



UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE APLICATĂ ȘI ȘTIINȚA
MATERIALELOR



Departamentul de Chimie Analitică și Ingineria Mediului
Școala Doctorală: Chimie Aplicată și Știința Materialelor

*Nanosisteme multicomponente cu aplicații în
patologiile cu risc cardio-cerebro-vascular*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:

Prof. Dr. Ing. Gheorghe NECHIFOR

DOCTORAND:

Farm. Fawzia SHA'AT

Cuvinte-cheie: nanosisteme polimerice, nanosisteme lipidice, lipozomi, transferozomi, etozomi, afecțiuni cardio-cerebro-vasculare, besilat de amlodipină, valsartan, *Sambucus ebulus*, extracte vegetale

CUPRINS

LISTĂ DE ABREVIERI	6
INTRODUCERE	8
PARTEA I. STUDIUL CRITIC AL DATELOR DE LITERATURĂ	11
Capitolul 1. ASPECTE GLOBALE PRIVIND PATOLOGIA CARDIO-CEREBRO-VASCULARĂ	12
1.1 Incidență, date statistice	12
1.2 Aspecte privind tratamentul actual al bolilor cardio-cerebro-vasculare	13
1.2.1 Tratatamentul pe bază de substanțe de sinteză al afecțiunilor cardio-cerebro-vasculare	13
1.2.2 Tratatamentul pe bază de extracte vegetale al afecțiunilor cardio-cerebro-vasculare	15
Capitolul 2. ASPECTE GLOBALE PRIVIND DEZVOLTAREA DOMENIULUI DE NANOTEHNOLOGIE	19
2.1 Domeniul nanotehnologiei – generalități	19
2.2 Situația actuală privind nanosistemele cu substanțe de sinteză	21
2.3 Situația actuală privind nanosistemele încărcate cu extracte vegetale	26
Capitolul 3. DEZVOLTAREA DE NANOSISTEME MULTICOMPONENTE CU SUBSTANȚE CARDIOVASCULARE	34
3.1 Obținerea de nanosisteme multicomponente polimerice	34
3.1.1 Farmacodinamia și farmacocinetica substanțelor de sinteză	35
3.1.2 Compoziția matricei nanosistemelor polimerice	38
3.1.3 Metode de obținere a nanosistemelor polimerice	42
3.2 Obținerea nanosistemelor multicomponente lipidice	44
3.2.1 Compoziția chimică și potențialul farmacologic al speciilor vegetale	45
3.2.2 Compoziția nanosistemelor lipidice	46
3.2.3 Metode de obținere a nanosistemelor lipidice	47
3.3 Tehnici de caracterizare a nanosistemelor polimerice și lipidice	49
3.3.1 Spectroscopia FT-IR	49
3.3.2 Spectrometria UV-VIS	50
3.3.3 Tehnici cromatografice	51
3.3.4 Tehnici de microscopie	52
3.3.5 Difuzia dinamică a luminii (DLS)	54
3.3.6 Metode de determinare <i>in vitro</i>	55
PARTEA II. CONTRIBUȚII ORIGINALE	57
Capitolul 4. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA NANOSISTEMELOR MULTICOMPONENTE POLIMERICE ÎNCĂRCATE CU BESILAT DE AMLODIPINĂ ȘI/SAU VALSARTAN	58
4.1 Obiective	58
4.2 Materiale și metode	58
4.2.1 Materiale	58
4.2.2 Obținerea nanosistemelor polimerice cu un singur API	59
4.2.3 Obținerea nanosistemelor polimerice cu o combinație de APIs	60
4.2.4 Evaluarea eficienței de încorporare a nanosistemelor polimerice PEG/PLGA	61
4.2.5 Determinarea dimensiunii de particulă, a indicelui de polidispersitate și a potențialului zeta a nanosistemelor polimerice PLGA	62
4.2.6 Studiul cedării <i>in vitro</i> a substanțelor AML, VAL din nanosistemele polimerice	62
4.2.7 Analiza statistică	62
4.3 Rezultate și discuții	62

Nanosisteme multicomponente cu aplicații în patologii cu risc cardio-cerebro-vascular

4.3.1	Obținerea nanosistemelor polimerice și determinarea gradului de încorporare a amestecului AML:VAL în matricea polimerică	62
4.3.2	Analiza dimensională a nanosistemelor polimerice multicomponente	68
4.3.3	Studiul cedării <i>in vitro</i> a substanțelor active AML, VAL din nanosisteme polimerice cu matrice PEG	72
4.3.4	Studiul cedării <i>in vitro</i> a substanțelor active AML, VAL din nanosisteme polimerice cu matrice PLGA	76
4.4	Concluzii parțiale	80
	Capitolul 5. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA NANOSISTEMULUI MULTICOMPONENT PE BAZĂ DE PLGA ÎNCĂRCAT CU BESILAT DE AMLODIPINĂ ȘI VALSARTAN	82
5.1	Obiective	82
5.2	Materiale și metode	82
5.2.1	Materiale	82
5.2.2	Determinarea compatibilității dintre matricea polimerică și substanțele active	84
5.2.3	Determinarea morfologiei nanosistemelor polimerice	84
5.2.4	Evaluarea distribuției nanosistemelor polimerice în celulă	86
5.2.5	Evaluarea citotoxicității nanosistemelor polimerice în celulă	89
5.2.6	Analiza statistică	90
5.3	Rezultate și discuții	90
5.3.1	Determinarea gradului de compatibilitate între substanțele active și matricea polimerică și morfologiei nanosistemelor polimerice	90
5.3.2	Evaluarea distribuției intracelulare a nanosistemului polimeric optim	93
5.3.3	Evaluarea citotoxicității nanosistemului polimeric optim	98
5.4	Concluzii parțiale	100
	Capitolul 6. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA EXTRACTELOR VEGETALE STANDARDIZATE DIN SPECIILE VEGETALE: <i>Sambucus ebulus</i>, <i>Lycium barbarum</i>, <i>Armoracia rusticana</i>, <i>Echinacea purpurea</i>	101
6.1	Obiective	101
6.2	Materiale și metode	101
6.2.1	Materiale	101
6.2.2	Material vegetal	104
6.2.3	Obținerea extractelor vegetale standardizate	104
6.2.4	Determinarea conținutului în compuși polifenolici	105
6.2.5	Identificarea compușilor polifenolici prin HPTLC	106
6.2.6	Identificarea și cuantificarea compușilor polifenolici prin HPLC	106
6.2.7	Determinarea activității antioxidante	107
6.2.8	Evaluarea <i>in vitro</i> a citotoxicității extractelor vegetale standardizate	107
6.2.9	Analiza statistică	109
6.3	Rezultate și discuții	109
6.3.1	Obținerea extractelor vegetale standardizate	109
6.3.2	Identificarea și cuantificarea compușilor polifenolici în extractele vegetale standardizate....	110
6.3.3	Determinarea activității antioxidante pentru extractele vegetale standardizate	117
6.3.4	Evaluarea efectului citotoxic și antiproliferativ al extractelor vegetale standardizate	118
6.4	Concluzii parțiale	121
	Capitolul 7. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA NANOSISTEMELOR LIPIDICE CU EXTRACT VEGETAL STANDARDIZAT DE <i>SAMBUCUS EBULUS</i>	122
7.1	Obiective	122
7.2	Materiale și metode	122
7.2.1	Materiale	122
7.2.2	Obținerea nanosistemelor lipidice încărcate cu extract de <i>Sambucus ebulus</i>	123
7.2.3	Caracterizarea nanosistemelor lipidice încărcate cu extract de <i>Sambucus ebulus</i>	125
7.2.4	Studiul comportamentului de cedare <i>in vitro</i> a polifenolilor din nanosisteme lipidice	126

Nanosisteme multicomponente cu aplicații în patologiile cu risc cardio-cerebro-vascular

7.2.5	Testul de inducere a stresului oxidativ	126
7.2.6	Analiza statistică	127
7.3	Rezultate și discuții	127
7.3.1	Obținerea nanosistemelor lipidice - studiul influenței parametrilor de preparare	127
7.3.2	Caracterizarea nanosistemelor lipidice încărcate cu extract vegetal SE	130
7.3.3	Studiul cedării <i>in vitro</i> a polifenolilor din nanosisteme lipidice	136
7.3.4	Efectul pre-tratamentului cu extract de SE liber și încorporat în nanosisteme lipidice împotriva toxicității induse de H ₂ O ₂ asupra liniei celulare L-929	138
7.4	Concluzii parțiale	141
	Capitolul 8. CONCLUZII	142
8.1	Concluzii generale	142
8.2	Contribuții originale	146
8.3	Perspectivă de dezvoltare ulterioară	147
	BIBLIOGRAFIE	148
	ANEXA 1	163
	ANEXA 2	165
	ANEXA 3	167

INTRODUCERE

Scopul tezei de doctorat, intitulată *Nanosisteme multicomponente cu aplicații în patologiile cu risc cardio-cerebro-vascular*, este de a obține și caracteriza nanosisteme cu matrice polimerică și lipidică în care să fie încorporate substanțe de sinteză, respectiv un extract vegetal standardizat în vederea aplicațiilor biomedicale ale acestora, cu o referire specială la administrarea acestora în terapia bolilor cu risc cardio-cerebro-vascular.

Originalitatea acestor studii poate fi relevată din mai multe perspective:

- obținerea unor nanosisteme polimerice de tip PEG/PLGA în care a fost încorporată o combinație de două substanțe active din clase farmacodinamice diferite, dar cu acțiuni complementare (amlodipina – blocant al canalelor de calciu, și valsartan – antagonist al receptorilor angiotensinei II), în doză fixă de 1:16 (mg) – AML :VAL;
- obținerea a trei tipuri de nanosisteme lipidice (lipozomi, etozomi, transferozomi) în care a fost înglobat un extract vegetal standardizat din frunzele speciei *Sambucus ebulus* ;
- abordarea relației calitative existente între nanosistemele obținute și celule normale de fibroblaste murine (NIH3T3, L-929), fibroblaste umane (PCS-201-012) și celule epiteliale mamare (MCF-12A) și efectele pe care acestea le produc ;
- investigarea comportamentului nanosistemelor polimerice odată ajunse în interiorul celulei printr-o tehnică microscopică de baleiaj cu laser ;
- investigarea profilului de cedare a principiilor active din nanosistemele obținute în scopul utilizării lor ulterioare ca sisteme de transport controlat, în vederea creșterii complianței pacientului.

Obiectivele aferente scopului general al lucrării au urmărit o serie de aspecte, precum:

1. Selectarea polimerului convenabil pentru aplicații biomedicale (în special pentru terapia bolilor cu risc cardio-cerebro-vascular): materialul polimeric trebuie să fie caracterizat printr-o biocompatibilitate și biodegradabilitate mărite; produșii rezultați în urma procesului de metabolizare a polimerului trebuie să fie lipsiți de orice potențial toxicologic; să prezinte o citoaderență bună în scopul de a nu fi eliminat mai ușor din organism, adică de a conduce la un clearance scăzut a substanței active încapsulate în materialul polimeric; proprietățile structurale care conferă hidrofilia/ hidrofobia polimerului, precum și gradul de reticulare a materialului polimeric vor determina ca aceste sisteme să elibereze agenți terapeutici hidrofilii sau hidrofobi.
2. Selectarea unui extract vegetal standardizat care să conțină o mare cantitate de polifenoli totali, întrucât proprietățile antioxidante puternice ar putea influența în mod benefic evoluția bolilor cu risc cardio-cerebro-vascular
3. Selectarea metodei optime de preparare a nanosistemelor polimerice și lipidice, în urma căreia să se obțină particule cu dimensiuni cât mai reduse pentru administrarea intravenoasă, de exemplu, însă, în același timp să fie suficient de mari pentru a nu fi epurate prea ușor din sistemul sangvin.
4. Obținerea unor nanosisteme polimerice și lipidice care să prezinte o eficiență de încorporare mare a principiilor active, dimensiune mică a particulelor, distribuție uniformă și un grad de stabilitate moderat spre mare, precum și un profil de eliberare a principiilor active care să permită o administrare ulterioară într-un mod controlat.
5. Elaborarea unor protocoale de lucru în ceea ce privește evaluarea nanosistemelor intracelular, în scopul investigării acestora privind profilul de citotoxicitate.

