



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00391

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

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

(71) Solicitant:
• 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

(54) NANOTRANSPORTORI PE BAZĂ DE SQUALEN VEGETAL
CE POT CO-ÎNCAPSULA MEDICAMENTE HIDROFILE ȘI
LIPOFILE

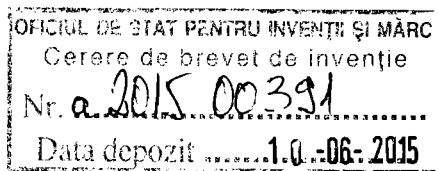
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor nanotransportori lipidici funcționali, pentru încapsularea și eliberarea de medicamente hidrofiele și lipofile. Procedeu conform invenției constă în formarea unei pre-emulsii lipidice libere și încărcate cu două componente active, Pemetrexed și Hesperidin, prin contactarea unei faze lipide și a unei faze apoase la temperatura de 80...82°C, timp de 15 min, supunerea pre-emulsiei lipidice unor etape succesive de omogenizare cu grad de forfecare la 12000 rpm, timp de

1 min, ulterior la presiune ridicată la 500 bar, timp de 196 s, dispersiile apoase de nanotransportori lipidici liberi și încărcate cu cele două componente active fiind supuse unei etape de liofilizare la -55°C, timp de 72 h, din care rezultă nanotransportori lipidici în stare solidă, funcționali.

Revendicări: 15
Figuri: 8





NANOTRANSPORTORI PE BAZA DE SQUALEN VEGETAL CE POT CO-INCAPSULA MEDICAMENTE HIDROFILE SI LIPOFILE

I. DESCRIERE

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-incapsuleze 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 metabolitilor 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.clc.2015.02.007; Liang Y., Lung Cancer, 87 (2015) 34-38*) și de asemenea determină apoptoza și citotoxicitate demonstrată în celulele de osteosarcomă (*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 (ex: 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 (ex: 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 marită, eficiența 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

10-06-2015

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.

Nanoformularile pe baza 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 că NLCs cresc eficiența de încapsulare, îmbunătățesc stabilitatea chimică, biodisponibilitatea și eliberarea prelungită a compusilor de natură lipofilă, însă manifestă o restricție ridicată în ceea ce privește încapsularea componentelor de natură hidrofilă.

Primele studii de incorporare a ingredientelor active hidrofile au fost dezvoltate de *Gallarate și colab.* care au utilizat tehnica coacervării bazată pe transformarea de faze (ex: soluție micelară în particule solide de acid gras) pentru incorporarea *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 micle inverse (tehnica PIT) a fost mai târziu folosită de *Vrignaud și colab.* pentru încapsularea *clorhidratului de Erlotinib* în nanotransportori lipidici preparați cu diferiți surfactanți (derivati 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 (ex: palmitat de cetil și esteri ai glicerolului cu acizi grași cu lant variabil, acid stearic, colesterol, ceară de albine) și un lipid lichid (triacilgliceroli ai acidului capric și caprilic) ce încapsulează ca substanță activă un filtru UV, utilizând metoda omogenizării la presiune înaltă (HPH). Pe aceeași linie științifică este

1 0 -06- 2015

incadrata si cercetarea din **CN 102283809 (A)** realizata cu scopul obtinerii unor NLC cu aplicatii locale, utilizand ambele metode de omogenizare cu grad inalt de forfecare si la presiune ridicata.

De asemenea, pentru a reduce inflamatia si a asigura o stabilitate chimica adecvata a medicamentelor incapsulate, literatura patentelor furnizeaza diferite metode de obtinere a NLC utilizand tehnici precum difuzia cu solventi (**CN103417481; US 20110038941 A1**), omogenizarea cu grad inalt de forfecare, microemulsionarea (**US 2010/0247619 A1; US 761 1733**), ultrasonarea (**EP 2821077 A1**) injectie – liofilizare (**CN102151250**), omogenizare la presiune ridicata (**WO 2011116963 A2**).

Problemele de stabilitate fizica (agregare, fuziune) si chimica (hidroliza, oxidare), expulzare a medicamentului, control al dimensiunii particulelor, eficienta de incapsulare scazuta a medicamentelor solubile in apa, impurificare cu metale etc., au condus adesea la scaderea calitatii formularii nanotransportorului, dar si a actiunii farmacologice a medicamentului incapsulat.

Cu scopul de a imbunatati aceste caracteristici definitorii pentru un sistem de distributie, si in principal de a realiza o co-incapsulare multipla a doua categorii de medicamente lipo- si hidrosolubile in acelasi sistem nanotransportor ce prezinta el insusi proprietati terapeutice, prezenta inventie descrie o metoda combinata de omogenizare cu grad inalt de forfecare (HSH) si omogenizare la presiune ridicata (HPH) care permite obtinerea unor nanotransportori cu eficiente de incapsulare maxime pentru cele doua medicamente cu solubilitate preferentiala apa/ulei.

Comparativ cu metodele existente de preparare a nanotransportorilor lipidici, compozitia, rapoartele intre componentele lipidice, surfactanti si substantele active, dar si prezenta uleiului de Amarant confera nanotransportorilor preparati avantajele de a imbunatati semnificativ eficienta de incapsulare a unui medicament hidrofil, simultan cu mentinerea unor valori ridicate ale eficientei de incapsulare a medicamentului lipofil (ex: cu valori ale eficientei de incapsulare de 89% pentru *Pemetrexed* si de 94% pentru *Hesperidin*) si de a asigura o eliberare controlata a ambelor categorii de medicamente.

Obtinerea unor nanoparticule, care pe langa rolul de transportor eficient manifesta si capacitatea de a prezenta proprietati terapeutice care sa potenteze sau sa substituie dozele ridicate de medicamente (in special cazul celor utilizate in chemoterapie care prezinta un risc ridicat de citotoxicitate asupra celulelor normale), ramane pana in prezent o problema care nu este pe deplin rezolvata. Drept urmare, dezvoltarea unor nanotransportori eficienti și siguri, bazati pe ingrediente naturale din surse vegetale reprezintă o necesitate în industria farmaceutica. Utilizarea resurselor vegetale, care prezinta efecte benefice asupra organismului prin virtutea proprietatilor biologice demonstrate, reprezinta o alternativa ce poate îndeplini cerințele consumatorului asociate unui consum preferential de produse naturale.

Referitor la utilizarea uleiurilor vegetale, Viladot Petit et. al. în **US 20130017239 A1** au dezvoltat formulări cosmetice pe baza 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 2012/0128777A1**), uleiul de canepă 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**.

