



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00391**

(22) Data de depozit: **10/06/2015**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **27/11/2020** BOPI nr. **11/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/12/2016 BOPI nr. **12/2016**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **LĂCĂTUȘU IOANA, ALEEA BĂIUȚ NR.4, BL.C7BIS, AP.28, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BADEA NICOLETA, STR.LEREȘTI NR.3, BL.A 2, SC.6, ET.4, AP.88, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BADEA GABRIELA, STR. DR. NICULAE D. STAIKOVICI NR. 45-49, BL. 3, SC. A, ET. 1, AP. 4, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **OTT CRISTINA, BD. ALEXANDRU OBREGIA NR. 5-7, BL. 14, SC. 4, ET. 2, AP. 131, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **STAN RALUCA, BD. MATEI BASARAB NR. 87, BL. 121, SC. A, ET. 2, AP. 6, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ISTRATI DANIELA, ALEEA FUIORULUI NR. 4, BL. Y3C, SC. 2, ET. 5, AP. 65, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **POPA OVIDIU, CALEA GRIVIȚEI NR.206, BL.K, SC.D, ET.6, AP.26, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MEGHEA AURELIA, STR.OLIMPULUI NR.76, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 7611733 B2; US 7147841 B2

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR NANOTRANSPORTORI PE BAZĂ DE AMARANT ȘI SQUALEN ȘI NANOTRANSPORTORII OBTINUȚI PRIN ACEST PROCEDEU**



Invenția prezentă se referă la un procedeu de obținere a unor nanotransportori lipidici funcționali pe baza de fracții vegetale cu conținut variabil de Squalen, capabili să co-încapsuleze și să co-elibereze simultan două substanțe active de natură hidrofilă și hidrofobă, respectiv un medicament sintetic cu acțiune antitumorală - *Pemetrexed* (*Pm*) și un medicament natural - *Hesperidin* (*Hes*) ce prezintă acțiune antioxidantă în conjuncție cu alte efecte terapeutice.

Pemetrexed disodic este un medicament din categoria metaboliților de tip folat utilizat în chemoterapie pentru tratarea meduloblastomei (**Morfouace M., Cancer Cell 25 (2014) 516-529**), a cancerului de plămâni pentru pacienții nefumători (**Gautschi O, Clinical Lung Cancer, doi:10.1016/j.clcc.2015.02.007; Liang Y., Lung Cancer, 87 (2015) 34-38**) și de asemenea determină apoptoza și citotoxicitate demonstrate în celulele de osteosarcoma (**Zhu X., Biochem. and Biophys. Res. Comm. 452 (2014) 72-78**).

Hesperidina este un bioflavonoid izolat din coji de portocale care prezintă diferite proprietăți biologice, în special asociate cu prevenirea cancerului și a bolilor cardiovasculare (**Roohbakhsh A., Life Sci. 124 (2015), 64-74**). Studiile farmacologice au scos în evidență atât potențialul anti-tumoral cât și chemoprotectiv (exemplu: induce apoptoza în cancerul de colon (**Saiprasad G., Europ. J. of Cancer, 50 (2014) 2489-2507**) dar și efecte protectoare împotriva stresului oxidativ (**Javed H. J. of the Neurological Sci. 348, (2015), 51-59; Pari L, Toxicology Rep. 2, (2015), 46-55**).

Medicamentele lipofile manifestă o biodisponibilitate redusă, în timp ce medicamentele hidrofile au o permeabilitate limitată de-a lungul membranelor biologice (exemplu: bariera hemato-encefalică - BBB) din cauza caracterului puternic lipofil al acestora. În consecință, aceste medicamente trebuie să fie administrate în doze zilnice ridicate, ceea ce adesea conduce la apariția unor efecte adverse cu grad variabil de severitate. Pentru distribuția medicamentelor de-a lungul membranelor biologice, incluzând bariera hemato-encefalică și bariera mucoasei stomacale, medicamentul de interes trebuie să fie într-o formă lipidică solubilă astfel încât biodisponibilitatea să fie amplificată considerabil.

În tratamentul diferitelor afecțiuni nu este suficient ca medicamentul să prezinte acțiune farmacodinamică mărită, eficientă terapeutică a oricărui medicament fiind dependentă în principal de distribuția și absorbția acestuia într-o concentrație adecvată pentru a viza celulele și țesuturile lezate. O mare provocare în domeniul sistemelor de încapsulare, distribuție și eliberare de medicamente reiese din dificultatea de a obține sisteme funcționale care să combine un cumul de caracteristici, precum o toxicitate scăzută, lipsa de imunogenitate, biodegradabilitate ridicată, să nu se acumuleze în celule sau țesuturi și ideal, să prezinte efecte biologice adiționale care să prezinte o bună sinergie cu medicamentele încapsulate.

Nanoformulările pe bază de lipide și surfactanți biocompatibili cum sunt nanoparticulele lipidice solide (SLNs) și transportorii lipidici nanostructurați (NLC) sunt printre cele mai atractive strategii pentru încapsularea și distribuția medicamentelor cu proprietăți specifice. Sistemele NLC sunt nanoparticule lipidice solide modificate, în care miezul lipidic este format din lipide solide și lichide, iar surfactanții care stabilizează miezul lipidic sunt selectați din categoria materialelor GRAS. Numeroase studii au demonstrat ca NLCs cresc eficiența de încapsulare, îmbunătățesc stabilitatea chimică, biodisponibilitatea și eliberarea prelungită a compușilor de natură lipofilă, însă manifestă o restricție ridicată în ceea ce privește încapsularea componentelor de natură hidrofilă.

Primele studii de încorporare a ingredientelor active hidrofile au fost dezvoltate de Gallarate și colab. care au utilizat tehnica coacervării bazată pe transformarea de faze (exemplu: soluție micelară în particule solide de acid gras) pentru încorporarea Cisplatinului în

nanoparticule lipidice de acid stearic (de tip SLN) (**Gallarate M., Journal of Drug Delivery Science and Technology, 20, (2010), 343-347**). Tot o metodă bazată pe solubilizarea în micelle inverse (tehnica PIT) a fost mai târziu folosită de Vrignaud și colab. pentru încapsularea clorhidratului de Erlotinib în nanotransportori lipidici preparați cu diferiți surfactanți (derivați de sorbitan) și ulei Labrafac (amestec de triacilgliceroli ai acizilor capric și caprilic) în rapoarte de 1:1 (**Vrignaud S., Int. J. of Pharmaceutics 436 (2012), 194-200**). Deși tehnica microemulsionării permite obținerea unor nanoparticule lipidice de ordinul zecilor de nm, prezintă dezavantajul utilizării unor concentrații foarte mari de surfactant (cuprinse între 10 și 25%) care pentru domeniul farmaceutic implică existența unui risc ridicat de toxicitate. Referitor la literatura patentelor, această tehnică a microemulsionării a fost brevetată în **WO 2013105101 A1, US 7611733 B2** pentru încapsularea unei game destul de largi de medicamente de natură hidrofilă și amfifilă.

În schimb, natura lipofilă a acestor nanotransportori lipidici le conferă acestora avantaje multiple asociate încapsulării medicamentelor lipofile prin solubilizare în miezul lipidic. De-a lungul ultimilor ani au fost prezentate în literatură diferite metode și compoziții de preparare a SLN și NLC cu scopul distribuției de ingrediente active lipofile sau dezvoltare de formulări cosmetice și farmaceutice. De exemplu, **US 20030235540 A1** și **US 7147841 B2** descriu obținerea de astfel de nanoparticule lipidice ce conțin o matrice lipidică formată din diferite lipide solide (exemplu: palmitat de cetil și esteri ai glicerolului cu acizi grași cu lanț variabil, acid stearic, colesterol, ceară de albine) și un lipid lichid (triacilgliceroli ai acidului capric și caprilic) ce încapsulează ca substanța activă un filtru UV, utilizând metoda omogenizării la presiune înaltă (HPH). Pe aceeași linie științifică este încadrată și cercetarea din **CN 102283809 (A)** realizată cu scopul obținerii unor NLC cu aplicații locale, utilizând ambele metode de omogenizare cu grad înalt de forfecare și la presiune ridicată.

