



Universitatea Politehnică din București  
Școala Doctorală a Facultății de Chimie Aplicată și  
Știința Materialelor  
Domeniul Inginerie Chimică



# Dezvoltarea de sisteme cu eliberare controlată pentru valorificarea unor compuși naturali

---

## *REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT*



Doctorand,

Ing. Ana-Maria-Claudia BREZOIU

Conducător științific:

Prof. dr. ing. Daniela BERGER

Anul 2021

București

**Cuvinte-cheie:** polifenoli, silice mezoporoasă, ulvan, irinotecan, eliberare controlată, acțiune țintită, activitate antioxidantă, HPLC-PDA, stabilitate chimică.

## Cuprins

<b>I. STUDIU DE LITERATURĂ.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Silicea mezoporoasă ca transportor în sistemele cu eliberare controlată.....</b>	<b>10</b>
1.1. Introducere.....	10
1.2. Principalele tipuri de silice mezoporoasă .....	14
1.3. Procedee de sinteză a silicei mezoporoase.....	15
1.4. Modificarea suprafeței silicei.....	17
1.4.1. Modificarea suprafeței prin funcționalizare .....	17
1.4.2. Modificarea silicei cu heteroatomi.....	19
1.5. Utilizare silicei în sistemele cu eliberare controlată .....	20
1.6. Biocompatibilitate și toxicitate a silicei mezoporoase .....	21
<b>2. Tescovina de struguri .....</b>	<b>24</b>
2.1. Principalii compuși polifenolici prezenți în extractele din tescovină de struguri .....	25
2.2. Procedee de obținere a extractelor polifenolice din tescovină de struguri .....	26
2.2.1. Extracția convențională din tescovină de struguri.....	27
2.2.2. Extracția asistată de ultrasunete din tescovină de struguri .....	27
2.2.3. Extracția asistată de microunde din tescovină de struguri.....	29
2.2.4. Extracția cu fluide supercritice din tescovină de struguri .....	30
2.3. Încapsulare a extractelor polifenolice din tescovină de struguri .....	31
2.4. Acțiune biologică a extractelor din tescovină de struguri .....	33
2.4.1. Acțiune antioxidantă a extractelor polifenolice din tescovina de struguri .....	33
2.4.2. Acțiune chemopreventivă a extractelor polifenolice din tescovina de struguri.....	34
2.4.3. Acțiune antiinflamatoare a extractelor polifenolice din tescovina de struguri .....	35
2.4.4. Acțiune antimicrobiană și antivirală a extractelor polifenolice din tescovina de struguri.....	35
2.4.5. Acțiunea extractelor polifenolice din tescovina de struguri în tratamentul diabetului .....	36
2.4.6. Acțiunea extractelor polifenolice din tescovina de struguri în tratamentul bolilor cauzate de îmbătrânirea creierului.....	36
2.4.7. Acțiunea extractelor polifenolice din tescovina de struguri în tratamentul hipertensiunii arteriale și al bolilor cardiace asociate.....	37
<b>3. Aronia melanocarpa .....</b>	<b>38</b>
3.1. Principalii compuși polifenolici din extractele din aronia .....	39
3.2. Metode de obținere a extractelor polifenolice din aronia.....	42
3.2.1. Extracția convențională din aronia.....	42
3.2.2. Extracția asistată de ultrasunete din aronia .....	43
3.2.3. Extracția asistată de microunde din aronia.....	43
3.2.4. Extracția la presiuni înalte din aronia.....	44
3.3. Modalități de încapsulare a extractelor de <i>Aronia</i> .....	45
3.4. Acțiune biologică a extractelor polifenolice din aronia .....	45
3.4.1. Activitate antioxidantă a extractelor polifenolice din aronia .....	45
3.4.2. Activitate antiinflamatoare a extractelor polifenolice de aronia .....	48
3.4.3. Activitate antimicrobiană a extractelor polifenolice de aronia.....	48
3.4.4. Activitate gastro-protectoare și antidiabetică a extractelor polifenolice de aronia.....	49
3.4.5. Activitate cardio-protectoare a extractelor polifenolice de aronia .....	50
3.4.6. Activitate anti-cancer a extractelor polifenolice de aronia.....	51

<b>4. Stabilitatea extractelor polifenolice.....</b>	<b>52</b>
<b>5. Irinotecanul ca agent citostatic.....</b>	<b>53</b>
5.1. Asigurarea acțiunii țintite cu ajutorul restului folat .....	56
5.2. Asigurarea acțiunii țintite cu ajutorul ulvanului .....	58
5.3. Asigurarea acțiunii țintite cu ajutorul direcționării magnetice .....	59
<b>Bibliografie .....</b>	<b>63</b>
<b>II. CONTRIBUȚII ORIGINALE.....</b>	<b>75</b>
<b>Justificarea alegerii temei.....</b>	<b>76</b>
<b>Obiectivele tezei de doctorat.....</b>	<b>77</b>
<b>1. Materiale și metode .....</b>	<b>78</b>
1.1. Materiale folosite .....	78
1.2. Metode de caracterizare spectrofotometrică a extractelor polifenolice.....	78
1.3. Determinarea compoziției prin cromatografie de lichide de înaltă performanță.....	82
1.4. Caracterizarea extractelor obținute din alge verzi.....	83
1.5. Caracterizarea suporturilor și extractelor încorporate.....	85
1.6. Determinarea activității antioxidante pe solid .....	86
<b>2. Caracterizarea extractelor polifenolice etanolice din tescovină de struguri și încorporarea acestora în matrici de silice mezoporoasă .....</b>	<b>89</b>
2.1. Extracte polifenolice din tescovină de struguri. Valorificare prin încorporarea acestora în matrici de silice mezoporoasă.....	89
2.1.1. Obținerea extractelor polifenolice în etanol .....	89
2.1.2. Caracterizarea extractelor polifenolice în etanol.....	90
2.1.3. Caracterizarea materialelor ce conțin extractul etanolic încorporat .....	97
2.1.4. Determinarea activității de captare de radicali liberi a extractelor etanolice încorporate .....	100
2.1.5. Evaluarea citocompatibilității <i>in vitro</i> a extractelor etanolice.....	105
2.2. Obținerea unei stabilități îmbunătățite a extractelor polifenolice din tescovina de struguri prin încorporarea în matrici de tip silice mezoporoasă.....	107
2.2.1. Obținerea extractelor polifenolice din tescovină CS .....	108
2.2.2. Caracterizarea extractelor polifenolice din tescovină CS.....	109
2.2.3. Caracterizarea materialelor ce conțin extract CS încorporat .....	113
2.2.4. Determinarea activității de captare a radicalilor liberi a extractului CS liber și încorporat în matrici mezoporoase.....	116
2.3. Concluzii parțiale referitoare la extractele alcoolice din tescovină de struguri .....	119
<b>3. Efectul încorporării unui extract hidroalcoolic din tescovină de struguri în matrici de silice mezoporoasă funcționalizată asupra biocompatibilității și a activității antioxidante .....</b>	<b>121</b>
3.1. Obținerea extractelor polifenolice hidro-etanolice .....	121
3.2. Caracterizarea extractelor polifenolice .....	121
3.3. Caracterizarea suporturilor de tip silice pură și funcționalizată .....	129
3.4. Caracterizarea materialelor ce conțin extracte încorporate .....	135
3.5. Activitatea de captare de radicali liberi ale extractelor încorporate.....	136
3.6. Profilele de eliberare a polifenolilor din suporturi de tip silice MCM-41 pură sau funcționalizată..	138
3.7. Evaluarea viabilității celulare și a nivelului de stres oxidativ .....	144
3.8. Concluzii parțiale referitoare la extractele hidro-alcoolice .....	148

<b>4. Evaluarea biologică a extractului Aronia liber și încorporat în matrici de silice mezoporoasă .....</b>	<b>150</b>
4.1. Obținerea extractului polifenolic de aronia.....	150
4.2. Caracterizarea extractului polifenolic de aronia .....	150
4.3. Obținerea și caracterizarea extractului de <i>Aronia</i> încorporat în matrici de silice mezoporoasă .....	153
4.4. Determinarea activității antimicrobiene.....	157
4.5. Determinarea efectelor citotoxice.....	158
4.6. Determinarea activității antimigratorie .....	161
4.7. Concluzii parțiale referitoare la extractele de aronia .....	161
<b>5. Transportori pe bază de silice mezoporoasă pentru irinotecan în vederea țintirii țesutului tumoral ...</b>	<b>162</b>
5.1. Asigurarea acțiunii țintite cu ajutorul restului folat .....	162
5.1.1. Obținerea suporturilor mezoporoase și a materialelor pe bază de irinotecan .....	162
5.1.2. Caracterizarea suporturilor și a materialelor pe bază de irinotecan.....	164
5.1.3. Experimente de eliberare <i>in vitro</i> a irinotecanului din suporturile tip SBA-15.....	168
5.1.4. Evaluarea biologică a nanoparticulelor încărcate cu irinotecan .....	171
5.2. Asigurarea acțiunii țintite cu ajutorul ulvanului .....	174
5.2.1. Extracția și caracterizarea ulvanului .....	174
5.2.2. Obținerea suporturilor cu ulvan și a materialelor pe bază de irinotecan încorporat .....	180
5.2.3. Caracterizarea suporturilor de tip silice-ulvan .....	182
5.2.4. Experimentele de eliberare <i>in vitro</i> a irinotecanului din suporturile silice-ulvan .....	185
5.3. Asigurarea acțiunii țintite prin direcționare magnetică.....	186
5.3.1. Obținerea suportului modificat cu nanoparticule de oxid de fier (III) și a materialului compozit pe bază de irinotecan .....	186
5.3.2. Caracterizarea FeMCMB și a materialului pe bază de irinotecan .....	187
5.3.3. Eliberarea <i>in vitro</i> a irinotecanului din suportul FeMCMB .....	189
5.4. Concluzii parțiale referitoare la sistemele pe bază de irinotecan .....	190
<b>Concluzii generale și perspective .....</b>	<b>192</b>
<b>Listă de publicații .....</b>	<b>199</b>
<b>Bibliografie .....</b>	<b>201</b>

## Introducere

Teza de doctorat este constituită din două părți: un studiu de literatură structurat în cinci capitole și o parte de contribuții originale alcătuită tot din cinci capitole. În primul capitol al primei părți se prezintă utilizarea silicei mezoporoase ca transportor în sistemele cu eliberare controlată, fiind vizate aspecte referitoare la principalele tipuri, procedee de sinteză, modalități de funcționalizare a suprafeței interioare a pereților porilor cu heteroatomi sau prin modificare chimică, utilizări și respectiv aspecte privind biocompatibilitatea acestora. În următoarele două capitole se găsesc informații referitoare la materiile prime folosite pentru obținerea extractelor polifenolice, tescovina de struguri și fructele de *Aronia melanocarpa*, principalii compuși polifenolici existenți în extractele obținute din acestea, metode folosite pentru extracția polifenolilor, raportări anterioare privind încapsularea extractelor și respectiv referitoare la activitatea lor biologică (antioxidantă, chemopreventivă, antiinflamatoare, antimicrobiană, antidiabetică etc.). Capitolul patru al tezei prezintă principalele studii efectuate pe fitocompnenți sau pe extracte, în vederea determinării stabilității acestora. În ultimul capitol au fost prezentate informații privind utilizarea irinotecanului, un citostatic de semisinteză, în vederea realizării acțiunii țintite prin trei strategii diferite.

Partea de contribuții originale începe cu descrierea metodelor utilizate pentru caracterizarea extractelor, suporturilor și materialelor ce conțin extract încorporat. Al doilea capitol ilustrează obținerea unor extracte etanolice din tescovină de struguri, în comparație cu o pulbere comercială de coji de struguri, iar extractele cu cele mai bune proprietăți antioxidante au fost încorporate în silice mezoporoasă modificată cu heteroatomi, pentru care s-a dovedit o stabilitate ridicată prin nano-constrângere în mezopori. Următorul capitol prezintă obținerea unor extracte hidro-alcoolice din tescovină din soiul Mamaia pentru care au fost determinate profilele chimice și activitatea antioxidantă. Extractul hidro-alcoolic cu proprietățile cele mai bune a fost încorporat în silice de tip MCM-41 funcționalizată cu grupări organice. S-a determinat activitatea antioxidantă prin metodele ABTS și DPPH pentru probe solide, precum și nivelul de specii reactive de oxigen la nivel celular (NIH3T3). Capitolul patru prezintă obținerea unui extract etanolic din fructe de aronia care s-a dovedit a avea proprietăți antioxidante și antimicrobiene îmbunătățite prin încapsularea în Zn-MCM-41 și antitumorale pe linia celulară umană de melanom A375 și mult mai puțin toxice pe linia de celule sănătoase keratinocite umane HaCaT. Ultimul capitol cuprinde rezultate legate de dezvoltarea unor sistemele cu eliberare controlată a irinotecanului. Au fost propuse suporturi inovative, modificate cu grupare folat, cu ulvan, o polizaharidă sulfonată naturală, sau respectiv o silice de tip MCM-41 care a avut depusă pe suprafața nanoparticule cristaline de oxid de fier (III), pentru a facilita modularea cineticii de eliberare a citostaticului.