Teză de doctorat este structurată în două părți principale, și anume: *Stadiul actual al cunoașterii* (partea I) și *Contribuții originale* (partea a-II-a).

Studiul bibliografic cuprinde 3 capitole, sintetizând stadiul actual al cercetărilor privind incidența, tratamentul alopatic și naturist al afecțiunilor cu risc cardio-cerebro-vascular,

utilizarea sistemelor nanostructurate în livrarea de substanțe active, precum și despre metodele fizico-chimice și *in vitro* cel mai des utilizate în cazul dat.

Partea a II-a a tezei, extinsă pe 4 capitole, reprezintă contribuțiile/cercetările personale.

Capitolul 1 *Aspecte globale privind patologia cardio-cerebro-vasculară* prezintă date statistice privind incidența bolilor cardio-cerebro-vasculare în România și Europa, informații privind tratamentul actual pe bază de substanțe active, cât și pe bază de extracte vegetale al afecțiunilor cardio-cerebro-vasculare.

Capitolul 2 *Aspecte globale privind dezvoltarea domeniului de nanotehnologie* dezbate noțiuni fundamentale despre evoluția nanotehnologiei și situația actuală a nanosistemelor încărcate cu substanțe active de sinteză și extracte vegetale.

Capitolul 3 *Dezvoltarea de nanosisteme multicomponente cu substanțe cardiovasculare* discută despre obținerea nanosistemelor multicomponente polimerice (farmacodinamia și farmacocinetica principiilor active, componentele nanosistemului, metode de obținere), obținerea nanosistemelor lipidice (compoziția și potențialul farmacologic speciilor vegetale, componentele nanosistemelor, metode de obținere), precum și despre cele mai uzuale metode fizico-chimice și *in vitro* ce se folosesc la caracterizarea nanosistemelor ce au aplicabilitate biomedicală.

Partea a II-a a prezentei teze de doctorat dezvoltă obiectivele generale și specifice și redă contribuțiile originale în 4 capitole, finalizând acest studiu prin concluziile generale ce sunt prezentate în Capitolul 8.

Capitolul 4 *Obținerea și caracterizarea nanosistemelor multicomponente polimerice încărcate cu besilat de amlodipină și/sau valsartan* prezintă materialele și metodele folosite în acest studiu în vederea obținerii unor serii de nanosisteme polimerice încărcate fie cu o singură substanță activă, fie cu o combinație din două substanțe active, evaluarea eficienței de încorporare, determinarea dimensiunii de particulă, a indicelui de polidispersitate și a potențialului zeta, și studiul cedării *in vitro* a substanțelor active luate în lucru din nanosistemele obținute. În urma acestui studiu a fost selectat nanosistemul optim, supus ulterior unor noi investigații.

Capitolul 5 *Obținerea și caracterizarea nanosistemului multicomponent pe bază de PLGA încărcat cu besilat de amlodipină și valsartan* discută despre caracterizarea nanosistemului polimeric optim, privind morfologia, evaluarea distribuției intracelulare și a citotoxicității.

Capitolul 6 *Obținerea și caracterizarea extractelor vegetale standardizate din speciile vegetale : Sambucus ebulus, Lycium barbarum, Armoracia rusticana și Echinacea purpurea* prezintă materialele și metodele folosite pentru obținerea extractelor vegetale standardizate, și caracterizarea lor din punct de vedere al conținutului de polifenoli, a activității antioxidante și a potențialului citotoxic. La sfârșitul acestui studiu a fost selectată specia vegetală, implicit extractul care a prezentat cantitatea cea mai mare de polifenoli, cu scopul de a fi încorporat în matrici lipidice.

Capitolul 7 *Obținerea și caracterizarea nanosistemelor lipidice cu extract vegetal standardizat de Sambucus ebulus* prezintă materialele și metodele în vederea obținerii nanosistemelor lipidice cu extractul vegetal standardizat din frunzele speciei *Sambucus ebulus* și caracterizarea acestora din punct de vedere al eficienței de încorporare, determinării dimensiunii de particulă, a indicelui de polidispersitate și a potențialului zeta, și au fost investigate comportamentul cedării *in vitro* a polifenolilor din nanosistemele obținute, precum și efectul pre-tratamentului cu extract liber și încorporat în nanosisteme împotriva toxicității induse de H₂O₂ asupra celulelor.

Această teză de doctorat se finalizează cu capitolul 8, *Concluzii*, în cadrul căruia sunt sintetizate principalele rezultate originale discutate pe parcursul tezei și care au dus la

îmbunătățirea domeniului de tratament al bolilor cu risc cardio-cerebro-vascular, contribuții originale, cât și perspectivele de dezvoltare ulterioară.

Prezenta teză conține 164 pagini, aspecte generale și contribuții originale fiind consemnate în 102 tabele și figuri și 302 de referințe bibliografice.

Capitolul 4. Obținerea și caracterizarea nanosistemelor multicomponente polimerice încărcate cu besilat de amlodipină și/sau valsartan

4.2.2. Obținerea nanosistemelor polimerice cu o combinație de APIs

Combinația de substanțe active AML-VAL care a fost încorporată în nanosistemele polimerice a fost selectată în urma studiului critic al datelor de literatură, având un raport masic fix AML:VAL de 1:16 (mg). Metoda de obținere a acestor nanosisteme a fost *nanoprecipitarea*. [1]

Tabelul 1. Formularea nanosistemelor binare AML:VAL – matrice PEG

Nr. crt.	Cod probă	m _{AML:VAL} (mg)	m _{PEG} (mg)	m _{F127} (mg)	V _{CH₃-CO-CH₃} (mL)	V _{H₂O} (mL)	Rata picurare (ml/min)	Viteza agitare (rpm)	Timp agitare (minute)
1	F1'	1:16	5 (PEG 6000)	10	5	15	0,5	1200	60
2	F2'	1:16	7,5 (PEG 6000)	10	5	15	0,5		
3	F3'	1:16	5 (PEG 4000)	10	5	15	0,5		
4	F4'	1:16	7,5 (PEG 4000)	10	5	15	0,5		

Tabelul 2. Formularea nanosistemelor binare AML:VAL – matrice PLGA

Nr. crt.	Cod probă	m _{AML:VAL} (mg)	m _{PLGA} (mg)	m _{F127} (mg)	V _{CH₃-CO-CH₃} (mL)	V _{H₂O} (mL)	Rata de picurare (ml/min)	Viteza de agitare (rpm)	Timp de agitare (minute)
1	F1	1:16	5	10	5	15	0,5	1200	60
2	F2	1:16	7,5	10	5	15	0,5		
3	F3	1:16	10	10	5	15	0,5		
4	F4	1:16	17	10	5	15	0,5		
5	F5	1:16	34	10	5	15	0,5		
6	F6	1:16	51	10	5	15	0,5		
7	F1''	1:16	5	10	5	15	0,5	2400	60
8	F2''	1:16	7,5	10	5	15	0,5		
9	F3''	1:16	10	10	5	15	0,5		
10	F4''	1:16	17	10	5	15	0,5		
11	F5''	1:16	34	10	5	15	0,5		
12	F6''	1:16	51	10	5	15	0,5		

4.3 Rezultate și discuții

4.3.1. Obținerea nanosistemelor polimerice și determinarea gradului de încorporare a amestecului AML:VAL în matricea polimerică

Toate formulările cu PLGA au prezentat EE (%) ridicată pentru ambele APIs. Prin creșterea cantității de PLGA (5; 7,5; 10; 17; 34; 51 mg), suspensia de nanoparticule a devenit din ce în ce mai tulbură, atingând un maxim al eficienței de încorporare pentru ambele

substanțe active în cazul formulării F3 cu PLGA 10 mg. Cantitatea crescută de polimer PLGA poate duce la încorporarea medicamentului hidrofob într-o măsură mai mare. Astfel, pentru formularea F3 s-a observat gradul maxim de încorporare în cazul ambelor principii active și anume $91,98 \pm 0,45 \%$ pentru VAL și $82,54 \pm 0,40 \%$ for AML, cu deosebiri minore față de F₁ și F₂, în care s-a folosit o cantitate mai mică de PLGA (5, respectiv 7,5 mg). O viteză mare de agitare determină picături mai mici și, prin urmare, suprafața totală a particulelor crește. [2-4] Acest fapt duce la un spațiu suplimentar pentru ca matricea polimerică să încapsuleze mai multe molecule de substanță; astfel EE (%) pentru VAL a fost ușor îmbunătățită. Cu toate acestea, comparând vitezele de agitare aplicate metodei de preparare: 1200, respectiv 2400 rpm, s-a ajuns la concluzia că modificarea acestui parametru influențează (nu substanțial) eficiența de încorporare a nanosistemelor polimerice.

4.3.2. Analiza dimensională a nanosistemelor polimerice multicomponente

Tabel 3. Caracteristicile nanosistemelor multicomponente cu AML:VAL – matrice PLGA

Nr.crt.	Cod probă	Dimensiune (nm)	Potențialul zeta	PDI
1	F1	124,70 ± 1,15	-30,86 ± 0,31	0,095 ± 0,050
2	F2	135,60 ± 1,30	-32,46 ± 0,31	0,089 ± 0,020
3	F3	140,40 ± 1,34	-33,07 ± 0,22	0,108 ± 0,030
4	F4	158,40 ± 1,15	-34,45 ± 0,52	0,091 ± 0,040
5	F5	171,10 ± 1,30	-38,34 ± 0,21	0,048 ± 0,030
6	F6	204,10 ± 1,34	-39,34 ± 0,21	0,102 ± 0,050
7	F1''	123,90 ± 1,13	-30,44 ± 0,32	0,105 ± 0,010
8	F2''	125,60 ± 1,21	-31,76 ± 0,22	0,099 ± 0,030
9	F3''	130,80 ± 1,53	-34,24 ± 0,20	0,101 ± 0,040
10	F4''	132,10 ± 1,31	-37,45 ± 0,24	0,104 ± 0,080
11	F5''	130,10 ± 1,30	-38,72 ± 0,23	0,098 ± 0,020
12	F6''	152,70 ± 1,29	-40,45 ± 0,33	0,097 ± 0,060

4.3.3. Studiul cedării in vitro a substanțelor active AML, VAL din nanosisteme polimerice cu matrice PEG

AML-VAL s-au solubilizat complet în PBS 0,1 M la pH 7,4, atingând un maxim după 6 ore pentru AML și respectiv 7 ore pentru VAL, în timp ce nanosistemele pe bază de PEG au furnizat o eliberare mult mai lentă a substanțelor active. Efectul de burst a fost redus drastic în nanosisteme (CDR - cumulative drug release sub 20% pentru AML și 38% pentru VAL au fost eliberate în primele 30 de minute pentru toate nanosistemele pe bază de PEG).

S-a observat că atât greutatea moleculară a polimerului folosit (4000; 6000), cât și cantitatea de PEG (5; 7,5) au influențat eliberarea AML și VAL. Formularea cu cantitatea mai mică de polimer (5 mg) și greutatea moleculară 6000 (F1') a avut CDR mai mare, eliberarea atingând maximum $63,20 \pm 2,03\%$ pentru AML și $60,30 \pm 1,74\%$ pentru VAL după cinci zile.