De asemenea, pentru a reduce inflamația și a asigura o stabilitate chimică adecvată a medicamentelor încapsulate, literatura patentelor furnizează diferite metode de obținere a NLC utilizând tehnici precum difuzia cu solvenți (**CN 103417481; US 20110038941 A1**), omogenizarea cu grad înalt de forfecare, microemulsionarea (**US 2010/0247619 A1; US 7611733**), ultrasonarea (**EP 2821077 A1**) injecție - liofilizare (**CN 102151250**), omogenizare la presiune ridicată (**WO 2011116963 A2**).

Problemele de stabilitate fizică (agregare, fuziune) și chimică (hidroliză, oxidare), expulzare a medicamentului, control al dimensiunii particulelor, eficiență de încapsulare scăzută a medicamentelor solubile în apă, impurificare cu metale etc, au condus adesea la scăderea calității formulării nanotransportorului, dar și a acțiunii farmacologice a medicamentului încapsulat.

Cu scopul de a îmbunătăți aceste caracteristici definitorii pentru un sistem de distribuție, și în principal de a realiza o co-încapsulare multiplă a două categorii de medicamente lipo- și hidrosolubile în același sistem nanotransportor ce prezintă el însuși proprietăți terapeutice, prezenta invenție descrie o metodă combinată de omogenizare cu grad înalt de forfecare (HSH) și omogenizare la presiune ridicată (HPH) care permite obținerea unor nanotransportori cu eficiente de încapsulare maxime pentru cele două medicamente cu solubilitate preferențială apă/ulei.

Comparativ cu metodele existente de preparare a nanotransportorilor lipidici, compoziția, rapoartele între componentele lipidice, surfactanți și substanțele active, dar și prezența uleiului de Amarant conferă nanotransportorilor preparați avantajele de a îmbunătăți semnificativ eficiența de încapsulare a unui medicament hidrofil, simultan cu menținerea unor valori ridicate

ale eficienței de încapsulare a medicamentului lipofil (exemplu cu valori ale eficienței de încapsulare de 89% pentru Pemetrexed și de 94% pentru Hesperidin) și de a asigura o eliberare controlată a ambelor categorii de medicamente.

Obținerea unor nanoparticule, care pe lângă rolul de transportor eficient manifestă și capacitatea de a prezenta proprietăți terapeutice care să potențeze sau să substituie dozele ridicate de medicamente (în special cazul celor utilizate în chemoterapie care prezintă un risc ridicat de citotoxicitate asupra celulelor normale), rămâne până în prezent o problemă care nu este pe deplin rezolvată. Drept urmare, dezvoltarea unor nanotransportori eficienți și siguri, bazați pe ingrediente naturale din surse vegetale reprezintă o necesitate în industria farmaceutică. Utilizarea resurselor vegetale, care prezintă efecte benefice asupra organismului prin virtutea proprietăților biologice demonstrate, reprezintă o alternativă ce poate îndeplini cerințele consumatorului asociate unui consum preferențial de produse naturale.

Referitor la utilizarea uleiurilor vegetale, Viladot Petit et. al. în **US 20130017239 A1** au dezvoltat formulări cosmetice pe bază de capsule de nanoparticule lipidice, reprezentate de nanoparticule lipidice solide (SLN) și de transportori lipidici nanostructurați (NLC) acoperite cu polimeri. Pentru sinteza nanoparticulelor lipidice au fost utilizate diferite tipuri de lipide solide în asociere cu lipide lichide printre care uleiurile de soia, de porumb, de măsline, dar și uleiuri marine (ulei de pește, ulei de alge). Într-un patent similar (**US 2012/0128777 A1**), uleiul de cânepă a fost folosit de Keck și colab. cu scopul obținerii unor micro- și nanoparticule lipidice care să conducă la acumularea la nivel dermic a particulelor solide. Alte sisteme de distribuție de tip NLC ce încapsulează vitamina C, vitamina A și preparate cu ulei de soia au fost brevetate în **US 2013/0017239 A1**.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu de obținere a unor nanotransportori lipidici pe bază de fracții vegetale, cu conținut variabil Amarant cu Squalen bio-active, capabili să co-încapsuleze și să co-elibereze susținut două tipuri de medicamente (cu acțiune antioxidantă și antitumorală) ce prezintă polarități diferite.

Procedeu conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că constă în:

a. formarea unei pre-emulsii lipidice libere și încărcate cu două componente active hidrofile și hidrofobe, respectiv Pemetrexed și Hesperidin, obținute prin contactarea, sub agitare magnetică, a unei faze apoase și a unei faze lipidice, la o temperatură de 80...82°C și menținere la un regim de temperatură constantă, timp de 15 min;

b. supunerea pre-emulsiei lipidice la un proces inițial de omogenizare cu grad înalt de forfecare de 12 000 rpm, timp de 1 min și ulterior la un proces de omogenizare la presiune ridicată, respectiv la 500 bar, timp de 196 sec;

c. obținerea unor dispersii apoase de nanotransportori lipidici liberi și încărcăți cu Pemetrexed și Hesperidin, prin răcire ușoară, sub agitare magnetică, la temperatura camerei a emulsiei supuse celor două tipuri de omogenizări;

d. obținerea de nanotransportori lipidici funcționali în stare solidă prin supunerea dispersiilor apoase de nanotransportori lipidici liberi și încărcăți la un proces de liofilizare la -55°C timp de 72 h.

Nanotransportori lipidici de natură solidă încărcăți cu Pemetrexed și Hesperidin, obținuți prin procedeul definit în oricare din revendicările de la 1 la 7, **caracterizați prin aceea că**, aceștia conțin:

a. 21,6% fracție vegetală cu conținut variabil de Squalen din întreaga matrice lipidică formată din lipide solide și lichide;

b. 10,1% amestec de medicamente de natură hidrofobă și hidrofilă din care 5,8% Pm și 4,3% Hes, respectiv 5,9% amestec de medicamente din care 3,9% Pemetrexed și 2% Hesperidin, încapsulate în matricea lipidică astfel formată, procente fiind exprimate în greutate.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:	1
- asigură o co-încapsulare a ambelor categorii de medicamente, atât de natură hidrofilă cât și hidrofobă, în același sistem nanotransportor ce prezintă particularități structurale unice, favorabile pentru o încapsulare multiplă atât în miezul lipidic hidrofob cât și în învelișul exterior generat de prezenta surfactanților;	3 5
- procedeul de co-încapsulare a ambelor medicamente - Pemetrexed și Hesperidin în nanotransportorii lipidici pe bază de fracții naturale izolate din semințe de Amarant se desfășoară în mediu apos, nu utilizează condiții de proces care să conducă la denaturarea principiilor active provenite din uleiurile vegetale și nu afectează integritatea structurală a celor două medicamente încapsulate;	7 9
- obținerea nanoparticulelor lipidice se bazează pe folosirea unor materii prime biocompatibile, concentrații minime de surfactanți și nu implică utilizarea unor substanțe agresive (exemple: solvenți organici sau surfactanți ce prezintă efect toxic asupra organismului);	11 13
- prin procedeul propus se formează o rețea lipidică puternic dezordonată, favorabilă pentru co-încapsularea a cel puțin două medicamente cu concentrații adaptabile efectului biologic urmărit; aceste caracteristici structurale se datorează golurilor create prin utilizarea unor lipide cu structuri chimice diferite, respectiv a lipidelor solide împreună cu fracțiile uleioase cu conținut variabil de Squalen;	15 17
- utilizarea celor trei uleiuri vegetale izolate din semințe de Amarant cu concentrații de 5,8%, 34,7% și 83,4% Squalen bioactiv și conținut ridicat de acizi grași ω -6, manifestă multiple beneficii:	19 21
a. participă la formarea unui miez lipidic omogen și/sau miez cu nanocompartimente distincte ce pot fi utilizate ca transportori de substanțe active de natură hidrofobă și hidrofilă;	23
b. imprimă proprietăți biologice suplimentare, în completare la cele ale medicamentelor de sinteză și ca atare un important potențial terapeutic de natură să îmbunătățească sănătatea publică;	25
c. prin asocierea acestor remedii naturale cu cele sintetice se realizează o diminuare a concentrației de medicamente sintetice care, funcție de efectul biologic urmărit poate manifesta efecte toxice (exemplu: medicamentele utilizate în terapia cancerului);	27 29
d. prin virtutea proprietăților sale antioxidante poate proteja anumite medicamente ce prezintă o sensibilitate ridicată la oxidare;	31
e. constituie o sursă de valorificare a resurselor naturale provenite din flora autohtonă asociată cu o eficiență economică sporită.	33
Procedeul propus este simplu și eficient, implică etape distincte și ușor de reprodus, asigurând același nivel de control și prin transpunere la scară pilot.	35
Procedeul constituie o metodă optimă pentru obținerea unor nanotransportori lipidici ce manifestă ei însuși proprietăți terapeutice prin virtutea miezului lipidic format din fracții vegetale cu concentrații ridicate de Squalen bioactiv și acizi grași ω -3 și ω -6 (exemplu: proprietăți antioxidante chiar și în absența medicamentelor de sinteză) și de asemenea pot să fie adaptați pentru co-încapsularea unei game largi de medicamente ce prezintă proprietăți specifice.	37 39
Nanoparticulele lipidice cu conținut de medicament antitumoral și antioxidant, obținute prin procedeul propus pot fi utilizate sub ambele forme - ca dispersii apoase sau sub formă de produs solid - pentru dezvoltarea unor formulări medicamentoase ce îmbină remediile sintetice cu cele naturale în scopul obținerii unui maxim de eficiență a tratamentului asociat cu existența unor efecte secundare minime.	41 43 45
Procedeul conform invenției constă în aceea că se formează inițial o pre-emulsie lipidică ce conține 10% amestec lipidic și 2,45% amestec de surfactanți, la o temperatură de 80°C, prin contactarea sub agitare magnetică a două faze, o fază lipidică ce conține monostearat de	47