## I. STUDIU DE LITERATURĂ

### 1. Silicea mezoporoasă ca transportor în sistemele cu eliberare controlată

Materialele pe bază de silice mezoporoasă sunt utilizate ca suporturi în sistemele cu eliberare controlată de medicamente pe baza biocompatibilității [1, 2], a capacității de adsorbție ridicată (porozitate mare, care permite înglobarea unei cantități mari de agent terapeutic), posibilitatea modificării suprafeței, care datorită prezenței grupărilor silanice de pe suprafață pot fi implicate în formarea de legături cu grupări organice și astfel se poate realiza adsorbția controlată a moleculelor de medicament, dar și eliberarea progresivă a acestora [3-5].

## **2. Tescovina de struguri**

Tescovina de struguri, un amestec de coji, sâmburi și teci, care rezultă în urma presării strugurilor în timpul procesului de producție a vinului, reprezintă un produs secundar abundent, constituind aproximativ 20-30%gr. din strugurii procesați [6, 7].

În timpul procesului de vinificație, zaharurile din struguri sunt convertite în alcool etilic, dar compușii bioactivi, polifenolii, nu sunt extrem de afectați în acest proces, ceea ce conduce la o păstrare a conținutului de polifenoli în proporție de circa 70% din cantitatea inițială în tescovină [6, 8, 9]. Astfel, aceasta reprezintă un produs secundar cu concentrații ridicate de compuși polifenolici variați, dar neomogen distribuiți [10, 11].

## **3. *Aronia melanocarpa***

Principalii compuși fenolici prezenți în extractele de *Aronia* sunt acizi fenolici din clasa acizilor hidroxicinamici: acidul clorogenic (acidul 3-cafeoilchinic, 23,12% din conținutul total de polifenoli) și acidul neoclorogenic (acidul 5-cafeoilchinic, 11,23% din conținutul total de polifenoli), flavonoide: antociani, proantocianidine, flavonoli și catechine. Din categoria flavonol glicozidelor fac parte quercitin-3-glicozida și quercitin-3-galactozida, care reprezintă circa 10% din conținutul total de polifenoli [12]. Din categoria antocianilor în extractele de *Aronia* se regăsesc cianidin glicozidele (aproximativ 57% din conținutul total de polifenoli), dintre care cei mai importanți compuși sunt: cianidin 3-*O*-galactozida și cianidin 3-*O*-arabinozida [13].

## **4. Stabilitatea extractelor polifenolice**

Eficiența extractelor polifenolice este determinată de menținerea stabilității chimice, a bioactivității și biodisponibilității compușilor ce se găsesc în acestea [14].

În general, polifenolii sunt instabili în timpul procesării alimentelor, a distribuției sau păstrării lor, sau ulterior, după ingerare, în tractul gastrointestinal, prin urmare activitatea și implicit beneficiile lor asupra sănătății devin limitate. Din nefericire, aceștia suferă procese de oxidare care conduc la apariția unei culori brune și/sau a unor mirosuri neplăcute, cu o pierdere semnificativă a activității antioxidante [15].

## **5. Irinotecanul ca agent citostatic**

Irinotecanul, un produs de semi-sinteză obținut pe baza alcaloidului natural camptotecină, este un inhibitor al topoizomerazei I care interferează cu etapa de replicare a ADN-ului, mai precis a duplicării acestuia. Medicamentul cationic este un agent antineoplazic utilizat încă din anul 1994 pentru tratamentul diferitor tipuri de cancer și tumori solide (rectal, cancer de colon, ovarian, cancer cu celule mici și a glioblastomului) [16, 17].

Principalul impediment al utilizării irinotecanului în tratamentul diferitor tipuri de cancer este reprezentat de o toxicitate ridicată care conduce la apariția diferitor efecte adverse: neutropenie [18], diaree severă care determină o deshidratare puternică și chiar moarte [17].

Un sistem cu eliberare controlată ideal pentru agenții anticancerigeni trebuie proiectat în așa fel încât să îmbunătățească semnificativ tratamentele obișnuite ce folosesc medicamentul ca atare, având rol protector pentru a preveni degradarea medicamentului, ceea ce asigură o concentrație mai mare de medicament care ajunge la locul tumorii. Mai mult decât atât, nanoparticulele trebuie să fie sintetizate astfel încât să asigure o selectivitate pentru celulele tumorale și să se acumuleze în acestea în vederea reducerii efectelor negative la nivelul celulelor sănătoase [19].

## II. Contribuții originale

### Justificarea alegerii temei

În cadrul tezei de doctorat „*Dezvoltarea unor sisteme cu eliberare controlată pentru valorificarea unor compuși naturali*” au fost aplicate atât cunoștințe din domeniul ingineriei chimice, cât și din domenii conexe precum biomedicina, prin evaluarea biocompatibilității, a activității antioxidante sau a citotoxicității sistemelor propuse.

Resursele naturale conțin numeroși fitocompuși, care pot prezenta numeroase efecte biologice benefice precum antioxidant, antiinflamator, antidiabetic, antitumoral etc. În ultima perioadă se acordă o atenție deosebită compușilor naturali deoarece aceștia prezintă proprietățile benefice ce nu sunt asociate cu efectele adverse extrem de comune în cazul medicamentelor de sinteză.

Totuși, extractele încă nu sunt utilizate la adevăratul lor potențial deoarece acestea prezintă compoziție complexă și variabilă în funcție de condițiile de izolare și natura materialului vegetal ce depinde de soi, condițiile climatice și calitatea solului. De asemenea, efectele biologice ale extractelor încă nu sunt studiate îndeajuns și prin urmare este dificilă utilizarea acestora luând în considerare faptul că sunt mult mai sensibile la factorii de mediu și se pot degrada ușor ceea ce determină diminuarea proprietăților terapeutice.

În acest sens, scopul acestei lucrări a presupus atât dezvoltarea unor sisteme relativ simple de extract polifenolic – transportor de tip silice mezoporoasă în vederea creșterii stabilității în timp a compușilor naturali, cât și modelarea proprietăților suprafeței silicei pentru a conduce la eliberare controlată a fitocompușilor din suport, sau diminuarea citotoxicității asociate în cazul utilizării unui citostatic prin folosirea unor transportori care să asigure acțiunea țintită a țesutului tumoral. Mai mult, s-a dovedit o acțiune sinergică a suportului și compușilor biologic activi rezultând sisteme cu activități biologice îmbunătățite.

Astfel, au fost propuse posibilități de încorporare a extractelor polifenolice preparate atât din reziduuri ale industriei vinului, cât și dintr-o materie primă mai puțin utilizată, fructele de aronia, în matrici de silice mezoporoase pentru creșterea stabilității și conservarea activității antioxidante pe o durată de timp mai îndelungată. Obținerea extractului polifenolic bogat în fitocompuși sub formă de pulbere, îl face să fie mult ușor de depozitat și manipulat.

În ultima parte a tezei se prezintă dezvoltarea unor sisteme cu eliberarea controlată și țintită a irinotecanului, un citostatic produs prin semi-sinteză. În acest sens, pentru asigurarea acțiunii țintite a medicamentului și scăderea efectelor adverse au fost abordate trei direcții. O primă direcție constă în asigurarea acțiunii țintite a țesutului tumoral prin legarea de suportul de silice a unui rest folat, care să faciliteze accesul preferențial în celulele tumorale, o a doua strategie a fost utilizarea unei polizaharide sulfonate naturale extrase din alge verzi, ulvanul, care să favorizeze internalizarea în celulele tumorale și ultima direcție vizată a fost asigurarea acțiunii țintite prin direcționare magnetică, caz în care a fost proiectat un suport cu suprafața interioară a porilor decorată cu nanoparticule de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  care poate fi aplicat pentru eliberarea controlată de irinotecan pe durate lungi.

## Obiectivele tezei de doctorat

- Sinteza și caracterizarea suporturilor de tip silice mezoporoasă pură, modificată cu heteroatomi sau funcționalizată cu grupări organice
- Variația parametrilor de extracție (solvent, materie primă, metodă de extracție) în vederea obținerii de extracte cu un conținut cât mai ridicat de compuși benefici
- Determinarea profilului chimic al extractelor polifenolice din tescovină de struguri și din fructe de aronia
- Dezvoltarea a două proceduri pentru determinarea activității antioxidante pe probe solide prin metode simple și reproductibile
- Evaluarea stabilității extractelor polifenolice în timp
- Dezvoltarea de nanoplatforme de tip silice mezoporoasă pentru eliberarea controlată a polifenolilor prin modelarea interacțiunilor dintre suprafața silicei și fitocompuneții din extract
- Dezvoltarea unor sisteme transportor-extract pentru păstrarea sau chiar îmbunătățirea activității biologice a extractelor
- Valorificarea unor compuși naturali în vederea asigurării acțiunii țintite a țesutului tumoral
- Modelarea cineticii de eliberare a agentului citostatic ales drept model din suporturile de tip silice mezoporoasă propuse

### 1. Materiale și metode

Extractele polifenolice au fost caracterizate utilizând mai multe metode spectrofotometrice (Shimadzu UV-1800) pentru determinarea conținutului total de substanțe reducătoare, de polifenoli, flavonoide și antociani, iar profilul chimic al extractelor a fost determinat prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC, Shimadzu Nexera 2).

Activitatea antioxidantă a materialelor ce conțin extracte încorporate (metoda DPPH) a fost evaluată printr-o procedură adaptată pentru probe solide elaborată în cadrul acestei teze de doctorat. Astfel, considerând că silicea mezoporoasă are o porozitate ridicată și astfel poate absorbi molecule organice (radicali liberi DPPH), dar și că interacția dintre un material și radicalii din soluție este una slabă, a fost determinată activitatea antioxidantă a extractului, după 24 h de incubare în soluție etanolică de DPPH, în triplicat și comparată cu cea a extractului liber, a suportului corespunzător în aceeași cantitate ca în materialul ce conține extractul încorporat, folosind drept control degradarea în timp a soluției de DPPH.

### 2. Caracterizarea extractelor polifenolice etanolice din tescovină de struguri și încorporarea acestora în matrici de silice mezoporoasă

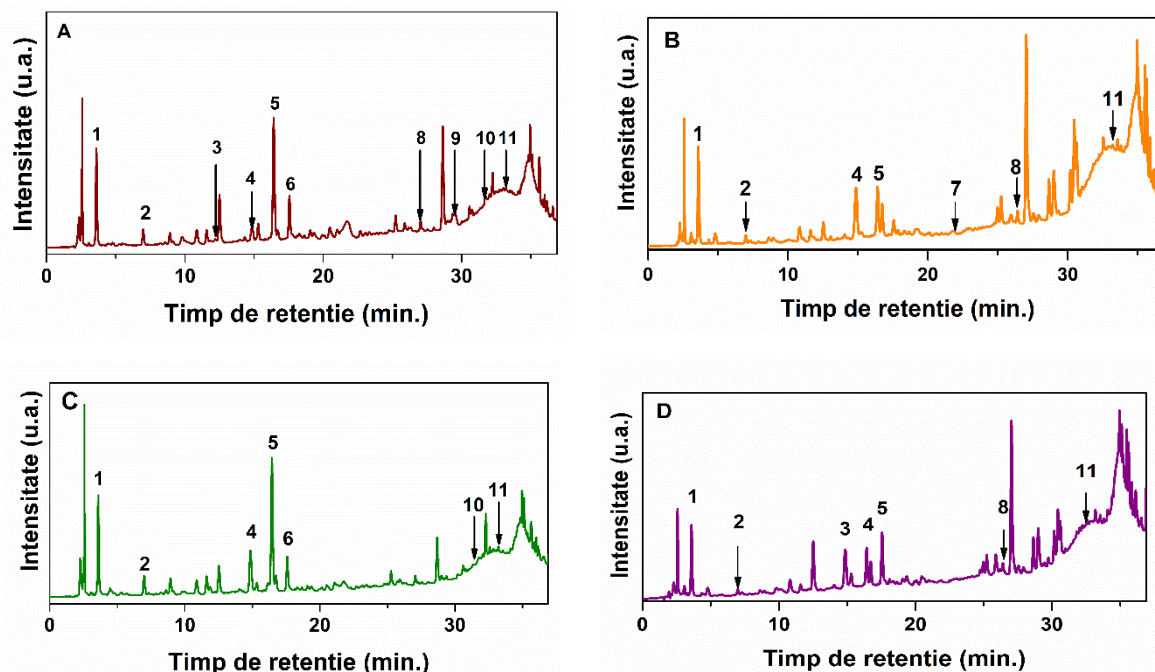
Au fost puse la punct metodele spectrofotometrice utilizate pentru caracterizarea extractelor polifenolice, determinarea compoziției acestora prin cromatografie de lichide de înaltă performanță, dar și dezvoltarea unei proceduri pentru testarea activității antioxidante a extractelor încorporate în matrici mezoporoase [20]. Apoi, este prezentată și analiza fracțiilor corespunzătoare fiecărei din cele trei etape de extracție dar și a extractului global atât în cazul metodei convenționale, cât și pentru extracția în prezență de microunde (MW), dar și determinarea stabilității extractelor uscate pe baza analizelor DSC [21].

#### 2.1. Extracte polifenolice din tescovină de struguri. Valorificare prin încorporarea acestora în matrici de silice mezoporoasă

Treisprezece substanțe dintre standardele disponibile au fost identificate în extractele preparate sau în extractele analizate după patru luni. Cromatogramele extractelor analizate imediat după preparare sunt prezentate în figura 1.



