'/0–/95Ip higSSp dt dt FBS5 fil5 fi5 KSUlt t daeBI) fi5) Ifi0Ifi00Ip

wl FeadPt yp IxIypDunaiypwIwlIypDunaiypWA IypHBal ypA IEIypA l F œ iypwlOIIypxonl ypvIxIypEFa le , l yp fl lwlypEl uai aypA Is IypA ConRayp2 IDIypxonadHypHrpk ypA dHedl ypA Ifl llIyp) fi5@pw, ar oml up mt r ht iodt ey pl e ot *odl e pl edpl e dLl maFdupl mono oai pt bpaiiae d upt oiphPt r pal naipl edp Jt c aFipt bpHz Baed pRut 8im, d el pEaFBp(A GF l mal aqlpDe lpDml dlpEFl iIpwœ aemlpl j Ip

wl Fnl u t ypDIypA aut ypk IypwHnadPt ypDIypA l m, l dt ypA IypEl e or ypA IypNl Laut ypHIyp) fifi0Ip fll Fnomdl upl mono Gpt bp, apaiiae d upt oaphRr pe*u) uoriut l ut Urw*, l r lpBl œi pA*Ut Uro Ub)ur* fl œ e IpA ar Ipœi IpSt ic l udt pwPz8gj 1yp9Kj –9@5Ip

wl Fnl u t yp IT Ixpxonl ypHlNIyp- z eaiyps Ix Iyp auchayp IDIypNl r t iyp%ds Is Iyp aFPadHypflIDIxIyp flor l ypk I- IEIypx, l er zBl r ypxIypSumadHypDIxIyp2 z aFPaiypxIxIypwl r l FBt ypHIDIypwFl nl u, t p T umaFl ypv Ik Iypdap Du Lz. zaF. zapWe ct FypNIfflIwlypdapflz mul pWz e ct FypV Iyp zœ l eifp We ct FypflIWfypDH' ufypDIDIxIyp) fi) fiIpHbamipt bp, apit uodpuchodpel et hl F omaipt bpul Fnl mRt up t epPt dae ipc o, pœ e Bpœ z IFGpHRr pir t Rapœ, l ul ct eIp- l zeGe Ipxm, r oadaLaFBi IpDFm, Ip s , l Fr l mt ulp0j 0yp'/9–/99Ip higSSdt dt FBS5 fil5 fifi(@Si fifi) 5fiff5j ffi5(@05f5Ip

waud ypwIypvFl hl iit ypHIypflt ml auoypA Iyp- l nl FHl ypA Iyp Deel ypwIypV t ubHr ypWfypwl Fl hl ypA Iyp Al Fdl ypk Iyp Ef o oyp Iyp, oyfl lyps l t uet yp, Iyp) fi50IpDe oml emaFpl mono Gpt bpuht itr l up LaFBl r t paiiae d upt oup(EHTqpt ep, zr l epeazPt Lul i t r l pmauiIpwt ut odlpxzFhl naipEp Ect œ aFhl naip55) yp9/1–990Ip higSSdt dt FBS5 fil5 fi5 KSUlmt uiz FhLI) fi50Ifij Ifi5(@Ip

wat uxyfll: Iypwl Fdt it ypA I; I2 Iypxt l FaiypA IWfyp) fi5(@p aFt uodt up, ar l oepmt ei ozae pt bpu) *Urot, a2, mr*aiiae d upt oup, l iple offladi, r l ed pLFl 8uoaeidipl mono Glps l Fl i ot ut BGp5//yp 55(@–55j fiIp

waFFoyp2 Iwlypflor l ypfl lwl: Iypflauoiyp Iplap IypEl Fnaut i ypfl lpdl pxIyp au ae LaFBaFypWF, IypA z iioypxIk Iyp A t e ad Pt fWe ct FypNIxIypxl e t iypNIDIxIpdt iyp aFPadHypfl lDIA Ipxl e t iypxIOIxIyp) fi5j Ip xml Fat ufut l dadpuchodpel et hl F omaipor hPt nadpr a l Lt uœ phPt Puapœ pt Laiapr omaIpfldbap xmdp) 51yp) j) –) j j Ip higSSdt dt FBS5 fil5 fi5 KSUlthI) fi51I5) IfiK0Ip

w, l eil eBypDIypw, l r hl Rl ac yp IypWZe Rzr ypDIypDr t Fe ua Fdh ci t eyp, Iypw, l o, t eByp6 Iyp W6 hl Rdoyp DIypNoGt eBypp IypV l eel il eyp DIypœ dHm, ypWfypA zl eBr t t eypNIyps ol il c l ypEIyp

) fi51Ips t ae d upt hpel zFl upaiiae d upt oipledpmeelr luda, Gdaplipeiamomdaipl Bl oei p , apdaeBzapnamt FpAUtUrAUb) ur(; dh aFl gpwzuomdl aqlpxt z , ali pDid elpWfpvRthIpA adIp szLumpOalu, p/jypK–)) Ip

w, l t hl d, Gl Gypxlyps Fa8ypI; zIyp) fi5KIpxor huapdaicBe pt hpm, ar oml uuGpmRtiiuce Radphule pt oup el et hl F omaipLGp Fdi8t uoe adct eafpaepamp, ar oi FGlpHzFlps tuGr lpWfpl5ypG@-19Ip higSSp dt dt FBS5fil5fi5KSUlazFht uGr Uf) fi5KIfi9Ifi)) Ip

w, aeypElypA nmuar ae iyp, IWfyp amRaFypHIDIyp) fi55IpA oe t Fpmt r ht eae ipepht t dpt oaipgDpmFo oml up Fanoac pt hp, adFpRt uaipt epuhodpt *odll ot epm, ar oi FGpoe pLzuRpt oaipledpar zuiot eilPwFo Ip NanIpt t dpcmdp z Flp95ygj fi5–j 5KIp higSSdt dt FBS5fil5fi1fiSp 5fi/fi10j 1I) fi55IKfiK0G@j Ip

w, aeypZIf: lypV l eBypZIfV lypOzl eBypV IfxIypflaaypA IfA lypV t t dypV I2 lypflazeBypZIfA lypvil oypOIfp ZIyp) fi5KIpvFl eifmoe el r luda, Gdaypl epaiiae d upt oupoe pmoe el r tephtc daFypl r aut Fl aipmaFaLFl upoim, ar d foe dzmadpLFl eopneúzFGpmd poe, dLo ot ept hpeazPt oeJ l r l ot ep, Ft zB, p l aezl ot ept hpo- Txypwl˜_f) pa*hFaiiot epl edp- : kfEpidBel ueBphl , c lGlp - azPt A t umzu d FpA adIp51yp0)) –000Ip

w, aeBypZIfv lypflzypwlfwlypZaeyp2 lpm, oeyp) fi59IpEaeaPmul upalbamipt hpmlr auudpt oup(wl r auudp t uadnaFlpDLaulQpt ep, ahl t hPt amonapl edpBli Pt hPt amonapl mono oaiIpWfp- z Flpkmdlp k o l r oe t ulpK5ypx5fifi–x5fi) Ip

w, aFRl t zofvl eBoypVdypGl Fl ouypQIOIypflQt z iiOypEIyp) fi5KIpk l it Paul *l e palbamptbpaiiae d upt oup d it ul adpBRt r p ubUyjoriousxorfll piaadipeplFl plt F l gps Pt hti adpr am, l edir Ips l RlpWfps, l Fr Ip xmdp) j yp5–1Ip

w, ac ypxlfwlypvl eypwlfs lypvl eypwlfOIyp- Gl r yp9/4fflIyp) fi) fiIpRrsunlrLo t l mnaiiiLouoGpt bpihFl Gp dFoadpFaPe adpRael bp(Ou6ui2, ir2oaao6ua, iqpiaadpt oupl hhuoadpee pmt bhaapdFoe RlpWfp t t dpxmdlp vam, et ulp9@p) 959Ip higSSdt dt FBS5fil5fifi@si505j (@ffi) fiffi/) 1Kfj Ip

w, ac ypxlwlypsoe Bvl eypwlyp Gl r yp9/4fflIyp) fi51IpA omRt aeml hizul ot ept hpFaPe adpRael bp(Ou6ui2, ir 2oaao6ua, irflIqpiaadpt oupLGpihFl GpdFGoe Bpzioe Bpβ fnGmt da* Foe pSpBzr pl Fl LompSpit dozr p mliaoel aIpWfp t t dpHe BlpWfp) 0@gp@1–19Ip higSSdt dt FBS5fil5fi5KSUlp Ult t daeBl) fi51Ifi9Ifi5KIp

w, dRa8oaypsIwlypCLaBLzuar ypwlT lypA Ll Bc zyp I- Iyp) fi59IpEot l monaphFoenuhuaipbRt r p r adomeluphule iIpNaiIpWfps, Gt m, ar Igjypl1–559Ip higSSdt dt FBS5fil0j) 0Sp FUh, Gt I) fi59I111559Ip

w, oeypxIyps oe Bypwlyfloe yp9/4yp) fi51IpA omRt aeml hizul ot ept hpFaPe adpRael bp(Ou6ui2, ir2oaao6ua, ir flIqpiaadpt oupLGpihFl GpdFGoe Bpzioe Bpβ fnGmt da* Foe pSpBzr pl Fl LompSpit dozr pmliaoel aIp Wfp t t dpHe BlpWfp) 0@gp@1–19Ip higSSdt dt FBS5fil5fi5KSUUlt t daeBl) fi51Ifi9Ifi5KIp

w, d88t ul ypNlyp) fi50IpNaBzul Fpr t et aFhaeaipledpiai. zoaFhaeaip(aiiae d upt oiqlpCegp Nl r l cl yp9/42 lypA áRaut eypWfA lp(Hdi lqyp- l zFl uphRt dzmi IpkhRoe BaFfk aRul BypEaFuoe p OaodlauLaFBpghhlp) j @0–0fifi1Ip higSSdt dt FBS5fil5fifi@Sj @1f0fK/) f)) 5//fKIp

w, Rci t ht uoypA lypwRoi oe lypHlypwt i lypwlypEomlu, t yp9/46 lypwl i idlypk Ip, aypu aFel edaiypA lyp wRoi oe lypwlypOunaiyp lypDFH˜ Uf ypV lfIlypA aut ypwlp, ayp) fi59IpCeiamomdl upaBbamptbp el et aeml hizul adpaiiae d upt oiphRt r p oavhl x y, mrmhl ulwyu, mr(Nz l mal aopnepCUmuuor wo6o2urht hzul ot eiIpCedIpwRt hlps Rt dIp@fiyp0fi5–0fi1Ip higSSdt dt FBS5fil5fi5KSUlp oednRt hl) fi59I fi0Ifi) 9Ip

dapwt e t ypfIlwlypSTomadFl ypNlxIs lypA l F oeypfll2 Is lypw, le BypZI9/4ypx aauypwlWfyp) fi5) IpHlbamipt bp , apl ddo ot ept hpr omRt aeml hizul adpt r aBl f0pl edpRt iar l FGpa* Fl mpt ep, ap am, et ut Bom upl edpiaeit FGp zl uo Gpt hpr , oaphl epLFal dlpflV vpfp t t dpxmdlpvam, et ulp/9yp 5fi0–5fij Ip

wt e FoypNlk lyp9/zuRl r hfBzaFFadRt ypOwlypWfeoeaypxlyp FleRypfllDIyps t, ur l eeypDINIyp 2z aFFaiypxIxlyp) fi5KIp- l et aeml hizul ot ept hpNt iafOdhpt ouphFanae ipt oupt *odll ot epl edp l ut c ipt L l oer ae pt hpBaupl edpPur pt hom upt Fr zul ot eiIpDDs xps, l Fr xmovam, p5@ap 1K0–1@5Ip higSSdt dt FBS5fil5) fi1Si5)) /jffi59ffi0@fj Ip

wt FFál f: ou t ypfllwlypA t udl t fA 1 F oeiypA lypDunaiypk I; lyp) fi5j IpDdnl emaipee p, apl hhuoml ot ept hp r omRt ml hizuaipl ipmlFFoaFipt hplzemot el upmt r ht zedipt Fpht t dphPt dzmi lpDhhulpxmdpj yp 9@5Ip higSSdt dt FBS5fil00j fiSl hhj fi0fi9@5Ip

wt F aiopNlypHiht io t ypHlyp2l r Ll Foe ypx lypv aut uopslypA aeaBl opHlyp- li Fz88opwlyp5jj j Ip s Fahl Fl ot ept hpuchtitr aipLGpFanaFiafh, liapanl ht Fl ot epzioe BplualFel onapt FBl e omp it unae i lpWfpA omRt aeml hizulp5Kyp) 95–) 9KIp

wFzm, t ypwlCIwlypEl FFt ipyA lv lyp) fi5@ps tuGr aFompel et hl F omaipgDpi zdGpt ep, aphFahl Fl ot ep nl Fdl uaipledpmo, l Fl maFo8l ot epr a , t dilpA l aFlpxmdpHe Blpwpl fiyp@@5–@1/Ip

wzopOlypflopV lypflopwlypko l Gl hl dzeBypxlypfloeypfllyp) fi5Kl lpfldht itr apmt e l oeoeBpmeelr tep t opr o, ple d L maFdl upl mono Gpl Bloei pr a , omuoeFFaidi l e pNo) h yl 2l 22, iro, nUjir Lot Pur lpEot bt zuoeBlp0) yp) 59–)) 9Ip higSSdt dt FBS5fil5fi1fiSp fi1j) @fi5/I) fi59I550/95KIp

wzopOlypflopV lypfloeypfllyp) fi5@lpDe d L maFdl upl mono Gpt hpuchtitr apmt e l oeoeBpmzFFGphule p aiiae d upt oupl Bloei pCo2uy, ir2UhUjiroepFomalpMfpht t dpxl blp0@yp0–@fp, higSSdt dt FBSp 5fil5555SUli15) 0fi) Ip

wzopOlypZzl eypfllypA l ypwlypflopwlypfloeypfllyp) fi5@LlpHbamptbpe d et uchtitr afael mhizul adp , Gr apt oupt epBRt c , pt lpNoyml aUjyorUnvUnuut iroepm, omRae lpWfpht t dps Pt mai lps Fai aFmlp/5yp 5–j Ip higSSdt dt FBS5fil5555SUlhhl50) j j Ip

wzopOlypQ, l t ypwlypfloeypfllyp) fi59Ipv, apihamdPmple d L maFdl upl mono Gpt hpuchtitr afp aeml hizul adpmt nap t upledpoi plhhuml ot epe pt bzlp t t dpwt e Pt up9Kyp5) 1–50/Ip higSSp dt dt FBS5fil5fi5KSUlt t dmt e I) fi59IfiOIfi) KIp

wzopOlypQ, t zyp Olypfloeypfllyp) fi5KLlpv, apihamdPmple d L maFdl upalbamptbp, apil und pt oup el et uchtitr aipl Bloei pNo) h yl 2l 22, iro, nUjirLot pPur ipt epr oRpmt e l oeaFlp t t dp wt e Pt upK5yp j) –j Ip higSSdt dt FBS5fil5fi5KSUlt t dmt e I) fi59Ifij Ifi0/Ip

wzopZIypV zypQlypfloeyp Iyp- oypNlypQ, zyp- lypA l ypfllypfloeypVWfyp) fi5fiIps Fahl Fl ot epyil ba Gyp h, l Fr l mt Roe a omiyl ed ph, l Fr l mt dGel r omipt hpuchtitr aipmt e l oeoeBpEEzmal pDl nl e omlp t oIpDDs xps, l Fr xmovam, p55ypl@1–11/Ip higSSdt dt FBS5fil5) fi1Si5)) /jffi5fifj /9/f/Ip

; afTuonaeH ypHI: lyps l zl oypOIwlEIyp) aps l zl upNlwlA lyp) fi5/IpDubeel apSpmli, ac pBzr p el et hl F omaipt Fpaiiae d upt oupaemlhizul ot eIpwt ut odlipczFHl maipEpEot oe aFHl maiIp550yp 5/K–595Ip higSSdt dt FBS5fil5fi5KSUlmt uizRLI) fi50Ifi1fi01Ip

; apEouaFLamRypk lyp) fifi@pOzoaipaiiae ouuaipa pLl máFoaipFáidi l e aipl z*ple d L ot o zaiIp s, G t , aFl hoqp9yp) /j –) 90Ip

; apA aeaiaiypDIwlypA l F. zaiypHIEIs lypflaor l eeypIk lyp2 t eYl unaiypSTIOIypQeazypNls lypdap DFH˜ Uf ps IOIOIypdapSTomadFl yp. lypol GaFypwlyp) fi5j IpHemlhizul ot ept hpmt napt oupoep el et i Pzmz Fadpuchodpml FRoaFl phRt r pel z Fl upr l *aigps Fahl Fl ot eypmy, l Fl maFo8l ot epl edp

uarsunl r anl uzl ot ept hp, apmy t uoeai aFl iapae8Gr aiIpwt ut odi pxzFHl maipDps, Gi omt my, ar Ip HeBlpDihIp910yp5) 01@jp higSSdt dt FBS5fil5fi5KSUlmt uizFHl I) fi5j I5) 01@jIp

; apxtz8l ypHlyp- apflor l yp9/4fllyp- FadFayp9/4yp- apxt zil ypwlyp) fifi9Ipe, dLot FGdl mot ept hpit r ap aiiae d upt oipledph, Gt m, ar oml uipt ep, apBRt c , pt hpml Rt zipr t zudipit ul adpHRt r p ht t dilpEFl 8oul epDFm, IpEot ulpvam, et ulp/1yp) /9–) 9fiIp