II. Problema tehnică pe care o rezolvă procedeul conform invenției constă în obținerea unor nanotransportori lipidici pe baza de fracții vegetale, cu conținut variabil de Squalen, capabili să co-încapsuleze și să co-elibereze sustinut două tipuri de medicamente (cu acțiune antioxidantă și antitumorală) ce prezintă polarități diferite. Procedeul de obținere a nanotransportorilor lipidici conform invenției cuprinde:

- a) formarea unei *faze lipidice* fără conținut de medicament, la o temperatură de 80°C, ce conține un amestec de lipide solide și ulei izolat din semințe de Amarant, respectiv monostearat de gliceril : palmitat de cetil : fracție vegetală cu concentrație variabilă de Squalen, într-un raport de greutate de 1,16 : 1,16 : 1, respectiv formarea unei *faze lipidice* ce conține o concentrație de component activ de natură hidrofobă de 0,6% *Hesperidin* și respectiv 0,27% *Hesperidin*;
- b) formarea unei *faze apoase* fără conținut de medicament, la o temperatură de 80°C, ce conține un amestec de surfactanți de tip colat de sodiu : monolaurat de polioxietilensorbitan : copolimer bloc polietilenglicol-polipropilenglicol într-un raport de greutate de 28 : 20 : 1, respectiv formarea unei faze apoase ce conține o concentrație de component activ de natură hidrofilă de 0,8% *Pemetrexed* și respectiv 0,53% *Pemetrexed*;
- c) formarea unei pre-emulsii lipidice – precursorare de transportori lipidici nanostructurați – prin contactarea sub agitare magnetică a celor două faze, apoasă și lipidică, și menținere la un regim de temperatură constant de 80°C timp de 15 min;
- d) obținerea unor dispersii apoase de nanotransportori lipidici liberi și co-încărcați cu cele două medicamente cu caracter hidrofil și lipofil, prin supunerea pre-emulsiei lipidice inițial la un proces de omogenizare cu grad înalt de forfecare (la 12000 rpm, timp de 1 min), urmat de un proces de omogenizare la presiune ridicată (la 500 bar, timp de 196 sec) și ulterior răcire ușoară la temperatura camerei, sub agitare magnetică;

10-06-2015

- e) obținerea de nanotransportori lipidici funcționali în stare solidă, liberi și încărcati cu *Pm* și *Hes*, prin supunerea dispersiilor apoase de nanotransportori la o etapă de liofilizare la -55°C timp de 72h.

Nanotransportorii lipidici încărcăți cu medicament antitumoral – *Pemetrexed* și antioxidant – *Hesperidin* obținuți pe baza de fracții de Amarant cu conținut variabil de Squalen bioactiv cuprind:

- 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% *Pm* și 2% *Hes*, încapsulate în matricea lipidică astfel formată, procentele fiind exprimate în greutate.

III. Invenția prezintă următoarele avantaje:

- 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 prezența surfactanților.
- Procedul 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.
- Obținerea nanoparticulelor lipidice se bazează pe folosirea unor materii prime biocompatibile, concentrații minime de surfactanți și nu implică utilizarea unor substanțe agresive (ex: solvenți organici sau surfactanți ce prezintă efect toxic asupra organismului).
- 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.
- 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:

- 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 hidrofila;
 - 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;
 - 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 (ex: medicamentele utilizate în terapia cancerului);
 - d. prin virtutea proprietăților sale antioxidante poate proteja anumite medicamente ce prezintă o sensibilitate ridicată la oxidare;
 - e. constituie o sursă de valorificare a resurselor naturale provenite din flora autohtonă asociată cu o eficiență economică sporită.
- Procedul propus este simplu și eficient, implică etape distincte și ușor de reprodus, asigurând același nivel de control și prin transpunere la scară pilot.
 - Procedul 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 -6 (ex: proprietăți antioxidante chiar și în absența medicamentelor de sinteză) și de asemenea pot să fie adaptați pentru co-incapsularea unei game largi de medicamente ce prezintă proprietăți specifice.
 - Nanoparticulele lipidice cu conținut de medicament antitumoral și antioxidant, obținute prin procedul 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.

IV. Procedul 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 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, dupa care este lăsată să se racească la temperatura camerei, sub agitare magnetica, și ulterior în urma unui proces de liofilizare la -55°C timp de 72h, conduce la obținerea de nanotransportori lipidici de natura solida cu proprietati antioxidante amplificate si o abilitate excelenta de eliberare treptata a ambelor categorii de medicamente de natura hidrofila si lipofila.

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

- a. Nanotransportori lipidici liberi (fără conținut de medicament hidrofil si lipofil), formati prin combinarea a doua lipide solide biocompatibile (monostearat de gliceril si palmitat de cetil), cu o fractie uleioasa vegetala izolata din seminte de Amarant (ex: *Sq 1* = fractie vegetala ce contine 5,8% Squalen; *Sq 2* = fractie vegetala ce contine 34,7% Squalen si *Sq 3* = fractie vegetala ce contine 83,4 % Squalen).
- b. Nanotransportori lipidici ce co-incapsuleaza concentrații variabile de medicament hidrofil (*Pm*) si hidrofob (*Hes*), formati similar cu nanotransportorii fara continut de substante active.

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

- formarea unei topituri lipidice, prin utilizarea de lipide solide și uleiuri vegetale (monostearat de gliceril, palmitat de cetil si fractii uleioase din seminte de Amarant cu concentratii variabile de Squalen);
- adăugarea în topitura lipidică a unor cantitati diferite de medicament lipofil ce asigura o concentratie de 0,6% si respectiv 0,27% *Hesperidin* in dispersia apoasa de nanotransportori lipidici;
- adăugarea în faza apoasa formata dintr-un amestec de surfactanți de tip colat de sodiu : monolaurat de polioxietilensorbitan : copolimer bloc polietilenglicol-polipropilenglicol a unor cantitati diferite de medicament hidrofil ce asigura o concentratie de 0,8% si respectiv 0,53% *Pemetrexed* in dispersia apoasa de nanotransportori lipidici.

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

Tabel 1 – Compozitia nanostructurilor lipidice obtinute prin utilizarea fractiilor vegetale cu continut variabil de Squalen

Tabel 2 – Parametrii cinetici ai eliberării *Pemetrexed* din nanotransportorii lipidici

Tabel 3 – Parametrii cinetici ai eliberării *Hesperidin* din nanotransportorii lipidici

Figura 1 – Determinarea diametrelor medii ale nanotransportorilor lipidici, pe baza tehnicii de imprastiere dinamica a luminii (DLS)

Figura 2 – Valorile potentialului electrocinetic determinate pe sistemele de NLC libere si incarcate cu amestec de *Pm* si *Hes* sintetizate cu diferite fractii de Squalen

Figura 3 – Microscopia de transmisie electronica a probelor de nanotransportori lipidici NLC_Sq3_PmHes 1 (a) si NLC_Sq3_PmHes 2 (b)

Figura 4 – Evaluarea modificarilor structurale, inainte si dupa co-incapsularea *Pm* si *Hes* in sistemele NLC preparate cu fractii vegetale ce contin 5,8% Squalen (a), 34,7% Squalen (b) si 83,4% Squalen (c).