gliceril: palmitat de cetil: fracție uleioasă vegetală ce conține 5,8%, 34,8% sau 83,7% Squalen, într-un raport de greutate de 1,16:1,16:1 și o fază apoasă ce conține colat de sodiu: monolaurat de polioxietilensorbitan: copolimer bloc polietilenglicol-polipropilenglicol într-un raport de greutate de 28:20:1; pre-emulsia lipidică obținută este menținută la un regim de temperatură constant de 80°C, timp de 15 min, este supusă unei prime etape de omogenizare cu grad înalt de forfecare la 12000 rpm, timp de 1 min, ulterior unei etape de omogenizare la presiune ridicată la 500 bar, timp de 196 sec, după care este lăsată să se răcească la temperatura camerei, sub agitare magnetică, și ulterior în urma unui proces de liofilizare la -55°C timp de 72 h, conduce la obținerea de nanotransportori lipidici de natură solidă cu proprietăți antioxidante amplificate și o abilitate excelentă de eliberare treptată a ambelor categorii de medicamente de natură hidrofilă și lipofilă.

În cazul prezentei invenții, pentru urmărirea caracteristicilor dimensionale, de stabilitate, structurale, precum și a efectului și tipului de matrice lipidică asupra obținerii de nanotransportori lipidici ce manifestă activitate antioxidantă amplificată și capacitate de eliberare treptată a celor două tipuri de medicamente, s-au utilizat:

a. nanotransportori lipidici liberi (fără conținut de medicament hidrofil și lipofil), formați prin combinarea a două lipide solide biocompatibile (monostearat de gliceril și palmitat de cetil), cu o fracție uleioasă vegetală izolată din semințe de Amarant (exemplu: Sq 1 = fracție vegetală ce conține 5,8% Squalen; Sq 2 = fracție vegetală ce conține 34,7% Squalen și Sq 3 = fracție vegetală ce conține 83,4% Squalen).

b. nanotransportori lipidici ce co-încapsulează concentrații variabile de medicament hidrofil (Pm) și hidrofob (Hes), formați similar cu nanotransportorii fără conținut de substanțe active.

Etapele de obținere a nanotransportorilor lipidici ce co-încapsulează cele două componente hidrofil și hidrofob sunt:

- formarea unei topituri lipidice, prin utilizarea de lipide solide și uleiuri vegetale (monostearat de gliceril, palmitat de cetil și fracții uleioase din semințe de Amarant cu concentrații variabile de Squalen);

- adăugarea în topitură lipidică a unor cantități diferite de medicament lipofil ce asigură o concentrație de 0,6% și respectiv 0,27% Hesperidin în dispersia apoasă de nanotransportori lipidici;

- adăugarea în faza apoasă formată dintr-un amestec de surfactanți de tip colat de sodiu: monolaurat de polioxietilensorbitan: copolimer bloc polietilenglicol-polipropilenglicol a unor cantități diferite de medicament hidrofil ce asigură o concentrație de 0,8% și respectiv 0,53% Pemetrexed în dispersia apoasă de nanotransportori lipidici.

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

- tabelul 1, compoziția nanostructurilor lipidice obținute prin utilizarea fracțiilor vegetale cu conținut variabil de Squalen;

- tabelul 2, parametrii cinetici ai eliberării Pemetrexed din nanotransportorii lipidici;

- tabelul 3, parametrii cinetici ai eliberării Hesperidin din nanotransportorii lipidici;

- fig. 1, determinarea diametrelor medii ale nanotransportorilor lipidici, pe baza tehnicii de împrăștiere dinamică a luminii (DLS);

- fig. 2, valorile potențialului electrocinetic determinate pe sistemele de NLC libere și încărcate cu amestec de Pm și Hes sintetizate cu diferite fracții de Squalen;

- fig. 3, microscopia de transmisie electronică a probelor de nanotransportori lipidici NLC_Sq3_PmHes 1 (a) și NLC_Sq3_PmHes 2 (b);

- fig. 4, evaluarea modificărilor structurale, înainte și după co-încapsularea Pm și Hes în sistemele NLC preparate cu fracții vegetale ce conțin 5,8% Squalen (a), 34,7% Squalen (b) și 83,4% Squalen (c); 1
- fig. 5, eficiența de încapsulare a Hes și Pm în sistemele nanostructurate sintetizate cu fracții variabile de Squalen; 3
- fig. 6, evaluarea *in vitro* a proprietăților antioxidante a NLC-urilor preparate cu fracții diferite de Squalen bioactiv și încărcate cu concentrații variabile de Pm și Hes; 5
- fig. 7, profilele *in vitro* ale eliberării cantității cumulative procentuale de Pm (a) și Hes (b) din NLC cu diferite concentrații de Squalen; 7
- fig. 8, profilele *in vitro* ale eliberării cantității cumulative procentuale de Pm (a) și Hes (b) din NLC cu diferite concentrații de medicament hidrofil/lipofil. 9

Exemplul 1

Se formează o fază lipidică prin topirea la o temperatură de 80...82°C a unui amestec de 10% monostearat de gliceril, palmitat de cetil și fracție vegetală izolată din semințe de Amarant cu conținut de 5,8% Squalen într-un raport de greutate de 1,16:1,16:1. Formarea unei faze apoase la o temperatură de 80...82°C prin utilizarea a 2,45% amestec de surfactanți ce conține colat de sodiu, monolaurat de polioxietilensorbitan, copolimer bloc polietilenglicol-polipropilenglicol într-un raport de greutate de 28:20:1. Prin contactarea celor două faze lipidice și apoase, sub agitare magnetică și la o temperatură de 80...82°C, se formează o pre-emulsie lipidică care se menține la regim de temperatură constant, timp de 15 min. Pre-emulsia rezultată se supune inițial unei etape de omogenizare cu grad înalt de forfecare, aplicând 12000 rpm timp de 1 min și ulterior unei etape de omogenizare la presiune ridicată la 500 bar, timp de 196 sec. Nanodispersia rezultată este lăsată să se răcească la temperatura camerei, sub agitare magnetică, cu formarea unei dispersii apoase de transportori lipidici nanostructurați (NLC). Ulterior dispersia apoasă de NLC este congelată la -20°C timp de 24 h și supusă unui proces de liofilizare la -55°C timp de 72 h, cu obținerea unei pulberi de NLC liberă (fără medicament încapsulat). 13

Exemplul 2

Similar exemplului 1, cu deosebirea că fracția vegetală cu conținut de 5,8% Squalen este înlocuită cu o fracție de ulei de Amarant ce conține 34,7% Squalen. 15

Exemplul 3

Similar exemplului 1, cu deosebirea că fracția vegetală cu conținut de 5,8% Squalen este înlocuită cu o fracție de ulei de Amarant ce conține 83,4% Squalen. 17