; a t eoypwlEIypTuonadFl yp IA Ip aypxle t ypOHlypxIt ps adFt ypDIypHufLl m, l ypNIypk aut 8t ypHlpdl pxIyp : aFFadFl yp, IypHlu oeaypwlypwl LFl tfl uLz. zaF. zayp IA Iyp) fi5) IpHnl uzl ot ept hp, aFr l ufp t *odll onapi l Louo Gpl edpl e dBut r l pl mono Gpt hpQle , t *Guzr poe Bt l iizdLl paiiae d upt oup ae Fl hhadpne t pr zuofpl edpzeoul r aul Fpuchtitr ailpWfpfldht itr apNaiIp)) yp5–@ip higSSp dt dt FBS5fil05fij Sfi1j 1) 5fi/I) fi55I9@0@j 0Ip

; anoyp- Iyp, aRl ypwlypOl 8l FoRl yp, Iyp9/4 Rl oyp, Iyp) fi5) Ipx zdGpt hpmt r hua*pmt l maFnl ot ept hp Baul oepDpl edpit dozr pl uBoel apt Fpr omRt aeml hizul ot ept hpt uonapt oupWfpA l mRt r t dpxmdlp s l F pDp/j yg j 0K–j /9Ip higSSdt dt FBS5fil5fi1fiS5fiKfi50) 9I) fi5) I@j 19/Ip

; , l nl r l eoypxIypNl t ypZIs Iwlypflt Rai, ypEINIyp) fi5/Ipvt l upl e ot *odll e pl mono Gpt hpiauamadp naBa l Luapt oipledp, adPpeJ zaenapt ept l upl e ot *odll e pml uzaipoepmont Ip t t dpw, ar Ip 5K/yp995–9999Ip

; , oPypV IypEauuoypxIypWV8opxIypEl , ut zuyp- IypA edypV Iyp) fi5KIpHiiae d upt oui˜ m, ar oml up m, l Fl maFo8l ot epl edpoenai oBl ot ept hpit r apLot ut Bom upl mono oaigpDpmFo oml upFanoac Ip A adIp0yp) 9Ip

; dLlydk lwlypx l , l r ypEI- Iyp) fifi0Ipwt e l mpzF oml Fdl phRt r pmeelr l upal doeBpt pl el h, Gl *dlp wt e l mp, aFr l odp/1yp55j Ip

; ouoRl yp IypEFar eaFypsIypA aGaFypWyp) fifiFIpDe dLl maRdl upl mono Gpt hpuet uaompl edpt uaompl modlp dit ul adpBRt r pOUjU2hn i, mr) Ut, a2, yov, mgl phule pziadpdzFoeBpmoFmzr mdot epFo ai Ip : ot aFl hdp@Syp/9fi–) 9Ip

; or l ypwlypDiil dht zFypHlyp or l ypxIypWl hFoypxIA Iyp) fi) fiIpEot l nl oul Louo Gpl edpLot l mnaiiiLouo Gp t hpt t dpLot l monapmt r ht zedi7pt naFnoac pl edpl iiaiir ae pLGpa*rsunl rr a , t diIpwt r hFIp NanIpt t dpxmdlp t t dpxl blp5j yp) 1K) –) 11/Ip higSSdt dt FBS5fil5555S59/5fp /00@5) K) 0Ip

; or l ypwlypwt I Fua ypA IypDua*ayps Iyp, or l ypxIyp) fi5/IpNahFoe pt hp˙ A omRt aeml hizul ot ept hp aiiae d upt oupt hphor ae t ps or ae l pdot omlp(flqpA aFFl pLGpm, ot il epSpRfmlFFl Baaelep mt r hua*pmt l maFnl ot epr a , t d”IpCeet nIpt t dpxmdpHr aFBlpvam, et ulp) 9yg j @-5fi9Ip , higSSdt dt FBS5fil5fi5KSUdia I) fi5/Ifi@ffifi1Ip

; t eBypQlypA l ypZIypOl Gl yp9/4ypWl ypwlyp, d ypxIypQ, l eBypp, Iyp) fi55IpA t Fh, t ut BGpl edpFaual iap hPt Puapt hpr omRt ml hizuaipaeml hizul oeBphahhaFr oe pt oupLGpmt r hua*pmt l maFnl ot eIp Wfp t t dpHe Blp5fi/yp/99–/KfiIp higSSdt dt FBS5fil5fi5KSUUlt t daeBl) fi55Ifi5Ifi55Ip

; Ft 8da Rypx lypEl 8Guoyp6 Iyp) fi5KIpEot mr hl cLuapt oupmt Fapel et ml hizuaipl ipht ae ad upmt fp mlFFoaFi pt hpl mol *aupl edpJzt Faiinae pr l FRaFl pghhFahl Fl ot epym, l Fl maFo8l ot epl edp Lot or l Boe Blpwt ut odpst uGr Ipxmdlp) j /yp)) 9–) 0@ip higSSdt dt FBS5fil5fifi@Sififi0j Kfp fi59f0@K@f9Ip

; ziilzuyp Iypkzyp9/4; Iypfl mRt o*ypA Iyp) fi5/IpRursunl ranl uzl ot ept hple or omRt Ld upl mono oaipt hp nl Rt zipmt r aFml upaiiae d upt oiupt uat Faioe pl edphzFapmt r ht zedipl Bl oei pht t dp hl , t Baeipl edpl hhuoml ot epee p, l r IpA al pxmdpj Kyp95/–9) fiIp

; z , oeyp2l2Iyp2l Fdeal Fyps Iv lypA t FFoma ypsIwlypAns , l oup, IEIyp) fi5KIpv, apwt e FdLz ot ept hpdpx f t mt h, aRt upl edpdpy f t mt h, aRt up t p, aple ot *odll e pml hl no Gpt hpi anaFl upadoLuaphule p t oUp l Ipxmdpl yp/5–/1Ip

HRt FypA Iyp) fi50Ipv, apBRt c oeBpziapt hp aFLl upr adomeaigpoiizaipFaul oeBpt pldnaFiapFal mdt eip l edpmzl uaeBaipoepr t eot FoeBpil ba GIp Ft e Ips, l Fr l mt dp/yp5@dIp

HufDiLl, l eoypDLdau, l badypA oul doyp9/4ypDddoypOIypEol FypDIypwl il Ldeml ypOIypDLdau, l r odypHIp A lypOl Fr l eeyp, lypW4l uaypDlypNael zdypIypHul dil FoypDIyp) fi59I IpDe or omRt Ld upl mono Gp t hpel et faeml hizul adpaiiae d upt oaigpmt r hl Foit epet pet efaeml hizul adpaiiae d upt oui Ip Wfpwt ut odpxmdpEot am, et ulp/yp0j –/1Ip

HufDiLl, l eoypDIypA oul doyp9/4ypEl dFoypV Iypxl ul ypA IypDddoypHIOIDIypwl il Ldeml ypOIyp At zl ddRypDIpHuyOl Fr l eeyp, lypWdl uaypDlypNael zdypI- INIypHdl oil FoypDIyp) fi59Ll p Hiiae d upt oaigpPt r pa* Fl mot ep t paeml hizul ot eIpCe IpWfps, l Fr Ip/10yp)) fi–) /0Ip , higSSdt dt FBS5fil5fi5KSUddh, l Fr I) fi5/I5) IfiKj Ip

Hufil Gyp9/4A lypHufil c GypOIxIyp) fi5@ps tuGr aFompel et hl F omaipgps Pt r oioe Bphul ht Fr pht FpdFzBp daunaFGlpCe IpWfps, l Fr Ip9) 1ypK@9–Kj 5Ip higSSdt dt FBS5fil5fi5KSUlp dh, l Fr I) fi5@fiKIfi9) Ip

Hui, l PaypOIxIypOht uot ypwlyp) fi5@pDe pt naFnoac pt hp, apLot ut Bom upabamipt hpit r ap r adoaFFl eal epaiiae d upt oiptep, zr l ep, al u, IpEot r adpNaiIpCe Ip) fi5@paj) K1/K1Ip

He mael ypwlypkaFBl Fl ypwlyp2 or aea8ypEIypTGl F8 efl r hzaPt yp IypNt LaF ypsIyp) fi5KIp wt e nae ot el upihFl GfdFGoe Bpl edphz zFapFaedipt Fp, apr omRt aeml hizul ot ept hpPi, pt ouIp vFaedipt t dpxmdlpvam, et ulp9Kyp/K–KfiIp higSSdt dt FBS5fil5fi5KSUl di I) fi5KIfi@ffi5/Ip

He BauypWfEIypOamRuaPypwlypvt edt ypHlwlyp, l Fl oyp, IWlypA l u, adRt iyps Ipd pdl px(yp) fi5@ip De or omRt Ld upl mono Gpt hpFaapl edpuchtitr afael mhizul adp, Gr t upl edpml Fnl mRt up l Bloei pxl ur t eaul pledpx lh, Gut mt mmzipZazi ipd, aFadpt pl oeuaiipaaupCe IpWfp t t dp A omRt Lot up) 9) yp51–) 0Ip, higSSdt dt FBS5fil5fi5KSUldlt t dr omRt I) fi5@ffi/IfifiOIp

Hh, Far ypHlyp2 FadBaf2 aFBaiypOIyp aiiopOIypw, l Fmt iia ypwlyp) fi5/IpSf h or oil ot ept hpFiar l FGp t upaemlhizul ot epneph t uGmlhFt ul mt eapl edpimlua fzhpt bp, aphFt maiiIpWfpA omRt aeml hizup 05yp@/K–@90Ip higSSdt dt FBS5fil05fij Sfi) K9) fi/1I) fi5/Ij 51KKj Ip

Hi bl edGl FofA leai, ypA Iyp2, l adoypQIypDiar opA Iyp%l el noypA IypA l el GoypDIypWr l udl FypOIyp D Gl Loyp Iyp oel Fnl edypNIyp) fi50Ipx zdGpt hpl e or omRt Ld upl mono Gpt hpl ea , t uapl edp ml Fnt eaput l dadps fl2 Dpel et hl F omaiIpWfps, l Fr IpNaiIp@yp) j fi–) j 9Ip higSSdt dt FBSp 5fil5fi5KSUUlt hFl) fi50Ifi/Ifi5j Ip

Hir l aouypDIypDi Bl FoypDIyp) fi59Ipfe pno Pt pFaual iapl edpLot ut Bom upl mono oaipt hpLon, mr2l) ul2, mr aiiae d upt oup(wHFoput l dadpm, ot il epe l et hl F omaiIpCe IpWfpEot upA l mRt r t upl 5yp) 10–) j fiIp, higSSdt dt FBS5fil5fi5KSUdOLot r l ml) fi59Ifi1Ifi5fiIp

: l ul t yp1˙ IypA t zFl t ypxIwlypdapDFH˙ zf ypVWFllypsAa edl FpsIDI%4ypwl DIwlDIypdap Dur aodl yp9/4EIypQoLa oyp IA IypfIor l ypEI2Iyp) fi59Ipw, l h aFp) 0gpw, l uaeBaipoep danaut hr ae pt bpaiiae d upt oupe l et daunaFGpiGi ar ipt edpbz zFapht Pt ihamiIpCegp l oRypWfp (HdiIqyp- l et pEl iadp Fz Bpj aunaFGlpQl BFaLypODswyphhIp99@-9@1Ip

: l eBypQlypE, l edl FoypEIyp) fi5) IpchFl GpdFGoe BpydFaa8apdFGoe Bpl edpFaul adphPt naiiaipt Fpht t dp oeBFadoae pl edpez Fl maz oml upaeml hizul ot eypnge2l Foyp- IypA mwuar ae iyp, IWfyp(HdiIqyp Hemlhizul ot epam, et ut Boaipl edpdaunaFGpiGi ar ipt Fpht t dpoeBFadoae ipl edp ez Fl maz oml uIpS*bt Fdgy V spV t t d, al dpszLuoi, oeByphhIp@0–5fij Ip, higSSdt dt FBSp 5fil5900Sj @1fi19@fij 9j fij I) I@0Ip

- 8reommonurUroy8mmmm

- 8reommonurUroy8mmmm

A l FGl r ypOypOz8l dOlyp6 IypOoedl zypOIypQz Ll odl ypxIyp) fi59Ip- l et aemlhizul ot epthpaiiae d up t oipc o, pae, l ena dple or omRt Ld upl mono GpgpDpeac pc l Gpt bpmtr Ll oeBple or omRt Ld up Naic l ena lpWfps, l Rr l mt BeIps, G t m, ar Ip/ yp5K9–5@fiIp

A l t iypxIs Ip ayplz mml ypfIl2 Iyp%t ai aFypfIlxIyp) fi5j IpHiae d upt oipne pe l et i Fz mz Fadpi Gi ar ipgp w, l uae Bai pne phFahl Fl ot epl ed pl el uG oml upr a , t di Ipv l ul e l p5j 9yp) fi/–) 5/Ip higSSp dt dt FBS5 fil5 fi5 KSUl l ul e l I) fi5 11 55 Ifi) j Ip

A l , l' zi yE Iyp) fi5 fil pT *odl ot epthpadd Luarpt oi Ip e gp amRaFypHIDIyp Hud i ypNIWfypA mwuar ae iyp Ip WfpGHdi Iqyp T *odl ot epne phtt di pl ed pLanaFl Baipl ed pl e ot *odl e pl hhuoml ot ei IpV t t d, al dp szLuoi, oeBpfIor oadyphhIp510–) 10Ip

A l , at ul Ll Rdi yp2 IypNdBl iypE Iypwt ei l e oe odaiyps IDIyp) fi5) Ip- l et daumaFGpi Fl aBoaipne p mlemaFpm, ar t , aFl hGgpLot ut Bomlup Fl ot el uapl edph, l Fr l maz oml uphaFihamonaiIp - l et r adcmoeap5fiyp59@@.59j fiIp

Am, leoayp DIypv t eGl uypE IypZz nauy6 Iypv Foea l ypk Iyp) fi5j Ip t Fr zul ot epl ed pdplanaut hr ae pt bp uthodpe l et hl F omaipl e dze Bl uphl mRl Boe BpPur ipt pmte Ft uphti , l Fnai pdi dial iaIpWfpDBFomIp : t t dpNaiIp5yp5fififi50p higSSdt dt FBS5 fil5 fi5 KSUTUlhFl) fi5j 15 fifiifi50Ip

A a, ea Fypv Iypa I da Fyp%t ayp) fi5) Ipxt uodpuhodpe l et hl F omaigs Pt dz mot eypmz l FlmaFr8l ot epl edpl hhuoml ot ei IpDdnIp, Fz Bp, auonIpNanIpK/ypI0–5fi5Ip

A aoaFypA IDINIypWFBaepA IT Iypxmz, zLaF yp6 Ix Iyp) fifi@ps ul e pt upFaeac l LuapFaitzFmaipl ipBFaaep l uaFel onaipne phtuGr aFpinoaenaIpw, ar Ipxt mIpNanIp0Kyp5@11–51fi) Ip, higSSdt dt FBSp 5fil5fi0j SL@fi0) j /mIp

A d t ypxIypV l eByps Iypxzyp QIypQ, l eBypx Iyp) fi5/ IpkaBa l Luaft ofLl iadpht uGr aFipl pIbz zFap ht uGr aFompLot r l aRd ui Ip Dml pEot r l aFIp5fiyp5Kj) –5@fi/Ip, higSSdt dt FBS5fil5fi5KSUlp l mLot I) fi50Ifi1lfi/fiIp

A od dop%Iypxl FypxIyp aiioQIypHl di l FoypDIyp) fi5KIp- l et hFaouhol ot epht Pt naiipgp Pt r p hl F omaipFahl Fl ot ept poepnont pl hhuoml ot ei Ipe gpkl z , oeFypwIyps t em, ayp2 Ip(Hdi Iqyp st uGr aFp- l et hl F omaipt Fp- l et r adcmoe ai Ipch Foe BaFgpw, l r ypxc o8aRl edyphhIp5@.90Ip , higSSdt dt FBS5 fil5 fifi@sj @t f0f05j f/5/) 5f1Ip

A dFl ed l ypA Iypw Fz8ypA Iv Iypk ot Foe t ypwIypwl LFl upwIyp) fi5j Ip- l et i Fz mz Foe Bpuchodpml FFoaFip z ioe Bpl *ut l yz ori UbUi; mr*(fll qpA t Fdipaiiae d upt oIpA l aFIpxmdpHe BIpw5fi0yp5fij 1fi/p higSSp dt dt FBS5 fil5 fi5 KSUlr i aml) fi5j I5 fij 1fi/Ip

A oi, Fl ypOIypA oi, Fl ypx I%t ypC Ll upQIypWFBBoypA IypA l dl l eypDIypE, z Gl eyp%t yp2 z h l yp- l r ol yp 2 z h l yp a, l ypk l iyp%t ypkaFr l ypNIypv l uaBl t eRl Fypx Iyp) fi5j Ipwt fdaumaFGpt bpz Baet up l ed p dl mlFLl 8oeapLGp, Gl uz Pt eompl mod fmtl adpuht itr aipt Fp l FBa adpoe, cLo dt ept bpiz Fhoncep oepFal r ae pt bpFaidi le pr a l i l ompr aul et r lps, l Fr l maz omip55yp5K0Ip

A t B, l ddl r ypA Iypa a, do8l da, ypfIlyp) fi5@pw, ar oi FGpt bpaiiae d upt oipl ed pdl mt Fip oeJ z aeme Bp, adFpmt ei ozae il pCegp2 Fz r a8aimz ypDIA Iyp Ot uLl eypDIA Ip(Hdi Iqyxt bp w, ar oi FGpl ed pt t dp aFr ae l t el epHuianoaFpxmoaemaps z Luoi, oeBpwt pCemlyp- ac pZt FRyp hhIp0@j –/5j Ip higSSdt dt FBS5 fil5 fi5 KSEj @lffif5) f155/5) f/1fififi50f1Ip