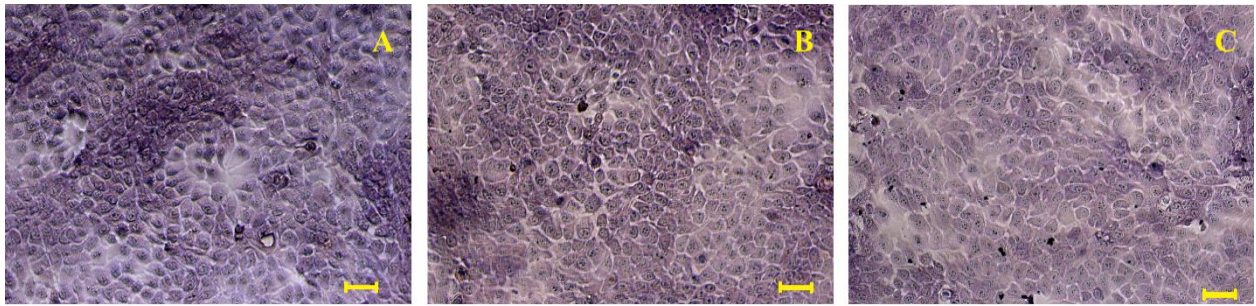
În toate extractele au fost regăsite cantități ridicate (0,462 – 1,171 mg/g extract) de acid galic, acid vanilic (0,368-1,088 mg/g extract), acid siringic (0,339-2,031 mg/g extract) și acid protocatehic (0,104-0,489 mg/g extract), dar și concentrații mici (0,019-0,083 mg/g extract) de *trans*-resveratrol. Extracția în prezență de MW a determinat scăderea conținutului de acid galic, acid protocatehic, acid vanilic, acid siringic și acid *trans*-*p*-coumaric (nedetectat) și creșterea concentrației de hidrat de rutin, (-) epicatechină și *trans*-resveratrol.



**Figură 1.** Cromatograma la 279 nm pentru extracte din **A**- Cabernet Sauvignon (CS), **B**-coji de struguri (GS, Conv), **C**- Fetească Neagră (FN) și **D**- coji de struguri (GS, MW) (1- acid galic; 2- acid protocatehic; 3-hidrat de catechină; 4-acid vanilic; 5- acid siringic; 6- (-) epicatechină; 7- acid *p*-coumaric; 8-hidrat de rutin; 9-clorură de pelargonidină; 10- miricetină; 11- *trans*-resveratrol).

Citocompatibilitatea *in vitro* a extractelor CS și GS libere și încorporate în matricea de silice mezoporoasă modificată cu oxid de zinc, Zn-MCM-41, și oxid de magneziu, Mg-MCM-41 a fost testată pe o linie de keratinocite umane normale celule HaCaT, prin metoda MTT pentru a evalua activitatea metabolică a celulelor după 24 h. Rezultatele au evidențiat o citocompatibilitate ridicată, similară pentru GS sau mai mare – efect regenerativ pentru CS, care se corelează cu activitatea antioxidantă. Viabilitatea celulară a fost dependentă de tipul de funcționalizarea a suportului de tip MCM-41. În timp ce modificarea cu ZnO a suportului MCM-41 a redus ușor procentul de celule viabile în comparație cu controlul ( $94 \pm 3\%$ ), funcționalizarea cu MgO a diminuat semnificativ procentul de celule viabile ( $69 \pm 6\%$ ).

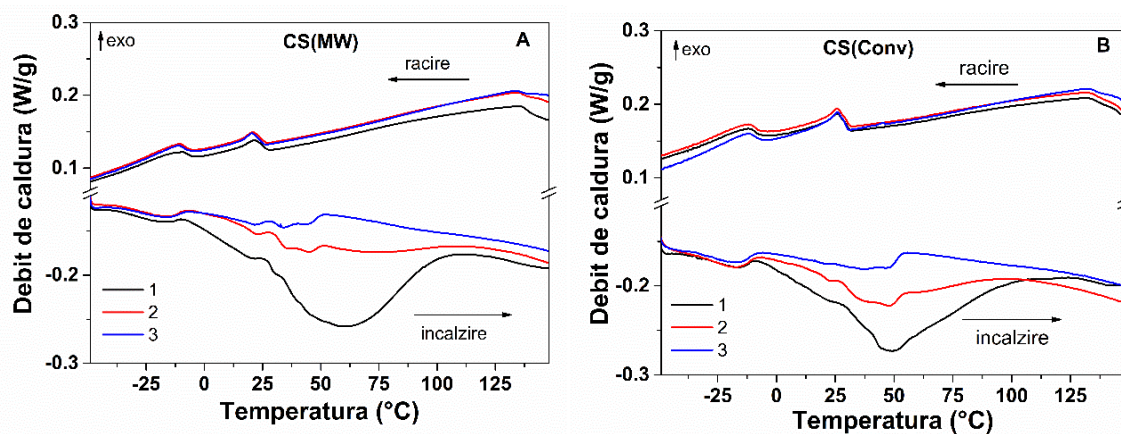
Extractul CS liber și încorporat în suportul Zn-MCM-41 au fost evaluate și în ceea ce privește efectele asupra morfologiei celulare prin colorare cu reactiv Giemsa. S-a observat o morfologia normală, cuboidală pentru toate monostraturile celulare tratate cu extractul liber sau încapsulat, similar controlului, keratinocitele netratate (Fig. 2).



**Figură 2.** Morfologia keratinocitelor normale: **A** – Control, **B** - Extract Cabernet Saugvinon, **C** – Extract încorporat, CS@Zn-MCM-41. Scală: 50  $\mu$ m.

## 2.2. Obținerea unei stabilități îmbunătățite a extractelor polifenolice din tescovina de struguri prin încorporarea în matrici de tip silice mezoporoasă

Analizele de calorimetrie diferențială cu scanare (CDS, Mettler Toledo DSC 3+) (Fig. 3) înregistrate pentru extractele uscate au dovedit că acestea au fost stabile până la 150°C. Evaporarea solventului rezidual a fost remarcată în timpul primului ciclu de încălzire pentru ambele extracte în intervalul de temperatură 25 – 100 °C. Acest efect endoterm este mult mai puțin semnificativ în al doilea ciclu de încălzire, fiind absent în cel de-al treilea ciclu, indicând o eliminare completă a solventului. De asemenea, se pot observa două tipuri de transformări reversibile la -7 °C și între 15–50 °C, care nu afectează stabilitatea extractelor.



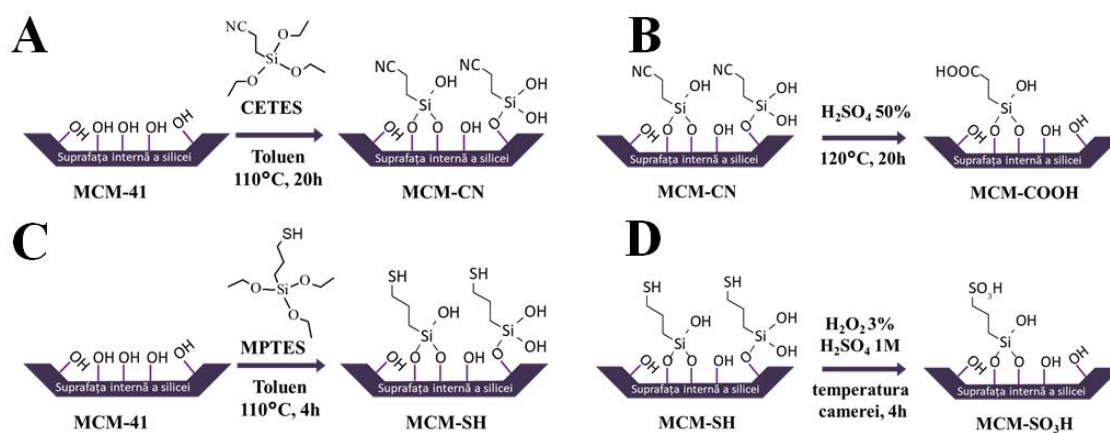
**Figură 3.** Analiza CDS pentru extractele libere de CS(MW) (**A**) și CS(Conv) (**B**) uscate la vid, fiind prezentate cele trei cicluri de încălzire-răcire.

## 3. Efectul încorporării unui extract hidroalcoolic din tescovină de struguri în matrici de silice mezoporoasă funcționalizată asupra biocompatibilității și a activității antioxidante

În acest capitol este prezentat studiul privind încorporarea unui extract polifenolic hidroalcoolic din tescovină de struguri, obținută în urma procesului de vinificație a unui vin rosé, în mezoporii silicelor de tip MCM-41 funcționalizate cu grupări organice. S-a investigat modalitatea prin care proprietățile acide ale suprafeței silicei influențează recuperarea compușilor polifenolici din suportul de tip silice în soluție tampon fosfat pH 5,7. De asemenea, a fost demonstrată o bună citocompatibilitate (procedura MTS) și o activitate antioxidantă *in vitro* pe fibroblaste de șoarece, linia celulară NIH3T3 pentru materialele cu

extract încorporat selectate care ar putea fi utilizate în formulări cosmetice sau nutraceutice [22].

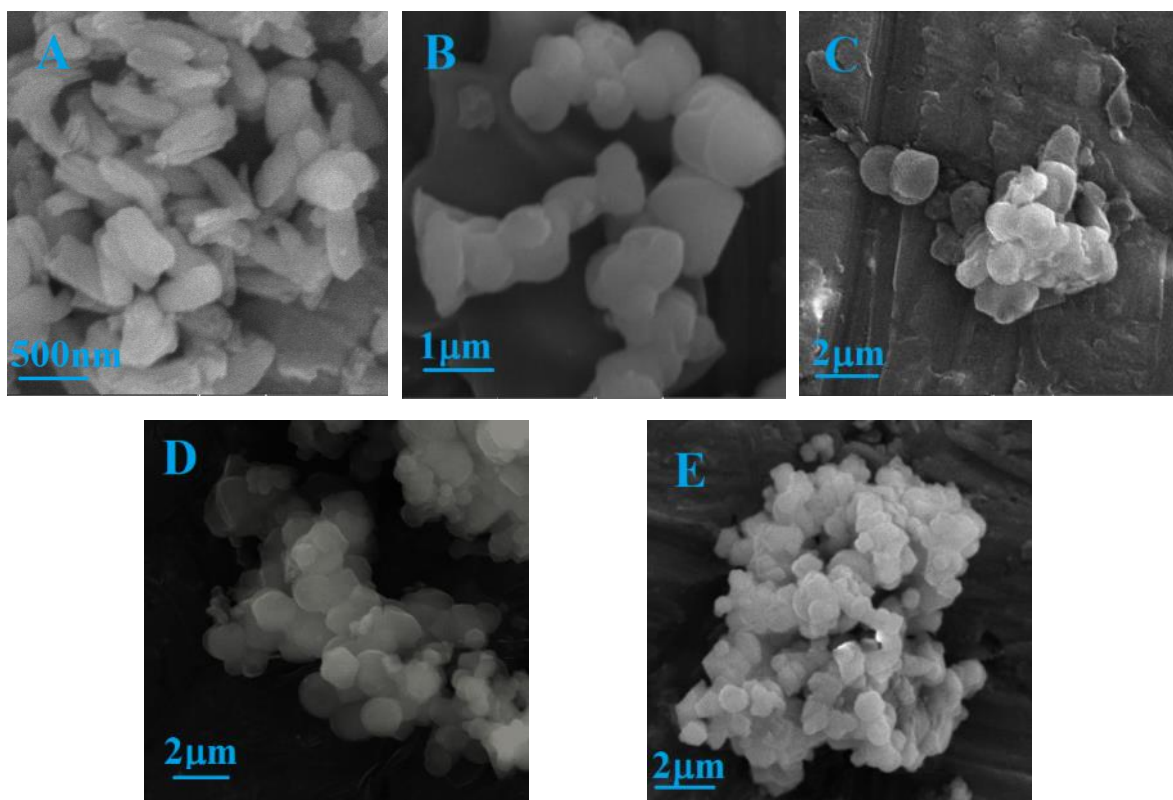
Materialele utilizate drept suporturi s-au obținut prin funcționalizarea post-sinteză între grupările silanice de pe suprafața silicei și agenții de funcționalizare- organosilanii (MCM-SH și MCM-CN), în timp ce MCM-SO<sub>3</sub>H și MCM-COOH au fost obținute în urma unor reacții de oxidare și respectiv hidroliză, conform schemelor de reacției prezentate în figura 4.



**Figură 4.** Obținerea suporturilor de tip silice mezoporoasă modificată cu grupări organice pentru **A**-MCM-CN, **B**-MCM-COOH, **C**-MCM-SH și respectiv **D**-MCM-SO<sub>3</sub>H.

Morfologia suporturilor de tip MCM-41 a fost evaluată cu ajutorul microscopiei electronice de baleiaj (SEM, Tescan Vega 3 LMH). Suportul sintetizat MCM-41E este constituit din particule cu formă elipsoidală cu diametre ce variază în domeniul 170-310 nm și raportul dimensiunilor de circa 2 (Fig. 5A). Toate materialele funcționalizate tip MCM-41 au fost obținute folosind drept materie primă o silice de tip MCM-41 comercială, de aceea acestea prezintă o morfologie similară, având particule ce formează aglomerate cu forme neregulate și dimensiuni între 0,5-1,5 μm (Fig. 5B-E). Nu s-au observat o diferențe semnificative în spectrul FTIR (Bruker Tensor 27) al probelor MCM-SH și MCM-SO<sub>3</sub>H, dar în analiza EDX s-a evidențiat o diferență mică în conținutul de sulf al probelor (Si/S=30 pentru proba MCM-SH și Si/S=37 pentru materialul MCM-SO<sub>3</sub>H) ceea ce a indicat că reacția de oxidare a avut loc și o parte din fragmentele mercaptopropil s-au rupt de suprafața silicei în timpul procesului de oxidare.