Figura 5 – Eficienta de incapsulare a *Hes* si *Pm* in sistemele nanostructurate sintetizate cu fractii variabile de Squalen

Figura 6 – Evaluarea *in vitro* a proprietatilor antioxidante a NLC-urilor preparate cu fractii diferite de Squalen bioactiv si incarcate cu concentratii variabile de *Pm* si *Hes*

Figura 7 – Profilele *in vitro* ale eliberării cantității cumulative procentuale de *Pm* (a) si *Hes* (b) din NLC cu diferite concentratii de Squalen

Figura 8 – Profilele *in vitro* ale eliberării cantității cumulative procentuale de *Pm* (a) si *Hes* (b) din NLC cu diferite concentratii de medicament hidrofil/lipofil

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 si fractie vegetala izolata din seminte de Amarant cu continut 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 contine colat de sodiu, monolaurat de polioxietilensorbitan, copolimer bloc polietilenglicol-polipropilenglicol într-un raport de greutate de 28 : 20 : 1. Prin contactarea celor doua faze lipidice si apoase, sub agitare magnetica 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 initial unei etape de omogenizare cu grad înalt de forfecare, aplicând 12000 rpm timp de 1 minut si ulterior unei etape de omogenizare la presiune ridicata la 500 bar, timp de 196 sec. Nanodispersia rezultata este lăsată să se racească la temperatura camerei, sub agitare magnetica, cu formarea unei dispersii apoase de transportori lipidici nanostructurati (NLC). Ulterior disperisia apoasa de NLC este congelata la -20°C timp de 24h si supusa unui proces de liofilizare la -55°C timp de 72h, cu obținerea unei pulberi de NLC libera (fară medicament incapsulat).

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.

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.

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*.

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*.

Etapile 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.

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 (Tabel 1).

Caracterizarea dimensională a nanotransportorilor lipidici pe baza 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 (ex: solubilitate diferentiată în miezul lipidic/inveliș 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 (ex: Z_{ave} cuprins între 141 și 116 nm), comparativ cu NLC-urile preparate cu o cantitate mai mare de *Pm* (ex: Z_{ave} 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

intre Z_{ave}/PdI fiind obtinut in cazul NLC_Sq3_PmHes 1 (116,5 nm/0,191) si respectiv NLC_Sq3_PmHes 2 (106 nm/0,228).

De asemenea, nu a fost observata o influenta clara a co-incapsularii celor doua substante active asupra Z_{ave} a NLC-ului preparat cu fractia vegetala bogata in Sq (83,4%).

In ceea ce priveste morfologia nanotransportorilor lipidici, cele doua formulari obtinute cu fractia inalt concentrata in Sq (83,4%) ce incapsuleaza 0,8% amestec de *Pm* si *Hes*, respectiv 1,4% amestec de *Pm* si *Hes* au fost supuse analizei TEM. Rezultatele obtinute au scos in evidenta formarea de nanotransportori lipidici sferici, cu o structura bine definita, diametre medii < 100 nm (Fig. 3) si existenta unui miez lipidic ce contine nanocompartimente distincte in care este localizat componentul activ.

Evaluarea stabilității nanotransportorilor lipidici liberi si incarcati cu *Pm* si *Hes*

Dezvoltarea unei sarcini nete la suprafata unei particule afecteaza distributia ionilor in regiunea interfaciala, conducand la o concentratie crescuta de ioni cu sarcina opusa fata de cea a particulei si la existenta unui strat dublu electric in jurul fiecarei particule. Valorile potentialului electrocinetic datorate sarcinilor din stratul dublu electric trebuie sa fie mai electronegative sau mai electropozitive de 25 mV pentru a evita aparitia fenomenelor de agregare a particulelor in timp.

Profilul potentialului electrocinetic (Fig. 2) a scos in evidenta existenta unor fenomene de repulsie eficiente intre particulele lipidice aflate in suspensie apoasa, favorabila pentru prevenirea agregarii nanotransportorilor lipidici ce co-incapsuleaza *Pm* si *Hes*.

Determinarea potentialului electrocinetic a scos in evidenta obtinerea unor nanotransportori lipidici ce prezinta o buna stabilitate fizica, cu valori cuprinse intre -32,3 mV si -54 mV. O observatie clara ce se poate desprinde prin compararea valorilor ξ ale primelor doua seturi de NLC ce co-incapsuleaza amestecul de *Pm* si *Hes* (Fig. 2) este legata de obtinerea unor nanotransportori lipidici mult mai stabili in cazul co-incapsularii unei cantitati mai mici de amestec de substante active (ex: 0,8% amestec de *Pm* si *Hes*).

Stabilitatea mai buna intalnita in cazul NLC-ului ce co-incapsuleaza 0,57% *Pm* si 0,27% *Hes*, de exemplu, între -47.1 si -54 mV poate fi rezultatul distribuției preferentiale a *Pm* atat in miezul lipidic cat si in invelisul de surfactanti. Datorită elementelor structurale, caracterul anionic al *Pm* ar putea conduce la o auto-asociere in mediu apos. Conform studiilor din literatura, auto-asocierea acidului folic conduce la formarea de mezosfere columnare hexagonale (Atluri R., Langmuir 29 (2013) 12003-12012). Între *Pm* si acidul folic există similitudini structurale, ambele poseda în fragmentul heterociclic grupari functionale ce formeaza legaturi de H, conducand la fenomene de auto-asamblare (ex: grupari carbonil si amino). Această similitudine ar putea justifica o captura adecvata a mezofazelor de *Pm* in interiorul miezului lipidic în timpul etapei de preparare.

Caracterizarea morfologica anterioara și studiile ulterioare de eficienta de incapsulare si eliberare *in vitro* sustin aceasta prezumție.

Influenta fractiei de Squalen bioactiv si a medicamentelor incapsulate in NLC asupra caracteristicilor structurale

Evaluarea efectului de co-incapsulare a celor doua componente active cu actiune antitumorală și antioxidantă in sistemele nanotransportor sintetizate cu fractiile de *Squalen* a fost realizata pe baza calorimetriei de scanare diferentia (DSC, Fig. 4).