Exemplul 4

Similar exemplelor 1, 2 și 3, cu deosebirea că se adaugă în faza lipidică încălzită la 80°C o cantitate de substanță activă lipofilă ce corespunde unei concentrații de 0,6% Hesperidin în dispersia apoasă de NLC obținută conform procedurii descris anterior. Topitura lipidică obținută se menține la 80°C timp de 2 min pentru a se asigura o bună dispersare a Hes. 19

Similar exemplelor 1, 2 și 3, cu deosebirea că se adaugă în faza apoasă încălzită la 80°C o cantitate de substanță activă hidrofilă ce corespunde unei concentrații de 0,8% Pemetrexed în dispersia apoasă de NLC obținută conform procedurii descris anterior. Faza apoasă obținută se menține la 80°C timp de 2 min pentru a se asigura o bună dispersare a Pm. 21

Etapele ulterioare corespund celor descrise în cadrul exemplelor 1, 2 și 3 cu obținerea dispersiilor apoase de nanotransportori lipidici pe bază de fracții vegetale cu conținut variabil de Squalen și medicamente hidrofili și lipofili și în final a NLC în formă solidă ce co-încapsulează Pm și Hes într-un raport de greutate de 1,3:1. Compoziția fiecărei formulări de NLC este prezentată în tabelul 1. 23

Exemplul 5

Similar exemplului 4, cu deosebirea că în faza lipidică se înlocuiește concentrația de 0,6% Hesperidin cu o concentrație de 0,27% Hesperidin, iar în faza apoasă se înlocuiește concentrația de 0,8% Pemetrexed cu o concentrație de 0,53% Pemetrexed. Etapele ulterioare corespund celor descrise anterior, cu obținerea de NLC în formă solidă ce co-încapsulează Pm și Hes într-un raport de greutate de 2:1 (tabelul 1).

Caracterizarea dimensională a nanotransportorilor lipidici pe bază de Squalen bioactiv (DLS și TEM)

Influența fracției de Squalen bioactiv asupra obținerii unor nanostructuri lipidice încărcate cu cele două substanțe active - Pm și Hes a fost inițial evaluată pe baza metodei de împrăștiere dinamică a luminii (DLS). Având în vedere caracterul hidrofil/lipofil al celor două substanțe active (exemplu: solubilitate diferențiată în miezul lipidic/înveliș de surfactant), cât și efectul concentrației de antitumoral versus antioxidant asupra acțiunii antitumorale, au fost utilizate diferite rapoarte masice între Pm și Hes pentru fiecare NLC preparat cu fracție vegetală cu conținut variabil de Sq.

Primul set de NLC-uri preparat la un raport de Pm:Hes = 1,3:1 a prezentat diametre medii ceva mai mari (exemplu: Zave cuprins între 141 și 116 nm), comparativ cu NLC-urile preparate cu o cantitate mai mare de Pm (exemplu: Zave cuprins între 124 și 106 nm pentru NLC preparate cu un raport de Pm:Hes = 2:1). În schimb, creșterea concentrației de Squalen în fracția de ulei de Amarant a condus pentru ambele rapoarte masice la o scădere a diametrelor medii (fig. 1), un raport optim între Zave/Pdl fiind obținut în cazul NLC_Sq3_PmHes 1 (116,5 nm/0,191) și respectiv NLC_Sq3_PmHes 2 (106 nm/0,228).

De asemenea, nu a fost observată o influență clară a co-încapsulării celor două substanțe active asupra Zave a NLC-ului preparat cu fracția vegetală bogată în Sq (83,4%).

În ceea ce privește morfologia nanotransportorilor lipidici, cele două formulări obținute cu fracția înalt concentrată în Sq (83,4%) ce încapsulează 0,8% amestec de Pm și Hes, respectiv 1,4% amestec de Pm și Hes au fost supuse analizei TEM. Rezultatele obținute au scos în evidență formarea de nanotransportori lipidici sferici, cu o structură bine definită, diametre medii < 100 nm (fig. 3) și existența unui miez lipidic ce conține nanocompartimente distincte în care este localizat componentul activ.

Evaluarea stabilității nanotransportorilor lipidici liberi și încarcați cu Pm și Hes

Dezvoltarea unei sarcini nete la suprafața unei particule afectează distribuția ionilor în regiunea interfacială, conducând la o concentrație crescută de ioni cu sarcina opusă față de cea a particulei și la existența unui strat dublu electric în jurul fiecărei particule. Valorile potențialului electrocinetic datorate sarcinilor din stratul dublu electric trebuie să fie mai electronegative sau mai electropozitive de 25 mV pentru a evita apariția fenomenelor de agregare a particulelor în timp.

Profilul potențialului electrocinetic (fig. 2) a scos în evidență existența unor fenomene de repulsie eficiente între particulele lipidice aflate în suspensie apoasă, favorabilă pentru prevenirea agregării nanotransportorilor lipidici ce co-încapsulează Pm și Hes.

Determinarea potențialului electrocinetic a scos în evidență obținerea unor nanotransportori lipidici ce prezintă o bună stabilitate fizică, cu valori cuprinse între -32,3 mV și -54 mV. O observație clară ce se poate desprinde prin compararea valorilor ξ ale primelor două seturi de NLC ce co-încapsulează amestecul de Pm și Hes (fig. 2) este legată de obținerea unor nanotransportori lipidici mult mai stabili în cazul co-încapsulării unei cantități mai mici de amestec de substanțe active (exemplu: 0,8% amestec de Pm și Hes).

Stabilitatea mai bună întâlnită în cazul NLC-ului ce co-încapsulează 0,57% Pm și 0,27% Hes, de exemplu, între -47,1 și -54 mV poate fi rezultatul distribuției preferențiale a Pm atât în miezul lipidic cât și în învelișul de surfactanți. Datorită elementelor structurale, caracterul anionic al Pm ar putea conduce la o auto-asociere în mediu apos. Conform studiilor din literatură, auto-asocierea acidului folic conduce la formarea de mezosfere columnare hexagonale (Atluri R., Langmuir 29 (2013) 12003-12012). Între Pm și acidul folic există similitudini structurale, ambele posedă în fragmentul heterociclic grupări funcționale ce formează legături de H, conducând la fenomene de auto-asamblare (exemplu: grupări carbonil și amino). Această similitudine ar putea justifica o captură adecvată a mezofazelor de Pm în interiorul miezului lipidic în timpul etapei de preparare.

Caracterizarea morfologică anterioară și studiile ulterioare de eficiență de încapsulare și eliberare *in vitro* susțin această prezumție.

Influenta fracției de Squalen bioactiv și a medicamentelor încapsulate în NLC asupra caracteristicilor structurale

Evaluarea efectului de co-încapsulare a celor două componente active cu acțiune antitumorală și antioxidantă în sistemele nanotransportor sintetizate cu fracțiile de Squalen a fost realizată pe baza calorimetriei de scanare diferențială (DSC, fig. 4).

Rezultatele obținute în urma analizei DSC au scos în evidență prezența a două picuri endoterme cu maxime ale punctelor de topire situate în intervalul $44 \div 48^{\circ}\text{C}$ (specifice acizilor grași nesaturați prezenți în fracția vegetală) și respectiv $52 \div 54^{\circ}\text{C}$ (corespunzătoare amestecului de lipide solide - monostearat de gliceril, palmitat de cetil). Alura foarte largă a picurilor endoterme sugerează existența unor miezuri lipidice foarte dezordonate.

Toate sistemele nanotransportor sintetizate cu cele trei fracții de Sq (exemplu: Sq1, Sq2 și Sq3) prezintă modificări ale valorilor punctelor de topire, ale ΔH , precum și ale alurei maximelor endoterme (fig. 4), după încapsularea componentelor active, ceea ce sugerează o perturbare semnificativă a rețelei lipidice ca urmare a co-încapsulării Pm și Hes.

O analiză comparativă a celor trei tipuri de nanotransportori preparați cu fracție vegetală ce conține 5,8% Sq, 34,7% Sq și respectiv 83,4% Sq (fig. 4) a scos în evidență formarea unor rețele lipidice diferite înalt dezordonate în cazul fracției concentrate în Sq.