Parametrii texturali ai suporturilor determinați din izotermele de adsorbție-desorbție a azotului sunt prezentate în Tabelul 1. În urma funcționalizării, dimensiunea porilor a scăzut în comparație cu materialul MCM-41 comercial utilizat la prepararea materialelor de tip silice funcționalizată, mai vizibilă în cazul probelor de MCM-CN și MCM-COOH care prezintă un conținut mai ridicat de grupări funcționale legate de suprafața silicei (între 7,5-8,0 %gr) în comparație cu materialele MCM-SH și MCM-SO<sub>3</sub>H. Astfel, materialele funcționalizate prezintă o suprafață specifică mai mică cuprinsă între 585-845 m<sup>2</sup>/g și un volum total de pori de 0,74-0,43 cm<sup>3</sup>/g față de silicea pură (976 m<sup>2</sup>/g și 0,85 cm<sup>3</sup>/g).



**Figură 5.** Imagini de microscopie electronică de baleiaj (SEM) pentru MCM-41E (A), MCM-CN (B), MCM-COOH (C), MCM-SH (D) și MCM-SO<sub>3</sub>H (E).

Valorile ACR determinate prin procedura ABTS sunt în concordanță cu cele obținute prin metoda DPPH, valori puțin mai mari au fost observate pentru extractul MM(Conv) încorporat în toate suporturile mezoporoase după câteva luni de la preparare fiind păstrate la întuneric, la 4 °C (Fig. 6 C, D).

Valorile ACR ale extractelor încorporate determinate prin metoda ABTS au fost mai mari decât cele obținute prin metoda DPPH care ar putea fi atribuite solventului diferit, a pH-ului și a naturii speciilor radicalice, ceea ce influențează abilitatea de captare a radicalilor liberi a compușilor polifenolici. Totuși, valorile ACR mai ridicate obținute prin metoda ABTS prezintă aceeași tendință ca și extractul MM(Conv). Extractul încorporat în toate suporturile de tip MCM-41 prezintă o activitate antioxidantă mai bună, fiind aproape constantă după câteva luni de păstrare la întuneric, la 4 °C, în comparație cu extractul liber, a cărui activitate antioxidantă s-a diminuat în timp (Fig. 6). Aceste rezultate demonstrează o stabilitate îmbunătățită a extractului prin încorporarea în mezoporii silicei, luând în considerare că suporturile nu prezintă un efect semnificativ asupra abilității de captare a DPPH• sau ABTS•+. Suporturile mezoporoase prezintă o ACR mică (până la 2,5% sau 0,63% mai mare ca controlul pentru DPPH• sau respectiv ABTS•+, cu excepția MCM-41E). Efectul suportului MCM-41E asupra activității de captare de radicali liberi (cu 7,6% mai mare decât controlului) poate fi explicată pe baza capacității de adsorbție ridicate a speciilor organice datorită volumului mare de pori. Spre deosebire de celelalte materiale care conțin extract încorporat, o valoare mai mică a ACR a fost observată pentru proba MM@MCM-CN în comparație cu extractul liber după două luni (Fig. 6 A), probabil datorită caracterului bazic puternic al grupărilor cianoetil ceea ce determină interacții puternice de tip acid-bază între compușii fenolici și grupările funcționale organice legate de silice. Deși suportul MCM-CN a fost mai puțin eficient în stabilirea unor interacții dorite cu fitocompușii, după circa 6 luni de la preparare, abilitatea probei MM@MCM-CN de a neutraliza radicalii DPPH• a rămas

aproape constantă, în timp ce cea a extractului liber a scăzut semnificativ. Totodată, abilitatea probei MM@MCM-CN de a reduce carbocationii radicali ABTS•+ după 9 luni a fost mai ridicată decât cea a extractului liber.

**Tabel 1.** Parametri texturali ai suporturilor și a extractelor încorporate corespunzătoare.

Tip de suport	Suport				Extract (% gr)	MM@suport		
	n <sub>SiO<sub>2</sub></sub> / n <sub>GF</sub>	d <sub>DFT</sub> (nm)	S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g)	V <sub>p</sub> (cm <sup>3</sup> /g)		d <sub>DFT</sub> (nm)	S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g)	V <sub>p</sub> (cm <sup>3</sup> /g)
MCM-41E	-	3,93	781	0,69	42,0	3,66	97	0,11
MCM-SH	25	3,54	843	0,74	36,0	3,42	231	0,16
MCM-SO <sub>3</sub> H	50	3,66	798	0,59	38,5	3,54	141	0,10
MCM-CN	11	3,18	845	0,55	39,0	-	75	0,06
MCM-COOH	14	3,18	585	0,43	39,0	-	10	0,04

GF-grupare funcțională; d<sub>DFT</sub>- diametrul mediu al porilor determinat prin metoda NLDFT, S<sub>BET</sub>- suprafață specifică determinată prin metoda BET, V<sub>p</sub>-volum total de pori, măsurat la p/p<sub>0</sub> = 0,99. MCM-41 comercial (d<sub>DFT</sub> = 3,66 nm; S<sub>BET</sub> = 976 m<sup>2</sup>/g; V<sub>p</sub> = 0,85 cm<sup>3</sup>/g).

Pentru a corela procesului de eliberare a polifenolilor cu natura grupărilor organice grefate de suportul de silice, datele experimentale au fost fitate cu modelului cu trei parametri (Figura 7) [23], ce consideră un echilibru între moleculele organice adsorbite și desorbite și procesul de difuzie, toate fiind descrise de o cinetică de ordinul întâi, care facilitează transportul fitocompușilor în interiorul mezocanalelor suportului și ulterior în mediul de eliberare (ec. 1). Entalpia molară Gibbs, ΔG (ec. 2), caracterizează echilibrul de adsorbție (k<sub>on</sub>)/ desorbție (k<sub>off</sub>), fiind direct proporțională cu cantitatea de fitocompuși eliberați în prima parte a experimentului (*efect burst*), când moleculele care interacționează slab cu suprafața silicei sunt capabile să difuzeze rapid în mediul de eliberare, iar constanta de viteză pentru difuzie, k<sub>d</sub>, este proporțională cu viteza de eliberare a polifenolilor [24].

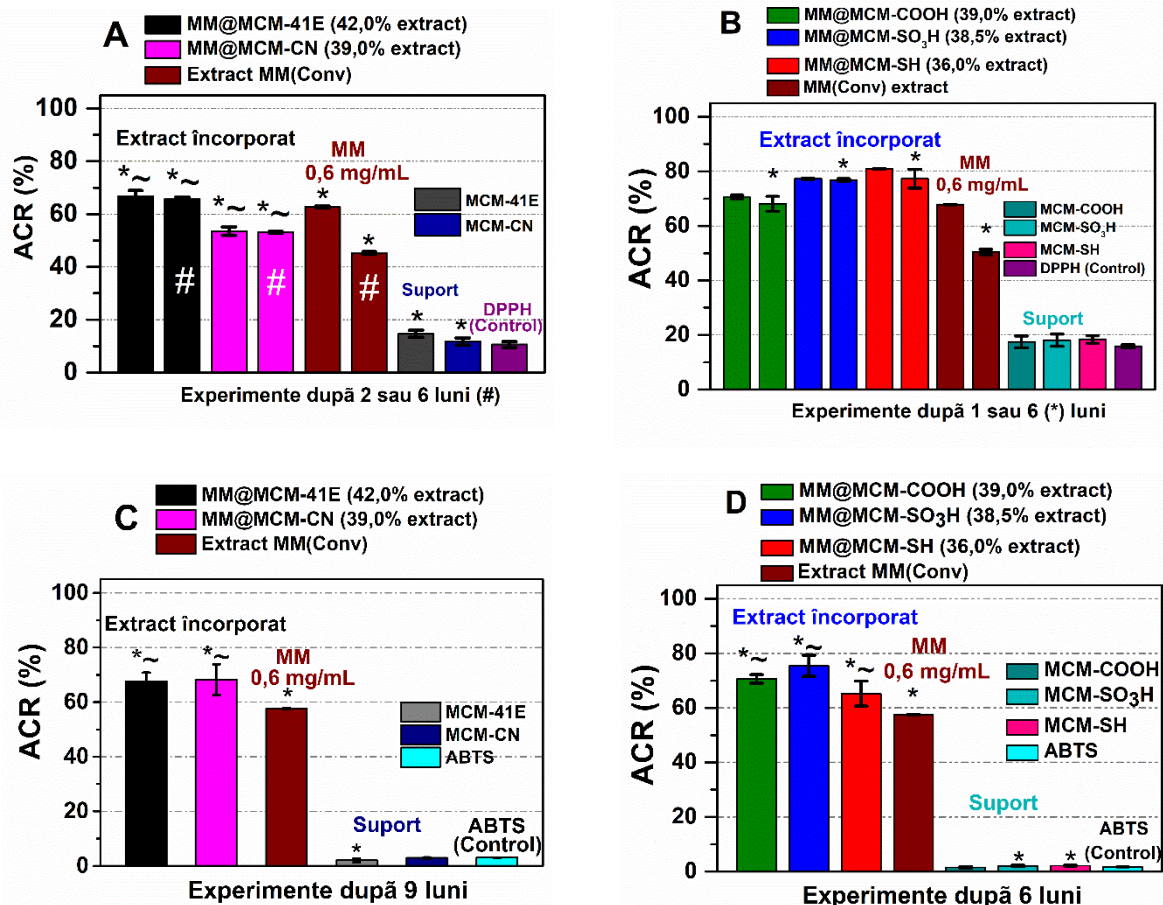
$$\frac{m(t)}{m(0)} = \frac{\lambda_2 \cdot (k_d - \lambda_2)}{(k_{on} + k_{off}) \cdot (\lambda_1 - \lambda_2)} \cdot (1 - e^{-\lambda_1 t}) + \frac{\lambda_1 \cdot (\lambda_1 - k_d)}{(k_{on} + k_{off}) \cdot (\lambda_1 - \lambda_2)} \cdot (1 - e^{-\lambda_2 t}) \quad (1)$$

$$\Delta G = -k_B \cdot T \cdot \ln \left( \frac{k_{on}}{k_{off}} \right) \quad (2)$$

unde: m(t) și m(0)- cantitatea de compuși eliberată la momentul t și respectiv la momentul inițial;

$$\lambda_{1,2} = \frac{(k_d + k_{on} + k_{off}) \pm \sqrt{(k_d + k_{on} + k_{off})^2 - 4 \cdot k_d \cdot k_{off}}}{2}$$

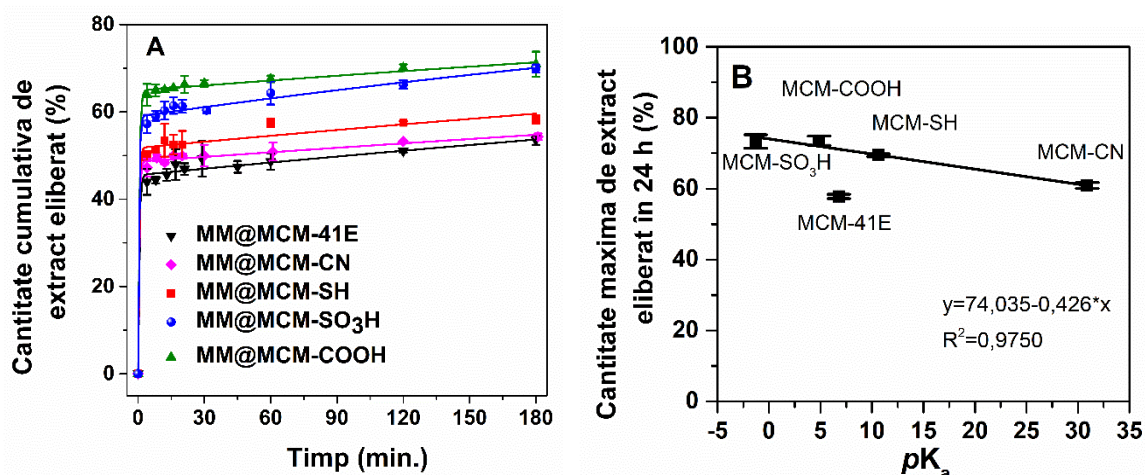
sunt valorile negative a sistemului liniar utilizat pentru a obține ecuația (1), k<sub>B</sub> - constanta Boltzman și T - temperatura absolută.



**Figură 6.** Activitatea de captare de radicali liberi pe probe solide pentru extractele încorporate în comparație cu suporturile corespunzătoare și extractul liber după 1-2 luni sau 6 luni (#), determinată prin procedura DPPH (A și B) și respectiv după 6-9 luni prin metoda ABTS (C și D). \* $p < 0,05$  în comparație cu controlul; ~ $p < 0,05$  în comparație cu extractul (testul  $t$ -Student).