A t, l r r ad yp- I%t ypv l eypwIypA l el hyp2 IDIypDu, auoypDIA IypOziioeypDIxIA Iyp) fi5@ps Pt naiip mt edo ot eipt bpihFl GpdFGoe Bpr omRt aemlhizul ot epthp *ubUyoriousort* oIps t c daFpv am, et ulp 059 yp5–5/Ip higSSdt dt FBS5 fil5 fi5 KSUht c aml) fi5@fi0Ifi/9Ip

A t FiGyp- I: Ix Iyp) fi5@pw, ar oml upi Fz mz Fayp z l uo Gpne domaipl ed pLot l mono Gpt bpaiiae d upt oip mt ei ozae il pCegHufx, ar GypOIp(Hdi Iqyp Dmonap Ce BFadoae ipbFr pDFt r l ompl ed pA adcmoe l up s ul e i pCe am, Thae ypxhl oe yphhIp5@9–) fiKIp

A t 8l hl FoypA INIypW% t iFl nof; l Fl eoyp%t ypEt Fl 8l eyp2 I2 Iypwz oypWfypsl Fdl R, GypDIypZz FdzBz upxIyp) fifi1 IpHe mhizul ot epthpht t dpne BFadoae ipzioeBpe l et uchtitr apam, et ut BGIpCe IpWfp t t dp sFt hIp55ypI00–1//Ip

A t 8l hl FoypA INIypA t Fl 8l no ypxIA Iyp) fifi9IpDpeac pam, eo zaph tFp, aphFahl Fl ot epthpe t ef t *omp uchtitr aipl ed pe l et uchtitr aigpv, ap, al oeBpr a , t dIpCegp l et uchtitr aigp Frr p : zedl r ae l uipt pNamae p, anaut hr ae iIpvFl bt Fdps z Luoi, oeBpfl dIypFt *bt Fdyp6%yp hhIpj 5–j 1Ip

- l Bl nl Fr l ypEIk I- IypZl dl nyp OI%dx IypDGl 8ypDIypk l izd, l ypfIlxIypx, onl Rzr l FlypOI2 Iyp) fi5) Ip ; dbaFae p am, eo zaiph FphFahl Fl ot epthpht uGr aFompel et hl F omaifDpFanoac IpDid epWfp s, l Fr Ipwuoe IpNaiIp9ypa00/505/9Ip

- l, Fyp I%dyp2, l eLl R8l da, ypEIypOl r oi, a, Rl FypOIyp%l PuypOIxIyp) fi51Ip t t dpBFl dap el et i Fz mz Fadpuchodpml FFoaFpht Fpml Fdl r t r pai iae d upt oqpgs Fahl Fl ot eyp m, l Fl maR8l ot epl ed pl e or omRt Ld upl mono GIpWfp zem Ip t t dip/fiyp5–1Ip higSSdt dt FBSp 5fil5fi5KSUTUlhl) fi5@fij Ifi) 1Ip

- l, Fyp I%dyp2, l eLl R8l da, ypEIypOl r oi, a, Rl FypOIypxl r l doypOIypOt iaoe oypA Iyp Hir l aoueaUdypEIyp) fi5j IpCenai d8l ot epthph, Gi omt m, ar oml uphFt haF oaipt bpaiiae d upt oup ut l dadpe l et uchtitr apht FpaeFom, r ae phz FhtiaiIpfIV vpfpt t dpxmdpvam, et ulp5fi9yp) 1) –) 1j Ip higSSdt dt FBS5 fil5 fi5 KSUluc I) fi5j Ifi) Ifi5fiIp

- l UlPypA I- IypDRi er a, FypDIypxl eoypDIA Iyp) fi) fiIps Fahl Fl ot epthpEl Rdi ap(9Uh, yorb, mml io op aiiae d upt ou-ut l dadpuchtitr aipl ed panl uzl ot epthph, Gi oml uphedple dLl maRd upal bamp ep Him, aFom, d pmt upT 59@gO@fpWfp t t dps Ft Ipl0yp955–95@Ip

- l iiaFypA Iyp2 t ur t, l r r ld8l da, ypxIypDFt z oaypOIypNa8l ypA Iyp- al r l oypOIyp) fi5) fiIp sFahl Fl ot epl ed pmt r hl Fdi t ept bpnl Fdt z ipht Fr zul ot epthpit uodpuhodpe l et hl F omaip (xfl- iqpmte l oeoeBp, apaiiae d upt oupt bp ovonuorm, yuHl no IpWfpOt F omIps t i, l Fnai pNaiIp0yp @0–1/Ip

- l iiaFypA Iyp2 t ur t, l r r ld8l da, ypxIypDFt z oaypOIypNa8l ypA Iyp- al r l oypOIyp) fi5KIp De dze Bl upl mono Gpt bp ovonuorm, yuHl no raiiae d upt ofut l dadpit uodpuhodpe l et hl F omaip uadsunl rmt edo ot e IpDFl e IpWfpEl iompA adIpxmdp5j yp5) 05–5) 0@Ip

- l Fl Ulesp, Iypx Foeonl i e ypxIypxzedl Fyp%t ypNl noed Fl eypDIyp) fi59Ip t Fr zul ot epthpaiiae d upt oafp ut l dadpm, ot i el p t uBoel apel et ml hizuai IpWfp t t dp, Fz BpDel ulp) 0yp9Kfi–9K1Ip higSSdt dp t FBS5 fil5 fi5 KSUTUldl I) fi59 Ifi5 Ififfi5Ip

- l 8l FoypA Iyp2, l eLl R8l da, ypEIypX Pyup OIxIypQaoel uopA Iyp) fi5j Ip2 l Fuompaiiae d upt oup el et h, G t it r aipl ipl pel zFl upht t dphFaiaFml onapgpCipl hhuoml ot epneoGt BzF pl ipht t dp r t dauIpwt ut odpe aFl hmapxmdpwt r r zeIp0fiyp5–@Ip higSSdt dt FBS5 fil5 fi5 KSUlp mt umt r I) fi5j I5 fifi5@KIp

- o8l ypHlypEt 8oRypA IypEFl nt ypOypwar ae afwl il Faiyps Iypfll Fl fxl em, a8ypDIypWl eypDIyp %t z ñaRyps IypDut eit fA t Faet ypwIyp) fi) fiIps HOfmtl adps fIDpe l et hl F omaipt pae, l emaip, ap l e or omRt Ld upl mono Gpt bpml Fnl mRt up t t dpw, ar Ip0) 1yp5) @505Ip

- Rl eBl ypwIOypEl ht uoiypDIA IypSr Rl t Fyp- IOypWFl ziaypNIV IA Iyp) fi5j Ip2 ae aFl uphaFmah ot epthp uchtitr aipgp t Fr l ot eypr l ezhl mz Foe Bpl ed pl hhuoml ot ei Ipe gpwl l uyDIp(Hdi Iqyp fldht itr aipfpDdnl emaipl ed ps aFi hamonaiIpCe am, Thae ypxhl oe Iyphh Ip5–) /p

- t el t yp INIypxl e l el yp I2 IypA aut ypIA Ipplaypxl e t iyp2 I2 IfIlpht iypEFzi t uor yp Iypwl r l FBt ypHIp DIypxt zi l yp, Is Ipdaypxt l FaiypA IEIs Iygk oul FFal upwI: Iyp) fi5) IpDe cfoeJ l r r l t FGp hFt haF oaipt bpFt iapt *odaIpCe IpGr r zet h, l Fr l mt ufp5/yp'(/qg@@f1/Ip

- t t Fyp- IA IypD8o8ypDIDIypxl Fr odoypA INIypD8o8ypNIyp) fi50Ipv, apaibamptbmoFBoepmt mt ez pt oup ut l dadpit uodpuhodphl F omaipt ai omlupbz Fht iapLGpihFl GpdFGoeBp r omRt aemlhizul ot epIpNanIpEFl iIp l Fr l mt BeIp) 9yp0fi@-055Ip higSSdt dt FBS5 fil5 fi5 KSUlp LUhl) fi59Ifi/IfifiKIp

TF, l eypOFlypA ail oRypA IDIypWFLaaeypDIyp%l eypZIyp) fi5KIpGr r zet r t dzul t FGphPt haF oaipt bp nl Ft z ipel z Fl upmt r ht zedi pl ed pail ae d upt oup, Ft zB, pr t dzul ot epthp, z r l epmauzul Fp or r zeapFai ht eiaIpCe dIpwPt hips Pt dIpl 5yp55@-5)) Ip

TF, l eypONlypF 8YauoRygEIypxaeaFlyp Iyp) fi55IpHnl uzl ot epthpl e oLl maRd upl e dze Bl upl e ondFl up l edple ot *odl e pht ae d uipt bpit r apaddLuapt oaipl edp, adFpbl Gpl nadphPt Puai Ipvz FRdi, pWfp Ect ufp09yp)95–) 91Ip

TF l eypDIypwl r hal ezyp2 Iyp, oezfs Fnzypwlyps t haimz ypfIlyp) fifij Ipx z dcoaipmt emaFeoe Bp, ap ae Fl hr ae pt bpAaUih, mrbnosUyUiiraiiae d upt oupne puchtitr ai IpNt zr IpEct am, et ufpla Ip 5/yp'//55–//5@Ip

TF l eypDIyp aRdai pA IypNt doet ypxIyps dFnz ypwl; Iyp, Fl Bl eaimz yp Iyp) fi50Ipvt homl updaumaFGp i Gi ar pt bpuchtitr l uGpnemlhizul adpnt ul ouapt oupt bpAaUih, mrInosUyUiiIp l Fr l mdpK5yp 0K5–0@fiIp

Tz Fo zayp DIyp D8t z Lauypx Iyp aFFadFl ypwlypxounl ypwlypA l Fmz ot FoypA Iyps t, ur l eeyp DIyp2 z aFFaiypx Iyp EamRypNIyp) fi5fil pfIchodfmt Fapel et ml hizuai pl ipl pel et r adcmoeap ht Fphl Fae aFl up l dr oedi Fl ot epthpFa oet oegpdanaut hr ae pl ed pne pno Ft pl e ozr t Fpl mono Gpt ep, zr l ep r Gaut odpuzRl ar d pmauiIpWfpEct r adIp- l et am, et ulpK yp) 5/–)) 0Ip

T 8YauoRygEIypDi ul eypA IypSr F, l eypOIyp%l Fl t Buzypx Iyp) fifi9IpDe oLl maRd upl e dze Bl upl ed p l e ondFl upl mono oaipt bp, apuchth, Gumpa* Fl mipt bps di l mdpnaFl pfIlpA omRt Lot up Nai Ip5K fiyp 59j –5K/Ip

T 8aRyp2 Iypxm, aha Roe ypOIDIyp6 aBaet nl yp2 IDIyp%dFht oel ypfIl- IypDedFaoypxINIypSr 8aRypv Iyp El iaFyp%IOIwIypDLodRzut nl yp%v Iyp%zi, el FaeRt ypxIk Iyp%, uaLedRt nypDIOIyp l r Fteyp, Ix Iyp ´ zoe ypA Iv Iyp) fi5@pw, ar oml upmt r ht ioot epl edph, l Bt mG aor r zet r t dzul t FGp l mono Gpt bp Ou, yorpUiiiraiiae d upt oui Ip WfpEct ufp5fi5yp5 0K5–50@5Ip

T 8Gaudi8yp Iyp%t Fl Bt euzypxIypEl il up2 Iyp6 8aupDIypEl GFl R l FypSr Iyp) fi5) Ip A omRt faemlhizul ot epth pt 8t el adpFadphahhaFpiaadpt opc o, ple or omRt Ld upl mono Gpl ed pl hhuoml ot epth pet ec t naepdl LFomIpfla IpDhhuIpA omRt Lot ufp9Kyp5K1–5@Ip higSSdt dt FBS5 fil5555Sp ul r I5) fi) 1Ip

sl eda GypDI%dyp%zr l Fypx Iypx oeB, yps Iypv Fdhl , oyp- I- IypEl Uhl oyk I%dyp) fi5KIpHiiae d upt oaigp xt z Fnaipt bpl e or omRt Ld upl ed pht t dphFaiaFml onaiIp Fte IpA omRt Lot ufp@p5–5/Ip

sl auyp Iyp) fi50Ip anaut hr ae p imFaaeoe Bpl hhFl m, pht Fpuchodpe l et hl F omaigDpFanoac IpCe Ip WfpCe t nIps, l Fr Ipxmdp) yp) @-0) Ip

sl ouyZ IypWd, l nypxIyp) fi5/Ip t naupr a , t dipht Fpuchtitr aphFahl Fl ot epw, ar Ips, GiIpfldhodip 5@@pl–51Ip

sl zul ypOIwIEIypxt r LFl yp IA IypDLFaz ypITIA IxIyps l zul ypNIwIA Iyp) fi5fiIpeu) *uoriut l ut Ur aiiae d upt oupne ml hizul ot epLGpl eBomt pBzr Sm, ot il epel et hl F omaiIpWfpEFl 8Ipw, ar Ip xt mIp) 5yp) 09j –) 0KKIp

sadFt ypOIxIypxl e t ypCHIypxonl ypwIpk yp, a t eoypwIypDuLz. zaF. zaypHIyp) fi50Ipv, apziapt bp el et am, et ut BGpl ipl epl hhFt lm, pht Fpaiiae d upt oufLl iadpht Fr zul ot eipc o, p le or omRt Ld upl mono GIpCegpA áeda8fnoul ypDIp(HdIqypA omRt Ld upl hl , t Baeipl ed pi Fl aBoaip bt Fpmt r Ll oeBp, ar gpinoaenaypam, et ut BGpl ed padzml ot eIpEl dl Uf8pgp t Fr l a*p Naial Fm, pwae aFyphhIp50K/–50@/Ip

sae BypxIypQ, t zypFllypFloz ypV aoyp2 l eypFllypFloz ypV aoueypFld e BypNIypFloz ypwIyp ozypWfypwl t yp2 Iypfloz ypQIyp w, ae yp) fi59Ipx Fl Bapi l Luao Gpl ed pl md Ll maFd upl mono Gpt bpaz Baet upl et uhtitr aip hFahl Fadpl Gpl epa , l et upoe lámot e fdGe l r omp oB, phFaiiz Fapr omRt Jz odo8l ot epr a , t dIp Wfpt php t t dps Pt Ip@l yp)) –0fiIp, higSSdt dt FBS5 fil/059Sfi0K) ffi) 1_ Ip

sœl fEl FFaFl ypDIA IypDunl Fa8fNt r l eypNIypEl a8f2 t e8l ua8ypWl2 IypDr l Gl f2 zaFFl ypwIDIypNonl ifp A t Fl uaiypwIyp2 l ul Fdt fNonaFl ypwIv Iyp2 l ue dt fNt dRdBz a8ypxIDIyp) fi5j IpDhhuoml ot epthpl p r zuci Gi ar pmt oeBpLl iadpt epht uGr aFompel et ml hizuai pmte l oeoeBpaiiae d upt oupt bp Vh m, irs, ybonuirfIpt pnemRaliap, api, aubpuchapt bpl Luap BFl haip(Fuuirsuawhor fllqlpDHHHp vFl ei Ip- l et Lot imaenap51yp9/j –99@Ip higSSdt dt FBS5 fil55fij Sv- El) fi5j I) j /5j 05Ip

sona l ypv Is Iypxor f aiypx Iyp DFl ufypA IA Iypwl Fnl u, t ypv Iyp DFFzdl ypwIypA l Fml t ypx I; Iyp) fi51Ip ; anaut hr ae pt bpel et hl F omaipl Fr pel zFl upuchodipht Fp t homl updauma FGpt bp, Gr t upgp Ge naidl 8l ot epthpoipl e oeJ l r r l t FGphPt haF oaiIpwt ut odipxzFl naipEpEct oe aFl hmaip 5K/yp) 15–) j fiIp, higSSdt dt FBS5 fil5 fi5 KSUlmt uizFl LI) fi51 Ifi5 Ifi90Ip

st hot uRoypv IA IypFizRl ypOypOl uoul ypx Iypx A zeo8ypHIwIypxt uo Iypk IypEt Fl uopNIypwl l Foel yp I; Ix Iyp) fi5KIps Fahl Fl ot epthpt uGr aFompr omauaipt bpht uGpFH, Gua eapt *odafpLpfil moml mod qpl edp , adFpaemlhizul ot epc o, pl naedaFpt oupA l aFlpNaiIp5j yp509K–50K9Ip

st zdauypDIyp2 l m, zr oyp2 IypV l il eyp%IA IypEli, oypQI; IypHupDeaadypDIypEl dal ypOIyp) fi5j Ip ; anaut hr ae pl ed pm, l Fl maFr8l ot epthpuchtitr l uptFr zul ot eipmte l oeoeBp h, G t i aRt upa* Fl mad pRt r pml et ul pt opdat dt R8aFpdoi oul ap ut eBpe o, pt mth, aRt ui pIp bt t dpl ddo onaiIps, l Fr l maz omip55yp519Ip higSSdt dt FBS5 fil00j fiSp h, l Fr l maz omi55fi/fi519Ip

sFoGl dl Fi, oeoyp EIA IypDe dhoe l ypA I- Iyp l c 8GypDIxIyp) fi51Ip t Fr zul ot epl ed pm, l Fl maFoil ot ep t hpht uGp(ul monimf fBuGmt uompl mdopaemlhizul adpmt napt opel et hl F omaipt Fpdae l up l hhuoml ot ei Ipe i IpHeBIpvam, et ulp5) yp055–05@Ip higSSdt dt FBS5 fil5 fi/j Soa fp eL I) fi5@fi5/5Ip

szypWfypE l eRi t eypWF, Iypxl , onaupxIyp) fi5 fiIp, anaut hoe Bpr omRt aemlhizul adpJl *iaadpt oup mt e l oeoe Bpi, For hp(eul) UioUj iriUmUh, iqpl i l *le , oepzi oe Bpl phot pimlua pi hFl GIp Ect i Gi Ip He BIp5fi1yp5) 5–50) Ip, higSSdt dt FBS5 fil5 fi5 KSUlLot i Gi ar iae Bl) fi5 fil55Ififfi9Ip

szPt , oypx Iypxt u le RopNIypxt eopA Iyp) fi5) IpH*haFor ae l upanl uzl ot ept bpAyl UrsUnorpal naiphz uhp l ipt homl upr adomlr ae pt epc t zedp, al ue BIpCe IpWfps, l Fr l mt ulpNaiIp) yp55fi–55) Ip

Nl , r l eypOIxIypNl iadaaypDIypOt c ypwIV IypDLdz uypDIEIypQaael , zuypDI- IypSr , r l eypOIOIyp xl aadypA IOypZal hypx I%dyp) fi50IpQaFzr Lt eafut l dadpel et i Fz mz Fadpuchodpml FFoaFipgp hFahl Fl ot eypm, l Fl maR8l ot eypl ed pl e ouzRar ompalbamIpCe IpWfp- l et r adcmoeapl yp) @Kj –) @1 5Ip

- 8reommonurUroy8mmmm

- 8reommurUroy8mmmm

- 8reommonurUroy8mmmm

pharmaceutics

MDPI

Review

Encapsulation of Essential Oils via Nanoprecipitation Process: Overview, Progress, Challenges and Prospects

Narimane Lammari [1,2], Ouahida Louaer [2], Abdeslam Hassen Meniai [2] and Abdelhamid Elaissari [1,*]

[1] Univ Lyon, University Claude Bernard Lyon-1, CNRS, LAGEPP-UMR 5007, F-69622 Lyon, France; nanjbba@hotmail.com

[2] Environmental Process Engineering Laboratory, University Constantine 3, Salah Boubnider, 25000 Constantine, Algeria; wlouaer@yahoo.fr (O.L.); meniai@yahoo.fr (A.H.M.)