Determinarea eficienței de încapsulare a Hes și Pm în același sistem lipidic nanotransportor

Pentru demonstrarea funcționalității fracțiilor vegetale cu concentrații de 5,8%, 34,7% și respectiv 83,4% Squalen, izolate din semințe de Amarant, s-a determinat eficiența de încapsulare a celor două substanțe active - Pm și Hes în sistemele de nanotransportori lipidici sintetizați.

O evaluare comparativă a eficienței de încapsulare a scos în evidență o capacitate excelentă de încapsulare a bioflavonei - Hes, cu valori ale EE > 93% în cazul primului set de NLC ce co-încapsulează un amestec de 0,8% Pm și Hes aflate într-un raport masic de 1,3:1 (fig. 5). Aceste valori mari ale EE% obținute pot fi asociate cu caracterul predominant lipofil al Hes captată integral în miezul lipidic. O creștere a raportului masic în favoarea Pm a condus la o scădere considerabilă a eficienței de încapsulare a Hes, însă valorile rămân în continuare ridicate, exemplu: EE% pentru NLC cu un raport masic Pm:Hes = 2:1 fiind cuprins între 83,8 și 86,6%.

În ceea ce privește gradul de încapsulare al Pemetrexedului disodic, deși acesta prezintă un caracter puternic hidrofil, au fost obținute eficiențe foarte bune de încapsulare tot în cazul NLC-urilor preparate la un raport masic Pm:Hes = 1,3:1 (EE% cuprinsă între 88 și 89,4%). Prin coroborarea rezultatelor potențialului electrocinetic cu rezultatele eficienței de

încapsulare (exemplu: modificarea și totodată corelarea distribuției sarcinilor de suprafață cu valorile eficienței de încapsulare: EE% ridicate dar ξ mai mici pentru NLC ce conțin un raport masic de Pm:Hes = 1,3:1 și respectiv EE% scăzute dar ξ mult mai electronegative în cazul NLC preparate cu un raport masic Pm:Hes = 2:1) precum și cele ale experimentelor de eliberare *in vitro* susțin captarea unei cantități considerabile de Pm în miezul lipidic, în pofida hidrofilicității acestuia.

Evaluarea in vitro a proprietăților antioxidante ale nanotransportorilor lipidici liberi și cu conținut variabil de Pemetrexed și Hesperidina

Pentru a se asigura o evaluare comparativă a activității antioxidante înainte și după încapsularea Pm și Hes, nanostructurile lipidice libere precum și NLC-urile încărcate cu Pm și Hes au fost supuse acțiunii unor radicali liberi generați *in situ* într-un sistem de chemiluminescența.

Majoritatea sistemelor de nanostructuri lipidice sintetizate cu cele trei fracții de Sq și încărcate cu diferite concentrații de antitumoral și bioflavonoid au prezentat o bună capacitate de a capta radicalii liberi oxigenați generați *in situ* într-un sistem de chemiluminescența (fig. 6).

Valorile activității antioxidante (AA%) pentru nanotransportorii liberi au fost cuprinse între 91 și 93%, ceea ce evidențiază rolul și eficiența fracțiilor vegetale pe bază de Sq de a capta radicalii liberi, fără existența unui antioxidant suplimentar (fig. 6). La co-încapsularea Pm și Hes în NLC au fost observate îmbunătățiri ale AA%, acestea fiind cuprinse între 95,4 și 98% în cazul sistemelor ce conțin 0,8% amestec Pm și Hes. Cele mai eficiente sisteme de captare a radicalilor liberi s-au dovedit a fi NLC-urile ce co-încapsulează un amestec de 1,4% Pm și Hes aflate într-un raport masic 1,3:1 (exemplu: AA% = $97,3 \div 98,2$).

Studiul eliberării in vitro a celor două substanțe active din același sistem lipidic nanotransportor preparat cu diferite fracții de Squalen bioactiv

Avantajele evidente ale nanotransportorilor lipidici preparați cu fracții vegetale cu conținut variabil de Squalen bioactiv au fost evidențiate în urma testelor de eliberare *in vitro* ale celor două componente active - Pm și Hes co-încapsulate în același sistem nanotransportor.

Experimentele de eliberare *in vitro* au fost realizate pentru formulările optime de nanotransportori lipidici încărcăți cu o concentrație totală de 0,8% amestec Pm și Hes și diferite concentrații de Squalen, utilizând celulele de difuzie Franz verticale. Pentru a evalua eliberarea celor două componente funcție de concentrația acestora în NLC, a fost de asemenea supus testelor de eliberare și un nanotransportor preparat cu fracția cea mai concentrată de Squalen (83,4%) ce co-încapsulează o concentrație de 1,4% amestec de Pm și Hes. De asemenea, pentru a demonstra avantajele clare ale sistemelor NLC dezvoltate în cercetarea prezentă în eliberarea susținută a ambelor componente active, au fost preparate și supuse studiilor de eliberare, sisteme de nanoparticule lipidice solide - SLN preparate fără fracția vegetală de Squalen dar încărcate cu aceleași concentrații de Pm și Hes. Cantitatea de Pm și respectiv Hes eliberată a fost evaluată timp de 24 h.

Pentru sistemele nanostructurate studiate, profilul de eliberare prezintă un model similar cu o eliberare rapidă în prima oră, urmată de o eliberare lentă de-a lungul celor 24 h (fig. 7 și 8). Contrar așteptărilor, Pemetrexedul (distribuit în proporție majoritară în învelișul de surfactanți) este eliberat mai lent comparativ cu Hesperidina. Această comportare poate fi atribuită unor potențiale efecte individuale și/sau cumulate: (i) prezentei unei concentrații mai mici de Hes comparativ cu Pm încărcate în NLCs; (ii) o prindere eficientă a Pm în învelișul de surfactanți cu posibilitatea existenței unor atracții electrostatice (datorită anionilor carboxil din structura Pm) dar și (iii) existenței unei cantități considerabile de Pm captat în imperfecțiunile

create de fracția vegetală din miezul lipidic. Pe de altă parte, profilul de eliberare a Pm, în special pentru NLC preparat cu fracție vegetală concentrată în Squalen (83,4%) și 0,8% amestec Pm și Hes, arată o eliberare a Pm aproape constantă de la 1 h până la 24 h, în timp ce profilul de eliberare al Hes indică o creștere a cantității cumulate de Hes eliberată de la 1 la 8 h, urmată de o eliberare constantă a Hes până la 24 h.

În ceea ce privește influența concentrației de Squalen utilizat la prepararea NLC, așa cum era de așteptat, se poate observa că existența unei concentrații mari de Sq asigură o eliberare lentă a Pm și Hes (exemplu: NLC_Sq3 asigură o eliberare de 11,2% Pm și 55,2% Hes, în timp ce NLC_Sq1 prezintă o eliberare de 36% Pm și 64,4% Hes). Prezența unei concentrații de 83,4% Sq în matricea lipidică a sistemelor de NLC permite formarea unei rețele lipidice dezordonate cu multe imperfecțiuni în care pot fi găzduite concentrații mari de componenți activi atât de natura lipofilă cât și hidrofilă.

Prin creșterea concentrației de medicament co-încapsulat de la 0,8% la 1,4% în NLC preparate cu 83% Sq (fig. 8), viteza de eliberare a Pm a crescut la 35% (NLC_Sq3 ce încapsulează un amestec de 1,4% Pm și Hes) comparativ cu 11,2% pentru NLC_Sq3 ce încapsulează un amestec de 0,8% Pm și Hes. În mod contrar, viteza de eliberare a Hes a scăzut lent la 44% pentru NLC_Sq3 ce co-încapsulează 1,4% amestec Pm și Hes, comparativ cu 55,2% în cazul NLC_Sq3 ce co-încapsulează 0,8% amestec Pm și Hes.

