

LI

Universitatea Politehnică din București

**UNIVERSITATEA „POLITEHNICA” DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE APLICATĂ ȘI ȘTIINȚA MATERIALELOR**



Nr. Decizie Senat 774 din 08.11.2021

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

SISTEME NANOTRANSPORTOARE PE BAZĂ DE PRINCIPII ACTIVE NATURALE CU ACȚIUNE ANTIOBEZITATE ȘI ANTIOXIDANTĂ

NANOCARRIER SYSTEMS BASED ON NATURAL ACTIVES WITH ANTI OBESITY AND ANTIOXIDANT ACTIONS

***Coordonator științific:
Prof. Emerit Aurelia Meghea***

Doctorand: Lucia Marina Cristina Coc (căs. Pascaru)

COMISIA DE DOCTORAT

Președinte	Prof. Ileana RĂU	Universitatea POLITEHNICA București
Conducător de doctorat	Prof. Emerit Aurelia MEGHEA	Universitatea POLITEHNICA București
Referent	Prof. Cristina Elena DINU-PÎRVU	Universitatea de Medicină și Farmacie “Carol Davila” din București
Referent	Conf. Marcela-Elisabeta BĂRBÎNȚĂ- PĂTRAȘCU	Universitatea BUCUREȘTI
Referent	Prof. Ioana LĂCĂTUȘU	Universitatea POLITEHNICA București

București 2022

CUPRINS

INTRODUCERE	11
PARTEA I. CERCETAREA BIBLIOGRAFICĂ	13
CAPITOLUL 1. TRANSPORTORI LIPIDICI NANOSTRUCTURAȚI (NLC)	13
1.1. ASPECTE INTRODUCIVE	13
1.2. METODE DE OBȚINERE A STRUCTURILOR NLC	16
1.3. STABILITATEA DISPERSIILOR DE TIP NLC	18
1.4. EXEMPLE DE SISTEME DE ÎNGLOBARE A COMPUȘILOR CU ACȚIUNE TERAPEUTICĂ (ANTIOBEZITATE, ANTIOXIDANTĂ)	19
1.5. CONCLUZII PARȚIALE	24
CAPITOLUL 2. OBEZITATEA. CONCEPTE DE BAZĂ ȘI MECANISME DE ACȚIUNE	25
2.1. ȚESUTUL ADIPOS ȘI OBEZITATEA	25
2.2. PARAMETRII BIOCHIMICI AI OBEZITAȚII	31
2.3. MODELE ȘI STRATEGII ÎN DEZVOLTAREA MEDICAMENTELOR ANTIOBEZITATE	36
2.4 CONCLUZII PARȚIALE	40
CAPITOLUL 3. PRINCIPII ACTIVE CU ACȚIUNE ANTI OBEZITATE ȘI ANTIOXIDANTĂ	41
3.1. PRINCIPII ACTIVE DE SINTEZĂ CU ACȚIUNE ANTI OBEZITATE	41
3.2. PRINCIPII ACTIVE NATURALE CU ACȚIUNE ANTI OBEZITATE	51
3.3. PRINCIPALELE SUBSTANȚE ACTIVE CU ACȚIUNE ANTIOXIDANTĂ ȘI ANTIOBEZITATE DIN PRODUSELE NATURALE	58
3.4. CONCLUZII PARȚIALE	66
PARTEA A II A. CERCETAREA EXPERIMENTALĂ	67
OBIECTIVELE ȘI SCOPUL CERCETĂRII	69
CAPITOLUL 4. METODICA EXPERIMENTALĂ	71
4.1. MATERIALE UTILIZATE ÎN SINTEZA SISTEMELOR NLC	71
4.2. SINTEZA SISTEMELOR NANOTRANSPORTOARE PE BAZĂ DE ULEIURI VEGETALE, LIBERE ȘI ÎNCĂRCATE CU PRINCIPII ACTIVE NATURALE ȘI DE SINTEZĂ	77
4.3. TEHNICI DE CARACTERIZARE UTILIZATE PENTRU INVESTIGAREA PROPRIETĂȚILOR SISTEMELOR NLC SINTETIZATE	80
CAPITOLUL 5. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA SISTEMELOR NLC ÎNCAPSULATE CU ACID CAFEIC	85
5.1. INTRODUCERE	85
5.2. CARACTERIZAREA SISTEMELOR NLC LIBERE ȘI ÎNCĂRCATE CU ACID CAFEIC	85
5.2.1. Sinteza nanotransportorilor lipidici (NLC)	87
5.2.2. Optimizarea sistemelor NLC și evaluarea stabilității fizice	88
5.2.3. Caracteristicile dimensionale și stabilitatea fizică a NLC-urilor încărcate cu acid cafeic	97
5.3. Caracterizarea morfologică a NLC-urilor cu acid cafeic	103