Rezultatele obtinute in urma analizei DSC au scos in evidenta prezenta a doua picuri endoterme cu maxime ale punctelor de topire situate in intervalul $44 \div 48^{\circ}\text{C}$ (specifice acizilor grasi nesaturati prezenti in fractia vegetala) și respectiv $52 \div 54^{\circ}\text{C}$ (corespunzatoare amestecului de lipide solide – monostearat de gliceril, palmitat de cetil). Alura foarte larga a picurilor endoterme sugereaza existenta unor miezuri lipidice foarte dezordonate.

Toate sistemele nanotransportor sintetizate cu cele trei fractii de Sq (ex: *Sq1*, *Sq2* și *Sq3*) prezinta modificari ale valorilor punctelor de topire, ale ΔH , precum și ale alurei maximelor endoterme (Fig. 4), dupa incapsularea componentelor active, ceea ce sugereaza o perturbare semnificativa a rețelei lipidice ca urmare a co-incapsularii *Pm* și *Hes*.

O analiza comparativa a celor trei tipuri de nanotransportori preparati cu fractie vegetala ce contine 5,8% Sq, 34,7% Sq și respectiv 83,4% Sq (Fig. 4) a scos in evidenta formarea unor rețele lipidice diferite inalt dezordonate in cazul fractiei concentrate in Sq.

Determinarea eficientei de incapsulare a Hes și Pm in acelasi sistem lipidic nanotransportor

Pentru demonstrarea functionalitatii fractiilor vegetale cu concentratii de 5,8%, 34,7% și respectiv 83,4% *Squalen*, izolate din seminte de Amarant, s-a determinat eficienta de incapsulare a celor doua substante active – *Pm* și *Hes* in sistemele de nanotransportori lipidici sintetizati.

O evaluare comparativa a eficientei de incapsulare a scos in evidenta o capacitate excelenta de incapsulare a bioflavonei – *Hes*, cu valori ale EE > 93% in cazul primului set de NLC ce co-incapsuleaza un amestec de 0,8% *Pm* și *Hes* aflate intr-un raport masic de 1,3 : 1 (Fig. 5). Aceste valori mari ale EE% obtinute pot fi asociate cu caracterul predominant lipofil al *Hes* captata integral in miezul lipidic. O crestere a raportului masic in favoarea *Pm* a condus la o scadere considerabila a eficientei de incapsulare a *Hes*, inasa valorile raman in continuare ridicate, ex: EE% pentru NLC cu un raport masic *Pm* : *Hes* = 2 : 1 fiind cuprins intre 83.8 și 86.6%.

In ceea ce priveste gradul de incapsulare al *Pemetrexedului disodic*, desi acesta prezinta un caracter puternic hidrofil, au fost obtinute eficiente foarte bune de incapsulare tot in cazul NLC-

urilor preparate la un raport masic $Pm : Hes = 1,3 : 1$ (EE% cuprinsa intre 88 si 89,4%). Prin coroborarea rezultatelor potentialului electrocinetic cu rezultatele eficientei de incapsulare (ex: modificarea si totodata corelarea distributiei sarcinilor de suprafata cu valorile eficientei de incapsulare: EE% ridicate dar ξ mai mici pentru NLC ce contin un raport masic de $Pm : Hes = 1,3 : 1$ si respectiv EE% scazute dar ξ mult mai electronegative in cazul NLC preparate cu un raport masic $Pm : Hes = 2 : 1$) precum si cele ale experimentelor de eliberare *in vitro* sustin captarea unei cantitati considerabile de Pm in miezul lipidic, in pofida hidrofilicitatii acestuia.

Evaluarea *in vitro* a proprietatilor antioxidante ale nanotransportorilor lipidici liberi si cu continut variabil de *Pemetrexed* si *Hesperidina*

Pentru a se asigura o evaluare comparativa a activitatii antioxidante inainte si dupa incapsularea Pm si Hes , nanostructurile lipidice libere precum si NLC-urile incarcate cu Pm si Hes au fost supuse actiunii unor radicali liberi generati *in situ* intr-un sistem de chemiluminescenta.

Majoritatea sistemelor de nanostructuri lipidice sintetizate cu cele trei fractii de Sq si incarcate cu diferite concentratii de antitumoral si bioflavonoid au prezentat o buna capacitate de a capta radicalii liberi oxigenati generati *in situ* intr-un sistem de chemiluminescenta (Fig. 6).

Valorile activitatii antioxidante (AA%) pentru nanotransportorii liberi au fost cuprinse intre 91 si 93%, ceea ce evidentiaza rolul si eficienta fractiilor vegetale pe baza de Sq de a capta radicalii liberi, fara existenta unui antioxidant suplimentar (Fig. 6). La co-incapsularea Pm si Hes in NLC au fost observate imbunatatiri ale AA%, acestea fiind cuprinse intre 95,4 si 98% in cazul sistemelor ce contin 0,8% amestec Pm si Hes . Cele mai eficiente sisteme de captare a radicalilor liberi s-au dovedit a fi NLC-urile ce co-incapsuleaza un amestec de 1,4% Pm si Hes aflate intr-un raport masic 1,3 : 1 (ex: AA% = 97,3 + 98,2).

Studiul eliberarii *in vitro* a celor doua substante active din acelasi sistem lipidic nanotransportor preparat cu diferite fractii de *Squalen* bioactiv

Avantajele evidente ale nanotransportorilor lipidici preparati cu fractii vegetale cu continut variabil de *Squalen* bioactiv au fost evidentiate in urma testelor de eliberare *in vitro* ale celor doua componente active – Pm si Hes co-incapsulate in acelasi sistem nanotransportor.

Experimentele de eliberare *in vitro* au fost realizate pentru formularile optime de nanotransportori lipidici incarcati cu o concentratie totala de 0,8% amestec Pm si Hes si diferite concentratii de *Squalen*, utilizând celulele de difuzie Franz verticale. Pentru a evalua eliberarea celor doua componente functie de concentratia acestora in NLC, a fost deasemenea supus testelor de eliberare si un nanotransportor preparat cu fractia cea mai concentrata de *Squalen* (83,4%) ce co-incapsuleaza o concentratie de 1,4% amestec de Pm si Hes . De asemenea, pentru a

demonstra avantajele clare ale sistemelor NLC dezvoltate in cercetarea prezenta in eliberarea sustinuta a ambelor componente active, au fost preparate si supuse studiilor de eliberare, sisteme de nanoparticule lipidice solide – SLN preparate fără fractia vegetala de Squalen dar incarcate cu aceleași concentrații de *Pm* si *Hes*. Cantitatea de *Pm* si respectiv *Hes* eliberată a fost evaluata timp de 24 ore.