Tabelul 1

NLC*	Amestec de surfactanti			Amestec de lipide			Pm(%)	Hes(%)
	Colat de sodiu (%)	Tween 20 (%)	Polox. (%)	Fracție vegetală cu Sq (%)	MSG(%)	PC(%)		
NLC_Sq1 (liber)	1,4	1	0,05	3% Sq 1	3,5	3,5		
NLC_Sq2 (liber)				3% Sq 2				
NLC_Sq3 (liber)				3% Sq 3				
NLC_Sq1_PmHes 1	1,4	1	0,05	3% Sq 1	3,5	3,5	0,8	0,6
NLC_Sq2_PmHes 1				3% Sq 2			0,8	0,6
NLC_Sq3_PmHes 1				3% Sq 3			0,8	0,6
NLC_Sq1_PmHes2	1,4	1	0,05	3% Sq 1	3,5	3,5	0,53	0,27
NLC_Sq2_PmHes2				3% Sq 2			0,53	0,27
NLC_Sq3_PmHes 2				3% Sq 3			0,53	0,27

* Sq 1 = fracție vegetală izolată din semințe de Amarant ce conține 5,8% Squalen; Sq 2 = fracție vegetală izolată din semințe de Amarant ce conține 34,7 % Squalen; Sq 3 = fracție vegetală ce conține 83,4% Squalen.

Tabelul 2

Pemetrexed	Ordin Zero		Ordin 1		Higuchi		Peppas-Korsmeyer			Hixon-Crowell	
	R2	k0	R2	k1	R2	k2	R2	k3	n	R2	k4
NLC_Sq1_Pm Hes2	0,4161	2,6585	0,2866	0,273366	0,6917	10,449	0,936	30,72557	0,066	0,4336	0,048
NLC_Sq2_Pm Hes2	0,6541	4,1781	0,598	1,336892	0,882	8,3154	0,6106	12,67944	0,0766	0,6564	0,0679
NLC_Sq3_Pm Hes2	0,6729	3,5776	0,5979	1,343801	0,8915	7,058	0,864	10,69547	0,0797	0,6758	0,0577
NLC_Sq3_Pm Hes 1	0,5458	3,0944	0,2723	0,267148	0,8123	11,507	0,9674	26,79785	0,1541	0,5767	0,0566

RO 131547 B1

1

Tabelul 3

3

5

7

9

Hesperidin	Ordin Zero		Ordin 1		Higuchi		Peppas-Korsmeyer			Hixon-Crowell	
	R2	k0	R2	k1	R2	k2	R2	k3	n	R2	k4
NLC_Sq1_Pm Hes2	0,6778	5,526	0,2044	0,21487	0,8948	19,354	0,9616	38,37956	0,2076	0,7639	0,1193
NLC_Sq2_Pm Hes 2	0,7641	4,5536	0,231	0,242045	0,9435	15,424	0,9649	25,78695	0,274	0,8197	0,089
NLC_Sq3_Pm Hes 2	0,8119	5,1824	0,2125	0,23007	0,9699	17,266	0,982	25,78695	0,3214	0,8696	0,104
NLC_Sq3_Pm Hes 1	0,6804	3,9223	0,2503	0,25356	0,9045	13,786	0,9977	26,36331	0,2263	0,7295	0,0745

1. Procedeu de obținere a unor nanotransportori lipidici funcționali pe bază de fracții uleioase de Amarant cu Squalen bio-activi, **caracterizat prin aceea că**, constă în: 3
 - a. formarea unei pre-emulsii lipidice libere și încărcate cu două componente active hidrofile și hidrofobe, respectiv Pemetrexed și Hesperidin, obținute prin contactarea, sub agitare magnetică, a unei faze apoase și a unei faze lipidice, la o temperatură de 80...82°C și menținere la un regim de temperatură constantă, timp de 15 min; 5
 - b. supunerea pre-emulsiei lipidice la un proces inițial de omogenizare cu grad înalt de forfecare de 12 000 rpm, timp de 1 min și ulterior la un proces de omogenizare la presiune ridicată, respectiv la 500 bar, timp de 196 sec; 11
 - c. obținerea unor dispersii apoase de nanotransportori lipidici liberi și încărcăți cu Pemetrexed și Hesperidin, prin răcire ușoară, sub agitare magnetică, la temperatura camerei a emulsiei supuse celor două tipuri de omogenizări; 13
 - d. obținerea de nanotransportori lipidici funcționali în stare solidă prin supunerea dispersiilor apoase de nanotransportori lipidici liberi și încărcăți la un proces de liofilizare la -55°C timp de 72 h. 17
2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, faza lipidică este formată dintr-un amestec de lipide solide și ulei izolat din semințe de Amarant, respectiv monostearat de gliceril:palmitat de cetil:fracție vegetală ce conține 5,8% Squalen, într-un raport de greutate de 1,16:1,16:1, la o temperatură de 80...82°C. 21
3. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că**, se folosește fracție vegetală cu conținut de 34,8% Squalen. 23
4. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că**, se folosește fracție vegetală cu conținut de 83,4% Squalen. 25
5. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, faza apoasă este formată la o temperatură de 80...82°C dintr-un amestec de surfactanți de tip colat de sodiu:monolaurat de polioxietilensorbitan:copolimer bloc polietilenglicol-polipropilenglicol într-un raport de greutate = 28:20:1. 29
6. Procedeu conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 5, **caracterizat prin aceea că**, pre-emulsia lipidică conține 30% amestec lipidic cu fracții vegetale al căror conținut de Squalen variază, fiind de 5,8%, 34,7% și 83,4%, 2,45% amestec de surfactanți și 1,4% amestec de medicamente de natură hidrofobă și hidrofilă, aflate într-un raport de greutate de 1,3:1. 33
7. Procedeu conform revendicării 6, **caracterizat prin aceea că**, în loc de 1,4% amestec de medicamente se folosește un amestec de 0,8% Pemetrexed și Hesperidin aflate într-un raport de greutate de 2:1. 35
8. Nanotransportori lipidici de natură solidă încărcăți cu Pemetrexed și Hesperidin, obținuți prin procedeul definit în oricare din revendicările de la 1 la 7, **caracterizați prin aceea că**, aceștia conțin: 37
 - a. 21,6% fracție vegetală cu conținut variabil de Squalen din întreaga matrice lipidică formată din lipide solide și lichide; 41
 - b. 10,1% amestec de medicamente de natură hidrofobă și hidrofilă din care 5,8% Pm și 4,3% Hes, respectiv 5,9% amestec de medicamente din care 3,9% Pemetrexed și 2% Hesperidin, încapsulate în matricea lipidică astfel formată, procente fiind exprimate în greutate. 45

1 9. Nanotransportori lipidici conform revendicării 8 obținute prin procedeul definit în
oricare din revendicările de la 1 la 7, **caracterizați prin aceea că**, sunt de formă sferică și au
3 un diametru mediu cuprins între 141 și 116 nm, în cazul utilizării unui raport de greutate între
Pemetrexed și Hesperidin de 1,3:1 și între 124 și 106 nm în cazul utilizării unui raport de 2:1.

5 10. Nanotransportori lipidici conform revendicărilor 6 și 7 obținuți prin procedeul definit
în oricare din revendicările de la 1 la 5, **caracterizați prin aceea că**, prezintă o polidispersitate
7 ce variază între $0,253 \div 0,190$, în cazul utilizării unui raport de greutate între Pemetrexed și
Hesperidin de 1,3:1 și între $0,152 \div 0,179$ în cazul utilizării unui raport de 2:1.

9 11. Nanotransportori lipidici conform revendicării 6 obținuți prin procedeul definit în
oricare din revendicările de la 1 la 5, **caracterizați prin aceea că**, prezintă valori ale potenția-
11 lului electrocinetic ce variază între $-32,3 \div -38,7$ mV, în cazul utilizării unui raport de greutate
între Pemetrexed și Hesperidin de 1,3:1 și între $-47,1 \div -54$ mV în cazul utilizării unui raport de
13 greutate între Pemetrexed și Hesperidin de 2:1.

15 12. Nanotransportori lipidici conform revendicării 8 obținuți prin procedeul definit în
oricare din revendicările de la 1 la 7, **caracterizați prin aceea că**, prezintă valori ale eficienței
de încapsulare a Pemetrexed cuprinse între 88 și 89,4 și valori ale eficienței de încapsulare a
17 Hesperidin cuprinse între 93,1 și 94,2 în cazul utilizării unui raport de greutate
Pemetrexed:Hesperidin de 1,3:1.

19 13. Nanotransportori lipidici conform revendicării 8 obținuți prin procedeul definit în
oricare din revendicările de la 1 la 7, **caracterizați prin aceea că**, prezintă valori ale eficienței
21 de încapsulare a Pemetrexed cuprinse între 83,8 și 86,6 și valori ale eficienței de încapsulare
a Hesperidin cuprinse între 86,9 și 87,7 în cazul utilizării unui raport de greutate
23 Pemetrexed:Hesperidin de 2:1.