Pe măsură ce greutatea moleculară a PEG a scăzut, a existat o scădere a CDR a formulării, de exemplu, eliberarea din F3' atingând un maxim de $52,90 \pm 1,54\%$ pentru AML și $44,10 \pm 1,67\%$ pentru VAL în același interval de timp. De asemenea, pe măsură ce proporția de polimer a crescut, eliberarea medicamentelor a scăzut, de exemplu, eliberarea din F2' atingând un maxim de $49,50 \pm 0,99\%$ pentru AML și $38,10 \pm 0,94\%$ pentru VAL în același interval de timp.

Nanosisteme multicomponente cu aplicații în patologiile cu risc cardio-cerebro-vascular

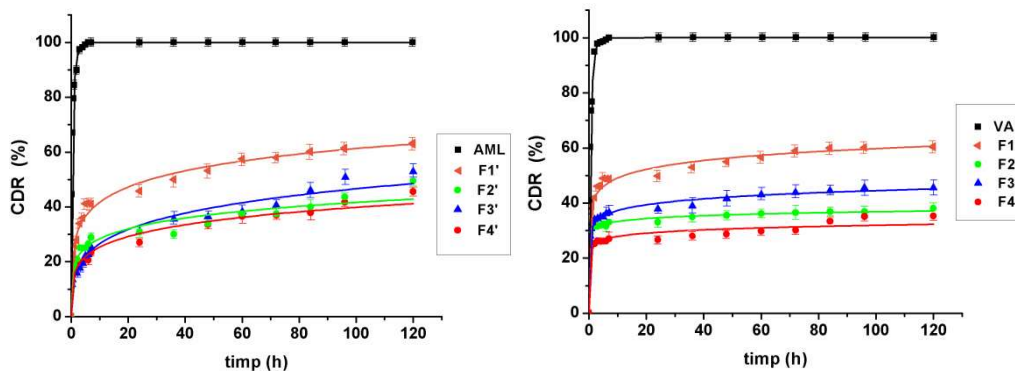


Figura 1. Profilul de cedare *in vitro* al AML și VAL din nanosisteme polimerice pe baza de PEG

Rezultatele eliberării *in vitro* au fost supuse unei analize cinetice pentru a determina mecanismul de eliberare a substanței active (AML, VAL). Prin urmare, datele experimentale au fost fitate utilizând șase modele, Weibull, Korsmeyer-Peppas, Higuchi, ordinul zero, ordinul întâi și Hixson-Crowell. Coeficientul de corelație (R^2) a fost ales pentru a distinge între modele. Pentru acest criteriu, o valoare mai apropiată de 1 înseamnă o potrivire mai bună. Rezultatele sunt prezentate în **Tabelul 4** și **Tabelul 5**.

Tabel 4. Coeficientul de corelație pentru diverse modele matematice – eliberarea AML liber versus încorporat în nanosisteme polimerice pe bază de PEG

Nr. crt.	Proba	Coeficientul de corelație (R^2)					
		Ordin zero	Ordin unu	Higuchi	Korsmayer-Peppas	Hixson-Crowell	Weibull
1	AMLliber	0,8514	0,9680	-*	-*	0,9345	0,9957
2	F1'	0,9921	0,8303	0,8904	0,9724	0,8170	0,9861
3	F2'	0,8559	0,8874	0,9310	0,9708	0,7391	0,9707
4	F3'	0,9006	0,9300	0,9631	0,9715	0,9153	0,9529
5	F4'	0,9152	0,9282	0,9207	0,9725	0,9712	0,9695

Tabel 5. Coeficientul de corelație pentru diverse modele matematice – eliberarea VAL liber versus încorporat în nanosisteme polimerice pe bază de PEG

Nr. crt.	Proba	Coeficientul de corelație (R^2)					
		Ordin zero	Ordin unu	Higuchi	Korsmayer-Peppas	Hixson-Crowell	Weibull
1	VALliber	0,7207	0,9762	-*	-*	0,9548	0,9987
2	F1'	0,7023	0,7675	0,8476	0,9710	0,7463	0,9864
3	F2'	0,7987	0,8135	0,9146	0,9719	0,8086	0,9944
4	F3'	0,7654	0,7904	0,8812	0,9713	0,7905	0,9876
5	F4'	0,9237	0,9266	0,9199	0,9703	0,9258	0,9502

*condiția pentru aplicarea modelului Korsmeyer-Peppas și Higuchi nu a fost îndeplinită ($M_t / M(\infty) < 2/3$)

Pentru nanoparticulele polimerice s-a observat că eliberarea AML și VAL din toate probele este cel mai bine descrisă de modelul Weibull și modelul Korsmeyer-Peppas ($R^2 > 0,95$). Pentru toate probele, exponentul difuzional, n , este mai mic decât 0,5, indicând un mecanism de eliberare pseudo-Fickian. De asemenea parametrul b este mai mic 0,75 relevând o difuzie Fickiană.

4.3.4. Studiul cedării *in vitro* a substanțelor active AML, VAL din nanosisteme polimerice cu matrice PLGA

În cazul nanosistemelor polimerice pe bază de PLGA cantitatea substanțelor active cedată a fost mai mică comparativ cu substanța liberă, în special în cazul formulărilor cu cantitate mare de PLGA. În cazul formulărilor cu cantitate mică de PLGA după 24 h a fost eliberată aproximativ întreaga cantitate de AML și VAL încărcată. Se poate observa că curba de solubilitate a AML-VAL a prezentat un „burst effect”, în timp ce în cazul substanțelor active încărcate în nanosistemele polimerice efectul de burst a fost redus.

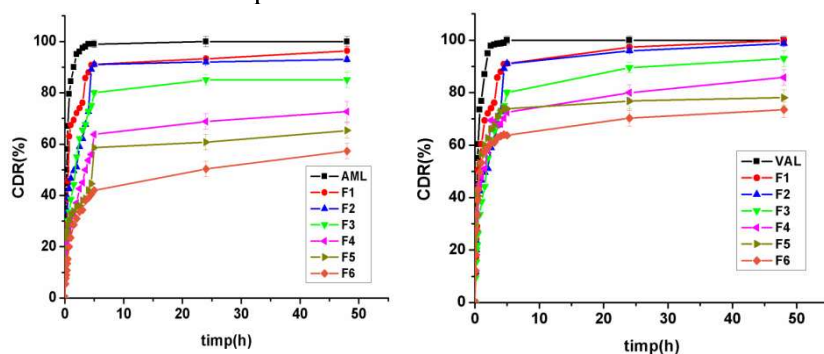


Figura 2. Profilul de cedare *in vitro* al AML și VAL din nanoformulările F1-F6

Pentru a evalua profilele de eliberare ale substanțelor active *in vitro*, au fost utilizate diverse modele cinetice pentru a descrie cinetica eliberării AML și VAL din nanosistemele polimerice pe bază de PLGA. S-au aplicat modele cinetice Korsmeyer-Peppas, Higuchi, de ordin zero, de ordin unu, și Hixson-Crowell. Coeficientul de corelație (R^2) a fost ales pentru compara modelele. Pentru acest criteriu, o valoare mai apropiată de 1 înseamnă o corelare mai bună. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 6 și Tabelul 7.

Tabel 6. Coeficientul de corelație pentru diverse modele matematice – eliberarea AML liber versus încorporat în nanosisteme polimerice pe bază de PLGA

Nr. crt.	Proba	Coeficientul de corelație (R^2)				
		Ordin zero	Ordin unu	Higuchi	Korsmayer-Peppas	Hixson-Crowell
1	AML liber	0,8514	0,9680	-*	-*	0,9345
2	F1	0,5681	0,8729	0,9921	0,9805	0,9810
3	F2	0,6704	0,8760	0,9646	0,9765	0,7441
4	F3	0,8531	0,8801	0,9834	0,9854	0,8682
5	F4	0,9348	0,9509	0,9856	0,9836	0,9465
6	F5	0,9106	0,9633	0,9759	0,9776	0,9410
7	F6	0,8964	0,9282	0,9842	0,9833	0,9200

Tabel 7. Coeficientul de corelație pentru diverse modele matematice – eliberarea VAL liber versus încorporat în nanosisteme polimerice tip PLGA

Nr. crt.	Proba	Coeficientul de corelație (R^2)				
		Ordin zero	Ordin unu	Higuchi	Korsmayer-Peppas	Hixson-Crowell
1	VAL liber	0,7207	0,9762	-*	-*	0,9548
2	F1	0,8949	0,9638	0,9695	0,9837	0,9363
3	F2	0,9613	0,9508	0,9647	0,9765	0,9609
4	F3	0,9378	0,8768	0,9725	0,9719	0,9165
5	F4	0,8780	0,8654	0,9555	0,9879	0,8320
6	F5	0,6534	0,7413	0,9645	0,9886	0,7929
7	F6	0,8890	0,8264	0,9677	0,9618	0,7129

*condiția pentru aplicarea modelului Korsmeyer-Peppas și Higuchi nu a fost îndeplinită ($M(t) / M(\infty) < 2/3$)

Curba de solubilitate atât a amlodipinei, cât și a valsartanului poate fi cel mai bine descrisă de o ecuație exponențială (modelul de ordin 1), cu $R^2 = 0,9680$ pentru AML și $R^2 = 0,9762$ pentru VAL. Pentru nanosistemele polimerice pe bază de PLGA s-a observat că eliberarea AML și VAL din toate probele este cel mai bine descrisă de modelul Higuchi și modelul Korsmeyer-Peppas ($R^2 > 0,95$). Pentru probele cu conținut mare de PLGA (17-51 mg), coeficientul n este mai mic de 0,5, indicând o difuzie Fickiană, în timp ce pentru celelalte probe n este cuprins între 0,5 și 1, indicând o difuzie non-Fickiană. De asemenea, formulările cu conținut mare de PLGA au prezentat o valoare mai mică pentru k_H decât celelalte formulări polimerice, indicând un efect de *burst* mai puțin intens.

Capitolul 5. Obținerea și caracterizarea nanosistemului multicomponent pe bază de plga încărcat cu besilat de amlodipină și valsartan

5.3 Rezultate și discuții

5.3.1. Determinarea gradului de compatibilitate între substanțele active și matricea polimerică și morfologiei nanosistemelor polimerice

Rezultatele obținute prin FT-IR au confirmat prezența grupărilor funcționale caracteristice substanțelor active și componentei polimerice PLGA în nanosistemele formulate. Rezultatele analizei FT-IR indică faptul că încorporarea substanțelor active în particulele polimerice a fost realizată, neexistând interacții la nivel molecular între agenții terapeutici sau între agenții terapeutici și polimer.

Totodată s-au înregistrat imagini SEM ale nanoparticulelor încărcate cu AML:VAL. Analiza a fost efectuată pentru proba F3 (PLGA:AML:VAL – 10.1:16 mg) optimă din punct de vedere a dimensiunii de particulă, distribuției și potențialului zeta, determinate prin DLS, și a eficienței de încorporare. Imaginile SEM ale nanosistemelor polimerice încărcate cu AML:VAL au arătat particule cu dimensiuni mai mari decât în cazul analizei DLS, probabil din cauza agregării nanoparticulelor în timpul procesului de liofilizare din cadrul analizei SEM.

5.3.2. Evaluarea distribuției intracelulare a nanosistemului polimeric optim

În acest studiu a fost utilizată microscopia confocală pentru a determina biodistribuția și localizarea la nivel celular a nanoparticulelor polimerice pe bază de PLGA încărcate cu AML:VAL. Linia celulară aleasă pentru această testare a fost linia de fibroblaste normale de șoricel (NIH3T3). În cazul probelor 48h+(NIH3T3 care au rămas timp de 48h în mediu cu NP-Fc), s-a putut observa o internalizare citoplasmatică, dar în același timp și o tendință mai mare de a forma conglomerate comparativ cu celelalte două categorii de probe (24h+ ; 24h+/-).