În ceea ce privește valorile parametrului  $\Delta G$  (Tabel 2), cea mai mică cantitate de polifenoli eliberată în prima parte a experimentului este obținută pentru silicea pură, urmată de suporturile funcționalizate cu grupări organice bazice (MM@MCM-CN și MM@MCM-SH). Cel mai semnificativ efect burst a fost observat pentru transportorii cu grupări acide, în special pentru proba MM@MCM-COOH, pentru care a fost obținut cel mai ridicat randament de recuperare a polifenolilor (Fig. 7A).

Totodată, creșterea acidității grupărilor organice legate de suprafața pereților porilor silicei a favorizat eliberarea polifenolilor pe baza unor interacții mai slabe acid-bază dintre suport și acizii fenolici, prezenți în cantitate mare în extractul MM(Conv), valorile  $pK_a$  ale grupărilor funcționale legate de silice fiind invers proporționale cu cantitatea de fitocompnenți eliberați în soluție tampon fosfat pH 5,7 (Fig. 7 B).



**Figură 7. A** - Profilele de eliberare din suporturile de tip MCM-41 fitate cu modelul cu trei parametri. **B** - Dependența cantității maxime de compuși polifenolici eliberați de valorile  $pK_a$  ale grupărilor organice grefate de suportul de silice.

Testele de viabilitate celulară efectuate pe fibroblaste murine NIH3T3 au dovedit lipsa toxicității pentru extractele polifenolice încorporate. Nivelurile de specii reactive de oxigen la nivel celular s-a corelat bine cu experimentele de eliberare a polifenolilor în soluție de tampon fosfat: cea mai mică producție citosolică de ROS-uri a fost observată în cazul probei MM@MCM-COOH, la care s-a obținut cea mai ridicată cantitate de polifenoli eliberați în PBS pH 5,7. Mai mult decât atât, extractele încorporate în silice de tip MCM-41, în special materialul MM@MCM-COOH au prezentat o stabilitate ridicată în timp și o activitate antioxidantă *in vitro* mai mare decât extractul polifenolic liber.

**Tabel 2.** Parametrii cinetici pentru eliberarea polifenolilor din suporturi de tip MCM-41

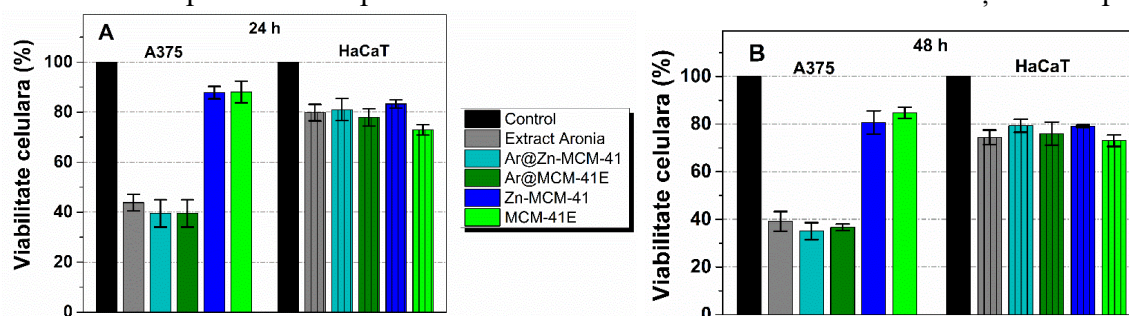
Materiale ce conțin extract încorporat	Ecuția de corelare cu trei parametri					Cantitatea maximă de extract recuperat (%)
	$\Delta G$ (10 <sup>21</sup> J)	$k_d$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{off}$ (10 <sup>3</sup> min <sup>-1</sup> )	$k_{on}$ (10 <sup>3</sup> min <sup>-1</sup> )	$R^2$	
MM@MCM-41E	-0,76	1,940	0,899	1,073	0,9936	57,8 ± 0,6
MM@MCM-SH	0,31	2,256	0,985	0,917	0,9934	69,4 ± 0,4
MM@MCM-SO <sub>3</sub> H	1,57	2,256	1,756	1,218	0,9975	73,3 ± 1,9
MM@MCM-CN	-0,07	2,256	0,721	0,732	0,9981	70,0 ± 1,4
MM@MCM-COOH	2,63	1,938	1,129	0,610	0,9993	73,5 ± 1,3

#### 4. Evaluarea biologică a extractului *Aronia* liber și încorporat în matrici de silice mezoporoasă

În această parte a tezei este prezentată încapsularea extractului de scoruș negru în silice de tip MCM-41 pură sau modificată cu nanoparticule de oxid de zinc. Scopul acestui studiu a fost evaluarea activității a două formulări ce conțin extract polifenolic de *Aronia melanocarpa* pe baza unor teste biologice preliminare precum activitatea acestora antiradicalică și antioxidantă, potențialul antimicrobian pe diferite tulpini bacteriene, efectul la nivel celular atât pe celule canceroase (de melanom uman A375), cât și normale de piele (keratinocite umane HaCaT).

Acest studiu [25] a fost realizat în colaborare cu un grup de cercetare de la Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” care a evaluat activitatea biologică a extractului etanolic liber și încorporat în matricile de silice mezoporoasă.

Citotoxicitatea extractului polifenolic de *A. melanocarpa* liber și încorporat în suporturi de silice mezoporoasă (Ar@MCM-41E și Ar@Zn-MCM-41), dar și a suporturilor corespunzătoare a fost evaluat pe linia celulară umană de melanom A375 și pe o linie netumorală de keratinocite umane (HaCaT). Celulele crescute în prezența probelor adăugate au fost evaluate după perioade diferite de incubare (24, 48, și 72 h). Deși au fost testate concentrații din domeniul 10-250  $\mu\text{g/mL}$ , în figura 8 sunt prezentate comparativ efectele citotoxice determinate de cea mai ridicată concentrație testată pe cele două linii celulare. Astfel, la 24 h (Fig. 8 A) se poate observa că pe linia celulară netumorală de keratinocite atât extractul liber, cât și extractele încorporate sau suporturile nu prezintă o toxicitate ridicată, având viabilități celulare mai mari de 80%, cu excepția MCM-41E care induce o oarecare toxicitate. În ceea ce privește linia tumorală A375, efectul extractului liber și al celui încorporat în matricile mezoporoase propuse este relativ similar, observându-se un efect citotoxic pronunțat și valori ale viabilității celulare în domeniul 39,5 - 43,8% față de control, efect ușor mai pronunțat pentru Ar@Zn-MCM-41 ( $39,5 \pm 5,5\%$  față de control), suporturile determinând doar o ușoară diminuare a viabilității celulare (87,8 - 88,0% față de Control). S-a putut observa destul de clar că la o durată de incubare mai mare (48 h) se poate observa o selectivitate ușor îmbunătățită a extractelor încorporate care sunt mai citotoxice pentru celulele tumorale, dar mai puțin toxice pe linia celulară HaCaT. Acest efect mai pronunțat poate fi corelat cu o activitate antioxidantă mai bună în timp a extractelor încorporate față de cel liber a cărui capacitate de captare de radicali liberi se diminuează mult mai ușor în timp.



**Figură 8.** Viabilități celulare pentru linia celulară de melanom uman (A375) și pe linia netumorală de keratinocite (HaCaT) pentru concentrația de 250  $\mu\text{g/mL}$  pentru durate de incubare diferite a probelor: 24 h (A), 48 h (B) pentru extractul de *Aronia* liber și încorporat în matricile mezoporoase și a suporturilor corespunzătoare.

Încorporarea extractului de *Aronia* în matrici mezoporoase a condus la păstrarea activității de captare de radicali liberi și antimicrobiană pe bacterii Gram-pozitive. Dintre suporturile propuse, încorporarea în matricea Zn-MCM-41 a condus la îmbunătățirea ușoară a activității antimicrobiene, probabil datorită efectului sinergic al extractului și a nanoparticulelor de ZnO dispuse uniform pe suprafața pereților porilor silicei.



## 5. Transportori pe bază de silice mezoporoasă pentru irinotecan în vederea țintirii țesutului tumoral

În această parte a lucrării este prezentat studiul influenței pe care suporturile utilizate o au asupra eliberării irinotecanului din nanoplatformele, investigarea modalității prin care modificarea transportorilor poate asigura acțiunea țintită a țesutului tumoral, dar și modelarea cineticii de eliberare a irinotecanului din suporturile propuse în corelație cu activitatea biologică.

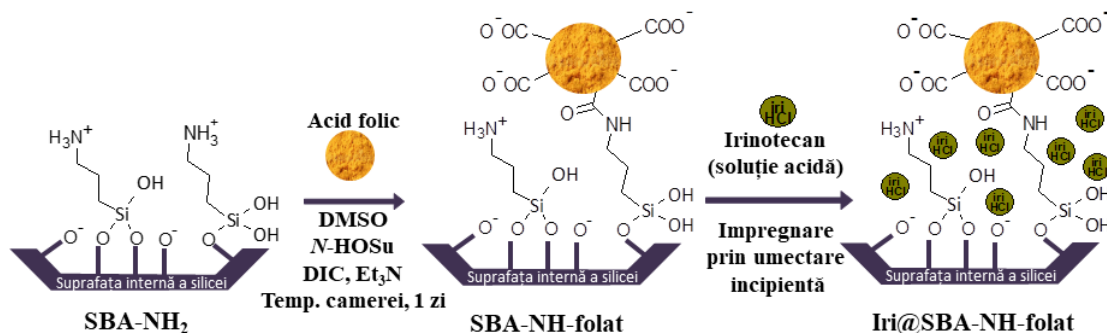
### 5.1. Asigurarea acțiunii țintite cu ajutorul restului folat

Acest studiu a fost realizat în colaborare cu un grup de cercetare de la Universitatea de Medicină „Carol Davila” care a evaluat efectul citotoxic al irinotecanului încorporat în matricile de silice mezoporoasă pură de tip SBA-15 sau cu grupări care să asigure acțiunea țintită (SBA-NH-folat), dar și investigarea distribuției sistemelor pe bază de irinotecan cu ajutorul microscopului hiperspectral Cytoviva și prelucrarea imaginilor aferente cu suita Matlab.

Supportul SBA-NH-folat a fost sintetizat printr-un procedeu în două etape (Fig. 9). Prima dată a fost sintetizat supportul SBA-NH<sub>2</sub> folosind silicea SBA-15 calcinată și 3-aminopropil trietoxisilan (APTES), în toluen (raport molar APTES/SBA-15/toluen=1/5/235), în condiții inerte și uscat timp de 15 h, la 110°C. Solidul rezultat a fost izolat prin centrifugare și ulterior spălat cu toluen pentru îndepărtarea organosilanului rămas nereacționat, cu acetonă pentru îndepărtarea toluenului, cu etanol și apoi cu HCl 1M pentru a facilita deblocarea porilor prin ruperea legăturilor de hidrogen formate între grupările -NH<sub>2</sub> și grupările silanol, iar apoi proba a fost lăsată să se usuce la temperatura camerei.

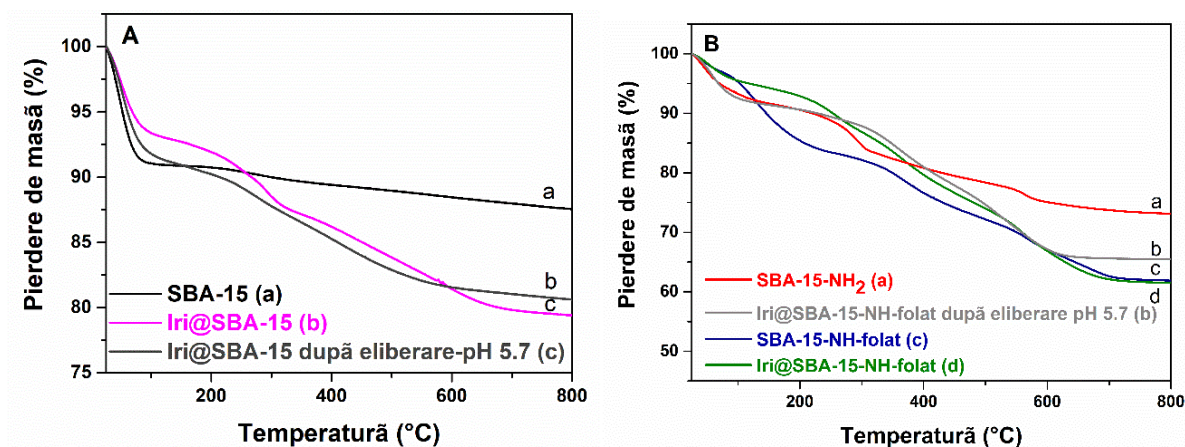
Pentru obținerea SBA-NH-folat s-a procedat astfel: acidul folic a fost dizolvat în dimetilsulfoxid (DMSO) anhidru la circa 60 °C, apoi a fost răcit și apoi, sub gaz inert, au fost adăugate *N*-hidroxisuccinimida (*N*-HOSu), *N,N*-diizopropilcarbodiimidă (DIC) și trietilamină, amestecul fiind omogenizat timp de trei minute și ulterior a fost adăugată cantitatea corespunzătoare de suport SBA-NH<sub>2</sub>, anterior uscat sub vid la 60°C (12 h) (raport molar acid folic/ HOSu / DIC / (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N / DMSO /SBA-NH<sub>2</sub> de 1/1,1/1,1/1,4/1400/1,66). Amestecul a fost menținut la temperatura camerei sub agitare magnetică constantă timp de 24 h, apoi a fost centrifugat și spălat cu DMSO cald în vederea eliminării acidului folic nelegat chimic de pe suprafața silicei, apoi cu etanol de mai multe ori și ulterior uscat la temperatura camerei rezultând o pulbere galbenă denumită SBA-NH-folat. Schema prin care s-a obținut transportorul SBA-NH-folat este prezentată în figura 9.