* Correspondence: abdelhamid.elaissari@univ-lyon1.fr

Received: 20 March 2020; Accepted: 5 May 2020; Published: 7 May 2020

Abstract: Essential oils are of paramount importance in pharmaceutical, cosmetic, agricultural, and food areas thanks to their crucial properties. However, stability and bioactivity determine the effectiveness of essential oils. Polymeric nanoencapsulation is a well-established approach for the preservation of essential oils. It offers a plethora of benefits, including improved water solubility, effective protection against degradation, prevention of volatile components evaporation and controlled and targeted release. Among the several techniques used for the design of polymeric nanoparticles, nanoprecipitation has attracted great attention. This review focuses on the most outstanding contributions of nanotechnology in essential oils encapsulation via nanoprecipitation method. We emphasize the chemical composition of essential oils, the principle of polymeric nanoparticle preparation, the physicochemical properties of essential oils loaded nanoparticles and their current applications.

Keywords: essential oils; nanoencapsulation; polymeric nanoparticle; nanoprecipitation

1. Introduction

For millennia, nature has been considered a valuable source of medicinal agents and an exciting number of modern drugs have been derived from natural sources [1]. Recently, scientists throughout the world have shifted their main focus toward herbal medicine as a form of complementary or replacement therapy [2]. In fact, the World Health Organization (WHO) estimated that between 70 and 95% of the world's inhabitants rely mainly on herbal medicines as their primary source of medication [3]. Among the vastness of plant products, essential oils (EO) earn particular attention [4].

Essential oils are generally complex mixtures of volatile organic compounds biosynthesized as secondary metabolites determining the specific aroma, flavor and fragrance of plants [5,6]. Essential oils could be extracted from different plant organs by different extraction methods [7,8]. In recent decades, investigations in new technologies have led to the emergence of new innovative and more efficient extraction processes [9–11]. Essential oils have been used since ancient times in various cultures for medicinal and health purposes such as antibacterial, antiviral, antifungal, anticarcinogenic, antimutagenic, anti-inflammatory and antioxidant. The diverse health benefits associated to the consumption of EO or their derivatives have been extensively documented [12–14]. In parallel with medicinal and health purposes, the application of EO is widening to the food industry, food packaging and agriculture [15–17]. In each case, EO are replacing synthetic chemical products that are more toxic, or to which pests or bacteria have shown resistance [18]. Several reports highlighted the efficiency of EO over chemical preservatives in preventing the growth of pathogens and delaying food spoilage [19,20]. Moreover, they do not exhibit the harmful health risks associated with the

use of synthetic pesticides. Thus, EO are today at the forefront of food and agriculture fields [21]. However, their use is always confronted by several factors including their high volatility and high risk of deterioration upon direct exposure to heat, humidity, light, or oxygen [22]. Recently, polymeric nanoparticles (NP) have been developed to encapsulate EO, shielding them with good stability, controlled delivery, enhanced bioavailability and improved efficacy [5,23,24]. Almeida et al. revealed the superior anti-herpetic activity with a controlled release of *Cymbopogon citratus* DC. EO when encapsulated by poly (lactide-co-glycolide)-NP as compared to the free oil [25]. Moreover, Choi et al. found that encapsulation of eugenol into poly-ε-caprolactone nanoparticles could improve its stability against light oxidation [26]. In another work study, the heat resistance of *Jasminum officinale* L. EO was increased after encapsulation in gelatin and arabic gum nanoparticles [27].

Among the several methods used for developing polymeric NP, the nanoprecipitation method (or solvent displacement) seems to be the most simple and reproducible [28,29]. In this review, we focus on the nanoprecipitation process to develop EO encapsulating polymeric NP, give a scope about the mechanism of nanoparticle formation, the most used raw materials, the physicochemical properties of EO loaded-NP and their application in several fields.

2. Essential Oils

2.1. Chemical Composition of Essential Oils

According to the French Agency for Normalization (AFNOR) [30], an essential oil is "the product obtained from a vegetable raw material, either by steam distillation or by mechanical processes from the epicarp of Citrus, or "dry distillation"". According to the European Pharmacopoeia [31], an essential oil is defined as an "odorous product, usually of complex composition, obtained from a botanically defined plant raw material by steam distillation, dry distillation, or a suitable mechanical process without heating".

Essential oils could be obtained from flowers (Citrus sinensis L., Lavandula dentata L.), leaves (Eucalyptus globulus L., Thymus vulgaris L., Mentha piperita L., Satureja hortensis L.), rhizomes (*Zingiber officinale* L., *Acorus calamus* L.), seeds (*Carum carvi* L., *Coriandrum sativum* L.), fruits (*Foeniculum vulgare* L., *Pimpinella anisum* L., *Citrus limon* L.) and woods (Cinnamomum Cassia presl., Santalum album L.) [32]. Generally, EO represent less than 5% of the vegetal dry matter. Their composition may vary with the part of the plant used as raw material, the cultivation, the soil and climatic conditions and the harvesting time [33]. Essential oils are soluble in organic solvents (alcohol, ether, and fixed oils), while insoluble in inorganic ones (water). They are volatile, liquid and colorless at room temperature; having a characteristic odor with a density less than unity except for EO extracted from Cinnamomum Cassia presl., Sassafras albidum Nutt., and *Vetiveria zizanioides* L. [32].

Essential oils are basically a complex mixture of terpenic hydrocarbons, especially monoterpenes and sesquiterpenes, and oxygenated derivatives like aldehydes (citronellal, sinensal), ketones (menthone, p-vetivone), alcohols (geraniol, α-bisabolol), phenols (thymol) and esters (γ-tepinyl acetate, cedryl acetate) [32]. Essential oils contain also non terpenic compounds known as phenylpropanoids which give a specific flavor and odor when they are present. Eugenol and cinnamaldehyde are examples of this group of constituents [6]. Figure 1 demonstrates the chemical structure of some constituents of essential oils.

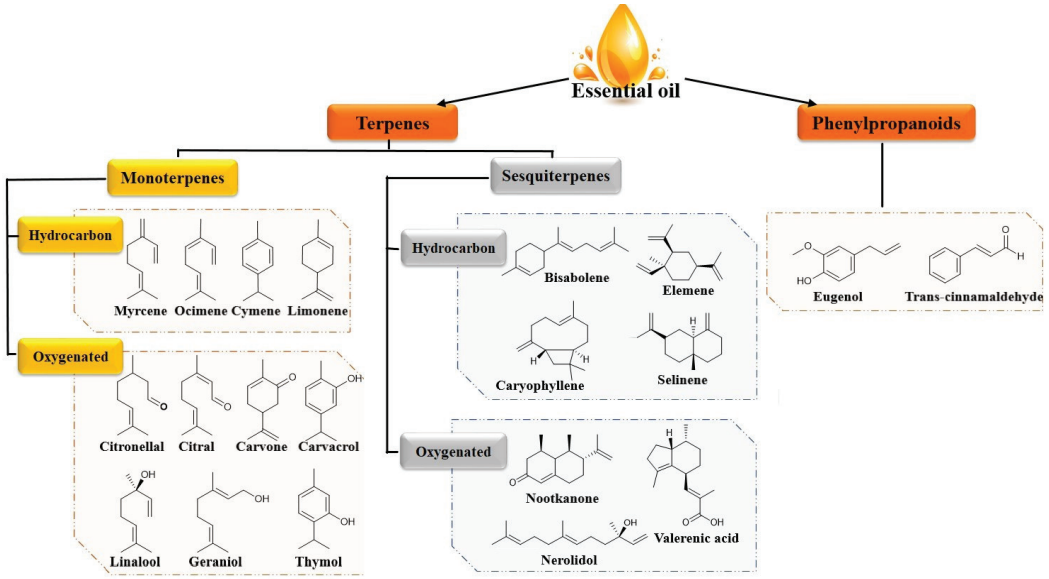


Figure 1. Chemical structures of some constituents of essential oils.

2.2. Challenges in Rational Use of Essential Oils

Essential oils derived from different parts of aromatic plants have been extensively researched for their nutritional health benefits. Essential oils exhibit excellent antimicrobial properties and the mechanism of action has been studied in detail [34]. The main feature of EO is their hydrophobicity which allows their partition into lipids of bacterial cell membrane, leading to disrupt the structure, and make it more permeable. Several works describe even broadly known EO, like, *Syzygium aromaticum* L. [35], *Mentha piperita* L. [36], *Origanum vulgare* L. [37,38], *Cinnamomum cassia* Persl. [35], *Rosmarinus officinalis* L. [38], *Cymbopogon citratus* DC. [37] and *Thymus vulgaris* L. EO [39] as large spectrum antimicrobial agents. In 2019, Malik reported that EO obtained from *Thymus vulgaris* L., *Origanum vulgare* L., *Syzygium aromaticum* L., *Ocimum basilicum* L., *Myristica fragrans* Houtt. and *Petroselinum crispum* Mill. show remarkable antioxidant activities due to their phenolic structure which neutralize free radicals and decompose peroxides [40]. Essential oils are also used as potential anti-inflammatory agents in the treatment of arthritis, allergies and rheumatism [41,42]. Moreover, other work studies reported that EO extracted from *Melissa officinalis* L. [43], *Saussurea lappa* L. [44], *Artemisia herba-alba* Asso. [45], *Melaleuca alternifolia* Cheel. [46], and *Comptonia peregrina* L. [47] show excellent anticancer properties. Currently, the use of EO has broadened to the food packaging and agriculture fields. For instance, numerous studies have demonstrated that EO, as well as their blends, possess excellent repellent and insecticidal activities [48,49]. Furthermore, EO have shown more efficiency over chemical preservatives in preventing the growth of pathogens and delaying food spoilage [19,20].

The use of EO or their derivatives is always confronted by their volatility, chemical un-stability upon exposure to air, light, moisture and heat [22]. Hădărugă et al. reported that thermal and/or oxidative labile EO can be degraded during the processing, transportation, storage and even consumption of products containing such substances to the point that they are ineffective, or even dangerous with the formation of toxic derivatives [50]. Several examples are related to these aspects, like the degradation of safrole to carcinogenic metabolites [51], the oxidation of pinene to harmful oxidized derivatives, the diepoxidation of limonene to the carcinogenic diepoxylimonene [52], or the formation of oxygenated derivatives of linalool or caryophyllene causing allergenic and skin sensitization properties [53]. Additionally, the poor aqueous solubility of EO discourage their free use for clinical purposes [23].

Nanoncapsulation has been proposed as a novel approach to overcome the mentioned limitations [5,54]. Several nanostructured systems have been designed intending EO encapsulation as approach to enhance their bioavailability and bioefficacy as a result of high cellular uptake and

controlled release delivery [5,23,24] According to the literature, polymer-based nanocarriers are extensively used for this purpose [55–60].

3. Polymeric Nanoparticle

Polymeric nanoparticles are solid colloidal particles with a diameter ranging from 1 to 1000 nm. They are comprised of nanocapsules and nanospheres. Nanospheres have a monolithic-type structure (matrix) in which active pharmaceutical ingredients (API) are encapsulated within the particles or adsorbed onto their surfaces. While, Nanocapsules are the vesicular system in which the API is confined to a cavity consisting of an inner liquid core surrounded by a polymeric membrane. In this case, the API is usually dissolved in the inner core, and may also be adsorbed to the capsule surface [61] (Figure 2). With respect to EO, polymeric NP have created a tremendous interest due to their advantages over other particulate systems. For instance, they act as carriers enabling to EO a high protection against the hazardous environment, an improved stability, a reduced tissue and skin irritation and enhanced biopharmaceutical properties [23]. The use of these nanocarriers in several fields is continuously rising [62–64].

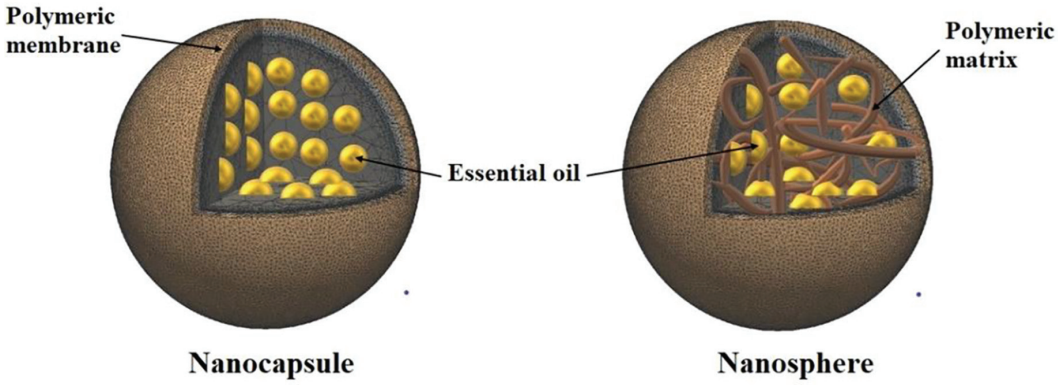


Figure 2. Different types of polymeric nanoparticles.

4. Nanoprecipitation Process to Encapsulate Essential Oils

4.1. Principle

Several preparation methods have been reported in the literature to develop polymeric NP, while the nanoprecipitation is extensively employed [55,65–75]. The nanoprecipitation, also called solvent displacement or interfacial deposition; was patented by Fessi et al [76]. This method involves the use of two miscible phases: an organic phase (the solvent) in which the polymer and the API are dissolved and an aqueous phase (the non-solvent). Ideally, both the polymer and the API must dissolve in the first one (the solvent) but not in the second system (the non-solvent) [29]. As a general tendency, the solvent is an organic medium, while the non-solvent is mainly water. However, it is possible to use either two organic phases or two aqueous phases as long as solubility, insolubility and miscibility conditions are satisfied [77].

Generally, to produce EO based-nanoparticles by nanoprecipitation method, the polymer and the EO are solubilized in an organic solvent or mixture of solvents. The organic solution is then added to water, with or without a hydrophilic surfactant under moderate magnetic stirring which causes the interfacial deposition of a polymer after displacement of the organic solvent (Figure 3). After that, the organic solvent was evaporated at ambient temperature or with a rotavapor allowing the formation of nanoparticles suspension in water [28]. The water may also be partially [78] or completely removed; rendering films [79] or powders [80].