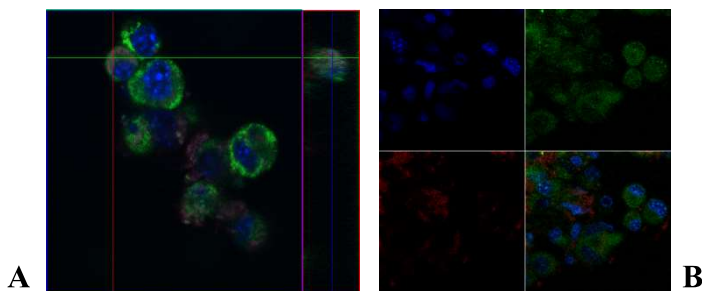


Fig. 3. Localizarea NP în celulele NIH3T3 (48 +) - A și (24 +/-) - B prin microscopie confocală
roșu-fluorescența ftalocianinei care marchează nanoparticulele, verde-fluorescența Rhodaminei B care colorează membrana celulară, albastru-fluorescența dată de Hoechst care colorează nucleul

Referitor la probele 24h +/- (celule care au stat cu suspensia de NP-Fc timp de 24h, ulterior fiind spălate cu mediu fără fenol și ținute la incubator pentru încă alte 24h, după care au fost colorate și vizualizate microscopic) s-a putut remarca o încorporare intracelulară mult mai mică decât la prima categorie de probe.

Faptul că NP-Fc au intrat în celulă după doar 24h de incubare (24h +) și că s-a obținut cel mai mare procent de internalizare a lor la acest timp de incubare, pledează pentru încorporare prin mecanismul de endocitoză. [5]

5.3.3. Evaluarea citotoxicității nanosistemului polimeric optim

În cadrul acestui experiment au fost utilizate cinci concentrații diferite: 150, 100, 50, 10 și 5 $\mu\text{g/mL}$ care au fost incubate cu celulele menționate anterior. Rezultatele au fost exprimate în funcție de procentul celulelor viabile. Semnalul colorimetric este proporțional cu activitatea reductazelor mitocondriale a celulelor viabile, existând o contribuție simultană a doi parametri, și anume: numărul celular și starea de activitate enzimatică mitondrială.

Astfel, în ceea ce privește situația celulelor – fibroblaste umane (ATCC-PCS-201-012) au fost observate valori ale viabilității cuprinse între $98,54 \pm 2,01$ % corespunzătoare concentrației F3 de 5 $\mu\text{g/mL}$ și $96,50 \pm 0,98$ % corespunzătoare concentrației F3 de 150 $\mu\text{g/mL}$.

În urma evaluării *in vitro* a nanosistemului polimeric prin metoda MTT, s-a constatat absența citotoxicității. Ținându-se cont de concentrațiile ridicate (concentrația maximă, prin corelarea cu parametrii farmacocinetici este echivalentul unei doze de peste 5 g/kg corp) se poate considera că F3 nu prezintă risc pentru sănătate.

Capitolul 6. Obținerea și caracterizarea extractelor vegetale standardizate din speciile vegetale: *Sambucus ebulus*, *Lycium barbarum*, *Armoracia rusticana*, *Echinacea purpurea*

6.2. Materiale și metode

Material vegetal: Frunzele de EP (*Echinacea purpurea*), LB (*Lycium barbarum*), AR (*Armoracia rusticana*) și SE (*Sambucus ebulus*) au fost recoltate la maturitate din județul Dâmbovița, România (latitudine: $45^{\circ} 18' 15.4''$ N, longitudine: $25^{\circ} 23' 28.4''$ E) și identificate de către echipa secției de Biotehnologii Extractive din cadrul Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare Chimico-Farmaceutică (INCDCF) – ICCF, București, România.

6.3. Rezultate și discuții

6.3.1. Obținerea extractelor vegetale standardizate

În acest studiu au fost efectuate o serie de extracții în alcool etilic 50% (v/v), solvent care asigură extracția polifenolilor [6] pentru 4 specii vegetale. În urma analizei datelor experimentale, se constată faptul că extractul hidroalcoolic din frunzele de *Sambucus ebulus* a prezentat cel mai mare conținut de polifenoli, $25,55 \pm 0,01$ mg GAE/ g material uscat, în conformitate cu datele din literatură.

6.3.2. Identificarea și cuantificarea compușilor polifenolici în extractele vegetale standardizate

Cromatogramele analizei HPTLC a arătat prezența compușilor polifenolici în cazul extractelor vegetale standardizate: acid cafeic, acid clorogenic, rutin și hiperoxidă.

De asemenea, extractele vegetale obținute au fost investigate utilizând analiza HPLC în fază inversă, folosind 19 compuși fenolici de referință. Din totalitatea compușilor fenolici de referință pentru extractul de SE au fost detectați și cuantificați patru compuși: acidul clorogenic ($14,389 \pm 0,018$ mg / g extract), acidul cafeic ($2,997 \pm 0,004$ mg/g extract), rutinul ($0,564 \pm 0,001$ mg/g extract) și quercetina ($0,073 \pm 0,001$ mg/g extract). În cazul extractului

de *Echinacea purpurea* a fost identificați și cuantificați 5 compuși polifenolici, preponderenți fiind acidul cioric (19,528 ± 0,004 mg compus/g extract) și acidul caftaric (15,423 ± 0,018 mg compus/g extract). Cromatograma extractului de *Armoracia rusticana* relevă prezența a trei compuși fenolici, toate având concentrații mici: acidul trans-ferulic, acidul p-cumaric, kaempferol. Kaempferolul a demonstrat cea mai mare concentrație în extractul din frunze de hrean, și anume 0,050 ± 0,002 mg compus/ g extract. Pentru extractul de *Lycium barbarum* au fost identificați și cuantificați 4 compuși polifenolici. Compusul care se găsește în proporția cea mai mare este acidul clorogenic, având o concentrație de 18,740 ± 0,031 mg/g extract. De asemenea, acidul cafeic a fost prezent într-o cantitate semnificativă, și anume 1,773 ± 0,002 mg/g extract.

6.3.4. Evaluarea efectului citotoxic și antiproliferativ al extractelor vegetale standardizate

Testele de citotoxicitate utilizează o procedură standardizată, care include expunerea celulelor la diferite concentrații ale probelor luate în studiu. Astfel, a fost selectată o linie celulară animală, și anume linia de fibroblaste murine – L929 (ATCC-CRL-6364) și a fost investigat potențialul citotoxic prin metoda evaluării viabilității metabolice a celulelor (testul de evaluare colorimetrică a activității enzimelor mitocondriale pe bază de formazan - MTS). Se observă că odată cu creșterea concentrației extractului vegetal, viabilitatea celulară scade, însă nu atât de mult încât să afecteze integritatea totală celulară. Testul MTS nu a evidențiat efecte citotoxice sau antiproliferative semnificative pentru niciuna dintre extractele vegetale, valorile IC₅₀ fiind cuprinse între 64,120 ± 0,288 μg/mL (extractul EP) și 91,910 ± 0,292 μg/mL (extractul LB), întrucât aceste doze sunt dificil de realizat *in vivo*. De asemenea, ținându-se cont de concentrațiile ridicate (concentrația maximă, prin corelarea cu parametrii farmacocinetici este echivalentul unei doze de peste 5 g/kg corp), se poate considera că toate extractele vegetale studiate nu prezintă risc pentru sănătate.

Capitolul 7. Obținerea și caracterizarea nanosistemelor lipidice cu extract vegetal standardizat de *Sambucus ebulus*

7.2.2. Obținerea nanosistemelor lipidice încărcate cu extract de *Sambucus ebulus*

Obținerea lipozomilor și transferozomilor încărcate cu extractul standardizat de *Sambucus ebulus* s-a făcut utilizând metoda hidratării filmului lipidic prin agitare manuală [7, 8]. Obținerea etozomilor încărcate cu extractul de *Sambucus ebulus* s-a făcut utilizând metoda de preparare la rece [9]. Toate formulările obținute au fost sonicate 20 de minute, utilizând o baie de sonicare umplută cu gheață, cu sistem automat de reglare a frecvenței și amplitudine reglată la 20%. Ulterior, toate veziculele au fost extrudate de 5 ori succesiv prin membrane de 0,4 μm și de 5 ori succesiv prin membrane de 0,22 μm. De asemenea au fost preparați lipozomi, transferozomi și etozomi goi cu rol de control. Toate probele au fost obținute în triplicat și depozitate la frigider la 8 °C timp de cel mult 48 de ore înainte de utilizarea lor în vederea caracterizării analitice și farmacologice.

7.3. Rezultate și discuții

7.3.1. Obținerea nanosistemelor lipidice - studiul influenței parametrilor de preparare

Prima fază a studiului a urmărit formularea diverselor nanosisteme lipidice (lipozomi, transferozomi, etozomi) cu extractul vegetal de SE. În acest sens, a fost realizat studiul influenței a diverși parametri asupra obținerii nanosistemelor lipidice cu SE utilizând metoda OFAT (one-factor-at-a-time experiment). Astfel, s-a variat un singur parametru, cum ar fi raportul PC: colesterol, raportul PC: colat de sodiu, cantitatea de extract, viteza de agitare, temperatura de evaporare pentru lipozomi și transferozomi, și raportul etanol: apa, raportul PC:extract SE pentru etozomi, în timp ce ceilalți parametri au fost menținuți constanți și s-a observat influența parametrului variat asupra eficienței de încorporare.

7.3.2. Caracterizarea nanosistemelor lipidice încărcate cu extract vegetal SE

Nanosistemele lipidice încărcate cu extract vegetal de SE au fost caracterizate privind eficiența de încorporare (EE %), dimensiunea particulei, indicele de polidispersitate (PDI) și potențialul zeta. **Evaluarea eficienței de încorporare** a fost determinată spectrofotometric utilizând metoda Folin-Ciocalteu. **Dimensiunea particulelor și PDI** ale veziculelor lipidice au fost determinate prin difuzia dinamică a luminii (DLS) folosind un analizor de dimensiune a particulelor. Valorile **potențialelor zeta** a veziculelor lipidice încărcate cu SE au fost determinate folosind un analizor Zetasizer. **Analiza AFM** a fost efectuată în colaborare cu domnul CS II dr. Mihai Anastasescu (Institutul de Chimie-Fizică "Ilie Murgulescu") utilizând un microscop XE-100, în modul non-contact. **Microscopia în câmp întunecat** a fost efectuată în colaborare cu dna conf. univ. Mona Mihăilescu (Facultatea de Științe Aplicate, UPB) utilizând un sistem CytoViva. **Analiza SEM** a fost efectuată cu un microscop Tescan Vega 3 LMH.