5.4. Determinarea eficienței de încapsulare (EE%) a acidului cafeic în sistemele NLC	103
5.5. Evaluarea proprietăților biologice ale sistemelor NLC pe bază de acid cafeic	104
5.5.1. Testarea <i>in vitro</i> a proprietăților antioxidante	104
5.5.2. Studii <i>in vitro</i> de eliberare controlată a acidului cafeic	106
5.6. CONCLUZII PARȚIALE	108
CAPITOLUL 6. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA SISTEMELOR NLC ÎNCAPSULATE CU CURCUMINĂ	111
6.1. INTRODUCERE	111
6.2. CARACTERIZAREA SISTEMELOR NLC LIBERE ȘI ÎNCĂRCATE CU CURCUMINĂ	112
6.2.1. Sinteza nanotransportorilor lipidici pe bază de curcumină	113
6.2.2. Caracterizarea dimensională a nanotransportorilor lipidici încărcăți cu curcumină	114
6.2.3. Caracterizarea morfologică a NLC-urilor pe bază de curcumină	119
6.3. DETERMINAREA EFICIENȚEI DE ÎNCAPSULARE (EE%) A CURCUMINEI ÎN SISTEMELE NLC	120
6.4. EVALUAREA PROPRIETĂȚILOR BIOLOGICE ALE SISTEMELOR NLC PE BAZĂ DE CURCUMINĂ	123
6.4.1. Testarea <i>in vitro</i> a activității antioxidante	123
6.4.2. Studii <i>in vitro</i> de eliberare controlată a curcuminei	125
6.5. CONCLUZII PARȚIALE	127
CAPITOLUL 7. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA SISTEMELOR NLC ÎNCAPSULATE CU PIPERINĂ	129
7.1. INTRODUCERE	129
7.2. CARACTERIZAREA SISTEMELOR NLC LIBERE ȘI ÎNCĂRCATE CU PIPERINĂ	131
7.2.1. Sinteza sistemelor NLC pe bază de piperină	132
7.2.2. Caracterizarea dimensională a nanotransportorilor lipidici încărcăți cu piperină	133
7.3. DETERMINAREA EFICIENȚEI DE ÎNCAPSULARE A PIPERINEI ÎN SISTEMELE NLC (EE%)	141
7.4. EVALUAREA PROPRIETĂȚILOR BIOLOGICE ALE SISTEMELOR NLC PE BAZĂ DE PIPERINĂ	143
7.4.1. Testarea <i>in vitro</i> a activității antioxidante	143
7.4.2. Studii <i>in vitro</i> de eliberare controlată a piperinei	146
7.5. CONCLUZII PARȚIALE	149
CAPITOLUL 8. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA SISTEMELOR NLC ÎNCAPSULATE CU CAPSAICINĂ	151
8.1. INTRODUCERE	151
8.2. CARACTERIZAREA SISTEMELOR NLC LIBERE ȘI ÎNCĂRCATE CU CAPSAICINĂ	153
8.2.1. Sinteza sistemelor NLC pe bază de capsaicină	154
8.2.2. Caracterizarea dimensională a nanotransportorilor lipidici încărcăți cu capsaicină	155

8.3. CARACTERIZAREA STABILITĂȚII TERMICE A SISTEMELOR NLC PE BAZĂ DE CAPSAICINĂ	161
8.4. DETERMINAREA EFICIENȚEI DE ÎNCAPSULARE (EE%) ȘI A CAPACITĂȚII DE ÎNCĂRCARE (LC%) A CAPSAICINEI (CAP), OLEOILE TANOLAMIDEI (OEA) ȘI FENILALANINOL OLEAMIDEI (FOA)	163
8.5. EVALUAREA <i>IN VITRO</i> A PROPRIETĂȚILOR BIOLOGICE ALE SISTEMELOR NLC PE BAZĂ DE CAPSAICINĂ	165
8.5.1. Testarea <i>in vitro</i> a activității antioxidante	165
8.5.2. Studii <i>in vitro</i> de eliberare controlată a capsaicinei	168
8.6. TESTAREA <i>IN VIVO</i> A PROPRIETĂȚILOR ANTI-OBEZITATE ALE SISTEMELOR NLC PE BAZĂ DE CAPSAICINĂ	170
8.6.1. Variația greutateii corporale la animalele de experiență în urma administrării nanotransportorilor lipidici încărcăți cu OEA / FOA și capsaicină	172
8.6.2. Influența sistemelor NLC pe bază de capsaicină asupra senzației de sațietate în urma administrării la animalele de laborator	174
8.6.3. Influența tratamentului cu NLC-LO-OEA / FOA-Cap asupra profilului lipidic și profilului glicemic	176
8.7. CONCLUZII PARȚIALE	179
CAPITOLUL 9. CONCLUZII	181
9.1. CONCLUZII GENERALE	181
9.2. CONTRIBUȚII ORIGINALE	187
9.3. PERSPECTIVE DE CERCETARE	188
BIBLIOGRAFIE	191

MULȚUMIRI

Doresc să mulțumesc din tot sufletul conducătorului meu de doctorat, doamna Prof. Emerit Aurelia Meghea, pentru încrederea, permanenta susținere și încurajare în elaborarea acestei lucrări, pentru că mi-a insuflat și adâncit pasiunea și dragostea pentru cercetare și pentru căldura cu care m-a înconjurat încă din primul an de studentă doctorand.