Pentru sistemele nanostructurate studiate, profilul de eliberare prezintă un model similar cu o eliberare rapida în prima oră, urmată de o eliberare lentă de-a lungul celor 24 ore (Fig. 7 si 8). Contrar asteptarilor, *Pemetrexedul* (distribuit in proportie majoritara in invelisul de surfactanti) este eliberat mai lent comparativ cu *Hesperidina*. Aceasta comportare poate fi atribuită unor potentiale efecte individuale si/sau cumulate: (i) prezentei unei concentrații mai mici de *Hes* comparativ cu *Pm* încărcate în NLCs; (ii) o prindere eficienta a *Pm* in invelisul de surfactanti cu posibilitatea existentei unor atractii electrostatice (datorita anionilor carboxil din structura *Pm*) dar si (iii) existentei unei cantitati considerabile de *Pm* captat in imperfectiunile create de fractia vegetala din miezul lipidic. Pe de altă parte, profilul de eliberare a *Pm*, în special pentru NLC preparat cu fractie vegetala concentrata in Squalen (83,4%) și 0,8% amestec *Pm* si *Hes*, arată o eliberare a *Pm* aproape constantă de la 1h pana la 24h, în timp ce profilul de eliberare al *Hes* indica o creștere a cantitatii cumulate de *Hes* eliberata de la 1 la 8 ore, urmată de o eliberare constantă a *Hes* pana la 24 de ore.

În ceea ce privește influenta concentrației de *Squalen* utilizat la prepararea NLC, așa cum era de așteptat, se poate observa că existenta unei concentratii mari de *Sq* asigura o eliberare lentă a *Pm* si *Hes* (ex. NLC_Sq3 asigura o eliberare de 11,2% *Pm* și 55,2% *Hes*, în timp ce NLC_Sq1 prezinta 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 retele lipidice dezordonate cu multe imperfectiuni in care pot fi găzduite concentratii mari de componentii activi atat de natura lipofila cat si hidrofila.

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 incapsuleaza un amestec de 1,4% *Pm* si *Hes*) comparativ cu 11,2% pentru NLC_Sq3 ce incapsuleaza un amestec de 0,8% *Pm* si *Hes*. In mod contrar, viteza de eliberare a *Hes* a scăzut lent la 44% pentru NLC_Sq3 ce co-incapsuleaza 1,4% amestec *Pm* si *Hes*, comparativ cu 55,2% in cazul NLC_Sq3 ce co-incapsuleaza 0,8% amestec *Pm* si *Hes*.

REVENDICĂRI

1. Procedeu de obținere a unor nanotransportori lipidici funcționali pe baza de fracții uleioase de Amarant cu *Squalen* bio-activ ce pot co-incapsula două medicamente – *Pemetrexed* și *Hesperidin*, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde:

- a. formarea unei pre-emulsii lipidice libere și încărcate cu două componente active hidrofile și hidrofobe (*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 (12 000 rpm, timp de 1 min) și ulterior la un proces de omogenizare la presiune ridicată (la 500 bar, timp de 196 sec);
- c. obținerea unor dispersii apoase de nanotransportori lipidici liberi și încărcăți cu cele două medicamente, 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 72h.

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, faza lipidică este formată dintr-un amestec de lipide solide și ulei izolat din seminte 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.

3. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că**, în loc de fracție vegetală cu conținut de 5,8% *Squalen* se folosește fracție vegetală cu conținut de 34,8% *Squalen*.

4. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că**, în loc de fracție vegetală cu conținut de 5,8% *Squalen* se folosește fracție vegetală cu conținut de 83,4% *Squalen*.

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.

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 cărui conținut de *Squalen* variază (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.

7. Procedeu conform revendicării 6, **caracterizat prin aceea că**, în loc de 1,4% amestec de medicamente se folosește un amestec de 0,8% *Pm* și *Hes* aflate într-un raport de greutate de 2 : 1.
8. Nanotransportori lipidici de natura solida încarcăți cu două medicamente – *Pm* și *Hes*, 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% *Pm* și 2% *Hes*, încapsulate în matricea lipidică astfel formată, procentele fiind exprimate în greutate.
9. Nanotransportori lipidici conform revendicării 8 obținuți prin procedeul definit în oricare din revendicările de la 1 la 7 **caracterizați prin aceea că** sunt de formă sferică și au un diametru mediu cuprins între 141 și 116 nm, în cazul utilizării unui raport de greutate între *Pm* și *Hes* de 1,3 : 1 și între 124 și 106 nm în cazul utilizării unui raport de 2 : 1.
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 ce variază între $0,253 \div 0,190$, în cazul utilizării unui raport de greutate între *Pm* și *Hes* de 1,3 : 1 și între $0,152 \div 0,179$ în cazul utilizării unui raport de 2 : 1.
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 potențialului electrocinetic ce variază între $-32,3 \div -38,7$ mV, în cazul utilizării unui raport de greutate între *Pm* și *Hes* de 1,3 : 1 și între $-47,1 \div -54$ mV în cazul utilizării unui raport de greutate între *Pm* și *Hes* de 2 : 1.
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 *Pm* cuprinse între 88 și 89,4 și valori ale eficienței de încapsulare a *Hes* cuprinse între 93,1 și 94,2 în cazul utilizării unui raport de greutate *Pm* : *Hes* de 1,3 : 1.
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 de încapsulare a *Pm* cuprinse între 83,8 și 86,6 și valori ale eficienței de încapsulare a *Hes* cuprinse între 86,9 și 87,7 în cazul utilizării unui raport de greutate *Pm* : *Hes* de 2 : 1.
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 sistemul

generator de chemiluminescență, în cazul utilizării unui raport de greutate $Pm : Hes$ de 1,3 : 1, respectiv între 95,4 și 98,0%, în cazul utilizării unui raport $Pm : Hes$ de 2 : 1.

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

Lista tabelelor și a figurilor

Tabel 1

NLC*	Amestec de surfactanti			Amestec de lipide			Pm (%)	Hes (%)
	Colat de sodiu (%)	Tween 20 (%)	Polox. (%)	Fractie vegetala 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_PmHes 2	1.4	1	0.05	3% Sq 1	3.5	3.5	0.53	0.27
NLC_Sq2_PmHes 2				3% Sq 2			0.53	0.27
NLC_Sq3_PmHes 2				3% Sq 3			0.53	0.27

* Sq 1 = fractie vegetala izolata din seminte de Amarant ce contine 5,8% Squalen; Sq 2 = fractie vegetala izolata din seminte de Amarant ce contine 34,7 % Squalen; Sq 3 = fractie vegetala ce contine 83.4 % Squalen.