Creșterea dimensiunii nanosistemelor lipidice (SE@L, SE@T, SE@E) comparativ cu nanosistemele lipidice goale - fără extract vegetal (L, T, E) a fost cauzată de încorporarea fitoconstituenților extractului SE în structura veziculelor. Mărimea nanosistemelor lipidice încărcate cu SE crește în ordinea următoare: lipozomi < transferozomi < etozomi. Toate nanosistemele lipidice au prezentat o distribuție îngustă de dimensiuni (PDI < 0,21), dovedind o bună omogenitate și tendință redusă de agregare. Încorporarea extractului SE a îmbunătățit omogenitatea, în timp ce veziculele lipidice goale au avut o distribuție mai mare a dimensiunilor decât veziculele încărcate cu SE. Valorile potențialelor zeta au fost în intervalul $43 \pm 1,03$ mV - $37 \pm 0,23$ mV, toate probele indicând o stabilitate moderată. [10]

Tabelul 8. Caracteristicile nanosistemelor lipidice

ID probă	Formulare	EE (%)	Dimensiune (nm)	ξ-potential	PDI
SE@L	PC: Colesterol: SE= 10:1:2 (m/m)	80,05 ± 0,51	123,01 ± 2,50	-43,01 ± 1,03	0,18 ± 0,01
SE@T	PC: Colat de sodiu: SE= 8:2:2 (m/m)	75,10 ± 1,12	155,12 ± 3,31	-39,17 ± 0,50	0,16 ± 0,02
SE@E	PC: SE= 8:2.5 (m/m); H ₂ O:Etanol = 7:3 (v/v)	85,10 ± 1,50	190,10 ± 2,53	-37,04 ± 0,23	0,20 ± 0,01
L	PC: Colesterol= 10:1 (m/m)	-	49,09 ± 1,52	-20,11 ± 1,23	0,44 ± 0,01
T	PC: Colat de sodiu = 8:2 (m/m)	-	105,03 ± 0,23	-25,10 ± 0,89	0,37 ± 0,02
E	PC = 8 mg; H ₂ O:Etanol = 7:3 (v/v)	-	65,12 ± 0,51	-30,19 ± 1,15	0,44 ± 0,01

Analiza AFM a probelor încărcate cu SE a relevat particule cvasi-sferice distribuite aleatoriu pentru toate tipurile de vezicule lipidice, cu dimensiuni de zeci de nm. Prin urmare, mărimea veziculelor lipidice obținute prin analiza AFM sunt mai mici decât diametrele hidrodinamice măsurate prin DLS sau dimensiunea determinată prin SEM, dar a fost observată aceeași ordine de creștere pentru dimensiunile veziculelor lipidice: lipozomi < transferozomi < etozomi. Imaginile hiperspectrale ale probei SE@E au fost obținute utilizând microscopie îmbunătățită pe câmp întunecat și s-a observat că nanoparticulele sunt izolate unele de altele, iar spectrele de împrăștiere a luminii prezintă intensități maxime similare, indicând o distribuție de dimensiuni înguste a veziculelor lipidice.

Eficiența de încorporare a extractului de SE în toate veziculele lipidice a fost peste 75% și a crescut în ordinea lipozomi < transferozomi < etozomi, metodele de preparare aplicate fiind eficiente. Rezultate similare raportate pentru eficiența de încorporare pentru *Polygonum aviculare* [11], *Glycyrrhiza glabra* L. [12] și *Artemisia arborescens* [13]. Veziculele lipidice încărcate cu SE au fost stabile timp de cel puțin trei luni, având

Nanosisteme multicomponente cu aplicații în patologiile cu risc cardio-cerebro-vascular

aproximativ aceeași cantitate de fitocompuși încorporați după o lună (pierderea compușilor din extract < 0,65 %) și după 3 luni (pierderea compușilor din extract < 3,35 %).

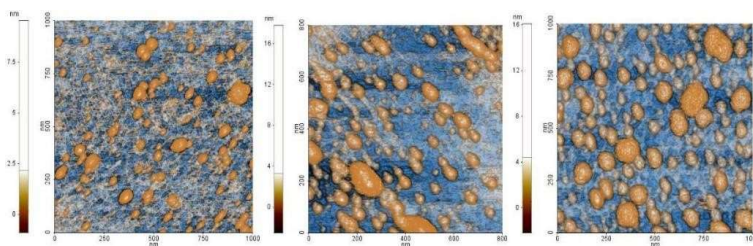


Fig. 4. Imagini AFM ale veziculelor lipidice încărcate cu extract SE: lipozomi (A); transferozomi (B) și etozomii (C)

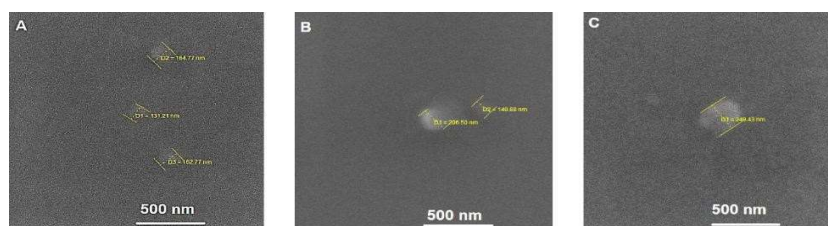


Fig. 5. Imagini SEM ale veziculelor lipidice încărcate cu extract SE (uscate în vid)

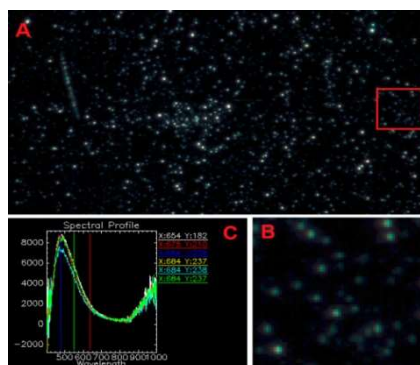


Fig. 6. Imagine înregistrată prin microscopie în câmp întunecat folosind Cytoviva (A); mărirea zonei marcate din figura A corectată cu spectrul lămpii (B) și spectrele colectate în punctele izolate (C)

7.3.3. Studiul cedării *in vitro* a polifenolilor din nanosisteme lipidice

Eliberarea polifenolilor din extractul liber a prezentat un „burst effect”, în timp ce în cazul extractului de SE încorporat în veziculele lipidice lipide cedarea fitoconstituenților a fost mai lentă. Cedarea polifenolilor din extractul vegetal a fost completă după 10 ore ($98,51 \pm 1,07\%$), pe când eliberarea polifenolilor din toate veziculele lipidice a avut o viteză de cedare mult mai mică (sub 70%).

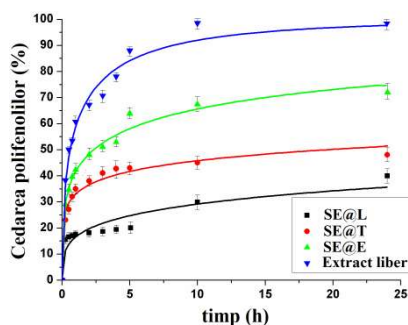


Fig. 7. Profilul de cedare in vitro a polifenolilor din veziculele lipidice încărcate cu extract SE comparativ cu extractul de SE liber (fitare cu modelul Weibull)

Pentru a evalua mecanismul de eliberare a polifenolilor, au fost aplicate trei modele matematice: Weibull, Korsmeyer-Peppas, și Higuchi. Cea mai bună corelație a coeficienților a fost obținută pentru ecuația Weibull, în toate formulările lipidice, parametru $b < 0,75$, relevând o difuzie Fickiană. Modelele Korsmeyer-Peppas și Higuchi au fost aplicate numai pentru primii 60% polifenoli eliberați cu coeficienți de corelație mai mari de 0,96, respectiv 0,92 (Fig. 8). Pentru toate probele, coeficientul n este mai mic de 0,5, indicând o difuzie Fickiană, mecanism în acord cu modelul Weibull. Lipozomii încărcăți cu SE au prezentat o valoare mai mică pentru k_H decât celelalte formulări lipidice, indicând un efect mai puțin intens, probabil datorită conținutului lor de colesterol, care a crescut rigiditatea bistratului lipidic, modificându-se permeabilitatea acestuia.

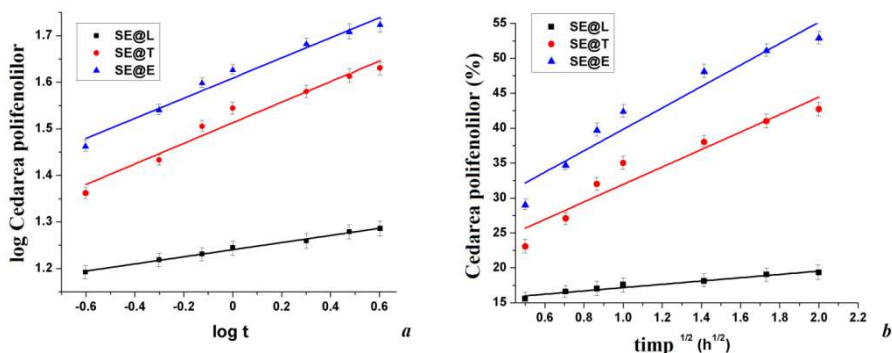


Fig. 8. Profilele de eliberare a polifenolilor din nanosistemele lipidice încărcate cu extract SE fitate cu modelele cinetice Korsmeyer-Peppas (a) și Higuchi (b).

7.3.4. Efectul pre-tratamentului cu extract de SE liber și încorporat în nanosisteme lipidice împotriva toxicității induse de H_2O_2 asupra liniei celulare L-929

Viabilitatea celulelor fibroblaste de șoarece L-929 a fost evaluată după 4 ore de expunere la diferite concentrații de soluție apoasă de peroxid de hidrogen în intervalul 1-100 mM, citotoxicitatea acestuia fiind dependentă de doză. În urma rezultatelor obținute, pentru studiile următoare a fost selectată concentrația de 50mM H_2O_2 , concentrație care reduce viabilitatea celulară la 50%. Au fost selectate trei concentrații (5, 10, 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$) ale extractului de SE și veziculelor lipidice încărcate cu SE, care sunt netoxice și care ar putea preveni citotoxicitatea indusă de H_2O_2 . Prin urmare, celulele fibroblaste L-929 au fost pretratate cu extract de SE liber și vezicule lipidice încărcate cu SE înainte de a adăuga soluția de peroxid de hidrogen cu concentrație corespunzătoare IC_{50} . Pre-tratamentul administrat liniei celulare de fibroblaste a îmbunătățit viabilitatea (Fig. 9), sugerând astfel un efect semnificativ citoprotector împotriva ROS atât pentru extractul liber, cât și pentru cel

încorporat în nanosistemele lipidice. Efectul nu a fost însă prezent în cazul celulelor expuse pe termen scurt la producții test, fapt ce sugerează că exercitarea acțiunii necesită prezența intracelulară a compușilor și este dependentă de modificarea expresiei unor enzime și substraturi antioxidante specifice. Toate probele au reușit să ofere protecție celulelor L-929 împotriva citotoxicității induse de H₂O₂, probabil datorită conținutului lor în polifenoli. Aceste experimente *in vitro* au demonstrat că polifenolii din extractul de frunze de SE au capacitatea de eliminare a radicalilor rezultând un efect citoprotector chiar și la o concentrație scăzută de 5 μg / mL. Este cunoscut faptul că utilizarea veziculelor lipidice ca și *nanotransportori* ar putea ajuta la internalizarea celulară a polifenolilor prin procesul de endocitoză. [14] Prin urmare, încorporarea extractului de SE în vezicule lipidice poate fi o metodă eficientă pentru a îmbunătăți transportul intracelular ai polifenolilor.

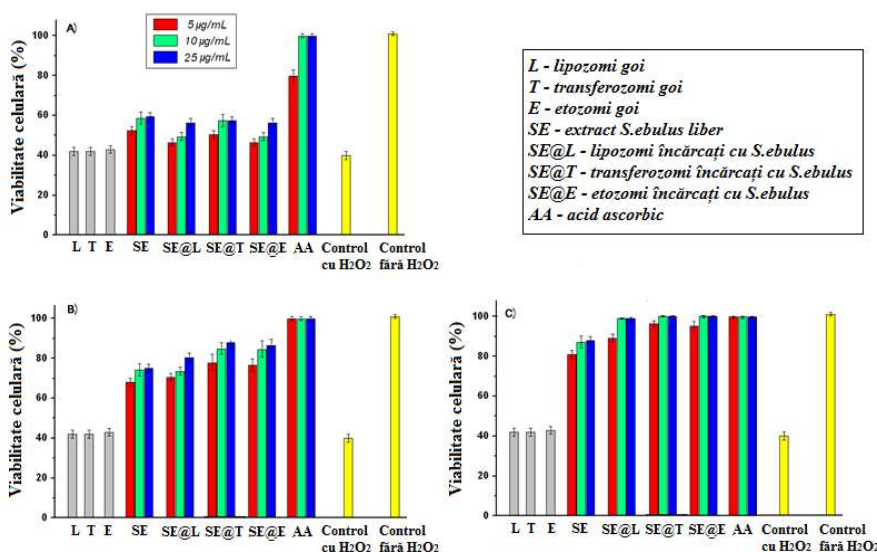


Fig. 9. Efectul H₂O₂ asupra viabilității celulei L-929 după expunere.