Mulțumesc doamnei Prof. Dr. Ing. Nicoleta Badea pentru sprijinul permanent pe care mi l-a acordat în realizarea acestei lucrări, pentru îndrumarea și colaborarea științifică susținută, pentru exemplul de profesionalism și dăruirea în activitatea de cercetare.

Mulțumesc doamnei Prof. Dr. Ioana Lăcătușu pentru sfaturile acordate și colaborarea permanentă din perioada elaborării tezei. De asemenea, doresc să mulțumesc, cu toată căldura, doamnei Prof. Raluca Stan și domnului Prof. Bogdan Manolescu din comisia de îndrumare pentru sprijinul și sfaturile oferite pe parcursul acestor ani.

Mulțumesc doamnei Prof. Anca Pop din cadrul Facultății de Medicină “Carol Davila” pentru frumoasa colaborare pe parcursul cercetării.

Mulțumesc tuturor colegilor mei pentru încurajările date și familiei mele pentru suportul moral, dragostea și sprijinul pe care mi le-au acordat în permanență.

Autoarea

INTRODUCERE

Sinteza și caracterizarea unor sisteme lipidice nanostructurate de tipul transportorilor lipidici nanostructurați (NLC) au ca rezultat obținerea de sisteme eficiente și sigure din punct de vedere farmacologic.

Transportorii lipidici nanostructurați sunt sisteme care au în alcătuire o matrice lipidică solidă care protejează și intervine în eliberarea controlată a compușilor activi de interes [1]. Acești transportori conțin un amestec de lipide solide și lipide lichide și derivă din sisteme de tip SLN (nanoparticule lipidice solide), cu mențiunea că sistemele SLN conțin doar lipide solide. Nanoparticulele NLC au formă sferică, dimensiuni cuprinse între 40 și 1000 nm, matricea lipidică fiind solidă la temperatura corpului. Sistemele NLC pot îngloba principii active naturale cu rol biologic benefic în tratarea anumitor afecțiuni, rol potențat prin asocierea cu uleiuri vegetale și substanțe active de sinteză.

Obiectivul cercetării în cadrul tezei de doctorat a fost acela de a dezvolta și sintetiza sisteme NLC pe bază de uleiuri vegetale și extracte naturale, în asociere cu anumiți compuși de sinteză, cu proprietăți antioxidante și antiobezitate. Sistemele nanotransportoare studiate prezintă capacitatea de a co-încapsula și de a elibera controlat compuși activi naturali (capsaicină, acid cafeic, curcumină, piperină) și de sinteză (oleoiletanolamidă, fenilalaninol oleamidă) în scopul obținerii unor formulări eficiente.

Teza de doctorat este alcătuită din 9 capitole, structurate în două părți.

PARTEA I. Cercetarea bibliografică cuprinde 3 capitole:

✓ **Capitolul 1** prezintă aspecte introductive privind sistemele NLC, precum caracteristicile structurale, avantajele și dezavantajele acestor sisteme de transport, tipuri de sisteme NLC, stabilitatea unor astfel de sisteme și metode de obținere.

✓ **Capitolul 2** prezintă concepte fundamentale privind obezitatea, precum mecanismele de acțiune și parametrii biochimici ai obezității, dar și efectele biologice ale unor compuși naturali cu potențial antiobezitate (capsaicină, piperină, ulei de in ș.a.).

✓ **Capitolul 3** prezintă exemple de medicamente și compuși utilizați în lupta cu obezitatea, precum și exemple de sisteme care înglobează astfel de compuși cu acțiune antiobezitate și antioxidantă.

PARTEA A II-A. Cercetarea experimentală prezintă obiectivele cercetării și rezultatele experimentale obținute, structurate în 6 capitole, în ultima parte a tezei regăsindu-se concluziile finale și bibliografia.

✓ **Capitolul 4** prezintă metodica experimentală care cuprinde materialele utilizate, metoda de sinteză și tehnicile de caracterizare a sistemelor NLC obținute.

✓ **Capitolul 5** prezintă optimizarea sistemelor NLC prin variația concentrației amestecului de surfactanți și evaluarea stabilității în timp, precum și sinteza și caracterizarea sistemelor NLC optimizate pe bază de acid cafeic.

✓ În cadrul **Capitolului 6** sunt prezentate sinteza și caracterizarea sistemelor NLC preparate cu ulei vegetal (ulei de in, respectiv, ulei de argan), încapsulate cu curcumină și co-încapsulate cu fenilalaninol oleamidă.