Conținutul de grupări organice a suporturilor de tip SBA-15 a fost determinat prin analiza termogravimetrică (Fig. 10) luând în considerare pierderea de masă până la 800 °C, după eliminarea contribuției apei adsorbite fizic, corespunzătoare primului efect endotermic. Pe baza analizelor termogravimetrice ale medicamentului încapsulat (Fig. 10), conținutul de medicament a fost determinat după scăderea umidității materialului și a contribuției date de grupărilor funcționale grefate de suprafața silicei. Conținutul de medicament al materialelor hibride a variat în domeniul de 11,2-11,6 %gr. De asemenea, se poate observa că irinotecanul nu a fost eliberat complet din mezopori conform analizei TG efectuată pe solidul izolat după experimentele de eliberare *in vitro* (Fig. 10 A-c și Fig. 10 B-b).



*DMSO – dimetilsulfoxid; N-HOSu – N-hidroxi succinimidă; DIC – carbodiimidă; Et<sub>3</sub>N – trietilamină;*

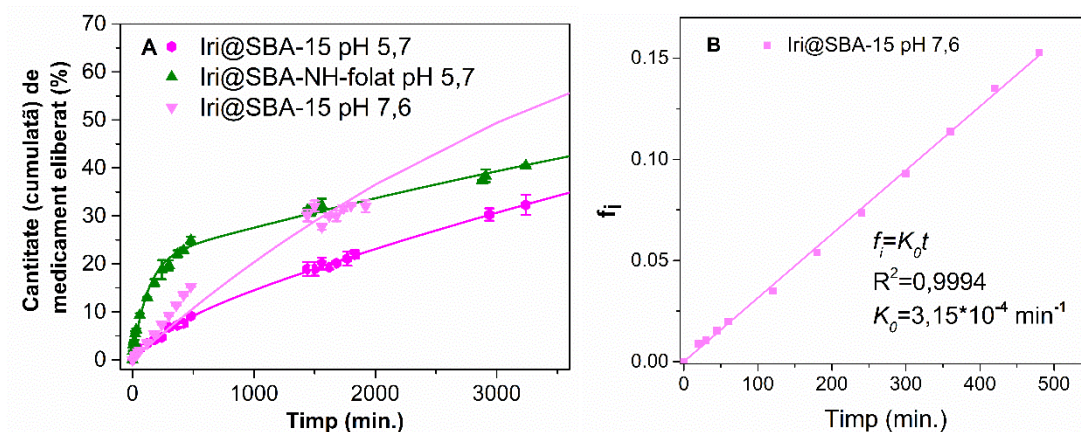
**Figură 9.** Schema de obținere a SBA-NH-folat în două etape de sinteză și a materialului ce conține irinotecan.



**Figură 10.** Analiza termogravimetrică a probelor de SBA-15 și a Iri@SBA-15 (A) și pentru SBA-NH-folat și Iri@SBA-NH-folat (B).

Pentru ambele suporturi s-a observat o cantitate redusă de medicament ce a fost eliberată,  $40,5 \pm 0,3$  % după 54 h – în soluție PBS pH 5,7, mai mare din suportul SBA-NH-folat (Fig. 11A). Totuși, în cazul probei Iri@SBA-15 în PBS pH 7,6, aceiași cantitate de medicament eliberată se atinge după 32 h. Eliberarea din ambele materiale compozite este lentă, iar valoarea parametrului  $\Delta G$  demonstrează un efect „burst” mic ceea ce înseamnă o cantitate redusă de medicament eliberată în prima etapă a procesului de eliberare. Cinetica de ordin zero descrie mult mai bine datele experimentale pentru eliberarea citostaticului din silica SBA-15 la pH 7,6 ( $R^2=0,9994$ ), iar valoarea mică a constantei  $K_0$  evidențiază o cinetică de eliberare lentă (Fig. 11B).

A fost observată o internalizare precară a suportului și irinotecanului încorporat în SBA-15 spre deosebire de suportul SBA-NH-folat care facilitează pătrunderea nanoparticulelor atât în citoplasmă, cât și în nucleu, ceea ce explică toxicitatea mică față de celulele tumorale a suportului și toxicitatea ridicată în cazul irinotecanului încorporat în suportul cu rest folat.

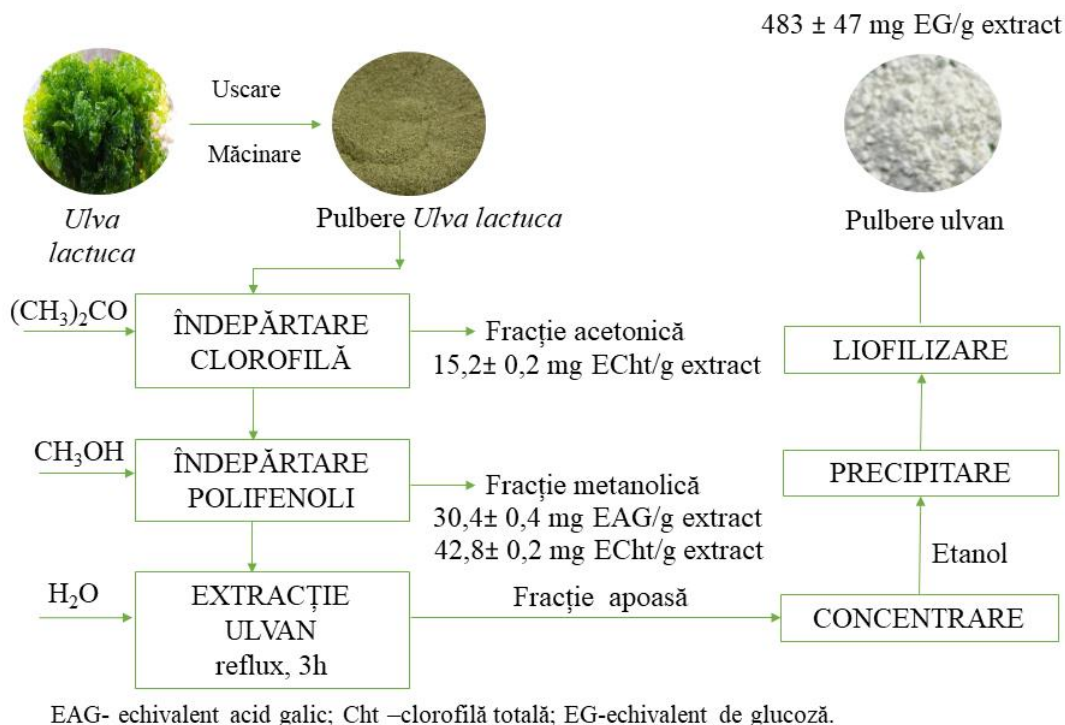


**Figură 11.** Profilele de eliberare *in vitro* irinotecanului din suporturile SBA-15 și SBA-NH-folat în soluție de tampon fosfat pH 5,7 și respectiv pH 7,6 (Cu linie continuă este reprezentată fîtarea cu modelul cu trei parametri-A) și respectiv pentru o cinetică de ordin zero-B.

## 5.2. Asigurarea acțiunii țintite cu ajutorul ulvanului

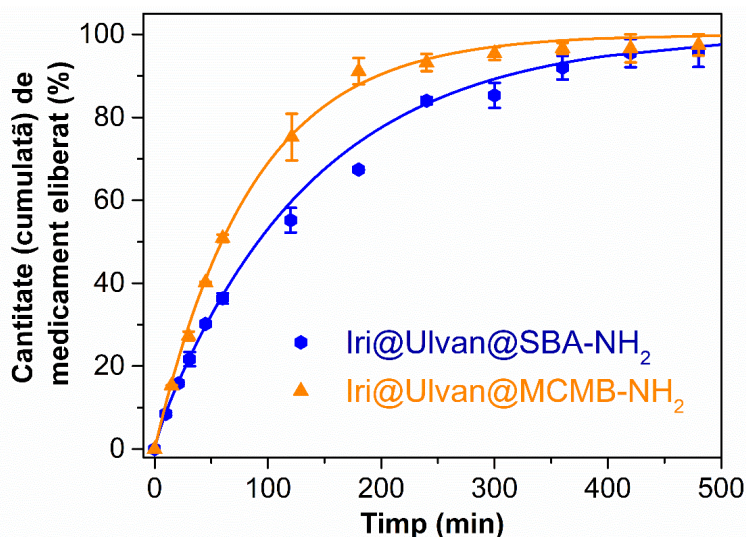
Pentru obținerea unui extract bogat în polizaharide, materialul vegetal mărunțit de *Ulva lactuca* s-a supus unui pretratament în acetonă pentru îndepărtarea clorofilei, apoi în metanol pentru îndepărtarea compușilor polifenolici și a restului de clorofilă. După fiecare etapă de extracție (de 30 minute), algele a fost separate prin filtrare, urmată de centrifugare (6000 rpm/10 min).

Reziduul vegetal a fost apoi tratat cu 50 mL apă ultrapură la reflux, la 100°C, timp de 3h/650 rpm pentru recuperarea ulvanului, iar schema de izolare a ulvanului din alge verzi este prezentată în figura 12.



**Figură 12.** Schema de obținere a ulvanului din algele verzi din specia *Ulva lactuca*.

Din datele experimentale obținute se poate observa că în ambele cazuri are loc eliberarea completă a irinotecanului din suporturile propuse în maximum 8h (Fig. 13). Totuși o eliberare mai lentă ( $\Delta G < 0$ ) este obținută în cazul utilizării suportului Ulvan@SBA-NH<sub>2</sub>, probabil datorită unei cantități mai mare de polimer prezent pe suprafața silicei (6%). Totodată, valoarea constantei de difuzie ( $k_d$ ) este mai mare pentru suportul ulvan@SBA-NH<sub>2</sub> datorită unor pori mai mari, difuzia prin suportul Ulvan@MCMB-NH<sub>2</sub> cu structuri întortocheate de tip ghem fiind mai lentă. De asemenea, se poate observa o tendință de readsorbție a medicamentului în pori mai mare pentru Iri@Ulvan@SBA-NH<sub>2</sub> ( $k_{on} > k_{off}$ ) (Tabel 3).



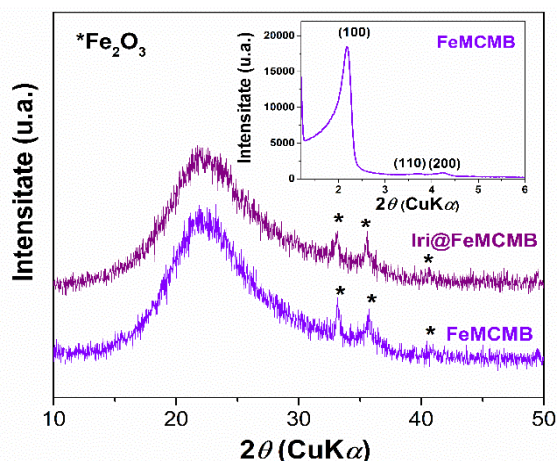
**Figură 13.** Profile de eliberare *in vitro* a irinotecanului din matricile de silice cu ulvan (cu linie continuă este reprezentată fitarea cu modelul cu trei parametri).

**Tabel 3.** Parametrii cinetici pentru eliberarea irinotecanului din suporturi mezoporoase tip ulvan depus pe silice

Medicament încorporat	Modelul cu trei parametri					Cantitate maximă de medicament eliberat (%)
	$\Delta G$ (10 <sup>21</sup> J)	$k_d$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{off}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{on}$ (min <sup>-1</sup> )	$R^2$	
Iri@Ulvan@SBA-NH <sub>2</sub>	-3,36	0,031	0,015	0,033	0,9978	96,1 ± 3,9
Iri@Ulvan@MCMB-NH <sub>2</sub>	1,70	0,020	1,483	0,996	0,9975	97,4 ± 2,6

### 5.3. Asigurarea acțiunii țintite prin direcționare magnetică

Suportul sintetizat (FeMCMB) prezintă un aranjament ordonat, hexagonal al porilor, așa cum poate fi observat din difractograma de raze X la unghiuri mici (Fig. 14 - inserare), fiind identificate cele trei reflexii Bragg specifice unei silice mezoporoase de tip MCM-41. Difractogramele de raze X la unghiuri mari pun în evidență încapsularea irinotecanului în mezoporii suportului în stare amorfă, nefiind vizibile picuri de difracție corespunzătoare medicamentului, ci doar cele asociate fazei cristaline a Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.



**Figură 14.** Difracția de raze X la unghiuri mari pentru suport și materialul pe bază de irinotecan și Inserată – difracția de raze X la unghiuri mici pentru FeMCMB.

Din parametrii cinetici pentru eliberarea irinotecanului din suportul propus deduși pe baza modelului cu trei parametri (Tabel 4), se poate observa că eliberarea este una lentă ( $\Delta G < 0$ ), cea mai lentă dintre toate sistemele propuse. Constanta de viteză pentru difuzie este cu trei ordine de mărime mai mică ca cele de adsorbție/desorbție ceea ce arată că procesul de difuzie este neglijabil față de cele de adsorbție/desorbție. De asemenea, procesul de adsorbție este favorizat,  $k_{on} > k_{off}$  ce se poate corela cu o cantitate extrem de redusă de medicament eliberată (9,5%).