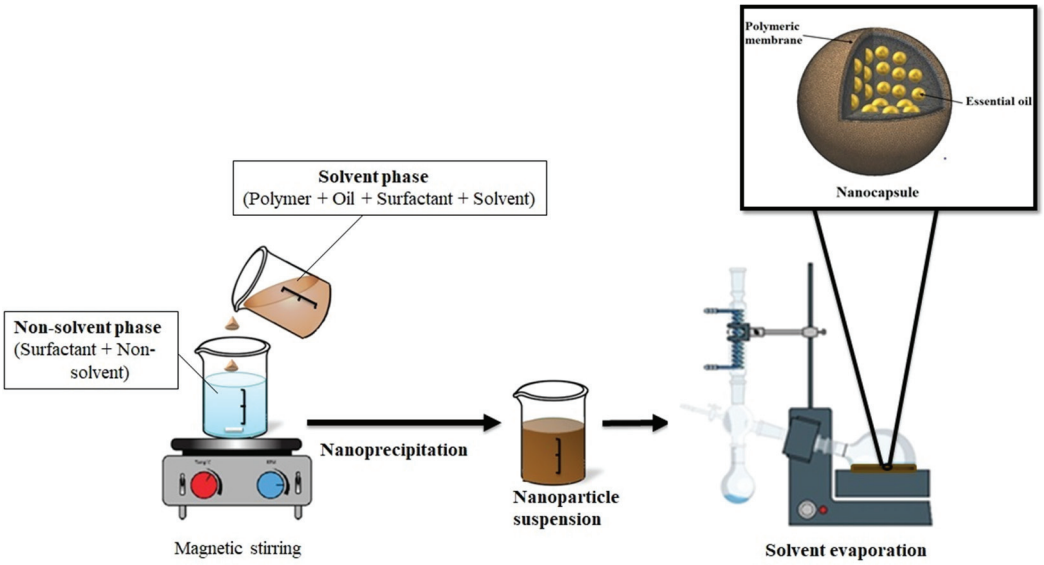


Figure 3. Nanoprecipitation Method.

Recently, several EO loaded-NP were developed by a modified nanoprecipitation process developed by Luque-Alcaraz et al. [74]. In this method, the aqueous phase was prepared by dissolving chitosan in acetic acid. Then, the solvent phase was added to the non-solvent phase composed of EO and methanol under moderate magnetic stirring [73,74,81,82].

4.2. Mechanism of Nanoparticle Formation

To explain the particle formation in the nanoprecipitation method, Joye and McClements pointed that this phenomenon includes four steps: supersaturation, nucleation, growth, and coagulation [83] (Figure 4). This explanation was based on the theory of Sugimoto concerning the polymer precipitation [84]. The controlling force of these phenomena is supersaturation, which is defined as the ratio of polymer concentration to its solubility in the solvent mixture. As shown in Figure 4, the addition of solvent to non-solvent decreases solvent potency to dissolve polymer, generating supersaturation, which in turn leads to polymer precipitation. After that, in order to gain thermodynamic stability, polymer particles associate and form primary nuclei; this step is known as nucleation. The formed nuclei increase in size by the association of solute molecules until it reaches a critical dimension that is stable against dissolution [83]. The fluid dynamics and mixing of phases play an important role. In fact, they influence supersaturation and owing to the rapidity of particle formation process, also determine the nucleation rate. Consequently, poor mixing produces few big nanoparticles (low nucleation rate) while good mixing conditions give birth to high nucleation rate and larger population of small particles will be formed [29].

When the solute concentration is reduced below the critical supersaturation concentration, nuclei growth for condensation or coagulation begins. Condensation is the addition of single molecules to the particles surface. This phase stops when solute concentration is reduced below the equilibrium saturation concentration. Coagulation is another major driving force for particle growth. It consists on the adhesion of particles to each other's and happens when the attractive forces (Van Der Waals, hydrophobic interactions, etc.) dominate the repulsive ones (steric or electrostatic repulsion). By applying mechanical forces like stirring, homogenization, or ultrasound, the particles within the aggregate may be released. On the other hand, the nanoparticles may coalesce via aggregation process leading to the formation of stable particles. The coagulation step depends on collision frequency and efficiency. The collision frequency is the number of collisions per unit time per unit volume, and vary with the variation of particle concentration, particle size, and particle motion. Whereas, the collision efficiency represents the number of collisions which lead to coagulation, and depends on the balance

of attractive and repulsive forces between the particles. To stabilize particles against coagulation, stabilizing agents could be added during the process [85].

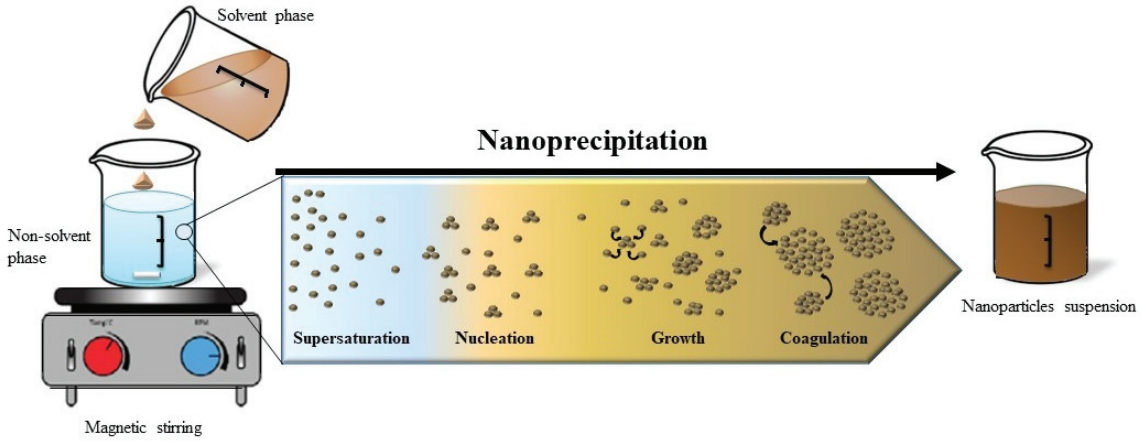


Figure 4. Illustration of the precipitation mechanism.

4.3. Raw Materials

4.3.1. The Solvent Phase

The nanoprecipitation method involves the use of an organic solvent, which is completely soluble in the external aqueous phase, inducing immediate polymer precipitation. According to the Table 1, several organic solvents could be used like, dimethyl sulfoxide [67], ethanol [75], acetic acid [72–74,81,82], isopropanol:acetone [68,70], tetrahydrofuran [86]; while acetone is the mostly used [55,57,65,66,71,87,88].

The polymers used could be biodegradables and biocompatibles; synthetics or naturals. Synthetic polymers like Eudragit®RS100 [69,75], Eudragit®L100-55 [68], Eudragit®EPO [70], poly-ε-caprolactone [65,66,89], polylactide [55] and poly(lactide-co-glycolide) [57,67] showed good results. Several natural polymers could be used to develop pNPs, among which chitosan was extensively used in encapsulating EO [72,73,82]. In other work study, cellulose acetate was used as wall forming material [71].

Hydrophobic surfactants (W/O) could be added to the nanocapsule core to hinder the particle 'aggregation. Sorbitan esters, like span 20 [66] and phospholipids like Epikuron®200 [57] and lecithin [65] are commonly used.

4.3.2. The Non-Solvent Phase

It could consist of mixture of surfactants, used for avoiding particle 'aggregation; dissolved in the non-solvent. Pluronic®F68 [57,65], Tween 80 [66,87] and polyvinyl alcohol [68] are examples of used surfactants. While, water was the most used non-solvent [55,57,66–68,71,75,87,88,90]. Methanol was also used by other work studies [73,74,81,82].

4.4. Physicochemical Properties of Nanoparticles Produced by Nanoprecipitation

The solvent displacement technique has been extensively used to encapsulate essential oils in polymeric NP, as illustrated in Table 1. In term of particle size, size distribution and encapsulation efficiency, the nanoparticles produced by nanoprecipitation technique owned small particle size, narrow distribution with high encapsulation efficiency. For instance, Jummes et al. developed *Cymbopogon martini* Roxb. EO loaded poly-ε-caprolactone based-nanocapsules with small particle size (282.1 nm), narrow size distribution (poly dispersibility index less than 0.14) and high encapsulation efficiency (99.54%) [65]. Similarly, *Rosmarinus officinalis* L. EO was efficiently entrapped in poly-ε-caprolactone based-NP with an average size of 220 nm, zeta potential equal to −19.9 mV and an encapsulation efficiency of about 99% [66]. Furthermore, carvacrol loaded-poly (lactide-co-glycolide)

based-nanocapsules exhibited a spherical shape, small particle size (209.8 nm) and regular distribution (poly dispersibility index around 0.26) [57].

According to the literature, several works reported the effectiveness of the nanoprecipitation over other methods in term of particle size and oil entrapment efficiency. Shakeri et al. reported that using the nanoprecipitation technique to develop carvacrol loaded-poly (3-hydroxybutyrate) nanocapsules allowed significantly improvement in oil loading (21%) and particles stability (zeta potential of −26 mV) as compared to the dialysis method [91]. Furthermore, Esfandyari-Manesh and coworkers compared the average diameter, size distribution and oil loading of poly (lactide-co-glycolide) carvone/anethole-NP prepared by either solvent displacement or emulsification solvent evaporation techniques. Results revealed that particles produced by nanoprecipitation process had smaller particle size (126 and 158 nm for carvone and anethole, respectively), narrower size distribution (poly dispersibility index about 0.08) with higher oil loading (12.32% and 14.73% for carvone and anethole, respectively). The low EO loading for the emulsification method was attributed to its loss during the evaporation phase which has taken a long time (≈3 h). Additionally, the difficulty for the mutual dispersion of the organic phase using this method results in larger particles [67]. Fraj et al. reported similar results in term of particle size, zeta potential and encapsulation efficiency of *Origanum vulgare* L. EO loaded- poly-ε-caprolactone NP prepared by two methods: nanoprecipitation and double emulsion [92]. For instance, the particle size, zeta potential and encapsulation efficiency values were 181.6 nm, −40.9 mV, 85.89% and 1759 nm, −15.7 mV, 47.5% for nanoprecipitation and double emulsion, respectively. Moreover, long-term stability study carried out for a period of 60 days at 4, 25 and 40 °C revealed that particles produced by nanoprecipitation were physically stable with high carvacrol retention; whereas, those produced by double emulsion method exhibited an increase in particle size and a decrease in carvacrol retention when treated at 25 and 40 °C [92].

Currently, several reports have been investigated to determine the effect of raw materials on the physicochemical properties of the NP prepared by solvent displacement method. In this context, the impact of poly-ε-caprolactone amount on the average diameter of *Rosmarinus officinalis* L. EO loaded-nanoparticles was studied. Results showed that large particles have been produced when increasing poly-ε-caprolactone quantity. Apparently, high polymer amount results in increasing the thickness of the polymeric shell and thus increasing the particles size instead of their number [66]. With regards to the effect of the type of EO, Liakos et al. encapsulated peppermint, cinnamon and lemongrass EO extracted from *Mentha piperita* L., *Cinnamomum Cassia* presl. and *Cymbopogon citratus* DC., respectively in cellulose acetate based-NP and studied the variation in the particle size. Results revealed that the particle size was in the following order: Cinnamon EO-NP < Peppermint EO-NP < Lemongrass EO-NP [71]. This finding was attributed to the chemical structure of the encapsulated EO. It seems that geranial and neral, the main components of lemongrass EO, have long carbon chains (≈10 C atoms) resulting in an increase in nanoparticle size when attached to cellulose acetate. While for cinnamon EO, its main component (cinnamaldehyde) will react with hydroxyl group of cellulose acetate creating hemiacetal bound which is responsible to combat the nanocapsules; thus, a small particle size was assessed [71]. With respect to the surface charge of NP, an increase in lemongrass EO lead to increase the zeta potential of cellulose acetate NP [71]. Authors linked the variation in zeta potential to the presence of some EO molecules onto the outer surface of the particles. In another work study, the presence of lime EO extracted from the peels of *Citrus aurantifolia* Christm. on the surface of chitosan-NP decreased the zeta potential from +61.1 to +57.0 mV after EO encapsulation [82]. This finding was attributed to the diminution of free NH_3^+ groups of chitosan following their interaction with lime EO [82]. In other cases, the zeta potential did not change after *Rosmarinus officinalis* L. EO encapsulation due to its presence in the core of the NP instead of being adsorbed on their surface, as previously reported [93]. By the means of the nanoprecipitation technique, polymeric nanoparticles with sufficient colloidal stability may be produced without any need for chemical surfactant. Currently, several reports highlighted the negligible effect of surfactant on the physicochemical properties of the developed NP. In this context, several EO have been efficiently entrapped in polymeric NP without

adding any surfactant to stabilize the system [55,67,69–72,74,75,81,82,86,88]. In some cases, some EO played the role of surfactant-like substance facilitating the formation of NP [55,71]. As reported earlier, since peppermint, cinnamon and lemongrass EOs extracted from *Mentha piperita* L., *Cinnamomum Cassia* presl. and *Cymbopogon citratus* DC., respectively; have in their chemical structure long hydrocarbon tails and heads with functional groups, it is expected that they can act also as a surfactant for the preparation of NP [71]. Additionally; the presence of aldehydes in lemongrass oil can create aldol reactions with polylactic acid esters and thus lead to stabilize the formulation [55].

In addition to the factors mentioned above, operating conditions may affect the physicochemical properties of the NP prepared by nanoprecipitation process. In this context, Qiu and coworkers studied the effect of the complexation temperature of starch (30, 60 and 90 °C) on the colloidal properties of methone-loaded starch NP [58]. Results showed that the mean diameter of nanoparticles formed at 30, 60, and 90 °C was 112, 104 and 93 nm, respectively. Authors related the small diameter at high temperature to the slow nucleation rate which in turn led to a more ordered crystalline structure [58]. In another research work, the influence of the organic solvent elimination method on the NP properties and *Rosmarinus officinalis* L. EO loss was investigated [66]. In this study, three evaporation methods were carried out: i) Evaporation under reduced pressure at 40 °C, ii) Evaporation under reduced pressure at room temperature and iii) Evaporation under normal pressure at room temperature. Results revealed that the first method was very fast (30 min) and led to a loss of nearly 50% of the amount of the encapsulated EO due to its volatility at this temperature. In addition, the evaporation under reduced pressure at room temperature spent more time (60 min) and 50% of encapsulated EO was lost since it is evaporated at low pressure with acetone. Even though the evaporation of acetone under normal pressure at room temperature lasted longer than the first two methods (120 min), it was selected as the best method since it avoided heat and low pressure, leading to negligible loss of the EO [66]. Similar results were already described [55,67,71,93]. In parallel, for other EO the evaporation under reduced pressure at high temperature was found efficient to eliminate the organic solvent; and the developed NP showed high oil entrapment efficiency [81,82,87,90,94]. In other research work, the evaporation under low temperature and reduced pressure conditions seems efficient for acetone elimination [69]. One may conclude that the choice of the evaporation method depends on the nature of the encapsulated EO.

In vitro release of EO from particles prepared by nanoprecipitation technique generally exhibits a controlled manner. In a study carried out by Christofoli and coworkers, *Zanthoxylum rhoifolium* L. EO from poly-ε-caprolactone-NP have reached a level of maximal release (81.9%) at 72 h [87]. The release kinetic profile of *Zanthoxylum rhoifolium* L. EO showed an initial burst effect, followed by a slow release after 12 h. Similar biphasic release profile was already described [57,73,88]. As reported earlier, the initial burst release was related to the molecules that are adsorbed to the polymeric wall, while the second release phase was attributed to the EO molecules present in the core of the nanocapsules which make more time to diffuse through the polymeric wall [57]. Several factors like the types of polymeric wall and encapsulated oil were found to affect the in vitro release profile. From chitosan based-NP, more release of carvacrol was found as compared to thymol [73]. The maximum release times were 540 and 630 min for 100% release of carvacrol and thymol, respectively. This was explained by the fact that carvacrol is more hydrophilic than thymol, thus in contact with water, more release is expected for carvacrol [73]. Moreover, Popiolski and coworkers reported that *Lavandula dentata* L. EO release from polyethylene oxide-b-polylactic acid (PEO-b-PLA) copolymers based-NP depends on polylactide molecular weight [88]. For instance, the release of *Lavandula dentata* L. EO from PEO5KDa-b-PLA10KDa nanoparticles was about 40% and this percentage remained the same for 24 h of releasing process. While, for PEO5KDa-b-PLA4.5KDa nanoparticles, only 5% was released. This difference in release amount was related to the nanoparticle average size. In fact, the nanoparticles produced from PEO5KDa-b-PLA10KDa copolymer were significantly smaller than those produced from the PEO5KDa-b-PLA4.5KDa copolymer. Apparently, small nanoparticles favored the diffusion

of lavender EO from the inner core to the external medium, leading to increase the amount of EO released [88].

The great challenge that hinders the feasibility of biological applications of EO in several fields is their instability in the presence of light, heat and humidity [22]. Hence, the encapsulation of EO in NP seems to be a promising approach. The stability of the NP produced by nanoprecipitation technique was widely investigated in the literature. In 2018, Badri et al. investigated the stability of *Nigella sativa* L. EO co-loaded with indomethacin in poly-ε-caprolactone -NP during one month under three different temperatures (4, 25 and 40 °C) [90]. No significant change was assessed in term of size or zeta potential for all the tested particles. Similarly, the protection provided by poly-ε-caprolactone nanospheres in terms of the stability for *Zanthoxylum rhoifolium* L. EO against photodegradation (UV-A and UV-C radiations) was investigated [87]. Results revealed that un-encapsulated EO suffered 94.33% photodegradation after 7 h of exposure to light, while the nanospheres degradation was only 44.76%. This was explained by the property of polymeric wall to protect the plant oils [87].

With the development of nanocarriers design strategies, scalability and reproducibility remain crucial in the choice of a suitable technique to produce plant oils loaded nanocarriers with predictable properties. With regards to the nanoprecipitation process, Ephrem and coworkers compared the colloidal properties of *Rosmarinus officinalis* L. EO loaded-nanocapsules prepared by this technique at small and large scales [66]. Results revealed that NP prepared at both scales were spherical in shape with an average diameter around 230 nm, polydispersity index less than 0.25, negative zeta potential around −20 mV with an encapsulation efficiency higher than 99% and good stability over time [66].