Tabel 2

Pemetrexed	Ordin Zero		Ordin 1		Higuchi		Peppas-Korsmeyer			Hixon-Crowell	
	R2	k0	R2	k1	R2	k2	R2	k3	n	R2	k4
NLC_Sq1_PmHes 2	0.4161	2.6585	0.2866	0.273366	0.6917	10.449	0.936	30.72557	0.066	0.4336	0.048
NLC_Sq2_PmHes 2	0.6541	4.1781	0.598	1.336892	0.882	8.3154	0.6106	12.67944	0.0766	0.6564	0.0679
NLC_Sq3_PmHes 2	0.6729	3.5776	0.5979	1.343801	0.8915	7.058	0.864	10.69547	0.0797	0.6758	0.0577
NLC_Sq3_PmHes 1	0.5458	3.0944	0.2723	0.267148	0.8123	11.507	0.9674	26.79785	0.1541	0.5767	0.0566

Tabel 3

Hesperidin	Ordin Zero		Ordin 1		Higuchi		Peppas-Korsmeyer			Hixon-Crowell	
	R2	k0	R2	k1	R2	k2	R2	k3	n	R2	k4
NLC_Sq1_PmHes 2	0.6778	5.526	0.2044	0.21487	0.8948	19.354	0.9616	38.37956	0.2076	0.7639	0.1193
NLC_Sq2_PmHes 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_PmHes 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_PmHes 1	0.6804	3.9223	0.2503	0.25356	0.9045	13.786	0.9977	26.36331	0.2263	0.7295	0.0745