Viabilitatea celulelor L-929 după 1 oră (A), 12 ore (B), 24 ore (C) pretratate cu extract de frunze SE liber/ încorporat în nanosisteme lipidice înainte de expunerea la soluția de H₂O₂

Evaluarea nanosistemelor lipidice prin testul MTS a demonstrat un efect citoprotector împotriva toxicității induse de peroxidul de hidrogen pe linia celulară de fibroblaste L-929 de șoarece al extractului liber din frunzele de *Sambucus ebulus* și încărcate în vezicule lipidice.

Capitolul 8. Concluzii

8.1. Concluzii generale

1. Concluzii asupra metodelor de obținere și a alegerii componentelor nanosistemelor polimerice
 - Metoda optimă pentru obținerea nanosistemelor polimerice a fost metoda nanoprecipitării (evaporare solvent), care s-a dovedit a fi o metodă rapidă și facilă ce conduce spontan la formarea nanoparticulelor, cu grad de încorporare ridicat și cu randament mare.
 - În scopul de a obține un nanosistem multicomponent optim, au fost efectuate trei tipuri de experimente în care au fost variați următorii parametri: tipul de polimer (PEG, PLGA), masa moleculară a polimerului în cazul PEG-ului (PEG 4000, PEG 6000), cantitatea de polimer: 5; 7,5 mg pentru PEG 4000 și PEG 6000, iar pentru PLGA: 5; 7,5; 10; 17; 34; 51 mg, și viteza agitării (1200, 2400 rpm) doar pentru formulările care au demonstrat eficiență de încorporare ridicată (formulările pe bază de PLGA).

Nanosisteme multicomponente cu aplicații în patologii cu risc cardio-cerebro-vascular

- Nanosistemele cu matrice PEG 6000 au dovedit grade de încorporare ușor mai mari comparativ cu cele cu matricea PEG 4000, masa moleculară având o influență neesențială asupra eficienței de încorporare.
- Nanosistemele polimerice pe bază de PLGA au avut grade de încorporare mai mari decât cele pe bază de PEG, indicând că natura polimerului joacă un rol important în formularea acestor sisteme.
- În ceea ce privește relația dintre cantitatea polimerului PLGA și eficiența de încorporare, există o proporționalitate directă (cu cât crește concentrația polimerului, crește și gradul de încorporare) până la o anumită valoare prag, depășită ca fiind concentrația de 10 mg PLGA.
- În cazul formulărilor cu matrice polimerică tip PLGA, viteza de agitare aplicată în acest studiu (1200, 2400 rpm) a condus la o ușoară modificare a eficienței de încorporare.
- Eficiența încorporării substanțelor active de sinteză (amlodipină besilat, valsartan) calculată pe baza determinărilor prin spectrofotometrie UV-VIS a fost mai mare de 75 %.
- Caracterizarea prin difuzia dinamică a luminii (DLS) a arătat pentru toate nanosistemele polimerice pe bază de PLGA dimensiune nanometrică cuprinsă în intervalul $123,90 \pm 1,13 - 204,10 \pm 1,34$ nm, potențial zeta negativ: (-) $40,45 \pm 0,33 - (-)30,86 \pm 0,31$, ceea ce înseamnă stabilitate bună a formulărilor obținute, și un indice de polidispersitate mai mic de 0,2, ce demonstrează uniformitatea nanosistemelor.
- În ceea ce privește studiul de cedare a substanțelor active din nanosistemele polimerice, au fost aplicate 5 modele cinetice: de ordin zero, de ordin unu, Higuchi, Korsmeyer-Peppas și Hixson-Crowell. S-a observat că eliberarea amlodipinei besilat și valsartanului din nanosistemele polimerice pe bază de PEG/ PLGA este cel mai bine descrisă de modelul Higuchi și modelul Korsmeyer-Peppas ($R^2 > 0,95$).

În urma analizării datelor experimentale a fost ales ca nanosistem optim formularea F3 care conține PLGA 10 mg, AML:VAL de 1:16 (mg), obținută prin metoda nanoprecipitării la o viteză de agitare de 1200 rpm și viteză a picurării de 0,5 mL/min, pentru care au fost continuate studiile de caracterizare fizico-chimice și din punct de vedere al profilului de siguranță.

2. Concluzii asupra caracterizării nanosistemului optim ales

- Analiza structurală FT-IR a demonstrat o bună compatibilitate între substanțele active (amlodipină besilat și valsartan) și matricea polimerică (PLGA).
- Analiza prin microscopie electronică de înaltă performanță (SEM) pentru nanosistemul multicomponent optim (F3) a arătat particule polimerice cu textură netedă și morfologie rotundă.
- A fost elaborat un protocol de lucru în scopul evaluării distribuției nanosistemului polimeric optim, în urma căruia s-a reușit a observa distribuția nanoparticulelor atât extra-, cât și intra-celulară pentru nanosistemul PLGA:AML:VAL (10:1:16 mg). Astfel, prin microscopie confocală s-a putut evidenția o localizare intracitoplasmatică a nanoparticulelor polimerice, însă nu s-a putut decela dacă nanoparticulele au fost incluse în organite citoplasmatic.
- Testul colorimetric *in vitro* MTS a arătat faptul că nanosistemul polimeric PLGA:AML:VAL (10:1:16 mg) a demonstrat o biocompatibilitate mare, neexistând potențial citotoxic la concentrațiile testate (5, 10, 15, 50, 100, 150 $\mu\text{g/mL}$) pe liniile celulare normale: celule epiteliale mamare umane (MCF 12A ATCC CRL-10782) și fibroblaste umane (ATCC-PCS-201-012).

3. Concluzii asupra metodelor de obținere și a alegerii extractului vegetal ca ingredient activ în tratamentul afecțiunilor cu risc cardio-cerebro-vascular

- Au fost obținute - din partea aeriană (frunzele) a unor specii vegetale autohtone - patru extracte standardizate hidroalcoolice în polifenoli totali exprimați în echivalenți gram de acid galic (g GAE/ 100 g extract): *Sambucus ebulus* (boz) - $2,550 \pm 0,010$ g GAE/100 g extract, *Echinacea purpurea* (echinacea) - $1,470 \pm 0,030$ g GAE/100 g extract, *Armoracia rusticana* (hrean) - $2,160 \pm 0,020$ g GAE/100 g extract, și *Lycium barbarum* (goji) - $1,830 \pm 0,030$ g GAE/100 g extract. Astfel, specia vegetală care a prezentat cea mai mare concentrație de polifenoli a fost *S. ebulus*.

- Analizele HPTLC și HPLC au demonstrat prezența anumitor compuși fenolici cu rol adjuvant în tratamentul afecțiunilor cu risc cardio-cerebro-vascular. În cazul tuturor extractelor vegetale, prin analiza HPTLC au fost observați 4 compuși acid cafeic, acid clorogenic, rutin și hiperozidă, iar prin analiza HPLC s-a reușit identificarea și cuantificarea a 4 compuși polifenolici pentru speciile vegetale *Sambucus ebulus* și *Lycium barbarum*, 5 compuși polifenolici pentru specia vegetală *Echinacea purpurea*, și 3 compuși polifenolici pentru specia vegetală *Armoracia rusticana*. Referitor la extractele de *S. ebulus* și *L. barbarum*, au fost evidențiate concentrații mari de acid clorogenic ($14,389 \pm 0,018$, respectiv $18,740 \pm 0,031$ mg compus/ g extract), în cazul extractului de *E. purpurea* acidul cicoric și acidul caftaric au fost compușii predominanți ($19,528 \pm 0,004$ mg compus/ g extract, respective $15,423 \pm 0,018$ mg compus/ g extract), iar extractul *A. rusticana* a prezentat cele mai mici concentrații în compuși polifenolici, predominant fiind kaempferolul ($0,050 \pm 0,002$ mg compus/ g extract).

- Toate extractele vegetale standardizate obținute au fost caracterizate în ceea ce privește acțiunea antioxidantă prin metoda DPPH, evidențiindu-se o putere anti-radicalică a ROS mare. Astfel, trei extracte au prezentat valoarea IC_{50} sub $50 \mu\text{g} / \text{mL}$: extractul de *S. ebulus* ($10,330 \pm 0,056 \mu\text{g} / \text{mL}$), extractul de *L. barbarum* ($11,330 \pm 0,056 \mu\text{g} / \text{mL}$) și extractul de *A. rusticana* - $20,09 \pm 0,056 \mu\text{g} / \text{mL}$, și un singur extract a arătat o valoare a IC_{50} peste $50 \mu\text{g} / \text{mL}$: extractul de *E. purpurea* - $56,890 \pm 0,056 \mu\text{g} / \text{mL}$.

- Evaluarea *in vitro* a citotoxicității a arătat un profil de siguranță mare în cazul tuturor extractelor vegetale, cu valori ale IC_{50} care susțin integritatea celulară: $64,120 \pm 0,288 \mu\text{g}/\text{mL}$ (extractul *Echinacea purpurea*), $64,710 \pm 0,322 \mu\text{g}/\text{mL}$ (extractul *Sambucus ebulus*), $70,400 \pm 0,305 \mu\text{g}/\text{mL}$ (extractul *Armoracia rusticana*), și $91,910 \pm 0,292 \mu\text{g}/\text{mL}$ (extractul *Lycium barbarum*).

Datorită concentrației mari în polifenoli, a activității antioxidante crescute, a fost selectat extractul standardizat din specia *Sambucus ebulus* L., pentru a putea fi încorporat în diferite tipuri de nanosisteme lipidice.

4. Concluzii asupra obținerii și caracterizării nanosistemelor lipidice încărcate cu extractul vegetal de *S. ebulus*

- Au fost elaborate și caracterizate trei tipuri de nanosisteme lipidice - lipozomi, transferozomi și etozomi, în care a fost încorporat un extract vegetal standardizat din specia vegetală *Sambucus ebulus*.

- A fost efectuat un studiu în care au fost modificați anumiți parametri pentru a stabili condițiile de preparare a nanosistemelor lipidice. Astfel, în cazul lipozomilor și transferozomilor au fost studiate: i) influența raportului PC / colesterol (colat de sodiu) asupra eficienței de încorporare, cele mai bune rezultate fiind obținute pentru raportul 10/1 PC / colesterol pentru lipozomi și raportul 8/2 PC / colat de sodiu pentru transferozomi; ii) influența temperaturii de evaporare asupra eficienței de încorporare, cea mai mare eficiență de încorporare fiind observată pentru formulările preparate la $35 \text{ }^\circ\text{C}$; iii) influența vitezei de agitare asupra eficienței de încorporare, viteza de agitare de 200 rpm determinând

cele mai bune rezultate pentru ambele nanosisteme lipidice, șiiv) *influența cantității de extract S. ebulus asupra eficienței de încorporare*, rezultatele cele mai bune obținându-se pentru 20 mg de extract *S. ebulus* pentru ambele nanosisteme lipidice. În cazul etozomilor încărcăți cu extract de *S. ebulus* a fost evaluată influența a doi factori (raportul PC/extract de SE și raportul apă/etanol) asupra eficienței de încorporare. Formularea cu 8/2,5 raport de PC/extract de SE și 3/7 raport apă/etanol a prezentat cea mai bună eficiență de încorporare.

- Eficiența încorporării fitoconstituenților în cazul nanosistemele lipidice a fost mai mare de 75 %. Astfel, lipozomii au prezentat eficiența de încorporare a fitoconstituenților $80,05 \pm 0,51$ %, transferozomii – $75,10 \pm 1,12$ %, și etozomii – $85,10 \pm 1,50$ %. De asemenea, în urma evaluării eficienței de încorporare timp de trei luni, s-a concluzionat faptul că toate nanosistemele lipidice au prezentat o stabilitate înaltă când au fost depozitate la 4 °C.