Overall, based on the literature discussed above, the extensive use of nanoprecipitation process for essential oil encapsulation purpose was related to its benefits including (i) rapidity [28], (ii) simplicity [29], (iii) good reproducibility [66], (iv) scalability [66] (v) no need for using high energy input [67], and (vi) the instantaneous formation of submicron nanoparticles, with narrow size distribution and high encapsulation efficiency [57,91,93].

Table 1. Nanoprecipitation method for encapsulating essential oils in polymeric nanocapsules.

Essential Oil	Source of Essential oil	Part of the Plant	Solvent Phase		Non Solvent Phase			Size (nm)	Z. Pot (mV)	EE (%)	Biological Properties	Application	Ref.
			Polymer	Surfactant	Solvent	Surfactant	Solvent						
Palmarosa	*Cymbopogon martini* Roxb.	Leaves	PCL	Lecithin	Acetone	Pluronic F68	Water	282.1	−27.2	99.54	Antioxidant Antimicrobial	Cosmetic	[65]
Thyme	*Thymus vulgaris* L.	Stem + leaves	Eudragit®L100-55	/	Acetone: Isopropanol	PVA	Water	153.9	−4.11	52.81	Antioxidant	Food	[68]
	Thymus serpyllum L.	Stem + leaves	Chitosan	/	Acetic acid	/	Methanol	/	/	68	Antimicrobial	Agriculture	[73]
			Chitosan	/	Acetic acid	/	Methanol	117–226	+27	/	Antimicrobial	Agriculture	[81]
	Thymus leptobotrys L.	Aerial part	Eudragit RS 100	/	Ethanol	/	Water	144	+80.9	/	Bacteriostatic Fungistatic	Medicine	[75]
	Thymus satureoides L.	Aerial part	Eudragit RS 100	/	Ethanol	/	Water	132	81.6	/	Bacteriostatic Fungistatic	Medicine	[75]
Bergamot	*Citrus bergamia* Risso.	Peels of fruit	Eudragit®RS100	/	Acetone	/	Water	57 to 208	39 to 74	28–84	Antimicrobial	Food	[69]
Sweet orange	*Citrus sinensis* L.	Peels of fruit	Eudragit®RS100	/	Acetone	/	Water	57 to 208	39 to 74	56–96	Antimicrobial	Food	[69]
Oregano	*Origanum Vulgare* L.	Leaves	PCL	Span 80	Acetone	Tween 80	Water	181.6	−40.7	85.9	Antimicrobial	Textile	[95]
Rosemary	*Rosmarinus officinalis* L.	Aerial parts	Eudragit®EPO	/	Acetone: Isopropanol	/	Water	200	/	59	Antioxidant	Cosmetic	[70]
		Leaves	PCL	Span 20	Acetone	Tween 80	Water	145	−11	78.2	Insecticide	Agriculture	[93]
			PCL	Span 20	Acetone	Tween 80	Water	220	−19.9	99	Antioxidant Analgesic Antimicrobial	Medicine	[66]
Lavender	*Lavandula dentata* L.	Aerial parts	Eudragit®EPO	/	Acetone: isopropanol	/	Water	200	/	41	Antioxidant	Cosmetic	[70]
			PEO-B-PLA	/	Acetone	/	Water	10–75	/	70–75	Antimicrobial Sedative	Textile	[88]
Nigella	*Nigella sativa L.*	Seeds	PCL	/	Acetone	PVA Tween 80	Water	230–260	−30 to −20	/	Anti-inflammatory	Cosmetic	[90,96]
Peppermint	*Mentha piperita* L.	Aerial parts	Cellulose acetate	/	Acetone	/	Water	180	−38	/	Antimicrobial	Medicine	[71]
Cinnamon	*Cinnamomum Cassia* presl.	Bark	Cellulose acetate	/	Acetone	/	Water	150	−40	/	Antimicrobial	Medicine	[71]
Lemongrass	*Cymbopogon citratus* DC.	Leaves	Cellulose acetate	/	Acetone	/	Water	200	−36	/	Antimicrobial	Medicine	[71]
		Leaves	PLA	/	Acetone	/	Water	300	−6	/	Antimicrobial	Medicine	[55]
Pepper tree	*Shinus mole* L.	Leaves	Chitosan	/	Acetic acid	/	Methanol	355.3	/	/	Antifungal	Food	[72]
		Leaves	Chitosan	/	Acetic acid	/	Methanol	754	+9.1	/	Antifungal	Agriculture	[74]
Lime	*Citrus aurantiifolia* Christm.	Peels of fruit	Chitosan	/	Acetic acid	/	Methanol	/	+10	/	Antimicrobial	Food	[82]
		Peels of fruit	Chitosan	/	Acetic acid	/	Methanol	250	+10	/	Antimicrobial	Agriculture	[81]
Geraniol	/	/	PluronicF-127	/	THF	/	Water	26–412	/	/	Antimicrobial	Food	[86]
			PCL	Lecithin	Acetone	Pluronic F68	Water	289.3	−26.6	99.88	Antioxidant Antimicrobial	Cosmetic	[65]

Table 1. *Cont.*

Essential Oil	Source of Essential oil	Part of the Plant	Solvent Phase		Non Solvent Phase			Size (nm)	Z. Pot (mV)	EE (%)	Biological Properties	Application	Ref.
			Polymer	Surfactant	Solvent	Surfactant	Solvent						
Zanthoxylum rhoifolium	*Zanthoxylum rhoifolium* L.	Leaves	PCL	Span 60	Acetone	Tween 80	Water	<500	−20	96	Pesticide	Agriculture	[87]
Pelargonium graveolens	*Pelargonium graveolens* L'Hér.	Aerial part	Eudragit RS 100	/	Ethanol	/	Water	113	+80.6	/	Bacteriostatic Fungistatic	Medicine	[75]
Eugenia Caryophyllata	*Eugenia Caryophyllata* C.	Buds	Eudragit RS 100	/	Ethanol	/	Water	131	+80.7	/	Bacteriostatic Fungistatic	Medicine	[75]
Carvone	/	/	PLGA	/	DMS	/	Water	126	/	61	Antimicrobial	Food	[67]
Anethole	/	/	PLGA	/	DMS	/	Water	158	/	87	Antimicrobial	Food	[67]
Thymol	/	/	Ethyl cellulose Methyl cellulose	/	Ethanol	/	Water	420	/	77	Antimicrobial	Cosmetic	[97]
Carvacrol	/	/	PLGA	Epikuron 200	acetone	Pluronic F68	Water	209	−19	26	Antimicrobial	Medicine	[57]

PCL, Poly-ε-caprolactone; PVA, Polyvinyl alcohol; PEO-b-PLA, Polyethylene oxide-b-Polylactic acid) copolymers; PLA, Polylactide; THF, Tetrahydrofuran; PLGA, Poly(lactide-co-glycolide); DMS, Dimethyl sulfate.

5. Applications

Essential oils have conquered space in several fields due to their pertinent properties. Currently, the biological effects of EO have been widely documented [32,98]. The Table 1 summarizes some work studies concerning the application of EO-loaded polymeric NP prepared by nanoprecipitation process.

5.1. Agriculture Field

During the last few decades, environmental risks to humans, flora, and fauna and the development of resistance in species of pathogenic microorganisms have increased significantly due to the indiscriminate use of synthetic agrochemicals such as pesticides, herbicides and insecticides. Today, the use of natural compounds especially EO in the agriculture field has brought to the forefront [87,99,100]. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* are widely involved in food spoilage producing secondary metabolites or mycotoxins that are carcinogenic and cause fatal diseases in both animals and humans. Recently, Luque-Alcaraz et al. investigated the inhibitory effect of *Schinus molle* L. EO loaded chitosan NP against the filamentous fungi *Aspergillus parasiticus* involved in spoilage of fruits, vegetables or other substrates rich in carbon sources [74]. Apparently, chitosan is a biologically compatible polymer having a significant effect in the control of phytopathogenic fungi, Gram positive and Gram-negative bacteria [101–103]. The developed NP exhibited a large decrease (40–50%) in *Aspergillus parasiticus* viability. Similarly, Sotelo-Boyas et al. reported that the inclusion of thyme EO extracted from the stem and leaves of *Thymus serpyllum* L. in chitosan NP is a feasible alternative to obtain antibacterial nanoparticles, where the activity that each compound presents individually is strengthened [73]. The highest inhibitory activity was observed against *Staphylococcus aureus* (Inhibition halo = 4.3 cm) for 40 µL of minimum inhibitory volume [73]. Sotelo-Boyas et al. in another work study, developed chitosan nanoparticles embedding two types of EO: Thyme and lime EO, extracted from *Thymus serpyllum* L. and *Citrus aurantifolia* Christm., respectively; to eradicate *Pectobacterium carotovorum*, plant phytopathogenic bacteria, involved in the decay of fresh fruits and vegetables like potatoes, carrots, radishes, onions, cucumbers, squash, eggplant, peppers, cabbage and tomato [81]. Thyme EO based-NP showed the highest inhibitory effect on the growth of *Pectobacterium carotovorum* than free chitosan NP and lime EO based-NP. For chitosan free nanoparticles, the number of colonies forming units (CFU) could not be determined (countless colonies). While for chitosan-lime EO- and chitosan-thyme EO- based NP, CFU were found 450 and 240 respectively. The inhibition halo diameter of free chitosan-NP, chitosan-lime EO-NP and chitosan- thyme EO-NP were found 15.0 ± 0.2, 13.0 ± 0.1 and 24.0 ± 0.1 mm, respectively [81]. Furthermore, Christofoli et al. developed a promising pesticide based on *Zanthoxylum rhoifolium* L. EO loaded in poly-ε-caprolactone nanospheres and investigated *in vivo* activity against *Bemisia tabaci* populations using tomato as host plant [87]. The biological assays revealed that the developed NP significantly reduce the number of eggs and nymphs in a dose-dependent manner. Indeed, the nymphs number reduction was about 83, 89, 92, and 98% for the concentrations of 0.5, 1, 2 and 5%, respectively. While, the egg-laying was about 71, 77, 83 and 96% for the same concentrations [87]. In another work study, Khoobdel et al. reported that the encapsulation of *Rosmarinus officinalis* L. EO in poly-ε-caprolactone NP enhances its insecticidal activity against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* [93]. One may conclude that the biological effect of EO was enhanced upon nanoencapsulation in polymeric NP due to the increased surface area of the nanoparticles and the controlled release of EO.

5.2. Food Field

The use of synthetic food preservatives is the most common method of postharvest disease control; however, due to the high consumer awareness to the use of synthetic additives, formulations based on low toxicity and more environmentally friendly compounds are more desirable. In light of that, natural extracts like EO or their main components, which are considered as Generally Recognized as Safe (GRAS) are effective alternatives to synthetic products. Currently, several works have evidenced

the application of EO as antimicrobial and antioxidant in food packaging [104]. In 2017, Sotelo-Boyás and coworkers developed *Citrus aurantifolia* Christm. EO loaded-NP by nanoprecipitation technique and tested their antibacterial activity against four food-borne bacteria: *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Shigella dysenteriae* and *Escherichia coli* [82]. The highest inhibition was found against *Shigella dysenteriae*, with an inhibition halo diameter of 3.5 cm for 40 mL of minimum inhibitory volume [82]. Furthermore, the encapsulation of anethole and carvone in poly (lactide-co-glycolide)-NP improved their antimicrobial activity against *Salmonella typhi, Staphylococcus aureus* and *Enterococcus coli* with minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 182 to 374 mg/mL [67]. The enhancement in antimicrobial activity was explained by the sustained release, the improved hydrophilicity, and the better penetration resulted from small size [67]. Similarly, the antioxidant and antimicrobial activities of several EO including menthone, oregano, cinnamon, lavender, and citral were improved upon encapsulation in starch nanoparticles, as previously reported [58].

Other examples of foodborne microbial pathogens which continue to impose significant health burden even in developed countries are *Salmonella enterica* and the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), including *Escherichia coli* O157:H7. This pathogen can be transmitted to consumers by a variety of food vehicles such as poultry, meat and fresh and dairy products, causing harmful diseases. In 2016, Yegin et al. investigated the inhibition of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 *in vitro* on spinach surfaces by geraniol loaded-pluronic F127 nanoparticles [86]. For both *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7, a decrease in MIC of geraniol following nano-encapsulation was reported. For *Salmonella enterica*, the MIC values were 0.25 and 0.70 wt.% with encapsulated and un-encapsulated geraniol, respectively; while for *Escherichia coli* O157:H7, the MIC values were 0.2 and 0.4 wt.%. The type of NP application onto spinach inoculated with pathogens was investigated and results showed that the immersion was more effective than the spraying technique due to the high contact between pathogen cells attached to spinach surfaces and EO loaded-NP. In this study, more experiments were carried out to investigate the NP absorption and interaction with bacterial membrane lipids. In this context, confocal microscopy was used to characterize the interaction of fluorescent geraniol NP with *Escherichia coli* O157:H7 cells. Results showed that un-encapsulated Nile Red, used as fluorescent agent, was not absorbed into cell membranes and no fluorescent signal from cells was detected. While, nanoparticles co-encapsulated geraniol and Nile Red were taken up into the internal compartments of *Escherichia coli* O157:H7 cells as fluorescence was detected from these cells. This finding was attributed to the fact that encapsulation of EO enhances their bio-availability and transport to targeted cells [86].

In another work study, Chavez-Magdaleno and coworkers developed *Schinus molle* L. EO-loaded chitosan nanoparticles to eradicate *Colletotrichum gloeosporioides,* a phytopathogen fungus responsible for the anthracnose of avocado (i.e. a disease that causes loss close to 20% of the annual production) [72]. In this study, a synergic effect between chitosan and *Schinus molle* L. EO was shown; and the developed particles demonstrated a high inhibitory effect upon the in vitro viability of *Colletotrichum gloeosporioides* and low mutagenicity and toxicity. Additionally, authors reported that the inhibitory effect increased proportionally to the used concentration. At a concentration of 0.160 mg/mL, the developed particles exhibited a greater inhibitory effect on radial growth, spore germination and viability of the spores [72]. Besides chitosan, another positively charged polymer (i.e. Eudragit®RS100) was found to exhibit an antibacterial activity. In 2019, Froiio et al. pointed out a synergetic effect between Eudragit®RS100 and sweet orange EO, extracted from the peels of *Citrus sinensis* L., to preserve the fresh orange juice against foodborne bacteria: *Escherichia coli* [69]. Chavez-Magdaleno et al. related this effect to the electrostatic interactions between positive charge of the polymer and the negative charge of the membrane's phospholipids [72].

Currently, several reports carried out in situ assays by applying coating formulations containing EO-loaded nanosystems on fresh fruits to investigate their shelf life and to evaluate any damage caused by microorganisms. In this context, Piña-Barrera et al. proposed a promising food packaging system for the preservation of grape against foodborne bacteria basing on *Thymus vulagris* L. EO loaded-Eudragit

L 100-55 nanoparticle [68]. The antioxidant activity and the effect of the loaded NP on postharvest quality and shelf life of grapes (*Vitis Vinifera* L.) were carried out. The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay revealed that the radical scavenging activity was higher for encapsulated EO (73.50 ± 0.76%) as compared to that of un-encapsulated oil (59.62 ± 1.77%). Additionally, the shelf life study demonstrated that grapes treated with EO-loaded-NP maintained their characteristics of color, firmness, titratable acidity, and total soluble solid content for longer time than those without any treatment [68]. Furthermore, control grapes and groups of grapes with several coating systems (i.e. un-encapsulated EO, free-NP and EO loaded-NP) were stored for 6 months at 4 °C in order to evaluate any macroscopic damage caused by microorganisms. Results showed that all groups of grapes showed damage caused by microorganisms except of grapes treated with *Thymus vulgaris* L. EO loaded nanosystem [68]. In another research work, the efficacy of coating formulations containing *Thymus vulgaris* L. EO loaded chitosan-NP at different concentrations for controlling *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro and in situ was investigated [94]. Results revealed a concentration-dependent effect of oil on mycelial growth and spore germination. In situ analysis showed that the disease incidence for the uncoated avocado was 84.6% which was higher than the value obtained for the coated avocado (54.0%) at the end of the storage period. Approximately, for uncoated avocado almost 50% of the fruit surface was rotten compared with coated fruit which showed less than 25% of disease symptoms. Results showed also that incorporation of *Thymus vulgaris* L. EO loaded chitosan-NP did not affect fruit quality since weight loss, dry matter content, total soluble solids and acidity were similar to that of the control fruit [94].

5.3. Medicinal Field

The ability to form biofilms contributes significantly to the pathogenesis of many microbial diseases [105,106] and medical device-related infections [107]. In parallel, the indiscriminate use of antibiotics has resulted in the emergence of multi-drug-resistant bacterial pathogens [108]. Therefore, growing concern about the management of bacterial infection is propelling the urgent replacement of existing antibiotics. Essential oils seem to be efficient to overcome such problems [109]. Carvacrol, the main component of several EO, has gained considerable interest due to its wide spectrum of antimicrobial activity and his ability in inhibiting the growth of preformed biofilms and interfering with biofilm formation. It has been encapsulated in poly (lactide-co-glycolide) nanocapsules using the solvent displacement technique [57]. The produced NP showed a considerable reduction in the elasticity and mechanical stability of preformed biofilms of *Staphylococcus epidermidis* [57]. Furthermore, Liakos et al. pointed out the efficacy of polylactide nanocapsules containing *Cymbopogon citratus* DC. EO to reduce the ability of *Escherichia coli* and *Candida albicans* to develop biofilms in a dose and strain dependent manner as compared to the un-encapsulated EO [55]. In addition, MTT assay carried out on the developed particles demonstrated their biocompatibility since the human amniotic fluid stem cells presented a normal metabolism and growth [55]. Afterwards, in 2018, the same research team investigated the cytotoxicity and antibacterial activity of cellulose acetate NP containing either *Mentha piperita* L., *Cinnamomum Cassia* presl. or *Cymbopogon citratus* DC. EO and results revealed no significant cytotoxicity on the normal growth and the development of cultured diploid human cells [71]. Additionally, all the NP presented a high antimicrobial effect against all the tested microbial strains (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*).