✓ **Capitolul 7** pune în evidență sinteza și caracterizarea sistemelor NLC pe bază de piperină – compus activ de origine vegetală cu numeroase efecte terapeutice.

✓ Sinteza și caracterizarea NLC-urilor pe bază de ulei de in și capsaicină în asociere cu un compus activ de sinteză (oleoiletanolamidă, fenilalaninol oleamidă) sunt prezentate în cel mai amplu capitol al tezei – **Capitolul 8**. Acest capitol prezintă, de asemenea, și studiile *in vivo* privind efectul antiobezitate al nanotransportorilor pe bază de capsaicină.

✓ Teza de doctorat se încheie cu **Capitolul 9** intitulat “Concluzii”, capitol în care sunt prezentate sintetizat rezultatele experimentale obținute, originalitatea acestor studii realizate, precum și perspectivele de cercetare.

Rezultatele originale au fost valorificate prin publicarea a 2 lucrări științifice în reviste ISI de specialitate, una în curs de publicare, și participarea la o conferință științifică internațională.

Cuvinte-cheie: transportori lipidici nanostructurați, acțiune antioxidantă, acțiune antiobezitate, acid cafeic, curcumină, piperină, capsaicină, ulei de in, ulei de argan, ulei de luminița nopții, ulei de parafină, oleoiletanolamidă, fenilalaninol oleamidă.

PARTEA A II-A CERCETAREA EXPERIMENTALĂ SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Scopul cercetării

Scopul principal al prezentei cercetări a fost sinteza și caracterizarea unor sisteme nanotransportoare pe bază de principii active de origine vegetală (acid cafeic, curcumină, piperină, capsaicină) în asociere cu ulei vegetal/ mineral (ulei de in, ulei de argan, ulei de luminița nopții/ ulei de parafină) și co-încapsulate cu principii active de sinteză. S-au utilizat lipide endogene recunoscute de celulele epiteliale: oleoiletanolamida și fenilalaninol oleamida, care prezintă capacitatea de a distribui uniform și controlat principiul activ.

Obiectivele cercetării

- ✓ Sinteza și evaluarea stabilității sistemelor NLC pe bază de ulei vegetal;
- ✓ Optimizarea concentrației de amestec de surfactanți pentru sistemele NLC pe bază de ulei vegetal;
- ✓ Încapsularea principiului activ în sistemele NLC cu concentrația optimă de amestec de surfactanți;
- ✓ Evaluarea proprietăților sistemelor NLC co-încapsulate cu mediatori lipidici (oleoiletanolamida – OEA, fenilalaninol oleamida – FOA) și compuși naturali (ulei de in – LO, ulei de argan – AO, ulei de parafină – UP, ulei de luminița nopții – ULN, acid cafeic – CA, curcumină – CRC, piperină – PIP, capsaicină – Cap);
- ✓ Evaluarea proprietăților biologice (proprietăți antioxidante, studii de eliberare controlată) a NLC-urilor sintetizate;
- ✓ Evaluarea răspunsului terapeutic al sistemelor NLC co-încapsulate cu mediatori lipidici comparativ cu răspunsul terapeutic al extractului vegetal neîncapsulat.

CAPITOLUL 5

SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA SISTEMELOR NANOTRANSPORTOARE ÎNCAPSULATE CU ACID CAFEIC

5.2. CARACTERIZAREA SISTEMELOR NLC LIBERE ȘI ÎNCĂRCATE CU ACID CAFEIC

Deoarece unul dintre marile avantaje ale sistemelor NLC este acela că permit o eliberare controlată eficientă a principiilor active, în prezenta cercetare am dezvoltat sisteme NLC pe bază de ulei bioactiv de semințe de in. Au fost evaluate capacitatea de a încapsula un principiu activ polifenolic hidrofil cu potențial antioxidant, antiinflamator și antineoplazic – acidul cafeic (CA) – și capacitatea de eliberare eficientă a acestui agent activ natural.

În acest context, obiectivul principal al prezentei cercetări este acela de a încapsula diferite cantități de acid cafeic în sisteme NLC, cu scopul de a determina influența concentrației de acid cafeic asupra proprietăților antioxidante și eliberării controlate de acid cafeic. În primul rând, a fost analizată influența concentrației de surfactant asupra celor mai importante caracteristici ale sistemelor NLC, precum dimensiunea medie a particulelor și potențialul zeta. Acidul cafeic a fost încapsulat în nanoparticule cu caracteristici adecvate. Sistemele NLC încărcate cu CA obținute au fost evaluate din punct de vedere al dimensiunii (diametrul mediu al particulelor, potențialului zeta) și al eficienței de încapsulare. Eficiența NLC-urilor, ca formulări farmaceutice, a fost caracterizată *in vitro* prin evaluarea activității antioxidante și prin studii de eliberare controlată a acidului cafeic din sistemele NLC.