10-06-2015

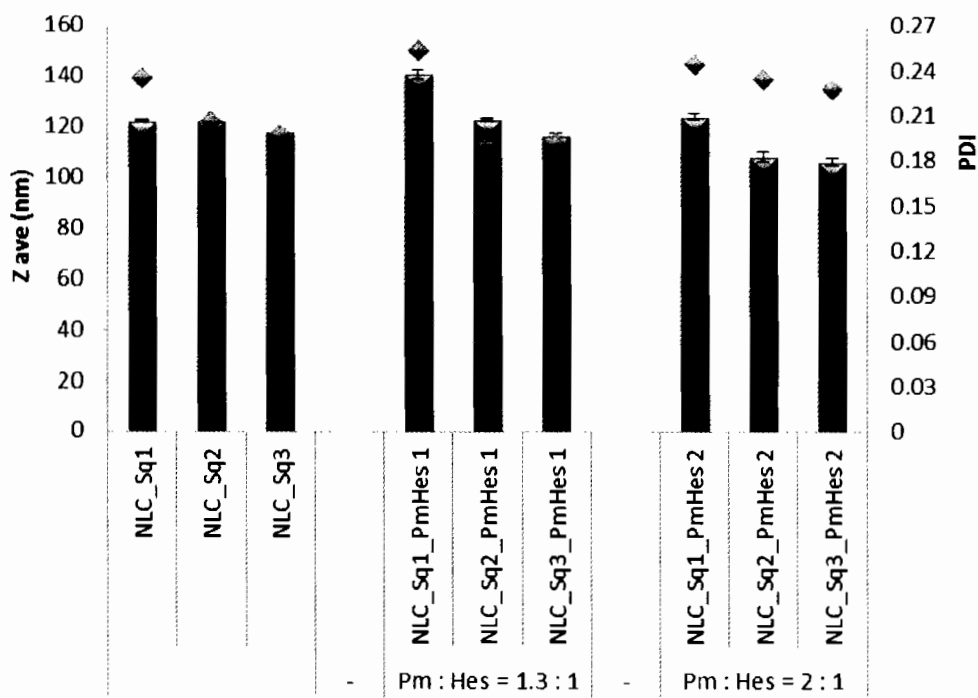


Figura 1

10-06-2015

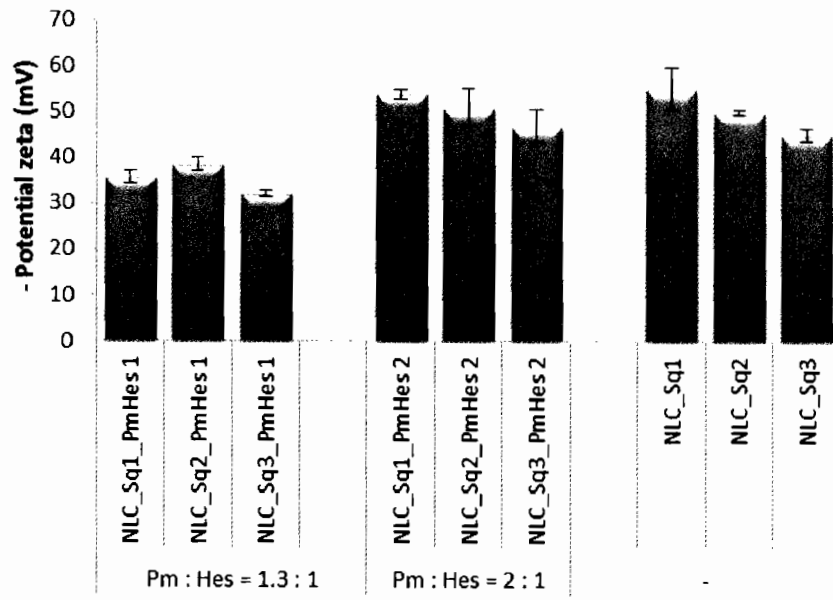


Figura 2

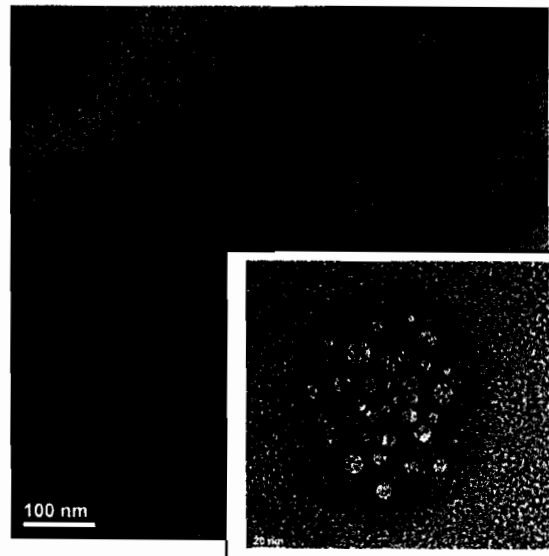
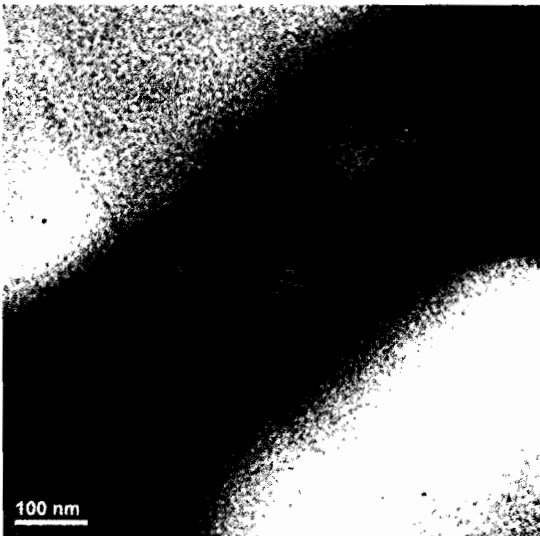
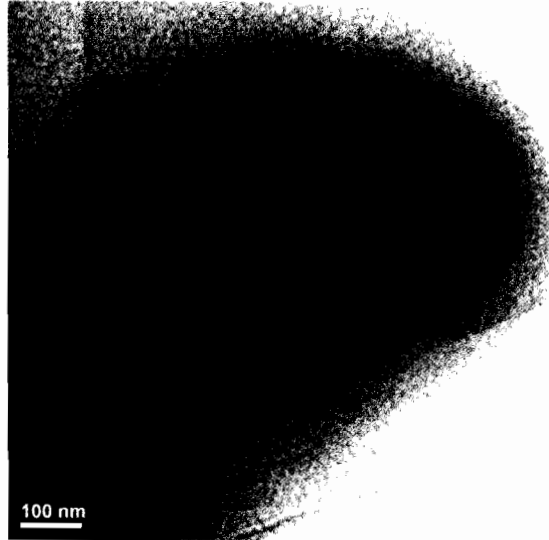
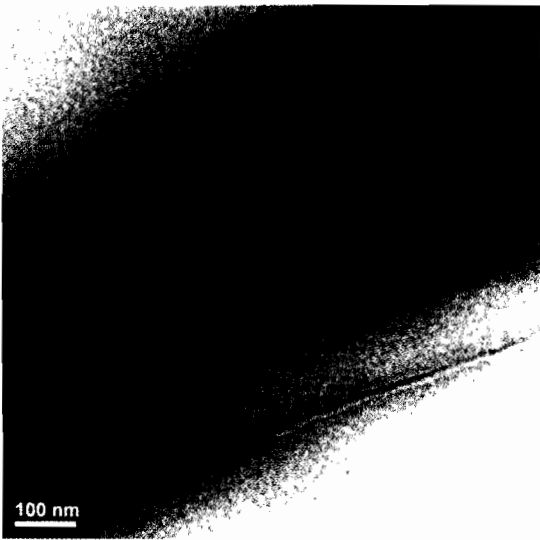