Pentru a descrie mai bine datele experimentale a fost utilizată și o cinetică de ordin zero, care evidențiază o eliberare extrem de lentă, cu o constantă de viteză aparentă pentru procesul de dizolvare  $k_0$  de  $5,047 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ , mai mică decât cea pentru eliberarea irinotecanului din suportul SBA-15 la aceeași valoare a  $pH$ -ului mediului de eliberare ( $3,150 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ).

Eliberarea irinotecanului din matricea de FeMCMB a fost cea mai lentă dintre toate sistemele analizate, cantitatea de medicament eliberată fiind extrem de redusă (9,5% din cantitatea încorporată în 32 h).

**Tabel 4.** Parametrii cinetici pentru eliberarea irinotecanului din FeMCMB pe baza modelului cu trei parametri și cantitatea maximă de medicament recuperat.

Medicament încorporat	Modelul cu trei parametri				$R^2$	Cantitate maximă de medicament eliberat (%)
	$\Delta G$ ( $10^{21} \text{ J}$ )	$10^3 k_s$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{on}$ ( $\text{min}^{-1}$ )		
Iri@FeMCMB	-5,42	0,240	1,414	5,022	0,9906	$9,5 \pm 0,2$

## Concluzii generale și perspective

În cadrul tezei de doctorat „Dezvoltarea unor sisteme cu eliberare controlată pentru valorificarea unor compuși naturali” au fost sintetizate suporturi de tip silice pură, funcționalizată cu heteroatomi sau cu grupări organice care au fost utilizate fie pentru dezvoltarea unor sisteme pentru încorporarea unor extracte polifenolice în vederea creșterii stabilității și păstrarea proprietăților benefice ale fitocompușilor sau sisteme cu eliberare controlată de irinotecan, caz în care au fost vizate trei strategii care să faciliteze acțiunea țintită a citostaticului.

În cadrul studiilor doctorale au fost preparate extracte polifenolice prin metoda convențională sau tehnica asistată de microunde. Prin metoda convențională au fost obținute extracte în etanol absolut din soiurile Cabernet Sauvignon și Fetească Neagră (soiuri de vin roșu) și Mamaia (soi de vin rosé), și hidro-alcoolice (EtOH/H<sub>2</sub>O=4/1 v/v) din soiul Mamaia, și respectiv prin extracție cu microunde din soiurile Cabernet Sauvignon și Mamaia, folosind tescovină de struguri din anul 2017 (zona Mării Negre-Murfatlar). Pentru a face o comparație, au fost preparate și extracte etanolice din pulbere de coji de struguri prin extracție convențională și asistată de microunde. Cantitatea de extract obținută a variat în funcție de soiul de tescovină utilizat între 9,2-19,3% pentru extractele etanolice (cea mai mare cantitate fiind obținută pentru extractul obținut în microunde din Cabernet Sauvignon dintr-o tescovină bogată în teci și sâmburi) și cuprins între 14,4-15,9% pentru extractele hidro-alcoolice din soiul Mamaia (valoarea mai mare fiind obținută pentru extractul convențional).

Pentru extractul etanolic de aronia preparat prin metoda convențională, cantitatea de extract obținută a fost mult mai mare ca în cazul utilizării tescovinei pentru extractele polifenolice din struguri, cu o valoare de 53,8%, care se justifică având în vedere că a fost preparat folosind fructe uscate de aronia și nu un reziduu.

Metodele spectrofotometrice aplicate au vizat determinarea conținutului total de polifenoli, de flavonoide și pigmenți antocianinici și respectiv determinarea activității antioxidante prin două metode: ABTS și DPPH. Conținutul total de polifenoli al extractelor a fost unul ridicat, cea mai mare valoare fiind obținută pentru extractul etanolic de Fetească Neagră (279,64±4,52 mg EAG/g extract), cel mai mare conținut de flavonoide fiind observat în cazul extractului etanolic din coji de struguri (18,96±0,02 mg EQ/ g extract), iar cel mai ridicat conținut de antociani a fost obținut în cazul extractului etanolic și hidro-etanolic din soiul Mamaia (13,27±0,47 mg CGE/g extract). În ceea ce privește activitatea antioxidantă, a putut fi observată influența materiei prime, a soiului de tescovină, a solventului utilizat și a metodei de extracție. Așadar a fost observat, în primul rând, că valorile obținute prin cele două metode testate sunt în concordanță și păstrează aceeași ordine a capacității de captare de radicali liberi a extractelor și, pe de altă parte, a pus în evidență obținerea unor extracte cu potențial antioxidant ridicat. Dintre extractele etanolice, cel mai puternic efect antioxidant l-a prezentat extractul CS(Conv) cu o activitate antioxidantă de 344±4 mg ET/g determinată prin metoda DPPH și respectiv 230±7 mg ET/g prin metoda ABTS. Extractul hidro-etanolic din Mamaia a prezentat, de asemenea, o activitate antioxidantă ridicată cu valori cuprinse între 289,96-313,35 mg ET/g, determinată prin cele două metode anterior menționate, în special pentru un extract preparat din tescovină de vin rosé.

Extractul etanolic de aronia, a prezentat un conținut total de polifenoli și flavonoide în concordanță cu datele raportate în literatură și un conținut de antociani mai redus datorită obținerii acestuia la temperatură ridicată (la reflux), care probabil a defavorizat extracția antocianilor.

În ceea ce privește profilul chimic al extractelor polifenolice, acesta depinde în mare parte de soiul tescovinei folosite și de compoziția acesteia. Cu toate acestea, în toate extractele analizate au fost identificați un număr maxim de treisprezece polifenoli (din cele douăzeci și trei de standarde disponibile), dintre care în extractele etanolice au fost cuantificați acidul galic, protocatehic, vanilic și siringic, iar miricetina a fost identificată doar în extractele de tescovină de struguri. Pentru tescovina de struguri din soiul Cabernet Sauvignon bogată în teci și sâmburi au fost identificați suplimentar, în toate extractele, (-)epicatechina și clorura de pelargonidină. În cazul extractelor hidro-etanolice de Mamaia, pe lângă compușii identificați în extractele etanolice au fost identificate și câteva flavonoide, precum hidrat de catechină, (-)epicatechină, hidrat de rutin și quercitină, nemaifiind identificată miricetina.

Pentru încorporarea extractelor polifenolice au fost alese suporturi de silice pură, modificată cu heteroatomi sau cu grupări funcționale organice. Aceste suporturi au fost alese datorită unei porozități ridicate și pe baza posibilității de a stabili interacțiuni între compușii polifenolici și suporturile propuse, care să asigure o stabilitate mai ridicată a fitocompușilor prin încorporare în matrici mezoporoase și implicit păstrarea proprietăților benefice pe o durată de timp mai lungă.

Suporturile de silice pură și funcționalizată cu heteroatomi au avut un volum total de pori relativ mare (0,47-0,88 cm<sup>3</sup>/g), suprafețe specifice ridicate (510-796 m<sup>2</sup>/g), și un diametru mediu al porilor similar de circa 2,66 nm (determinat prin metoda BJH), care au permis încorporarea unor cantități ridicate de extract polifenolic preparat fie din tescovină fie din fructe de aronia, cuprinse între 30,5-49,7 % extract în materialele compozite rezultate, ce a depins de volumul total de pori al suportului utilizat.

Pentru extractele hidro-alcoolice preparate din tescovina din soiul Mamaia au fost utilizate suporturi funcționalizate cu grupări organice preparate prin co-condensare folosind o silice pură și organosilanul corespunzător, iar materialele obținute au avut un volum total de pori de 0,43-0,74 cm<sup>3</sup>/g și dimensiunea porilor ajustată prin intermediul funcționalizării (3,18-3,66 nm – valori determinate pe baza modelului NLDFT), ceea ce a permis încorporarea unor cantități ridicate de fitocompuși (36-42% extract în materialul compozit).

Activitatea antioxidantă a extractelor încorporate a fost determinată prin metode dezvoltate în cadrul acestei teze care vizează determinarea pe probe solide a activității de captare de radicali liberi, evaluată față de aceeași concentrație de extract și de suport ca în materialul încorporat și având ca referință degradarea soluției de radicali liberi. Dintre cele două metode dezvoltate, metoda DPPH este mult mai reproductibilă și ușor de aplicat deoarece extractele încorporate și suporturile testate sunt mai stabile în soluție etanolică, însă necesită o durată de analiză mai mare, de 24 h, spre deosebire de metoda ABTS care este preferabilă pentru antioxidanți care nu sunt solubili în etanol sau care ar putea fi degradați în etanol și pentru care a fost propusă o durată de reacție mai mică pentru a evita hidroliza matricei de silice. Mai mult decât atât, reproductibilitatea mai bună a metodei DPPH este datorată și naturii reactivului (DPPH•) care se comercializează sub formă de radical liber, spre deosebire de carbocationul radical ABTS•+ care trebuie generat cu ajutorul K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>7</sub> din ABTS, dar care este mai reactiv.

În toate studiile efectuate au fost alese extractele cu proprietățile antioxidante cele mai ridicate și conținutul cel mai ridicat de fitocompuși și au fost încorporate în suporturile propuse pentru păstrarea proprietăților benefice pe o durată mai ridicată (de până la 9 luni) și pentru a facilita utilizarea acestora (sub formă de pulbere fină) în prepararea de produse nutraceutice sau cosmetice. Astfel, extractul de CS încorporat în suporturile de Zn-MCM-41 sau Mg-MCM-41 și extractul din coji de struguri încorporat în MCM-41 au păstrat mult mai bine activitatea antioxidantă a extractului pe o durată cuprinsă între 1-5 luni (o scădere a ACR de 0,82-3,2% pentru extractele încorporate față de 17,2-32,0% pentru extractele libere). Extractele de CS preparate prin metoda convențională și la microunde dintr-o tescovină bogată în teci și sămburi au fost încorporate în trei tipuri de silice modificată cu heteroatomi și au prezentat o stabilitate ridicată a extractului prin încorporare de până la 150°C, demonstrată prin analiza de calorimetrie diferențială cu scanare. În cazul acestor extracte, după 6 luni de păstrare, extractele încorporate au prezentat o activitate de captare a radicalilor liberi mai ridicată cu 9,2-24,5% și 27,1- 37,5% față de extractul convențional și la microunde libere, care au fost mai predispuse la degradare. Cea mai bună stabilitate pe termen lung a fost observată în cazul încorporării extractelor în suportul Zn-MCM-41, iar cea mai redusă, dar totuși semnificativ mai ridicată ca pentru extractul liber, a fost obținută pentru suportul cu fază cristalină de CeO<sub>2</sub> (Ce-MCM-41).

Pentru extractele hidro-alcoolice de MM adsorbite în silicea pură sau funcționalizată cu grupări organice s-a demonstrat că acestea prezintă o stabilitate mai mare pe o durată de până la 9 luni, testată comparativ prin cele două metode (DPPH, ABTS) decât extractele libere corespunzătoare. Prin ambele metode s-au obținut rezultate comparabile, ceea ce dovedește eficiența celor două proceduri dezvoltate în cadrul acestei teze. Folosind testul statistic *t*-Student a fost dovedită păstrarea proprietăților antioxidante în timp ca fiind semnificativ mai bună față de extractul liber pentru toate încorporările silice-extract. Profilele de eliberare a extractului MM din suporturile de silice funcționalizată au fost corelate cu ajutorul unui model semi-empiric, modelul cu trei parametri. S-a obținut o bună corelare între aciditatea suprafeței (pKa) și cantitatea maximă de extract eliberat, funcționalizarea suprafeței porilor suportului cu grupări organice a condus la modularea eliberării fitocompușilor din suporturile propuse, iar cele mai bune rezultate au fost obținute pentru MM@MCM-COOH, care a prezentat o bună păstrare a activității de captare de radicali liberi de până la 6 luni.

În cazul extractului etanolic de aronia, s-a observat că după 1 lună de la încorporare, extractul încorporat în silice pură, MCM-41E, nu prezintă o ACR semnificativ diferită de cea a extractului liber, spre deosebire de extractul încorporat în Zn-MCM-41, însă după șase sau nouă luni, extractele încorporate în Zn-MCM-41 și respectiv în MCM-41E păstrează mai bine proprietățile benefice ale fitocompușilor, ambele având o valoare a ACR semnificativ mai mare decât a extractului liber (testul *t*-Student), ceea ce evidențiază rolul benefic al încapsulării.

Testele biologice realizate pe extractele libere și încorporate în matrici mezoporoase de tip silice au fost efectuate în vederea evaluării eficienței formulărilor propuse în vederea utilizării acestora drept substanțe antioxidante în formă încapsulată cu posibile aplicații în nutraționale sau produse cosmetice.

În cazul extractelor etanolice de tescovină, testele de citocompatibilitate efectuate pe linia de keratinocite (HaCaT) au demonstrat o citocompatibilitate bună pentru extractele CS și GS, în special pentru extractul CS care a stimulat proliferarea celulară. Cele mai bune rezultate au fost obținute pentru CS@Zn-MCM-41, care a prezentat cea mai bună citocompatibilitate și a păstrat ACR în timp.