- Analiza prin difuzia dinamică a luminii (DLS) a arătat pentru toate nanosistemele lipidice încărcate cu *S. ebulus* o dimensiune nanometrică (lipozomi - $123,01 \pm 2,50$ nm, transferozomi - $155,12 \pm 3,31$ nm , etozomi - $190,10 \pm 2,53$ nm), uniformitate mare a distribuției particulelor, stabilitate moderată relevată prin valoarea potențialului zeta (lipozomi – (-) $43,00 \pm 1,03$, transferozomi – (-) $39,00 \pm 0,50$, etozomi – (-) $37,00 \pm 0,23$).

- Măsurătorile SEM au indicat o morfologie evasi-sferă, cu suprafață netedă pentru toate nanosistemele lipidice. Analiza AFM a evidențiat particule mai mari și mai omogen distribuite în cazul etozomilor, în timp ce în cazul lipozomilor, s-au observat particule mai mici compact distribuite. De asemenea, natura veziculară a nanosistemelor a fost confirmată de profilul lor spiky (noisy-like). Analiza microscopică a dovedit că nanosistemele lipidice prezintă o distribuție îngustă de dimensiuni, cei mai mici fiind lipozomii care sunt mai hidrofobi și mai puțin deformabili decât transferozomii și etozomii, în timp ce cei mai mari au fost etozomii, care au prezentat cea mai mare eficiență de încorporare.

- Imaginile hiperspectrale ale nanosistemelor lipidice (etozomi) au fost obținute utilizând microscopia în câmp întunecat, evidențiind o distribuție îngustă de dimensiuni a veziculelor lipidice.

- Studiile de cedare *in vitro* au fost efectuate în mediu de PBS, pH = 7,4, la temperatura de 37 °C și au demonstrat eliberarea mai lentă a polifenolilor entrapați în nanosistemele lipidice comparative cu solubilizarea polifenolilor în aceleași condiții experimentale. Astfel, au fost aplicate trei modele matematice (Weibull, Korsmeyer-Peppas și Higuchi) pentru a evalua mecanismul de eliberare a polifenolilor. Nanosistemele lipidice tip lipozomi au prezentat cea mai mică viteză de eliberare a polifenolilor, pe când transferozomii și etozomii au determinat o cedare mult mai rapidă a polifenolilor.

- Evaluarea *in vitro* a citotoxicității extractului vegetal liber și nanosistemelor lipidice încărcate cu *S. ebulus* a fost realizată prin metoda MTS, în urma căreia a fost demonstrat un efect citoprotector împotriva toxicității induse de peroxidul de hidrogen pe linia celulară de fibroblaste de șoarece L-929. De asemenea, s-a observat faptul că un pre-tratament scurt (o oră) cu extract de *S. ebulus* nu a prezentat o acțiune citoprotectoare semnificativă pe celule, fiind necesare cel puțin 12 ore de pre-tratament înainte de expunerea la soluție de peroxid de hidrogen pentru a observa rezultate semnificative în ceea ce privește prevenția unei potențiale citotoxicități.

8.2. Contribuții originale

Un element de originalitate constă în faptul că a fost încorporată o combinație de substanțe active, cu moduri de acțiune complementare de acțiune, în doză fixă (amlodipină:valsartan 1:16 mg) în nanosisteme polimerice cu matrice tip PLGA, PEG 4000, PEG 6000, în scopul cumulării efectelor terapeutice și diminuării efectelor secundare.

De asemenea, originalitatea acestei teze derivă și din realizarea unui protocol de a fi evaluată distribuția intracelulară a nanosistemelor polimerice cu AML:VAL dedicate

tratamentului afecțiunilor cu risc cardio-cerebro-vascular, pe linia celulară murină NIH3T3. S-a putut demonstra faptul că nanoparticulele polimerice intră prin membrană și corelând cu datele din literatură a fost făcut un prim pas în înțelegerea traseului acestor nanosisteme.

Un alt element de originalitate este și încercarea de a evalua profilul de siguranță pe liniile celulare de fibroblaste umane și celule epiteliale mamare pentru nanosistemele polimerice încărcate cu amlodipină și valsartan.

Din studiile de specialitate, până în prezent, nu au fost efectuate experimente în ceea ce privește încorporarea extractului din frunze de *Sambucus ebulus*. Astfel, această teză aduce ca noutate obținerea și caracterizarea a trei nanosisteme lipidice – lipozomi, etozomi, transferozomi, în care a fost încorporat extractul vegetal standardizat în polifenoli totali ai specie vegetale *Sambucus ebulus*.

Totodată, a fost elaborat un protocol privind testarea efectului citoprotector al nanosistemelor lipidice, aplicându-se un pre-tratament cu un extract standardizat de *Sambucus ebulus* liber și încorporat în nanosisteme lipidice împotriva toxicității induse de H₂O₂ asupra liniei celulare de fibroblaste murine L-929.

8.3. Perspective de dezvoltare ulterioară

Considerând că în această lucrare s-a început studiul unor sisteme inovative nanometrice cu aplicație în tratamentul bolilor cardio-cerebro-vasculare, și s-a reușit localizarea nanosistemelor polimerice în fibroblaste murine, este necesară continuarea investigării mecanismului prin care este realizat transportul nanoparticulelor în linii celulare specifice de tip cardiomiocite. Pornind în această direcție, pe viitor studiile ar trebui să se focuseze pe cuantificarea mecanismului endocitotic al nanosistemelor polimerice și lipidice :

- cu ajutorul unor molecule reporter solubile ce penetrează celula pe această cale – dacă vorbim de o endocitoză în fază fluidă (fluorofori de tipul Lucifer Yellow, TMA-DPH, albumină/dextrani/polizaharide marcate fluorescent sau radiomarcate, galactosidază, fosfatază alcalină, peroxidaza de hrean etc. care devin vizibile prin produșii de reacție ce apar la incubarea celulei cu substratul enzimei);
- prin utilizarea unor inhibitori farmacologici (clorpromazină, brefeldina A, depleția de potasiu intracitoplasmatic, șocul hipotonic – în cazul endocitozei mediate de clatrină; metil-β-ciclodextrină, nistatin, filipină etc. – în cazul endocitozei mediate de caveolină).

Pentru caracterizarea completă a unui nanosistem farmaceutic este necesară o abordare complexă, care să cuprindă o suită de tehnici experimentale complementare. În acest sens, datele termodinamice sunt necesare în procesul de studiere a solidelor farmaceutice. Astfel, studiile viitoare se vor concentra asupra determinărilor prin metode termice de analiză: DSC (Differential Scanning Calorimetry), TG (Termogravimetrie), DTA (Differential Thermal Analysis), termomicroscopie (HSM-Hot Stage Microscopy).

De asemenea, este necesară efectuarea determinărilor privind stabilitatea nanosistemelor pe o perioadă mai lungă de timp.

BIBLIOGRAFIE

- [1] S. Salatin, J. Barar, M. Barzegar-Jalali, K. Adibkia, F. Kiafar, and M. Jelvehgari, "Development of a nanoprecipitation method for the entrapment of a very water soluble drug into Eudragit RL nanoparticles," *Research in Pharmaceutical Sciences*, vol. 12, no. 1, pp. 1-14, January 1, 2017, 2017.
- [2] N. Ise, and I. Sogami, "Viscometric Properties of Dilute Ionic Polymer Solutions and Colloidal Dispersions," 2005.
- [3] A. André-Abrant, J.-L. Taverdet, and J. Jay, "Microencapsulation par évaporation de solvant," *European Polymer Journal*, vol. 37, no. 5, pp. 955-963, 2001/05/01/, 2001.

Nanosisteme multicomponente cu aplicații în patologiile cu risc cardio-cerebro-vascular

- [4] F. Kar, and N. Arslan, "Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity–molecular weight relationship," *Carbohydrate Polymers*, vol. 40, no. 4, pp. 277-284, 1999/12/01/, 1999.
- [5] J. G. Donaldson, "Endocytosis," *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*, W. J. Lennarz and M. D. Lane, eds., pp. 197-199, Waltham: Academic Press, 2013.
- [6] K. Rajbhar, H. Dawda, and U. Mukundan, "Polyphenols: methods of extraction," *Scientific Reviews & Chemical Communications*, vol. 51, pp. 1-6, 11/20, 2014.
- [7] K. Makino, T. Yamada, M. Kimura, T. Oka, H. Ohshima, and T. Kondo, "Temperature- and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data," *Biophys Chem*, vol. 41, no. 2, pp. 175-83, Nov, 1991.
- [8] L. Mihalcea, R.-M. Dinica, and C. Vizireanu, "Study on herbal actions of horseradish (*Armoracia rusticana*)," vol. 19, pp. 111-115, 02/13, 2013.
- [9] I. A. Chacko, V. M. Ghate, L. Dsouza, and S. A. Lewis, "Lipid vesicles: A versatile drug delivery platform for dermal and transdermal applications," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 195, pp. 111262, Jul 17, 2020.
- [10] H. Turkez, P. Sozio, F. Geyikoglu, A. Tatar, A. Hacimuftuoglu, and A. Di Stefano, "Neuroprotective Effects of Farnesene Against Hydrogen Peroxide-Induced Neurotoxicity In vitro," *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 34, no. 1, pp. 101-111, 2014/01/01, 2014.
- [11] S. S. Kwon, S. Y. Kim, B. J. Kong, K. J. Kim, G. Y. Noh, N. R. Im, J. W. Lim, J. H. Ha, J. Kim, and S. N. Park, "Cell penetrating peptide conjugated liposomes as transdermal delivery system of Polygonum aviculare L. extract," *Int J Pharm*, vol. 483, no. 1-2, pp. 26-37, Apr 10, 2015.
- [12] I. Castangia, C. Caddeo, M. L. Manca, L. Casu, A. C. Latorre, O. Diez-Sales, A. Ruiz-Sauri, G. Bacchetta, A. M. Fadda, and M. Manconi, "Delivery of liquorice extract by liposomes and hyalurosomes to protect the skin against oxidative stress injuries," *Carbohydr Polym*, vol. 134, pp. 657-63, Dec 10, 2015.
- [13] C. Sinico, A. De Logu, F. Lai, D. Valenti, M. Manconi, G. Loy, L. Bonsignore, and A. M. Fadda, "Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and in vitro antiviral activity," *Eur J Pharm Biopharm*, vol. 59, no. 1, pp. 161-8, Jan, 2005.
- [14] J.-Y. Fang, C.-T. Hong, W.-T. Chiu, and Y.-Y. Wang, "Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 219, no. 1, pp. 61-72, 2001/05/21/, 2001.

