

ETAPA a III a

Dezvoltarea de noi bio-produse farmaceutice nanostructurate pe baza de scualenă cu performanță terapeutică superioară

În această etapă s-a înființat cultura de *Cucurbita* sp. și s-a studiat influența factorilor agrotehnici asupra producției de semințe.

Pentru hidroliza enzimatică a uleiului de *Amaranthus* s-a folosit Lipase TL. A fost studiată influența parametrilor de operare asupra performanței procesului de hidroliza enzimatică (temperatura, conc. enzima, agitare, raport ulei/apa). Au fost evaluate comparativ fracții de ulei din semințe de *Amaranthus* ce conțin concentrații variabile de scualenă (ex: 5,8%, 34,7% și 82%) pentru obținerea unor nanotransportori lipidici funcționali, capabili să co-incapsuleze și să elibereze sustinut un medicament de natură sintetică – Pemetrexed = Pm (medicament aprobat în tratamentul anumitor tipuri de cancer pulmonar) și respectiv un bio-flavonoid izolat din coji de portocale Hesperidin = Hes, ce prezintă o capacitate antioxidantă bună în combinație cu alte efecte terapeutice (ex: asigură o creștere a circulației sanguine; manifestă efecte protectoare la nivelul creierului; utilizat pentru a trata limfedemul).

S-au dezvoltat nanotransportori lipidici pe baza de scualenă ce prezintă o omogenitate structurală bine definită cu diametre medii mai mici decât 100 nm și un potențial scăzut de apariție a fenomenelor de agregare și/sau coalescență în timp. În urma evaluării comparative a eficienței de încapsulare s-a observat atingerea unei capacități excelente de încapsulare a ambelor componente active, cu valori ale eficienței cuprinse între 88 și 94% în cazul bioflavonei Hes și > 83% în cazul antitumoralului Pm.

Pentru formulările solide de nanotransportori lipidici ce prezintă un procent de peste 20% fracție vegetală cu concentrații diferite de scualenă, a fost identificată o capacitate > 97% de a capta radicalii liberi generați în situ cu ajutorul unui sistem de chemiluminescență. Cel mai eficient sistem de captare a radicalilor liberi s-a dovedit a fi NLC preparați cu fracția de ulei de amarant îmbogățită în scualenă (82%) ce co-incapsulează un amestec de 1,4% Pm și Hes aflate într-un raport masic de 1,3 : 1, care prezintă o valoare a AA% de 98,2%.

Valorile ridicate ale activității antioxidante precum și capacitatea simultană de a co-incapsula și elibera treptat două tipuri de componente active ce prezintă un caracter lipofil/ hidrofil diferit – Pemetrexed de sodiu și Hesperidin din aceste sisteme de nanotransportori lipidici pot fi explicate prin avantajele nete pe care le prezintă acizii grași omega-3 și -6 în asocieră cu scualenă din fracțiile vegetale izolate din semințe de Amarant și nu în ultimul rând prin captarea ambelor principii active de origine vegetală și sintetică în același sistem nanotransportor. Aceste rezultate constituie o premisă în etapa finală a proiectului de dezvoltare a unor medicamente inovative pe baza de nanostructuri lipidice – sub formă de gel sau cremă – care prezintă abilitatea de a compensa și chiar îmbunătăți proprietățile specifice ale medicamentelor de sinteză convenționale.

A fost elaborată și proiectată o tehnologie care cuprinde 2 faze principale: hidroliza trigliceridelor și separarea fracționată cu ajutorul materialelor membranare. Activitățile s-au concretizat în realizarea de experimente de hidroliza chimică (bazică) și respectiv hidroliza enzimatică a trigliceridelor din uleiul de *Amaranth*, bogat în scualenă, urmate de experimente de separare fracționată a compusului menționat utilizând diverse tipuri de membrane. Au fost realizate și utilizate în experimente 6 tipuri de membrane și acestea au fost caracterizate d.p.d.v. structural prin termogravimetrie iar din punct de vedere hidrodinamic prin determinarea fluxurilor de apă distilată. Hidroliza chimică a uleiului de *Amaranth* a fost efectuată cu respectarea parametrilor menționați în Etapa II. Pentru hidroliza enzimatică a fost utilizată enzima „Lipase din *Candida rugosa*” (700U/mg solid), immobilizată atât în stare solubilă (immobilizare în celula de ultrafiltrare utilizând membranele M3 și M4) cât și în stare insolubilă (prin legare ionică și apoi reticulare cu glutaraldehidă, utilizând membranele M1, M2, M5 și M6). S-au obținut grade de fracționare a scualenei în faza de concentrat de 1,5 ori până la 1,8 ori pentru hidrolizatele chimice și respectiv de 1,7 ori până la 2,3 ori în hidrolizatele enzimatice. Este pus în evidență în acest mod avantajul oferit de tehnologia enzimatică de fracționare.

Experimentele care au permis stabilirea parametrilor tehnologici (flux, temperatură, presiune) și realizarea de experimente preliminare a tehnologiei elaborate.

Fracțiile de ulei condiționate sub formă de nanoparticule au fost caracterizate chimic și testate farmacologic. În urma testărilor s-a evidențiat o activitate antiproliferativă ridicată a preparatelor cu ce au încorporat fracția de ulei cu 82% scualenă. Au fost elaborate 2 formule de condiționare sub formă de gel.