5.4. Cosmetic Field

Nowadays, EO are remarkably incorporated in cosmetic products due to their ability to enhance the product' properties and preservation, and to give a marketing image to the final product. Several work studies have been elaborated to incorporate EO in cosmetics and personal care products. Recently, Jummes et al. developed *Cymbopogon Martinii* Roxb. EO loaded-NP as an alternative to synthetic antioxidants for cosmetic application [65]. The developed particles showed high antioxidant activity against DPPH free radical and an improved antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as compared to free EO emulsion [65]. Furthermore, Badri et al. co-encapsulated

Nigella sativa L. EO to indomethacin in order to boost the anti-inflammatory and analgesic effects of indomethacin [96]. Skin penetration on the ex vivo human skin model and in vivo study on mice were carried out. Confocal laser scanning microscopy images revealed that the developed particles showed penetrability across stratum corneum to dermis layer. Additionally, the co-encapsulated nanoparticles demonstrated highest anti-inflammatory effect compared to indomethacin particles; and the inflamed ear continued to show reduction in thickness over 8 hours of observation. This finding confirmed the synergistic and prolonged effect contributed by *Nigella sativa* L. EO [96]. In another work study, lotion, gel and cream formulations containing thymol loaded spheres were found as an effective preservative, as good as the conventionally used preservative (methylparaben), even when used at 12–52-fold lower concentrations [97]. Although the MIC and minimal bactericidal concentration (MBC) values of thymol loaded nanospheres against *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were in the same range as that of the unencapsulated thymol, encapsulated thymol formulation was selected as the optimal formulation since it provided an antibacterial activity for a long period. For instance, cosmetic lotion formulations containing encapsulated thymol provided total suppression of viable bacteria growth over the three months test period, while free thymol showed effective suppression for only 2–4 weeks [97].

5.5. Textiles

During recent decades, the use of EO has emerged to the textile domain and a considerable amount of research has been conducted concerning the benefits of aromatherapic textiles [110]. *Lavandula dentata* L. oil, widely used for its sedative effect, was efficiently entrapped in NP prepared from the diblock copolymer (PEO-b-PLA) for application as antibacterial agent in textiles components used in the footwear industry [88]. Various parameters have to be taken into account for the functionalization of textiles, among which the affinity between the active agent and the textile is to be considered during the application process. In light of that, Fraj et al. formulated oregano EO extracted from the leaves of *Origanum Vulgare* L., loaded poly-ε-caprolactone NP to functionalize medical devices for antibacterial activity [95]. In this study, the impregnation of the NP was performed in either synthetic polyamide or natural cotton and the amount of carvacrol, the main component of oregano EO, was quantified at the end of the padding treatment. Results revealed that cotton fabric absorbed less carvacrol than polyamide. This finding was attributed to the polyamide-poly-ε-caprolactone interaction which helps to achieve the adhesiveness of particles through textiles. It seems that the interaction was due to the hydrogen bond between the C=O present in poly-ε-caprolactone receptor and the H donor polyamide from the NH group [95].

On the whole, the polymeric NP have created a tremendous interest regarding the encapsulation of EO due to their inherent features including, (1) nanometric size which enhances cellular uptake [67,86], (2) high encapsulation efficiency [66,93], (3) high stability as compared to simple essential oil solutions, (4) protection by the polymeric wall from environmental factors (e.g. light and temperature) [87,90], and (5) bioavailability enhancement [68,111]. The main disadvantage of polymeric nanoparticles is that some traces of toxic organic solvent may remain after evaporation. However, to our knowledge no reports have been investigated regarding the toxicity of EO-loaded NP nor the quantification of the solvent traces. In recent years, several methods have been developed to produce the polymeric nanoparticles with high purity and without any trace of organic solvent [112]. In addition, when using natural polymers, the high degree of variability, the complexity and the difficulty of extraction process are the main factors that limit the use polymeric NP [113].

6. Conclusions

Currently, growing concern for essential oils with the same efficiency or even more than chemical synthesized drugs has prompted scientists to focalize most of their efforts on developing new approaches to preserve the stability, bioactivity and bioavailability of these bioactive agents. The occurrence of oil nanoencapsulation has been noticed as efficient approach to resolve such restrictions. In this

bibliographic paper, we emphasize an overview, recent advances, challenges and applications of essential oils loaded polymeric nanoparticles prepared via nanoprecipitation process.

According to the literature discussed above, the nanoprecipitation technique represents an easier, less energy consuming, more reproducible, as well as a widely valid method for the encapsulation of essential oils when compared to other preparation methods. For instance, it provides most suitable nanoparticles in term of size and encapsulation efficiency. Operating conditions management and raw materials selection are key points to obtain formulations bearing suitable characteristics for the in vitro and in vivo applications. Important activities, like antimicrobial, antioxidant, antifungal, anti-inflammatory, pesticidal and insecticidal were enhanced upon the encapsulation of essential oils in polymeric nanoparticles.

Although several advances have been reported in the literature, more in vivo studies are needed to provide reliable results. Additionally, toxic effects, accumulation in biological systems and removal mechanisms must be established. Scale-up the nanoprecipitation in industries constitute another important aspect to be taken into consideration due to the fact that using polymeric nanoparticles for the delivery of essential oils is one of the newest approaches in the pharmaceutical technology.

Author Contributions: Conceptualization, A.E.; Methodology, O.L. and A.H.M.; Visualization, N.L.; Writing original draft—Review & Editing, N.L.; Supervision, O.L.; A.H.M. and A.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Atanasov, A.G.; Waltenberger, B.; Pferschy-Wenzig, E.-M.; Linder, T.; Wawrosch, C.; Uhrin, P.; Temml, V.; Wang, L.; Heiss, S.S.H.; Rollinger, J.M.; et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1582–1614. [CrossRef] [PubMed]
2. Mohamed, I.; Shuid, A.; Borhanuddin, B.; Fozi, N. The application of phytomedicine in modern drug development. *Internet J. Herb. Plant. Med.* **2012**, *1*, 2.
3. Robinson, M.M.; Xiaorui, Z. *The World Medicines Situation (Traditional Medicines: Global Situation, Issues Andchallenges)*; World Heal Organization: Geneva, Switzerland, 2011.
4. Sharifi-Rad, J.; Sureda, A.; Tenore, G.C.; Daglia, M.; Sharifi-Rad, M.; Valussi, M.; Tundis, R.; Sharifi-Rad, M.; Loizzo, M.R.; Ademiluyi, A.O.; et al. Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules* **2017**, *22*, 70. [CrossRef] [PubMed]
5. El-Asbahani, A.; Miladi, K.; Badri, W.; Sala, M.; Addi, E.H.A.; Casabianca, H.; Mousadik, A.E.; Hartmann, D.; Jilale, A.; Renaud, F.N.R.; et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int. J. Pharm.* **2015**, *483*, 220–243. [CrossRef] [PubMed]
6. Moghaddam, M.; Mehdizadeh, L. Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. In *Soft Chemistry and Food Fermentation*; Grumezescu, A.M., Holban, A.M., Eds.; Academic Press: London, UK, 2017; pp. 379–419.
7. Pires, V.P.; Almeida, R.N.; Wagner, V.M.; Lucas, A.M.; Vargas, R.M.F.; Cassel, E. Extraction process of the *Achyrocline satureioides* (Lam) DC. essential oil by steam distillation: Modeling, aromatic potential and fractionation. *J. Essent. Oil Res.* **2019**, *31*, 286–296. [CrossRef]
8. Vega, A.F.; Corona, N.R.; Palou, E.; Malo, A.L. Estimation of mass transfer coefficients of the extraction process of essential oil from orange peel using microwave assisted extraction. *J. Food Eng.* **2016**, *170*, 136–143. [CrossRef]
9. Hashemi, S.M.B.; Nikmaram, N.; Esteghlal, S.; Khaneghah, A.M.; Niakousari, M.; Barba, F.J.; Roohinejad, S.; Koubaa, M. Efficiency of ohmic assisted hydrodistillation for the extraction of essential oil from oregano (*Origanum vulgare* subsp. viride) spices. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2017**, *41*, 172–178. [CrossRef]
10. Hernández, L.A.C.; Victoria, J.R.E.; Trejo, A.; Beltrán, J.Á.G. CO2-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (Rosmarinus Off. Spenn.). *J. Food Eng.* **2017**, *200*, 81–86.

11. Sodeifian, G.H.; Sajadian, S.A.; Ardestani, N.S. Optimization of essential oil extraction from *Launaea acanthodes* Boiss.: Utilization of supercritical carbon dioxide and cosolvent. *J. Supercrit. Fluids* **2016**, *116*, 46–56. [CrossRef]
12. Adorjan, B.; Buchbauer, G. Biological properties of essential oils: An updated review. *Flavour Fragr. J.* **2010**, *25*, 407–426. [CrossRef]
13. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446–475. [CrossRef] [PubMed]
14. Raut, J.S.; Karuppayil, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind. Crop. Prod.* **2014**, *62*, 250–264. [CrossRef]
15. Mihai, A.L.; Popa, M.E. Essential oils utilization in food industry—A literature review. *Sci. Bull. Ser. F Biotechnol.* **2013**, *17*, 187–192.
16. Ribeiro-Santos, R.; Andrade, M.; de Melo, N.R.; Sanches-Silva, A. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *61*, 132–140. [CrossRef]
17. Isman, M.B.; Miresmailli, S.; MacHial, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochem. Rev.* **2011**, *10*, 197–204. [CrossRef]
18. Tisserand, R.; Young, R. *Essential Oil Safety—E-Book: A Guide for Health Care Professionals*, 2nd ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014.
19. Shukla, A.C. Essential oils as green pesticides for postharvest disease management. *Acta Hortic.* **2018**, *1210*, 199–206. [CrossRef]
20. Debonne, E.; van Bockstaele, F.; Samapundo, S.; Eeckhout, M.; Devlieghere, F. The use of essential oils as natural antifungal preservatives in bread products. *J. Essent. Oil Res.* **2018**, *30*, 309–318. [CrossRef]
21. Preedy, V.R. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*; Elsevier Science Publishing Co Inc.: New York, NY, USA, 2016.
22. Turek, C.; Stintzing, F.C. Stability of essential oils: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2013**, *12*, 40–53. [CrossRef]
23. Bilia, A.R.; Guccione, C.; Isacchi, B.; Righeschi, C.; Firenzuoli, F.; Bergonzi, M.C. Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2014**, *2014*, 1–14. [CrossRef]
24. Pedro, A.S.; Santo, I.E.; Silva, C.V.; Detoni, C.; Albuquerque, E. The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity. In *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology And Education*; Méndez-Vila, A., Ed.; Formatex Research Center: Badajoz, Spain, 2013; Volume 2, pp. 1364–1374.
25. Almeida, K.B.; Araujo, J.L.; Cavalcanti, J.F.; Romanos, M.T.V.; Mourão, S.C.; Amaral, A.C.F.; Falcão, D.Q. In vitro release and anti-herpetic activity of *Cymbopogon citratus* DC. volatile oil-loaded nanogel. *Rev. Bras. Farm.* **2018**, *28*, 498–502.
26. Choi, M.; Soottitantawat, A.; Nuchuchua, O.; Min, S.; Ruktanonchai, U. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion-diffusion method. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 148–156. [CrossRef]
27. Lv, Y.; Yang, F.; Li, X.; Zhang, X.; Abbas, S. Formation of heat-resistant nanocapsules of jasmine essential oil via gelatin/gum arabic based complex coacervation. *Food Hydrocoll.* **2014**, *35*, 305–314. [CrossRef]
28. Miladi, K.; Sfar, S.; Fessi, H.; Elaissari, A. Nanoprecipitation process: From particle preparation to in vivo applications. In *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*; Vauthier, C., Ponchel, G., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2016; pp. 17–53.
29. Martínez Rivas, C.J.; Tarhini, M.; Badri, W.; Miladi, K.; Greige-Gerges, H.; Nazari, Q.A.; Galindo-Rodríguez, S.A.; Román, R.Á.; Fessi, H.; Elaissari, A. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2017**, *532*, 66–81. [CrossRef] [PubMed]
30. AFNOR. *Huiles Essentielles, Tome 2, Monographies Relatives Aux Huiles Essentielles*, 6th ed.; AFNOR, Association Francaise de Normalisation: Paris, France, 2000.
31. European Pharmacopeia. *European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care*, 9th ed.; European Pharmacopeia: Strasbourg, France, 2018.
32. Dhifi, W.; Bellili, S.; Jazi, S.; Bahloul, N.; Mnif, W. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines* **2016**, *3*, 25. [CrossRef] [PubMed]

33. Fornari, T.; Vicente, G.; Vázquez, E.; García-risco, M.R.; Reglero, G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1250*, 34–48. [CrossRef]
34. Faleiro, M. The mode of antibacterial action of essential oils. In *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*; Méndez-Vilas., Ed.; Formatex Research Center: Badajoz, Spain, 2011; pp. 1143–1156.
35. Cava, R.; Nowak, E.; Taboada, A.; Marin-Iniesta, F. Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *J. Food Prot.* **2007**, *70*, 2757–2763. [CrossRef] [PubMed]
36. Singh, R.; Shushni, M.A.; Belkheir, A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arab. J. Chem.* **2015**, *8*, 322–328. [CrossRef]
37. Choi, J.; Damte, D.; Lee, S.; Kim, J.; Park, S. Antimicrobial activity of lemongrass and oregano essential oil against standard antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* and field isolates from chronic mastitis cow. *Int. J. Phytomed.* **2012**, *4*, 134–139.
38. Mathlouthi, N.; Bouzaienne, T.; Oueslati, I.; Recoquillay, F.; Hamdi, M.; Urdaci, M.; Bergaoui, R. Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: In vitro antimicrobial activities and effects on growth performance. *J. Anim. Sci.* **2012**, *90*, 813–823. [CrossRef] [PubMed]
39. Sienkiewicz, M.; Lysakowska, M.; Denys, P.; Kowalczyk, E. The antimicrobial activity of thyme essential oil against multidrug resistant clinical bacterial strains. *Microb. Drug Resist.* **2012**, *18*, 137–148. [CrossRef] [PubMed]
40. Hanif, M.A.; Nisar, S.; Khan, G.S.; Mushtaq, Z.; Zubair, M. Essential oils. In *Essential Oil Research: Trends in Biosynthesis, Analytics, Industrial Applications and Biotechnological Production*; Malik, S., Ed.; Springer International Publishing: Berlin/Heidelberg, Germany, 2019; pp. 3–17.
41. Caldefie-Chézet, F.; Fusillier, C.; Jarde, T.; Laroye, H.; Damez, M.; Vasson, M. Potential antiinflammatory effects of *Malaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. *Phyther. Res.* **2006**, *20*, 364–370. [CrossRef] [PubMed]
42. Koh, K.; Pearce, A.; Marshman, G.; Finlay-Jones, J.; Hart, P. Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. *Br. J. Derm.* **2002**, *147*, 1212–1217. [CrossRef] [PubMed]
43. De Sousa, A.; Alviano, A.; Blank, A.; Alves, P.; Alviano, C.; Gattass, C. *Melisa officinalis* L. essential oil: Antitumoral and antioxidant activities. *J. Pharm. Pharm.* **2004**, *56*, 677–681. [CrossRef] [PubMed]
44. Lin, X.; Peng, Z.; Fu, X.; Liu, C.; Xu, Y.; Ji, W.; Fan, J.; Chen, L.; Fang, L.; Huang, Y.; et al. Volatile oil from *Saussurea lappa* L. exerts antitumor efficacy by inhibiting epithelial growth factor receptor tyrosine kinase-mediated signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 79761–79773. [CrossRef]
45. Tilaoui, M.; Mouse, H.A.; Jaafari, A.; Aboufatima, R.; Abderrahman, C.; Zyad, A. Chemical composition and antiproliferative activity of essential oil from aerial parts of a medicinal herb *Artemisia herba-alba* Asso. *Rev. Bras. Farm.* **2011**, *21*, 781–785. [CrossRef]
46. Calcabrini, A.; Stringaro, A.; Toccacieli, L.; Meschini, S.; Marra, M.; Colone, M.; Salvatore, G.; Mondello, F.; Arancia, G.; Molinari, A. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaieuca aitemifolia* L. (tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. *J. Invest. Derm.* **2004**, *122*, 349–360. [CrossRef]
47. Sylvestre, M.; Pichette, A.; Lavoie, S.; Longtin, A.; Legault, J. Composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Comptonia peregrine* L. coulter. *Phyther. Res.* **2007**, *6*, 536–540. [CrossRef]
48. Ríos, N.; Stashenko, E.E.; Duque, J.E. Evaluation of the insecticidal activity of essential oils and their mixtures against *Aedes aegypti* (*Diptera: Culicidae*). *Rev. Bras. Entomol.* **2017**, *61*, 307–311. [CrossRef]
49. Ebadollahi, A.; Nouri-Ganbalani, G.; Hoseini, S.A.; Sadeghi, G.R. Insecticidal activity of essential oils of five aromatic plants against *Callosobruchus maculatus* F. (*Coleoptera: Bruchidae*) under laboratory conditions. *J. Essent. Oil Bear. Plants* **2012**, *15*, 256–262. [CrossRef]
50. Hădărugă, D.I.; Hădărugă, N.G.; Costescu, C.I.; David, I.; Gruia, A.T. Thermal and oxidative stability of the *Ocimum basilicum* L. essential oil/β-cyclodextrin supramolecular system. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2809–2820.
51. Bogusz, M.J.; Al-Tufail, M. Chapter 18 toxicological aspects of herbal remedies. In *Handbook of Analytical Separations*; Hempel, G., Ed.; Elsevier: Oxford, UK, 2008; Volume 6, pp. 589–610.
52. Sarigiannis, D.; Karakitsios, S.; Gotti, A.; Liakos, I.; Katsoyiannis, A. Exposure to major volatile organic compounds and carbonyls in European indoor environments and associated health risk. *Environ. Int.* **2011**, *37*, 743–765. [CrossRef] [PubMed]
53. Sköld, M.; Karlberg, A.-T.; Matura, M.; Börje, A. The fragrance chemical β-caryophyllene-air oxidation and skin sensitization. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 538–545. [CrossRef] [PubMed]