LISTĂ ARTICOLE PUBLICATE ISI

1. Ramona-Daniela Păvăloiu, **Fawzia Sha'at**, Corina Bubueanu, Mihaela Deaconu, Georgeta Neagu, Mousa Sha'at, Mihai Anastasescu, Mona Mihailescu, Cristian Matei Gheorghe Nechifor and Daniela Berger, *Polyphenolic extract from Sambucus ebulus L. leaves free and loaded into lipid vesicles* - Revista Nanomaterials, **2020**, Vol. 10, No. 1, 56 (I.F. = 4.324)
2. Lucia Pirvu, **Fawzia Sha'at**, Ramona Pavaloiu, Denisa Ioana Udeanu, Bujor Albu, *Studies on Acinos alpines L.; polyphenols and bitter compounds profile, antimicrobial activity, antioxidant effect and release experiments on the ethanol and propylene glycol extracts*– Revista Farmacia, **2019**, Vol. 67, No. 6, pp. 1025-1033, IF =1.527
3. Ramona-Daniela Pavaloiu, **Fawzia Sha'at**, Corina Bubueanu, Cristina Hlevca, Gheorghe Nechifor, *Design and evaluation of a delivery system based on liposomes for Armoracia rusticana extract* - Revista de Chimie **2019**, Vol. 70, No. 7, pp. 2347-2349 (IF =1.605)
4. Ramona-Daniela Păvăloiu, **Fawzia Sha'at***, Corina Bubueanu, Georgeta Neagu, Adrian Albulescu, Cristina Hlevca, Gheorghe Nechifor, *Release of polyphenols from liposomes loaded with Echinacea purpurea* - Revista de Chimie, **2018**, Vol. 69, No. 9, pp. 2315-2316 (IF =1.605), ***autor corespondent**
5. **Fawzia Sha'at***, Ramona-Daniela Pavaloiu, Daniela-Crina Salceanu, Cristina Hlevca, Gheorghe Nechifor, *Evaluation of AML-VAL nanoparticles as combined therapy in cardiovascular disease*- Revista Materiale Plastice, **2018**, Vol. 54, No. 3, pp. 299-302, (I.F. = 1.393), ***autor corespondent**
6. **Fawzia Sha'at***, Ramona-Daniela Pavaloiu, Daniela-Crina Salceanu, Cristina Hlevca, Gheorghe Nechifor, *Formulation of polymeric multicomponent systems containing cardiovascular APIs* — Revista Materiale Plastice, **2018**, Vol. 55, No. 1, pp. 121-123 (I.F. = 1.393), ***autor corespondent**
7. Lucia Pirvu, **Fawzia Sha'at***, Luminita-Claudia Miclea, Tudor Savopol, Georgeta Neagu, Denisa Ioana Udeanu, Mihaela Georgeta Moisescu, *Polygonum bistorta L. Herba et flores. Polyphenols profile, antioxidant properties and cytotoxic effect on murine fibroblast cell line NIH3T3* - Revista Farmacia, **2017**, Vol. 65, No.4, pp. 571-576 (I.F = 1.348), ***autor corespondent**

LISTĂ ARTICOLE PUBLICATE BDI

1. **Fawzia Sha'at***, Ramona-Daniela Pavaloiu, Cristina Hlevca, Mousa Sha'at, Daniela Berger, Gheorghe Nechifor, *In vitro release kinetics of poorly water-soluble cardiovascular drugs from PEG - nanoparticles* – U.P.B. Sci. Bull., Series B, **2020**, Vol. 82, Iss. 1, pp. 103-112. ***autor corespondent**
2. Elena Mihai (Drăghici), Ramona-Daniela Păvăloiu, **Fawzia Sha'at**, Maria Pele, *Effect of various extraction methods on peanut protein extraction efficiency*, Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies, **2020**, Vol. XXIV, No. 1, 2020 ISSN 2285-1364, CD-ROM ISSN 2285-5521, ISSN Online 2285-1372, ISSN-L 2285-1364, pp.39-44
3. Ramona-Daniela Păvăloiu, **Fawzia Sha'at**, Mousa Sha'at, Gheorghe Nechifor, *Intracellular uptake study of polymeric nanoparticles loaded with cardiovascular drugs using confocal laser scanning microscopy* - Proceedings - The 24th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry session Polymer and Supramolecular Chemistry, **2020**, DOI: 10.3390/ecsoc-24-08427
4. Ramona-Daniela Păvăloiu, **Fawzia Sha'at**, Cristina Hlevca, Mousa Sha'at, Claudia Sevcenco, Maria Petrescu, Mihaela Eremia, Misu Moscovici, *Preliminary evaluation of pullulan nanoparticles loaded with valsartan*, **2020**, Proceedings - The 24th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry session Polymer and Supramolecular Chemistry, DOI:10.3390/ecsoc-24-08428
5. Lucia Pirvu, Bujor Albu, Sultana Nita, **Fawzia Sha'at**, Ramona-Daniela Pavaloiu, Cristina Bazdoaca, Adela Staras, Bianca Tihauan, Crina Maria Kameron, Alina Perisoara, *Epilobium hirsutum L. and Malva neglecta L. Propylene glycol extracts for cosmetic use; chemical composition, microbiological stability and diffusion aspects* – Sch. Acad. J. Pharm., **2019**, Vol. 8, No. 8, ISSN 2347-9531 (print), ISSN 2320-4206 (online), pp. 424-432
6. Corina Bubueanu, Ramona-Daniela Păvăloiu, **Fawzia Sha'at**, Angela Cășărică, *HPTLC phenolic compounds fingerprint and antioxidant activity of Sambucus ebulus leaves and fruit*, Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies, **2016**, Vol. XX, ISSN 2285-1364, CD-ROM ISSN 2285-5521, ISSN Online 2285-1372, ISSN-L 2285-1364, pp.243 – 247.

LISTĂ LUCRĂRI PREZENTATE ÎN CONFERINȚE ȘI SIMPOZIOANE NAȚIONALE ȘI INTERNAȚIONALE (selecție)

1. Ramona-Daniela Pavaloiu, **Fawzia Sha'at**, Georgeta Neagu, Radu Albuiescu, Mousa Sha'at, Cristina Hlevca, Gheorghe Nechifor, Daniela Berger, *In vitro cytotoxicity of polymeric nanoparticles coated with lipid layer loaded with cardiovascular drugs*, PRIOCHEM XVI 28-30.10.2020, ICECHIM, E-Poster
2. Ramona-Daniela Pavaloiu, **Fawzia Sha'at**, Mousa Sha'at, Gheorghe Nechifor, *Intracellular uptake study of polymeric nanoparticles loaded with cardiovascular drugs using confocal laser scanning microscopy*, The 24th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry session Polymer and Supramolecular Chemistry, 14 November **2020**, doi:10.3390/ecsoc-24-08427. 15.11.2020-15.12.2020 (conferinta online)
3. **Fawzia Sha'at**, Ramona-Daniela Pavaloiu, Cristina Hlevca, Claudia Sevcenco, Maria Petrescu, Mihaela Eremia, Misu Moscovici, *The preliminary results of pullulan nanoparticles loaded with 5-fluorouracil*, PRIOCHEM XVI 28-30.10. **2020**, ICECHIM (conferinta online), Proceedings, 2020, Vol. 57, Iss. 1, No. 4, ISSN 2504-3900, E-Poster
4. Ramona-Daniela Păvăloiu, **Fawzia Sha'at***, Corina Bubueanu, Georgeta Neagu, Cristina Hlevca, Mousa Sha'at and Gheorghe Nechifor, *Antioxidant Properties and Cytoprotective Effect Against H₂O₂ - Induced Cytotoxicity in Mouse Fibroblasts Cells (L-929) of Horseradish Leaves*, 15th International Symposium "Priorities of Chemistry for a Sustainable Development" PRIOCHEM, Bucharest, Romania, 30 Octombrie–1 Noiembrie **2019**, abstract publicat în Proceedings 2019, 29, 30; p. 209-210doi:10.3390/proceedings2019029030, Poster, *autor corespondent
5. Ramona-Daniela Păvăloiu, **Fawzia Sha'at**, Lucia Pirvu, Cristina Hlevca, Mousa Sha'at, Gheorghe Nechifor, *Design and evaluation of innovative lipid nanovesicles containing Centaurea cyanus L. extract*, 4th International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Self, Albena, Bulgaria, 29 mai - 01 iunie **2019**, Book of Abstracts, ISSN: 2682-9487, p.272, Poster.
6. **Fawzia Sha'at***, Ramona-Daniela Pavaloiu, Daniela-Crina Salceanu, Cristina Hlevca, Gheorghe Nechifor, *Formulation of polymeric multicomponent systems containing cardiovascular APIs* - 54th International Conference on Medicinal Chemistry - Interfacing Chemical Biology and Drug Discovery - RICT 2018, Strasbourg, Franta, 04 -06 iulie **2018**, *autor, corespondent
7. Ramona-Daniela Pavaloiu, **Fawzia Sha'at**, Corina Bubueanu, Cristina Hlevca, Daniela Berger, *ENG-LPHNp – Engineering of lipid-polymer nanoparticles loaded with cardiovascular drugs for biomedical applications*, 28th International Conference and Expo on Nanosciences and Nanotechnology, Barcelona, Spania, 26-28

Nanosisteme multicomponente cu aplicații în patologiile cu risc cardio-cerebro-vascular

noiembrie 2018, publicat în Journal of Nanomedicine & Nanotechnology, Vol.9, p.81, ISSN 2157-7439, <https://www.longdom.org/conference-abstracts-files/2157-7439-C10-095-010.pdf>, Barcelona, Poster.

8. **Fawzia Sha'at***, Ramona-Daniela Pavaloiu, Cristina Hlevca, Gheorghe Nechifor, *Release kinetics of amlodipine besylate and valsartan from PLGA-based nanoparticles*, PRIOCHEM, București, 10-12 octombrie 2018, Poster, *autor corespondent
9. **Fawzia Sha'at***, Ramona-Daniela Pavaloiu, Daniela-Crina Salceanu, Cristina Hlevca, Gheorghe Nechifor, *Evaluation of AML-VAL nanoparticles as combined therapy in cardiovascular disease*, Congresul Național de Farmacie din România 2018 (CNFR 2018), București, 26-29 septembrie 2018, ISSN: 2537-2823/ISSN-L:25372823, pag 181, E-poster ID 66, * autor corespondent
10. **Fawzia Sha'at ***, Ramona-Daniela Pavaloiu, Cristina Hlevca, Mousa Sha'at, Daniela Berger, Gheorghe Nechifor, *Cardiovascular APIs encapsulated into biodegradable matrix: in vitro evaluation on drug release kinetics*, 21st Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Constanta-Mamaia, România 4 – 7 septembrie, 2019, Poster, * autor corespondent

LISTA DE PROIECTE (responsabil proiect/ membru colectiv de cercetare) (selecție)

1. Contract subsidiar D nr. 18/03.07.2019 POC - *Produse topice pe bază de venin de viperă și ingrediente active vegetale*”(responsabil de proiect) - Iulie 2019 – iunie 2021
2. Program NUCLEU – PN 16-27-02-01, contract nr. 6N/2016 - *De la generic la suprageneric: obținerea și caracterizarea unor amestecuri multicomponente nanostructurate cu acțiune în afecțiunile cardiovasculare*(responsabil proiect) - 2016 – 2018
3. Program NUCLEU - PN 19-41-04-01, contract nr. 34 N/2019, *Sisteme terapeutice nanostructurate pe baza de biopolimeri microbieni cu eliberare controlată/ dirijată a substantelor antitumorale*, (membru colectiv de cercetare) - 2019 - 2022
4. Proiect Experimental Demonstrativ - PN-III-P2-2.1-PED-2019-2125, *Formulă terapeutică inovativă destinată inflamațiilor osteo-articulare* (membru colectiv de cercetare) - 2020- prezent
5. Proiect complex realizat în consorții CDI, PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0407, Proiect component nr.39/2018 - *Proiectarea unor bioconjugate cu acțiune țintită pentru tratarea bolilor inflamatorii intestinale*,(membru colectiv de cercetare) - 2018 - 2020
6. Proiect complex realizat în consorții CDI (PCCDI) - PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017, *Dezvoltarea unor platforme avansate de analiza și modelare a sistemelor biologice complexe*(membru colectiv de cercetare) - 2018 - 2020
7. NUCLEU - PN 1627-03-02, contract nr. 6N/2016, *Sisteme de transport și de cedare a unor extracte naturale cu potențial antioxidant pe bază de vezicule lipidice pentru administrare topică*, (membru colectiv de cercetare) - 2016 –2018
8. Contract subsidiar D nr.38/ 08.11.2017 POC, *Preparate cosmetice naturale pe baza de rasini organice și ingrediente de origine vegetala*, (membru colectiv de cercetare) - 2016 - 2019
9. ADER contract nr. 14.1.2/06.10.2015, *Studii și cercetări privind riscurile și beneficiile consumului de suplimente alimentare pe bază de plante medicinale și aromatice* (membru colectiv de cercetare) - 2015 - 2018.