25 14. Nanotransportori lipidici conform revendicării 8, obținuți prin procedeul definit în
oricare din revendicările de la 1 la 7, **caracterizați prin aceea că**, au proprietăți antioxidante,
prezentând o capacitate de a capta între 97,3 și 98,2% din radicalii liberi oxigenați formați în
27 sistemul generator de chemiluminescență, în cazul utilizării unui raport de greutate
Pemetrexed:Hesperidin de 1,3:1, respectiv între 95,4 și 98,0%, în cazul utilizării unui raport
29 Pemetrexed:Hesperidin de 2:1.

31 15. Nanotransportori lipidici conform revendicării 8, obținuți prin procedeul definit în
oricare din revendicările de la 1 la 7, **caracterizați prin aceea că**, prezintă abilitatea de a
asigura o co-eliberare susținută/treptată a ambelor categorii de medicamente hidrofiele și lipofile.

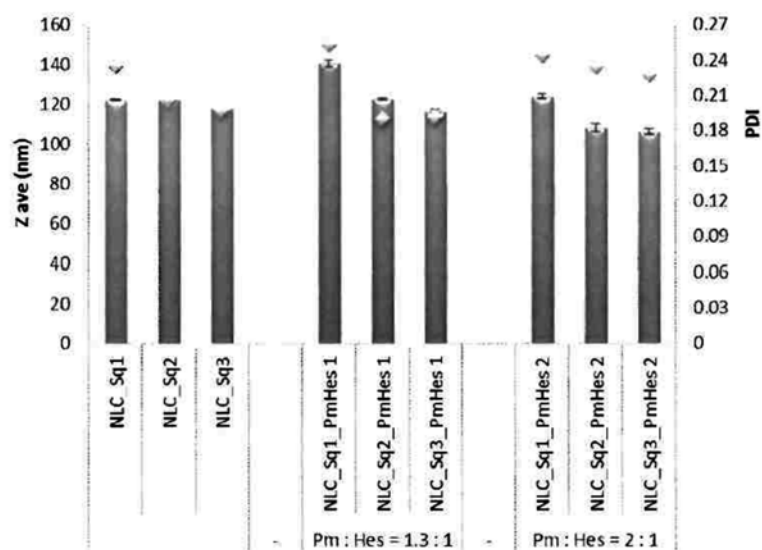


Fig. 1

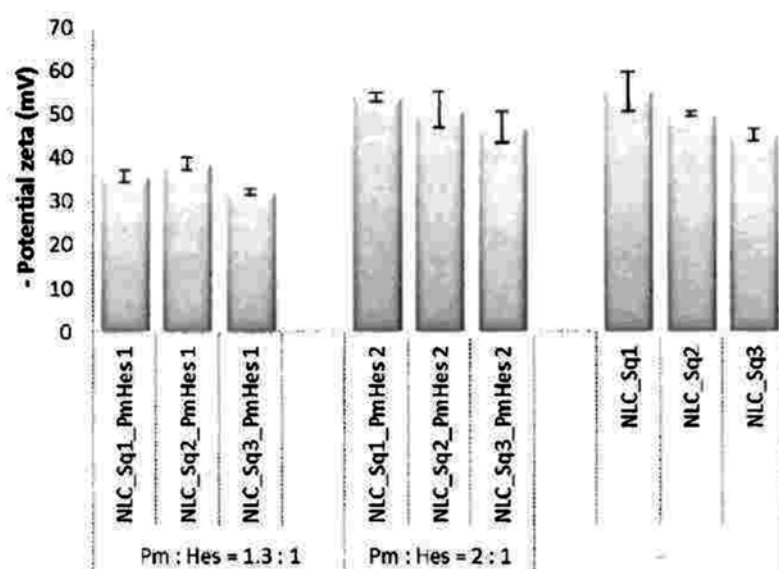


Fig. 2

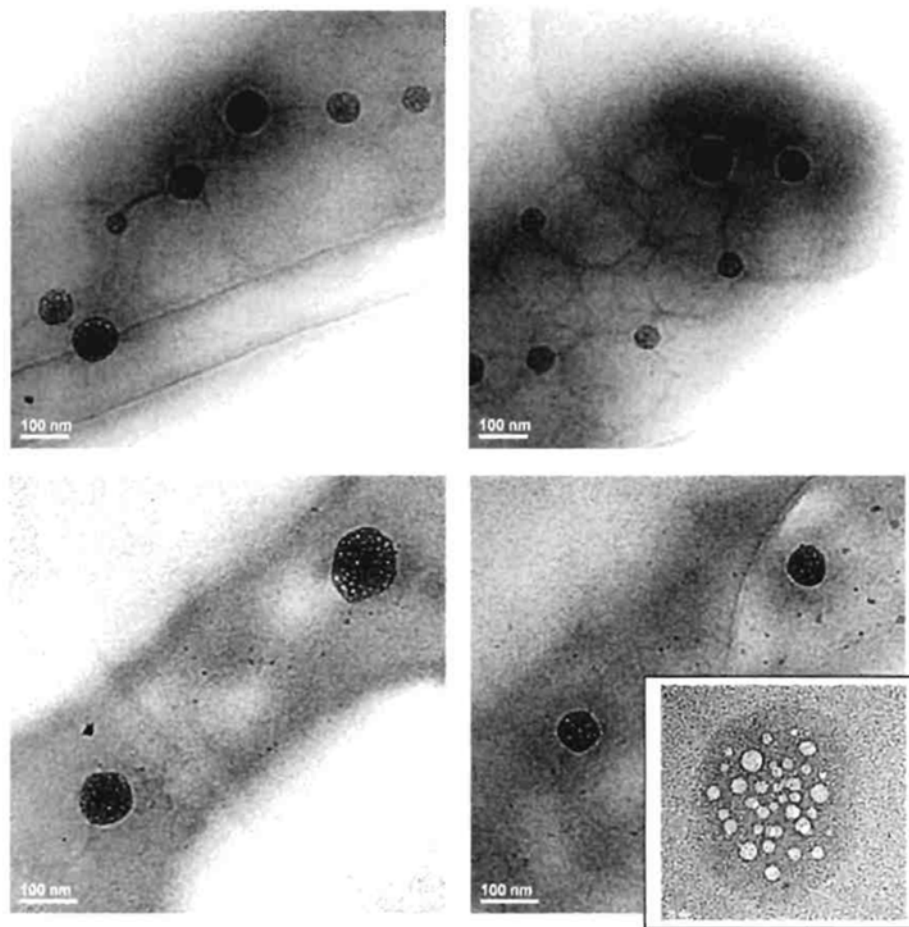


Fig. 3

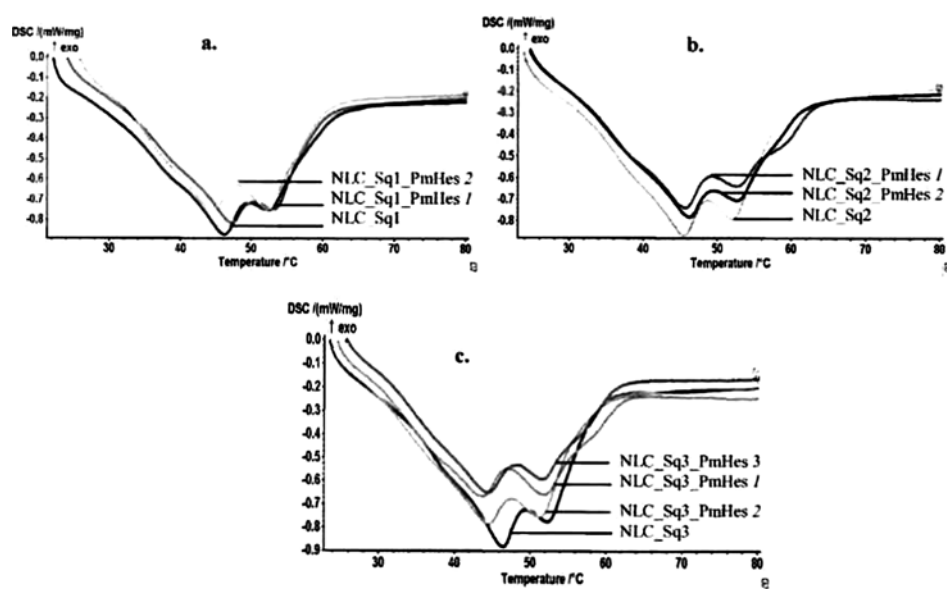


Fig. 4

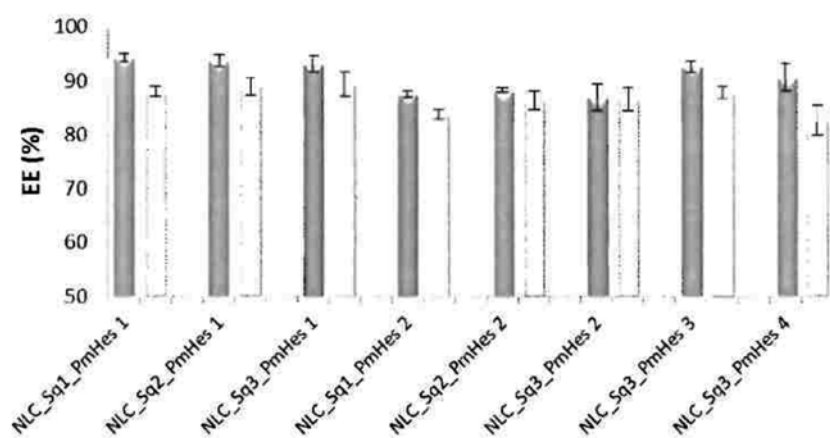


Fig. 5

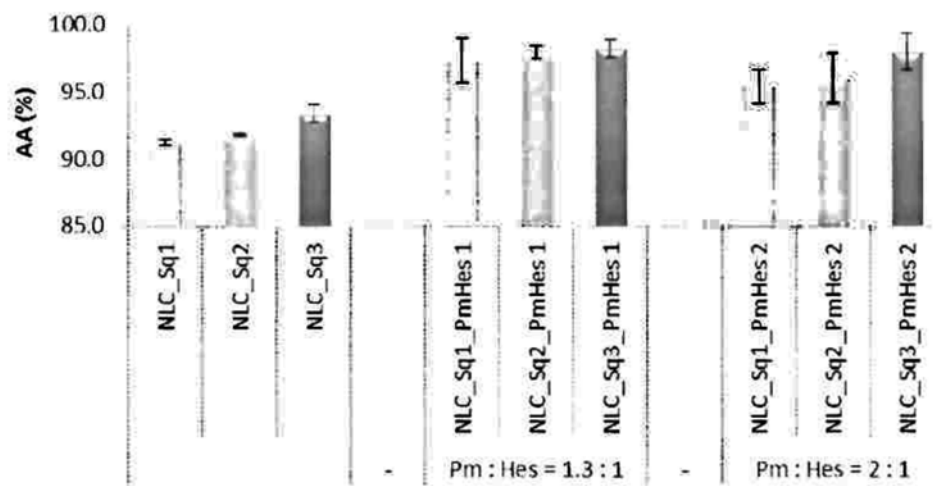


Fig. 6

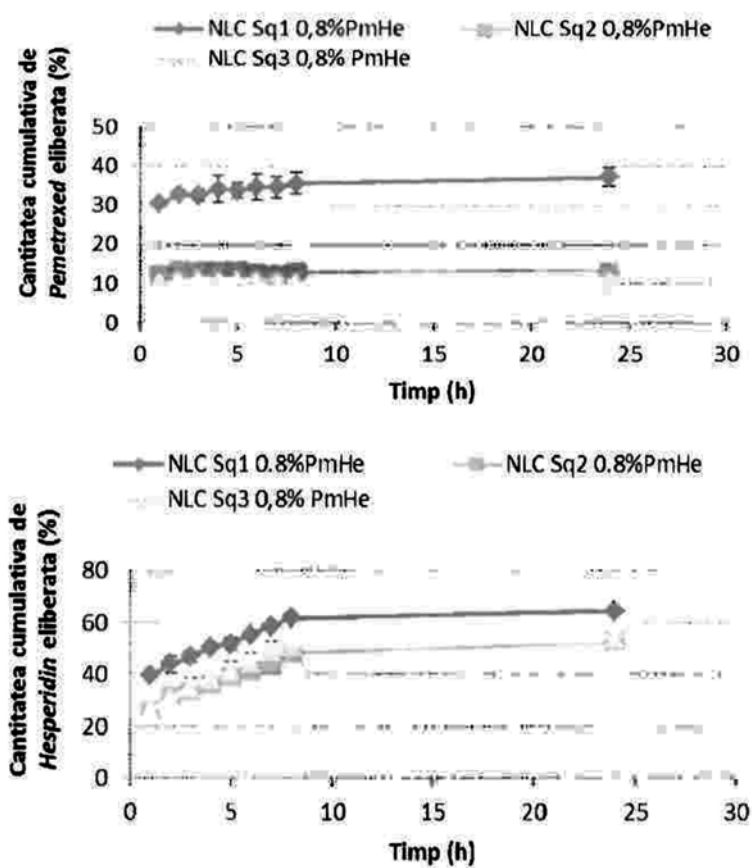


Fig. 7

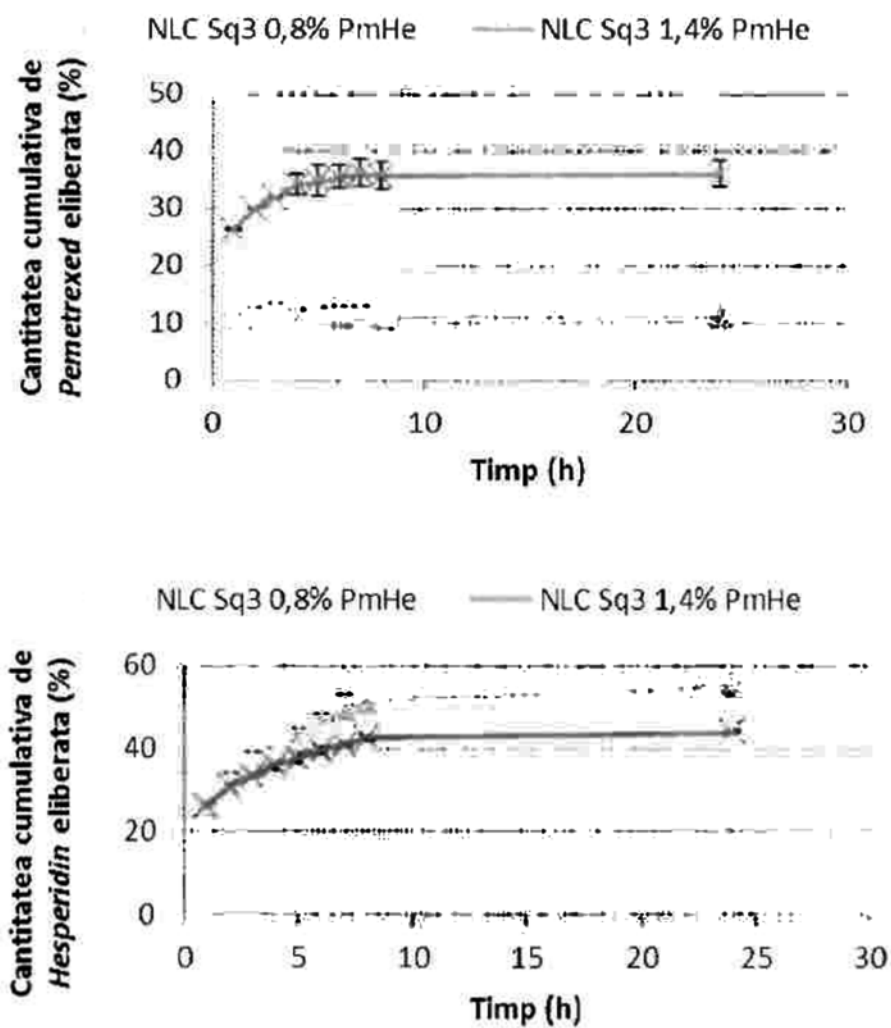


Fig. 8