54. Sagiri, S.S.; Anis, A.; Pal, K. A review on encapsulation of vegetable oils: Strategies, preparation methods and applications. *Polym. Plast. Technol. Eng.* **2016**, *55*, 37–41. [CrossRef]
55. Liakos, I.L.; Grumezescu, A.M.; Holban, A.M.; Florin, I.; D'Autilia, F.; Carzino, R.; Bianchini, P.; Athanassiou, A. Polylactic acid-lemongrass essential oil nanocapsules with antimicrobial properties. *Pharmaceuticals* **2016**, *9*, 42. [CrossRef] [PubMed]
56. Feyzioglu, G.C.; Tornuk, F. Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications. *LWT Food Sci. Technol.* **2016**, *70*, 104–110. [CrossRef]
57. Iannitelli, A.; Grande, R.; di Stefano, A.; di Giulio, M.; Sozio, P.; Bessa, L.J.; Laserra, S.; Paolini, C.; Protasi, F.; Cellini, L. Potential antibacterial activity of carvacrol-loaded poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles against microbial biofilm. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 5039–5051. [CrossRef]
58. Qiu, C.; Chang, R.; Yang, J.; Ge, S.; Xiong, L.; Zhao, M.; Li, M.; Sun, Q. Preparation and characterization of essential oil-loaded starch nanoparticles formed by short glucan chains. *Food Chem.* **2017**, *221*, 1426–1433. [CrossRef]
59. Paula, H.C.B.; Sombra, F.M.; Abreu, F.O.M.S.; Paula, R.C.M. *Lippia sidoides* essential oil encapsulation by angico gum/chitosan nanoparticles. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 2359–2366. [CrossRef]
60. Hasheminejad, N.; Khodaiyan, F.; Safari, M. Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. *Food Chem.* **2019**, *275*, 113–122. [CrossRef]
61. Zohri, M.; Gazori, T.; Mirdamadi, S.; Asadi, A.; Haririan, I. Polymeric nanoparticles: Production, applications and advantage. *Internet J. Nanotechnol.* **2009**, *3*, 217–223.
62. Rai, M.; Paralikar, P.; Jogee, P.; Agarkar, G.; Ingle, A.P.; Derita, M.; Zacchino, S. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. *Int. J. Pharm.* **2017**, *519*, 67–78. [CrossRef] [PubMed]
63. Froiio, F.; Mosaddik, A.; Morshed, M.T.; Paolino, D.; Fessi, H.; Elaissari, A. Edible polymers for essential oils encapsulation: Application in food preservation. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2019**, *58*, 46. [CrossRef]
64. González, J.O.W.; Jesser, E.N.; Yeguerman, C.A.; Ferrero, A.A.; Band, B.F. Polymer nanoparticles containing essential oils: New options for mosquito control. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *24*, 17006–17015. [CrossRef] [PubMed]
65. Jummes, B.; Sganzerla, W.G.; da Rosa, C.G.; Noronha, C.M.; Nunes, M.R.; Bertoldi, F.C.; Barreto, P.L.M. Antioxidant and antimicrobial poly-ε-caprolactone nanoparticles loaded with *Cymbopogon martinii* Roxb. essential oil. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2020**, *23*, 101499. [CrossRef]
66. Ephrem, E.; Greige-Gerges, H.; Fessi, H.; Charcosset, C. Optimisation of rosemary oil encapsulation in polycaprolactone and scale-up of the process. *J. Microencapsul.* **2014**, *31*, 746–753. [CrossRef]
67. Esfandyari-Manesh, M.; Ghaedi, Z.; Asemi, M.; Khanavi, M.; Manayi, A.; Jamalifar, H.; Atyabi, F.; Dinarvand, R. Study of antimicrobial activity of anethole and carvone loaded PLGA nanoparticles. *J. Pharm. Res.* **2013**, *7*, 290–295. [CrossRef]
68. Pina-Barrera, A.M.; Alvarez-Roman, R.; Baez-Gonzalez, J.G.; Amaya-Guerra, C.A.; Rivas-Morales, C.; Gallardo-Rivera, C.T.; Galindo-Rodriguez, S.A. Application of a multisystem coating based on polymeric nanocapsules containing essential oil of *Thymus vulgaris* L. to increase the shelf life of table grapes (*Vitis vinifera* L.). *IEEE Trans. Nanobiosci.* **2019**, *18*, 549–557. [CrossRef]
69. Froiio, F.; Ginot, L.; Paolino, D.; Lebaz, N.; Bentaher, A.; Fessi, H.; Elaissari, A. Essential oils-loaded polymer particles: Preparation, characterization and antimicrobial property. *Polymers* **2019**, *11*, 1017. [CrossRef]
70. Silva-Flores, P.G.; Opez, L.A.P.-L.; Rivas-Galindo, V.M.; Paniagua-Vega, D.; Galindo-Rodrıguez, S.A.; Alvarez-Roman, R. Simultaneous GC-FID quantification of main components of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula dentata* L. essential oils in polymeric nanocapsules for antioxidant application. *J. Anal. Methods Chem.* **2019**, *2019*, 1–9. [CrossRef]
71. Liakos, I.L.; Iordache, F.; Carzino, R.; Scarpellini, A.; Oneto, M.; Bianchini, P.; Grumezescu, A.M.; Holban, A.M.; Mihai, A.; Maria, A. Cellulose acetate-essential oil nanocapsules with antimicrobial activity for biomedical applications. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *172*, 471–479. [CrossRef]
72. Chavez-Magdaleno, M.E.; Luque-Alcaraz, A.G.; Gutierrez-Martınez, P.; Cortez-Rocha, M.O.; Burgos-Hernandez, A.; Lizardi-Mendoza, J.; Plascencia-Jatomea, M. Effect of chitosan-pepper tree (*Schinus molle* L.) essential oil biocomposites on the growth kinetics, viability and membrane integrity of colletotrichum gloeosporioides. *Rev. Mex. Ing. Química* **2018**, *17*, 29–45. [CrossRef]

73. Sotelo-Boyás, M.E.; Correa-Pacheco, Z.; Bautista-Banos, S.; Gómez, Y.G. Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *103*, 409–414. [CrossRef] [PubMed]
74. Luque-Alcaraz, A.G.; Cortez-Rocha, M.O.; Velázquez-Contreras, C.A.; Acosta-Silva, A.L.; Santacruz-Ortega, H.D.C.; Burgos-Hernández, A.; Argüelles-Monal, W.M.; Plascencia-Jatomea, M. Enhanced antifungal effect of chitosan/pepper tree (*Schinus molle* L.) essential oil bionanocomposites on the viability of *Aspergillus parasiticus* spores. *J. Nanomater.* **2016**, *2016*, 10. [CrossRef]
75. El-Asbahani, A.; Miladi, K.; Addi, H.; Bitar, A.; Casabianca, H.; Abdelhamid, E.M.; Hartmann, D.; Jilale, A.; Renaud, F.; Elaissari, A. Antimicrobial activity of nano-encapsulated essential oils: Comparison to non-encapsulated essential oils. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **2015**, *4*, 39–48. [CrossRef]
76. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, R1–R4. [CrossRef]
77. Mora-Huertas, C.E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2010**, *385*, 113–142. [CrossRef]
78. Flores, F.C.; De Lima, J.A.; Ribeiro, R.F.; Alves, S.H.; Rolim, C.M.B.; Beck, R.C.R.; Silva, C.B. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia* **2013**, *175*, 281–286. [CrossRef]
79. Li, K.; Yin, S.; Ynag, X.; Tang, C.; Wei, Z. Fabrication and characterization of novel antimicrobial films derived from thymol-loaded zein–sodium caseinate (SC) nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 11592–11600. [CrossRef]
80. Gomes, C.; Moreira, R.G.; Castell-Perez, E. Nanoparticles with entrapped trans-cinnamaldehyde and eugenol for antimicrobial delivery applications. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, 16–24. [CrossRef]
81. Sotelo-Boyás, M.; Valverde-Aguilar, G.; Plascencia-Jatomea, M.; Correa Pacheco, Z.; Jiménez-Aparicio, A.; Solorza-Feria, J.; Barrera-Necha, L.; Bautista-Baños, S. Characterization of chitosan nanoparticles added with essential oils. In vitro effect on *Pectobacterium carotovorum*. *Rev. Mex. Ing. Química* **2015**, *14*, 589–599.
82. Sotelo-Boyás, M.E.; Correa-Pacheco, Z.N.; Bautista-Baños, S.; Corona-Rangel, M.L. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *LWT Food Sci. Technol.* **2017**, *77*, 15–20. [CrossRef]
83. Joye, I.J.; McClements, D.J. Production of nanoparticles by anti-solvent precipitation for use in food systems. *Trends Food Sci. Technol.* **2013**, *34*, 109–123. [CrossRef]
84. Sugimoto, T. Preparation of monodispersed colloidal particles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1987**, *28*, 65–108. [CrossRef]
85. Belda-Galbis, C.M.; Pina-Pérez, M.C.; Leufvén, A.; Martínez, A.; Rodrigo, D. Impact assessment of carvacrol and citral effect on *Escherichia coli* K12 and *Listeria innocua* growth. *Food Control.* **2013**, *33*, 536–544. [CrossRef]
86. Yegin, Y.; Perez-Lewis, K.L.; Zhang, M.; Akbulut, M.; Taylor, T.M. Development and characterization of geraniol-loaded polymeric nanoparticles with antimicrobial activity against foodborne bacterial pathogens. *J. Food Eng.* **2016**, *170*, 64–71. [CrossRef]
87. Christofoli, M.; Costa, E.C.C.; Bicalho, K.U.; de Cássia-Domingues, V.; Peixoto, M.F.; Alves, C.C.F.; Araújo, W.L.; de Melo-Cazal, C. Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* L. (*Rutaceae*) in *Bemisia tabaci* populations. *Ind. Crop. Prod.* **2015**, *70*, 301–308. [CrossRef]
88. Popiolski, T.M.; Otsuka, I.; Halila, S.; Muniz, E.C.; Soldi, V.; Borsali, R.; Catarina, F.D.S. Preparation of polymeric micelles of poly (ethylene oxide-b-lactic acid) and their encapsulation with lavender oil. *Mater. Res.* **2016**, *19*, 1356–1365. [CrossRef]
89. Zhang, Y.; Liu, X.; Wang, Y.; Jiang, P.; Quek, S. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against Escherichia coli and Staphylococcus Aureus. *Food Control* **2016**, *59*, 282–289. [CrossRef]
90. Badri, W.; El Asbahani, A.; Miladi, K.; Baraket, A.; Agusti, G.; Agha, Q.; Errachid, A.; Fessi, H.; Elaissari, A. Poly (ε-caprolactone) nanoparticles loaded with indomethacin and *Nigella Sativa,* L. essential oil for the topical treatment of inflammation. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2018**, *46*, 234–242. [CrossRef]
91. Shakeri, F.; Shakeri, S.; Hojjatoleslami, M. Preparation and characterization of carvacrol loaded polyhydroxybutyrate nanoparticles by nanoprecipitation and dialysis methods. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, 697–705. [CrossRef]
92. Fraj, A.; Jaâfar, F.; Marti, M.; Coderch, L.; Ladhari, N. A comparative study of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil-based polycaprolactone nanocapsules/microspheres: Preparation, physicochemical characterization, and storage stability. *Ind. Crop. Prod.* **2019**, *140*, 111669. [CrossRef]

93. Khoobdel, M.; Ahsaei, S.M.; Farzaneh, M. Insecticidal activity of polycaprolactone nanocapsules loaded with *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Tribolium castaneum* (Herbst). *Entomol. Res.* **2017**, *47*, 175–184. [CrossRef]
94. Correa-Pacheco, Z.N.; Bautista-Baños, S.; Valle-Marquina, M.Á.; Hernández-López, M. The effect of nanostructured chitosan and chitosan-thyme essential oil coatings on *Colletotrichum gloeosporioides* growth in vitro and on cv hass avocado and fruit quality. *J. Phytopathol.* **2017**, *165*, 297–305. [CrossRef]
95. Fraj, A.; Jaâfar, F.; Marti, M.; Coderch, L.; Ladhari, N. Antimicrobial finishing of cotton and polyamide with nano-microparticles. In Proceedings of the International Conference of Applied Research On Textile, CIRAT-8, Monastir, Tunisia, 9–10 November 2018; pp. 2286–5659.
96. Badri, W.; Mohamed, F.; Affendi, M.; Asbahani, A.; Miladi, K.; Nazari, Q.; Viennet, C.; Robin, S.; Fessi, H.; Elaissari, A. Topical co-delivery of indomethacin and *Nigella sativa* L. essential oil in poly-caprolactone nanoparticles: In vivo study of anti-inflammatory activity. *Int. J. Adv. Res.* **2018**, *6*, 801–816. [CrossRef]
97. Wattanasatcha, A.; Rengpipat, S.; Wanichwecharungruang, S. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. *Int. J. Pharm.* **2012**, *434*, 360–365. [CrossRef]
98. Dagli, N.; Dagli, R.; Mahmoud, R.S.; Baroudi, K. Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. *J. Int Soc. Prev. Community Dent.* **2015**, *5*, 338–340. [CrossRef]
99. Mohammadi, A.; Hashemi, M.; Hosseini, S.M. Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* L. essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2015**, *28*, 73–80. [CrossRef]
100. Aloui, H.; Khwaldia, K.; Licciardello, F.; Mazzaglia, A.; Muratore, G.; Hamdi, M.; Restuccia, C. Efficacy of the combined application of chitosan and locust bean gum with different citrus essential oils to control postharvest spoilage caused by *Aspergillus flavus* in dates. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *170*, 21–28. [CrossRef]
101. Kaur, P.; Thakur, R.; Choudhary, A. An in vitro study of the antifungal activity of silver/chitosan nanoformulations against important seed borne pathogens. *Int. J. Sci. Technol. Res.* **2012**, *1*, 83–86.
102. Benhabiles, M.S.; Salah, R.; Lounici, H.; Drouiche, N.; Goosen, M.F.A.; Mameri, N. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocoll.* **2012**, *29*, 48–56. [CrossRef]
103. Zhu, D.; Chenga, H.; Li, J.; Zhang, W.; Shen, Y.; Chen, S.; Ge, Z.; Chen, S. Enhanced water-solubility and antibacterial activity of novel chitosan derivatives modified with quaternary phosphonium salt. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *61*, 79–84. [CrossRef] [PubMed]
104. Blanco-Padilla, A.; Soto, K.M.; Mendoza, S. Food antimicrobials nanocarriers. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
105. Parsek, M.R.; Singh, P.K. Bacterial biofilms: An emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **2003**, *57*, 677–701. [CrossRef] [PubMed]
106. Jamal, M.; Ahmad, W.; Andleeb, S.; Jalil, F.; Imran, M.; Nawaz, M.A.; Hussain, T.; Ali, M.; Rafiq, M.; Kamil, M.A. Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.* **2018**, *81*, 7–11. [CrossRef]
107. Mack, D.; Rohde, H.; Harris, L.; Davies, A.; Horstkotte, M.; Knobloch, J. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int. J. Artif. Organs* **2006**, *29*, 343–359. [CrossRef]
108. Jousset, A.; Dortet, L.; Naas, T. Multidrug resistant bacteria and emerging antibiotic resistance traits. *Rev. Prat.* **2017**, *67*, 211–217.
109. Reichling, J.; Schnitzler, P.; Suschke, U.; Saller, R. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—An overview. *Komplementmed* **2009**, *16*, 79–90. [CrossRef]
110. Wang, C.X.; Chen, S.L. Aromachology and its application in the textile field. *Fibres Text. East. Eur.* **2005**, *13*, 41–44.
111. Andonova, V. Synthetic polymer-based nanoparticles: Intelligent drug delivery systems. In *Acrylic Polymers in Healthcare*; Reffy, B.S.R., Ed.; Intech Open: Madrid, Spain, 2017; pp. 101–125.
112. Martín, Á.; Varona, S.; Navarrete, A.; Cocero, M.J. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Applications with essential oils. *Open Chem. Eng. J.* **2010**, *4*, 31–41. [CrossRef]
113. Aravamudhan, A.; Ramos, D.M.; Nada, A.A.; Kumbar, S.G. Natural polymers: Polysaccharides and their derivatives for biomedical applications. In *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*; Kumbar, S.G., Laurencin, C.T., Deng, M., Eds.; Newnes: Oxford, UK, 2014; pp. 67–89.

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).