Cercetările prezentate în acest capitol vizează furnizarea de noi perspective despre asocierea a două categorii de principii naturale active - hidrofile și lipofile – în același sistem lipidic transportor. Deși există mai multe studii în care acidul cafeic a fost încărcat în nanoparticule lipidice solide (SLN) [217], înglobarea sa în nanopurtători lipidici nu a fost raportată până acum. Noutatea realizată prin efectuarea acestei părți experimentale se referă la dezvoltarea de nanotransportori pe bază de ulei de in încărcăți cu acid cafeic, intensificând activitatea antioxidantă și punând în evidență efectul sinergic al celor două principii active naturale – uleiul de in și acidul cafeic.

5.2.1. Sinteza nanotransportorilor lipidici (NLC)

În prima etapă a cercetării prezentate în acest capitol, am sintetizat sistemele NLC pe bază de ulei de in, utilizând concentrații diferite de amestec de surfactanți (2%-3,5%). Sistemele NLC au fost caracterizate dimensional prin metoda DLS. În urma etapei de optimizare, alegând concentrația optimă de surfactanți (2,5%), am sintetizat sistemele NLC pe bază de ulei de in încărcate cu acid cafeic, folosind metoda emulsionării la cald cuplată cu omogenizarea cu grad înalt de forfecare și omogenizarea la presiune înaltă [218].

Compoziția sistemelor NLC sintetizate este redată în tabelul 5.1. S-au obținut patru formulări NLC diferite prin variația concentrației amestecului de surfactanți (2%, 2,5%, 3% și 3,5%), menținând constantă compoziția de monostearat de glicerol (GMS), palmitat de cetil (CP) și ulei de in (LO). Componentele principale ale uleiului de in sunt acidul acid α -linolenic, acidul oleic și acidul linoleic.

Tabelul 5.1. Compoziția sistemelor NLC preparate cu ulei de in (LO)

Formulare*	Amestec de surfactanți (g)	GMS (g)	CP (g)	LO (g)
NLC-LO1	2,0	3,5	3,5	3,0
NLC-LO2	2,5	3,5	3,5	3,0
NLC-LO3	3,0	3,5	3,5	3,0
NLC-LO4	3,5	3,5	3,5	3,0

*Masa probei sintetizate=100 g dispersie apoasă NLC
 *Toate sistemele NLC au fost preparate cu 10% fază lipidică, cu un raport masic de CP:GMS:LO=1:1:1 și un raport masic Tween 20:poloxamer:L- α fosfatidilcolină=70:15:15.

5.2.2. Optimizarea sistemelor NLC și evaluarea stabilității fizice

În vederea optimizării compoziției sistemelor NLC pe bază de ulei de in au fost evaluate caracteristicile dimensionale ale nanoparticulelor prin determinări ale diametrului mediu (Zave) al nanoparticulelor și indicelui de polidispersie (PDI), dar și stabilitatea fizică a nanoparticulelor prin determinări ale potențialului zeta. Analizând datele experimentale obținute, s-a demonstrat că toate sistemele NLC cu diferite concentrații de amestec de surfactanți sunt stabile în timp.

Diametrul mediu al nanoparticulelor (Zave) și indicele de polidispersie (PDI)

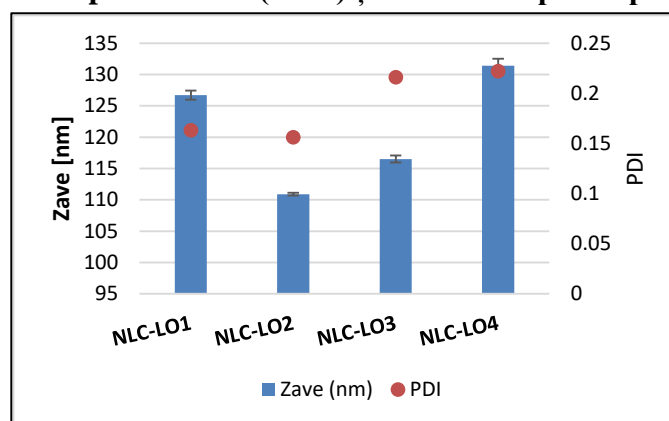


Figura 5.2. Distribuția diametrului mediu și a indicelui de polidispersie în cazul sistemelor NLC-LO cu concentrații diferite de surfactanți

Caracteristicile dimensionale (Zave și PDI) au fost evaluate prin tehnica de împrăștiere dinamică a luminii (DLS) [220]. Variația valorilor lui Zave și PDI a NLC-urilor este prezentată în figura 5.2.