Figura 3

10-06-2015

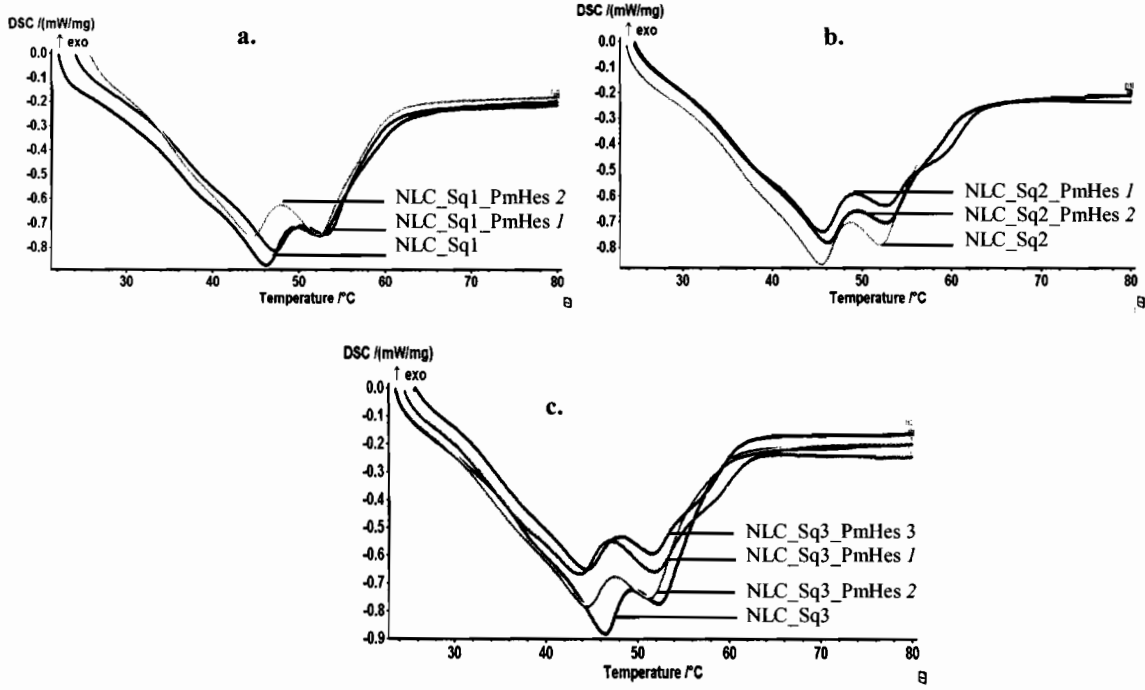


Figura 4

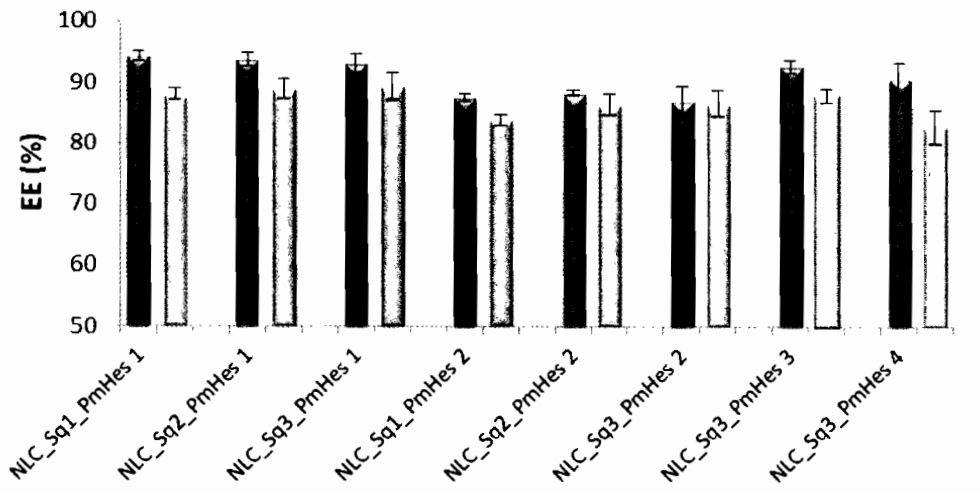


Figura 5

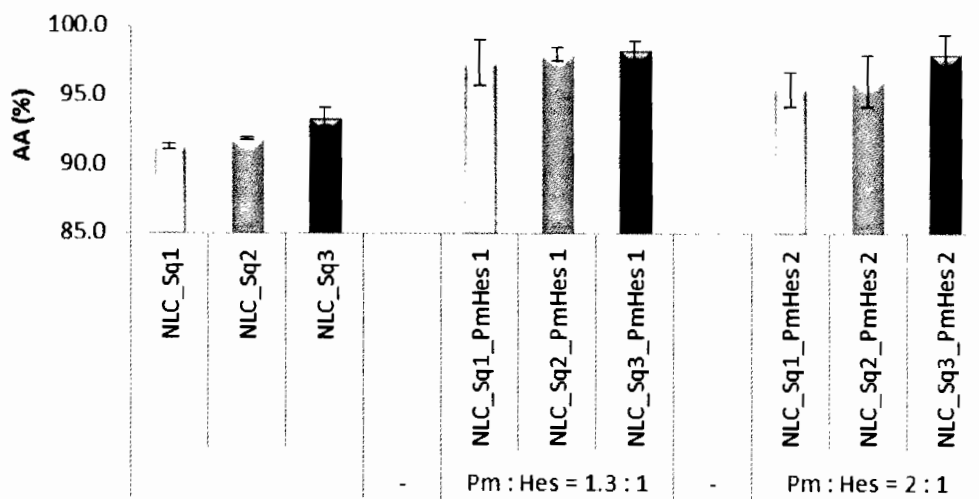


Figura 6

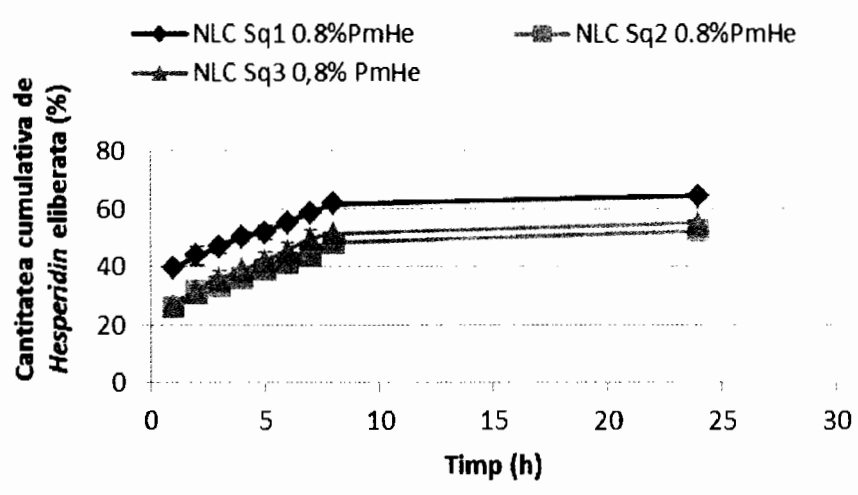
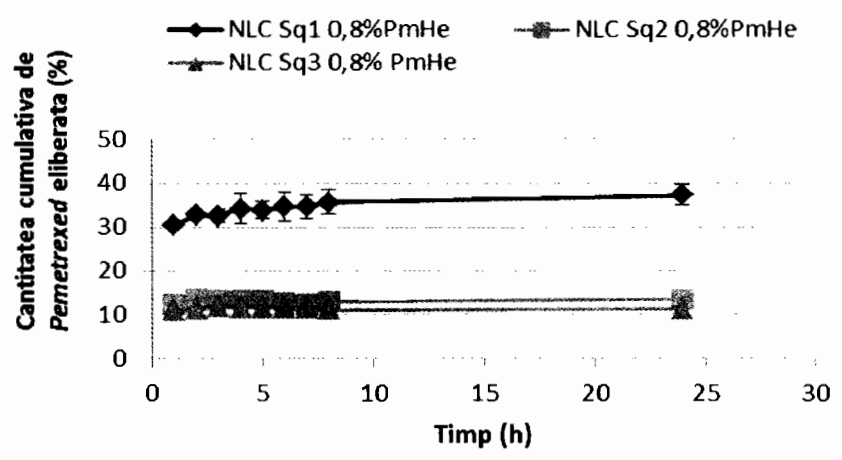


Figura 7

10-06-2015

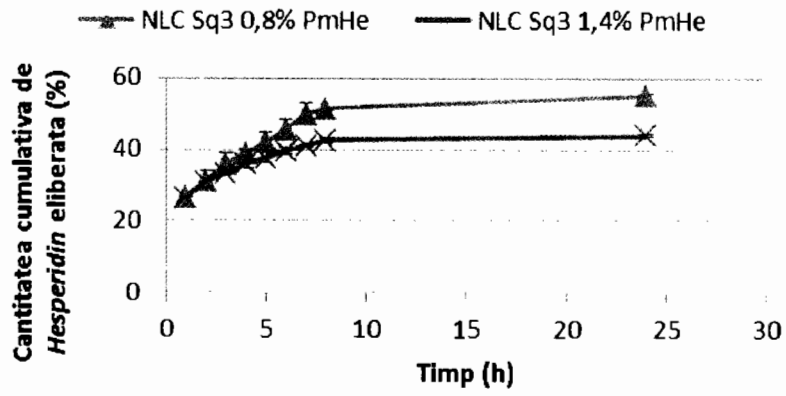
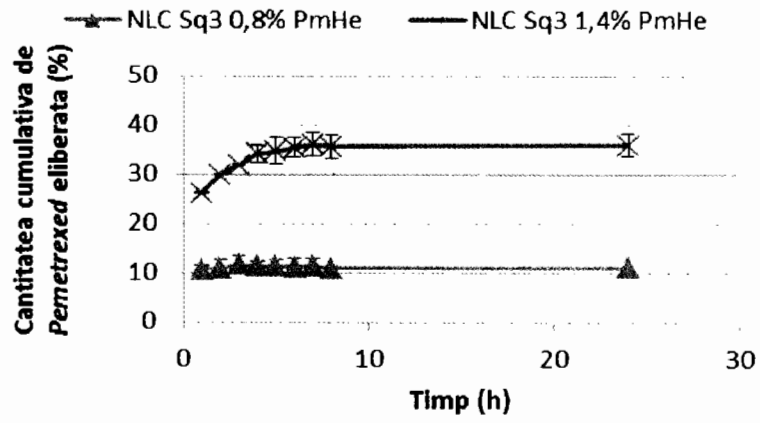


Figura 8