Încorporarea extractului polifenolic de *Aronia melanocarpa* în matrici mezoporoase a condus la păstrarea ACR și a activității antimicrobiene testată pe bacterii Gram-pozitive. Dintre suporturile propuse, la fel ca și în cazul tescovinei CS, încorporarea în Zn-MCM-41 a fost cea mai benefică și mai mult decât atât a condus la îmbunătățirea ușoară a activității antimicrobiene, ca urmare a efectului sinergic al extractului polifenolic și a nanoparticulelor de ZnO de pe suprafața pereților porilor silicei. Totodată s-a obținut un efect pronunțat antiproliferativ și antimigrator pe celule de melanom uman A375, fără a avea o toxicitate mai ridicată pe linia celulară de keratinocite umane (HaCaT).

Extractul convențional hidro-alcoolic din MM a fost evaluat pe baza testelor de viabilitate celulară efectuate pe fibroblaste murine NIH3T3, evidențiind lipsa toxicității pentru extractele polifenolice încorporate. Nivelurile de ROS-uri la nivel celular s-au corelat bine cu experimentele de eliberare a polifenolilor în soluție de tampon fosfat. Pentru proba MM@MCM-COOH s-a obținut cea mai mică producție citosolică de ROS-uri corelată cu cea mai mare cantitate de polifenoli eliberați în PBS pH 5,7, prezentând o stabilitate ridicată în timp și o activitate antioxidantă *in vitro* mai mare decât extractul polifenolic liber.

În ultima parte a tezei au fost abordate strategii care să vizeze acțiunea țintită a țesutului tumoral de către irinotecan, cu obținerea unor comportamente variate a procesului de eliberare a citostaticului din matricile mezoporoase propuse. Astfel, experimentele de eliberare *in vitro* în PBS cu două valori ale pH-ului (5,7 și 7,6) au evidențiat o desorbție redusă a irinotecanului din transportorii de tip SBA-15 ca atare și modificați cu rest folat, mai



mare în cazul suportului SBA-NH-folat (circa 40% din cantitatea de medicament adsorbită) pentru care s-a realizat o internalizare mai bună a citostaticului, determinată cu ajutorul experimentelor realizate la microscopului hiperspectral Cytoviva și prin prelucrarea ulterioară a imaginilor cu suita Matlab.

Ulterior au fost propuse suporturi de tip silice funcționalizată acoperită cu ulvan ca alternativă la acțiunea țintită asigurată de restul folat, platforme care au asigurat eliberarea completă a citostaticului în 8 h, procesul fiind mult mai rapid față de eliberarea din suportul cu rest folat (valori  $\Delta G$  mai mari). Totuși, un conținut mai ridicat de ulvan din suport a determinat o eliberare mai lentă și o valoare mai mare a constantei de difuzie care s-ar putea corela cu parametrii texturali ai suportului Ulvan@SBA-NH<sub>2</sub>. Eliberarea irinotecanului din suportul FeMCMB a fost una foarte lentă, conform unei cinetici de ordin zero.

Sistemele obținute ar putea fi utilizate în diferite contexte. Așadar, sistemul Iri@SBA-NH-folat ar fi recomandabil pentru o acțiune antitumorală țintită, cu efecte adverse diminuate pe baza unei internalizări foarte bune la nivel celular. Dacă se dorește eliberarea completă a citostaticului pe o durată mai redusă, sistemul Iri@Ulvan@SBA-NH<sub>2</sub> ar putea fi recomandat cu rezerva că acesta determină un efect citotoxic și pe celulele sănătoase.

### *Principalele contribuții originale*

- Încapsularea pentru prima dată a unor extracte polifenolice în matrici mezoporoase de tip silice MCM-41 pură sau funcționalizată cu heteroatomi sau grupări organice și demonstrarea conservării capacității de captare de radicali liberi timp mai îndelungat a extractelor încapsulate față de extractul liber. S-a demonstrat că prin modularea interacțiunilor dintre suprafața silicei și fitocomponenții din extract se poate îmbunătăți biodisponibilitatea acestora și astfel și activitatea biologică a acestora.
- Dezvoltarea a două metode pentru determinarea capacității de captare a radicalilor liberi (DPPH și ABTS) pentru probe solide ce compară cea a extractului încorporat cu cea a extractului liber și a suportului. Procedurile dezvoltate sunt reproductibile și ușor de aplicat pentru orice fel de probe solide care conțin o substanță cu capacitate de captare de radicali liberi.
- S-au propus pentru prima dată transportori pentru irinotecan de tip silice acoperită cu ulvan, o polizaharidă naturală obținută prin extracție din alge verzi, de tip *Ulva lactuca* sau silice funcționalizată cu grupări folat pentru a se asigura țintirea țesutului tumoral.

### *Perspective*

I. Utilizarea celor mai bune extracte încorporate preparate din tescovină de struguri și din aronia pentru dezvoltarea unor produse cosmetice cu aplicare topică;

II. Modificarea parametrilor de extracție în vederea obținerii de extracte mai bogate în antociani din aronia (utilizare de solvent acidulat, temperatură de extracție mai redusă, utilizarea unui amestec de solvenți);

III. Testarea sistemelor irinotecan depus pe SBA-15 și SBA-NH-folat în vederea determinării citotoxicității pe linie celulară de celule umane sănătoase, pentru a testa toxicitatea preponderentă față de celulele tumorale;

IV. Dezvoltarea unor sisteme cu eliberare controlată a irinotecanului alături de un polifenol pentru obținerea unui caracter sinergic și diminuarea toxicității citostaticului.

## Listă de publicații

### Articole

- V. Buda, **A. M. Brezoiu**, D. Berger, I. Pavel, D. Muntean, D. Minda, C. Dehelean, C. Soica, Z. Diaconeasa R. Folescu, C. Danciu, Biological evaluation of black chokeberry extract free and embedded in two mesoporous silica-type matrices, *Pharmaceutics* **2020**, 12(9), 838; FI=6,321;

- **A. M. Brezoiu**, L. Bajenaru, D. Berger, R.-A. Mitran, M. Deaconu, D. Lincu, A. Stoica Guzun, C. Matei, M. Moisescu, T. Negreanu-Pirjol, Effect of nanoconfinement of polyphenolic extract from grape pomace into functionalized mesoporous silica on its biocompatibility and radical scavenging activity, *Antioxidants* **2020**, 9(8), 696; FI=6,312;

- **A. M. Brezoiu**, D. Lincu, M. Deaconu, R.-A. Mitran, D. Berger, C. Matei, Enhanced stability of polyphenolic extracts from grape pomace achieved by embedding into mesoporous silica-type matrices, *U.P.B. Sci. Bull., Series B* **2020**, 82(3), 2020;

- **A. M. Brezoiu**, C. Matei, M. Deaconu, A. M. Stanciuc, A. Trifan, A. Gaspar-Pintiliescu, D. Berger, Polyphenols extract from grape pomace. Characterization and valorisation through encapsulation into mesoporous silica-type matrices, *Food Chem. Toxicol.* **2019**, 133, 110787; FI=6,023.

### Lucrări prezentate la conferințe

- **A. M. Brezoiu**, V. Buda, M. Deaconu, D. Lincu, A. Mocanu, C. Danciu, C. Matei, D. Berger, Chemical profile and biological activities of polyphenols extracts from black chokeberry free and embedded on silica-type supports, 1<sup>st</sup> Advances in Food Chemistry Conference, Online, România, 15-17 Aprilie, **2021**.

- **A. M. Brezoiu**, V. Buda, D. Lincu, C. Danciu, C. Matei, D. Berger, Investigation of Embedding Black Chokeberry Extract in Mesoporous Silica Supports on Its Beneficial Effects- Priorities of Chemistry for a Sustainable Development (PRIOCHEM), București, România, 28-30 Octombrie **2020**;

- **A. M. Brezoiu**, L. Bajenaru, M. Deaconu, D. Lincu, R.-A. Mitran, C. Matei, Daniela Berger, *Antioxidant activity of polyphenolic extract from rosé wine grape marc loaded on functionalized mesoporous silica*, International Chemical Engineering and Materials Symposium (SICHEM 2020), București, România, 17– 18 Septembrie **2020**;

- **A. M. Brezoiu**, M. Deaconu, D. Lincu, L. Bajenaru, C. Matei, D. Berger, *Embedding Polyphenols Extract from Grape Marc into Inorganic Supports with Enhanced Stability*, Priorities of Chemistry for a Sustainable Development (PRIOCHEM), București, România, 30 Octombrie-1 Noiembrie **2019**;

- **A. M. Brezoiu**, C. Matei, M. Deaconu, R.-A. Mitran, A. Trifan, A. M. Stanciuc, D. Berger, *Enhanced radical scavenger properties of polyphenolic extracts from grape marc through encapsulation into mesoporous silica-type matrices*, Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE), Constanța, România, 4-7 Septembrie **2019**;

- **A. M. Brezoiu**, C. Matei, M. Deaconu, A. Trifan, A. M. Stanciuc, D. Berger, *Valorization of grape pomace through encapsulation of polyphenols extract into mesoporous silica type matrices*, International Conference on Natural Products Utilization (ICNPU), Albena, Bulgaria, 29 Mai-01 Iunie **2019**.

## Bibliografie

1. Slowing, I.I., et al., *Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008. **60**(11): p. 1278-1288.
2. Hudson, S.P., et al., *The biocompatibility of mesoporous silicates*. *Biomaterials*, 2008. **29**(30): p. 4045-4055.
3. Wu, X., M. Wu, and J.X. Zhao, *Recent development of silica nanoparticles as delivery vectors for cancer imaging and therapy*. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 2014. **10**(2): p. 297-312.
4. Vallet-Regí, M., F. Balas, and D. Arcos, *Mesoporous Materials for Drug Delivery*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007. **46**(40): p. 7548-7558.
5. McCusker, L.B., F. Liebau, and G. Engelhardt, *Nomenclature of structural and compositional characteristics of ordered microporous and mesoporous materials with inorganic hosts: (IUPAC recommendations 2001)*. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2003. **58**(1): p. 3-13.
6. Dwyer, K., F. Hosseini, and M. Rod, *The Market Potential of Grape Waste Alternatives*. *Journal of Food Research*, 2014. **3**: p. 91-106.
7. Schieber, A., F.C. Stintzing, and R. Carle, *By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments*. *Trends in Food Science & Technology*, 2001. **12**(11): p. 401-413.
8. Beres, C., et al., *Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review*. *Waste Management*, 2017. **68**: p. 581-594.
9. González-Centeno, M.R., et al., *Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems*. *LWT - Food Science and Technology*, 2010. **43**(10): p. 1580-1586.
10. Fontana, A.R., A. Antonioli, and R. Bottini, *Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013. **61**(38): p. 8987-9003.
11. Rockenbach, I.I., et al., *Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking*. *Food Research International*, 2011. **44**(4): p. 897-901.
12. Jurikova, T., et al., *Fruits of Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* in the Prevention of Chronic Diseases*. *Molecules*, 2017. **22**(6).
13. Tian, Y., et al., *Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants*. *Food Chemistry*, 2017. **220**: p. 266-281.
14. Fang, Z. and B. Bhandari, *Encapsulation of polyphenols – a review*. *Trends in Food Science & Technology*, 2010. **21**(10): p. 510-523.
15. Munin, A. and F. Edwards-Lévy, *Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review*. *Pharmaceutics*, 2011. **3**(4).
16. Roy, B., et al., *Synthesis and Evaluation of a Molecularly Imprinted Polymer for Selective Solid-Phase Extraction of Irinotecan from Human Serum Samples*. *Journal of Functional Biomaterials*, 2012. **3**(1).
17. Bailly, C., *Irinotecan: 25 years of cancer treatment*. *Pharmacological Research*, 2019. **148**: p. 104398.
18. *What Causes Neutropenia?*, *News Medical Net*. [accesat la data de 01.06.2021]; <https://www.news-medical.net/health/What-Causes-Neutropenia.aspx>.
19. Ginghină, O., et al., *Current Landscape in Organic Nanosized Materials Advances for Improved Management of Colorectal Cancer Patients*. *Materials*, 2021. **14**(9).
20. **Brezoiu, A.-M.**, et al., *Polyphenols extract from grape pomace. Characterization and valorisation through encapsulation into mesoporous silica-type matrices*. *Food and Chemical Toxicology*, 2019. **133**: p. 110787.
21. **Brezoiu, A.M.**, *Enhanced stability of polyphenolic extracts from grape pomace achieved by embedding into mesoporous silica-type matrices*. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, 2020. **82**: p. 2020.
22. **Brezoiu, A.-M.**, et al., *Effect of Nanoconfinement of Polyphenolic Extract from Grape Pomace into Functionalized Mesoporous Silica on Its Biocompatibility and Radical Scavenging Activity*. *Antioxidants*, 2020, **9**(8).
23. Zeng, L., L. An, and X. Wu, *Modeling Drug-Carrier Interaction in the Drug Release from Nanocarriers*. *Journal of Drug Delivery*, 2011. **2011**: p. 370308.
24. Mitran, R.A., C. Matei, and D. Berger, *Correlation of Mesoporous Silica Structural and Morphological Features with Theoretical Three-Parameter Model for Drug Release Kinetics*. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2016. **120**.
25. Buda, V., et al., *Biological Evaluation of Black Chokeberry Extract Free and Embedded in Two Mesoporous Silica-Type Matrices*. *Pharmaceutics*, 2020. **12**(9).