Urmărind comportarea celor patru formulări NLC pe bază de ulei de in, s-a constatat că toate formulările sintetizate prezintă o distribuție adecvată a dimensiunii particulelor. Dimensiunea nanoparticulelor s-a încadrat între 110,9 nm (pentru proba NLC cu 2,5% amestec surfactant) și 131,4 nm (pentru proba NLC cu 3,5% amestec surfactant). Aceste rezultate ar putea fi corelate cu eficiența amestecului de surfactanți, dar și cu prezența uleiului de in care contribuie la scăderea viscozității amestecului lipidic, reducând tensiunea superficială de suprafață, cu formarea de particule mai mici și mai fine [221]. Valorile diferite ale lui Zave și PDI sunt influențate de masele moleculare ale surfactanților [222]. Cele mai bune date experimentale au fost obținute în cazul sistemului NLC-LO2 cu concentrația de surfactanți de 2,5%: Zave = 110,9 ± 2,3 nm și PDI = 0,156 ± 0,004.

În acest studiu experimental s-a remarcat că a fost obținută o corelație optimă între dimensiunea medie a nanoparticulelor și indicele de polidispersie în cazul probei NLC-LO2 preparată cu 2,5% amestec de surfactanți.

Potențialul zeta. Potențialul zeta (ξ) este una dintre caracteristicile principale care definesc comportarea nanoparticulelor într-o soluție apoasă, evidențiind **stabilitatea fizică** a sistemelor NLC.

Pentru determinarea potențialului zeta am efectuat diluții ale dispersiilor apoase de NLC, prin amestecarea a 200 μ L soluție NLC cu 50 mL apă deionizată și cu 50 μ L soluție NaCl 0,9% (m/v). Valorile potențialului zeta ale NLC-urile pe bază de ulei de in sintetizate sunt prezentate în figura 5.3.

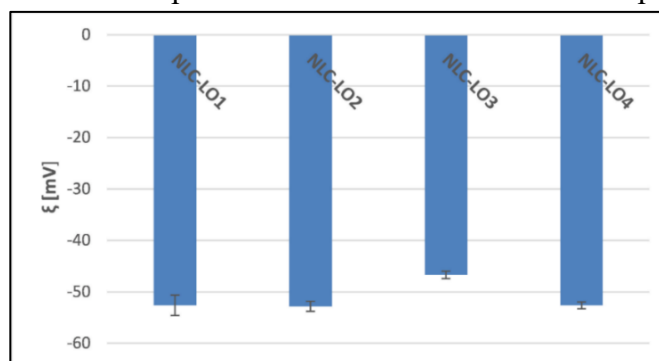


Figura 5.3. Distribuția potențialului electrocinetic în cazul sistemelor NLC-LO

Toate sistemele NLC-LO sintetizate prezintă o bună stabilitate fizică, cu o distribuție a potențialului zeta cuprins între -52,8 mV și -47,6 mV. Încărcările negative ale NLC-urilor se datorează amestecului de surfactanți, cel mai bun rezultat al potențialului zeta fiind obținut în cazul sistemului NLC cu 2,5% amestec de surfactanți ($\xi = -52,8 \text{ mV} \pm 0,56$) (figura 5.3), care relevă o stabilitate mare a sistemului NLC considerat și un potențial scăzut de agregare a nanoparticulelor lipidice solide din dispersia apoasă. Valorile negative ale potențialului zeta indică prezența repulsiilor între nanoparticule, repulsii care împiedică agregarea nanoparticulelor.

S-a remarcat faptul că cea mai bună valoare a potențialului zeta a fost obținută în cazul probei NLC-LO2, care prezintă cea mai bună stabilitate, ceea ce întărește considerațiile făcute anterior prin raportarea la dimensiunea medie a nanoparticulelor și la indicele de polidispersie, conform cărora concentrația optimă de amestec de surfactanți este de 2,5%.

5.2.3. Caracteristicile dimensionale și stabilitatea fizică a NLC-urilor încărcate cu acid cafeic

Compoziția sistemelor NLC încapsulate este redată în tabelul 5.7. Proba NLC-LO-CA1 conține cea mai mică concentrație de acid cafeic (0,5%), proba NLC-LO-CA2 conține concentrația intermediară de acid cafeic (1%), iar proba NLC-LO-CA3 conține cea mai mare concentrație de acid cafeic (1,5%).

Tabelul 5.7. Compoziția sistemelor NLC preparate cu acid cafeic (CA) și ulei de in (LO)

Formulare*	Amestec de surfactanți (g)	GMS (g)	CP (g)	LO (g)	Acid cafeic**(g)
NLC-LO-CA1	2,5	3,5	3,5	3,0	0,5
NLC-LO-CA2	2,5	3,5	3,5	3,0	1,0
NLC-LO-CA3	2,5	3,5	3,5	3,0	1,5

Diametrul mediu al nanoparticulelor și indicele de polidispersie

Sistemul NLC-LO2, având un diametru mediu al nanoparticulelor redus și o stabilitate fizică optimă, a fost utilizat pentru încapsularea antioxidantului natural – acidul cafeic. Rezultatele obținute prin tehnica DLS au arătat că probele NLC pe bază de acid cafeic prezintă un profil monomodal de

distribuție a dimensiunii, cu valori ale lui Zave de $145,5 \pm 0,8$ nm pentru NLC-LO-CA1, $119,7 \pm 0,9$ nm pentru NLC-LO-CA2 și $195,1 \pm 5,3$ nm pentru NLC-LO-CA3 (figura 5.10 (a)). Figura 5.10 (b) prezintă distribuția dimensiunii în cazul probei NLC-LO-CA2.

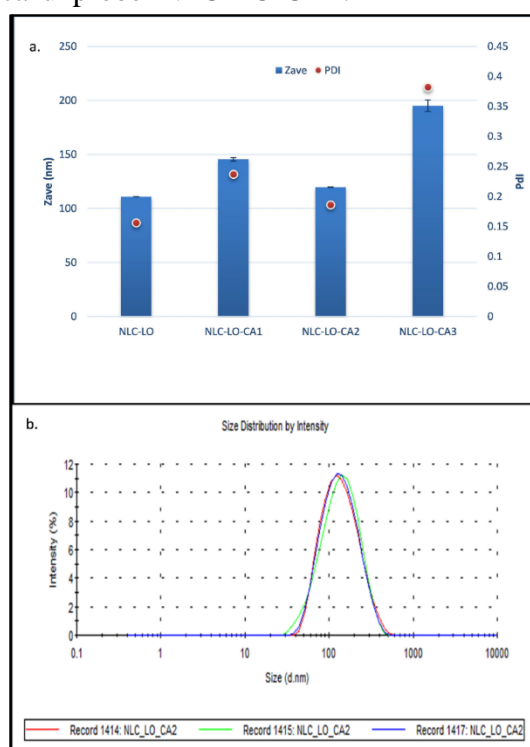


Figura 5.10. a) Distribuția diametrului mediu și a indicelui de polidispersie în cazul sistemelor NLC-LO2 încărcate cu acid cafeic

b) Exemplificarea distribuției dimensiunii particulelor pentru proba NLC-LO-CA2

S-a constatat o creștere semnificativă a lui Zave în cazul probei încărcate cu cea mai mare cantitate de acid cafeic ($195,1 \pm 5,3$ nm pentru NLC încărcat cu 1,5% CA) decât în cazul probei încărcate cu cantitatea intermediară de acid cafeic ($119,7 \pm 0,9$ nm pentru NLC încărcat cu 1% CA). Acest fenomen ar putea fi atribuit:

- ✓ caracterului hidrofil al acidului cafeic;
- ✓ încapsulării unei concentrații limitate de acid cafeic în învelișul surfactant;
- ✓ expulzării excesului de acid cafeic în exteriorul sistemului nanotransportor.

Potențialul zeta

Datele experimentale au evidențiat faptul că toate formulările NLC pe bază de acid cafeic prezintă potențiale electrocinetice negative (figura 5.12).

În comparație cu sistemele NLC libere, s-a observat o perturbare semnificativă a suprafeței electrice după încapsularea acidului cafeic, remarcându-se o creștere a potențialului zeta de la $-52,8$ mV în NLC-ul liber la $-48,2$ mV (NLC-LO-CA3), $-44,1$ mV (NLC-LO-CA1) și $-34,9$ mV (NLC-LO-CA2). Substanța activă (CA) cu structură anionică a indus o modificare notabilă a valorilor potențialelor zeta datorită rearanjării sarcinilor de suprafață. O posibilă explicație poate fi legată de mascarea sarcinilor negative ale grupărilor fosfat (din L- α -fosfatidilcolină), datorită captării acidului cafeic în învelișul surfactant prin legături slabe sau datorită atașării acidului cafeic la suprafața învelișului surfactant, generând o anumită compensare a sarcinilor de suprafață sau o acoperire a încărcării negative din L- α -fosfatidilcolină.

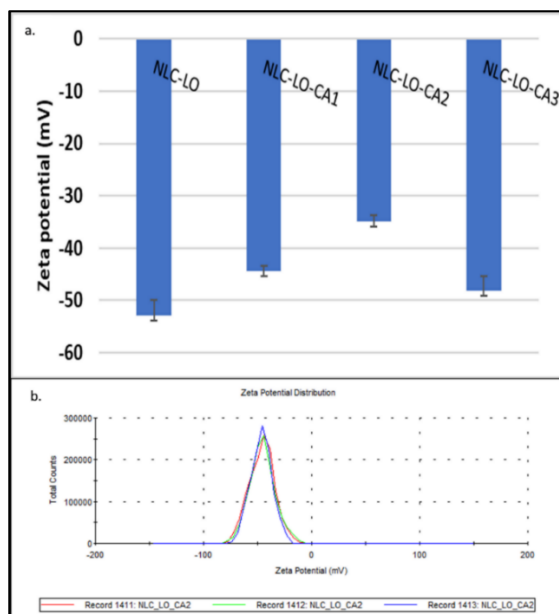


Figura 5.12. a) Distribuția potențialului electrocinetic în cazul sistemelor NLC-LO-CA
b) Exemplificarea distribuției potențialului zeta pentru proba NLC-LO-CA2

5.3. Caracterizarea morfologică a NLC-urilor cu acid cafeic

Miezul lipidic al nanotransportorilor lipidici este important pentru a favoriza proprietățile de eliberare controlată. Starea solidă a sistemelor NLC poate fi pusă în evidență prin *calorimetria de scanare diferențială* [226], analiză termică ce evidențiază posibilele modificări ale cristalinității în matricea lipidică. Caracterizarea morfologică a sistemelor NLC pe bază de acid cafeic, considerând concentrația optimă de substanță activă (1%), s-a realizat cu ajutorul microscopului de forță atomică (Atomic Force Microscope, AFM), imaginile 2D și 3D (figura 5.14 a,b)) oferă o privire generală asupra morfologiei sistemelor NLC, indicând o aglomerare a nanoparticulelor (distanța dintre cel mai mic peak și cel mai înalt peak este de aproximativ 4μm).

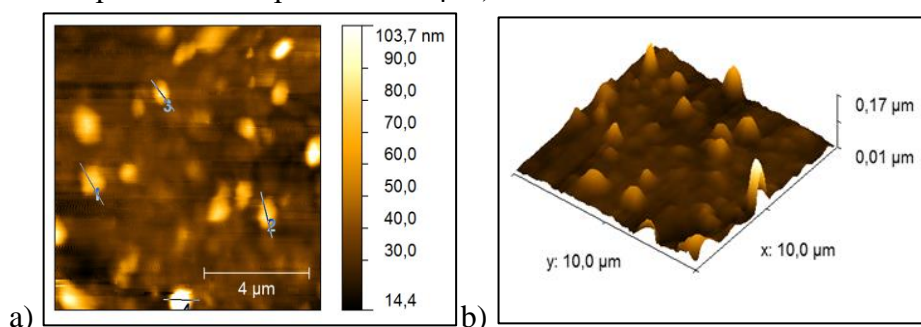


Figura 5.14. Profilul morfologic AFM (2D-a) și 3D-b)) în cazul sistemelor NLC încapsulate cu acid cafeic de concentrație 1%

5.4. Determinarea eficienței de încapsulare a acidului cafeic în sistemele NLC (EE%)

Rezultatele eficienței de încapsulare EE (%) au relevat faptul că acidul cafeic a fost încapsulat eficient în sistemele NLC, în principal, în învelișul format din amestecul de surfactanți și cosurfactanți, obținându-se valori ale eficienței de încapsulare (EE%) mai mari de 95%. Aceste rezultate subliniază o foarte bună compatibilitate în cazul concentrației de acid cafeic de 1% (figura 5.16).

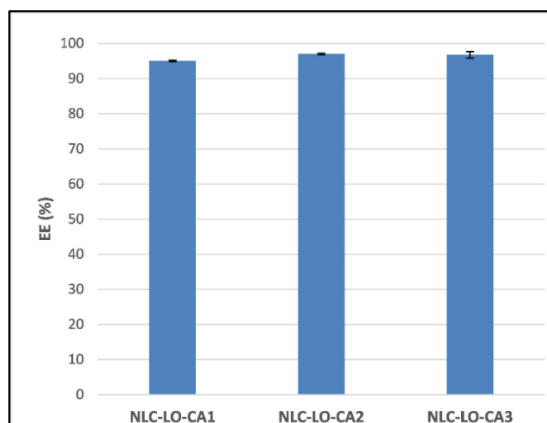


Figura 5.16. Eficiența încapsulării acidului cafeic în interiorul nanotransportorilor lipidici

5.5. Evaluation of the biological properties of caffeic acid-loaded NLC systems

5.5.1. Testarea *in vitro* a proprietăților antioxidante

Activitatea antioxidantă a sistemelor NLC încărcate cu acid cafeic a fost determinată prin metoda ABTS [228], măsurătorile fiind făcute cu ajutorul spectrofotometrului, la lungimea de undă de 734 nm și absorbanta soluției finale de $0,706 \pm 0,01$ [229].

În această etapă, NLC-urile încărcate cu acid cafeic au acționat asupra radicalilor $ABTS^{+*}$ generați *in situ*. Rezultatele experimentale (figura 5.17) au demonstrat o activitate antioxidantă semnificativă a acidului cafeic în asociere cu uleiul de in, reducerea radicalilor $ABTS^{+*}$ depinzând de concentrația de acid cafeic din probă. S-a putut observa că sistemul NLC care conține cantitatea minimă de acid cafeic (NLC-LO-CA1) prezintă o activitate antioxidantă ($47,2\% \pm 0,5$) mult mai bună decât în cazul acidului cafeic neîncapsulat ($21,5\% \pm 0,15$).

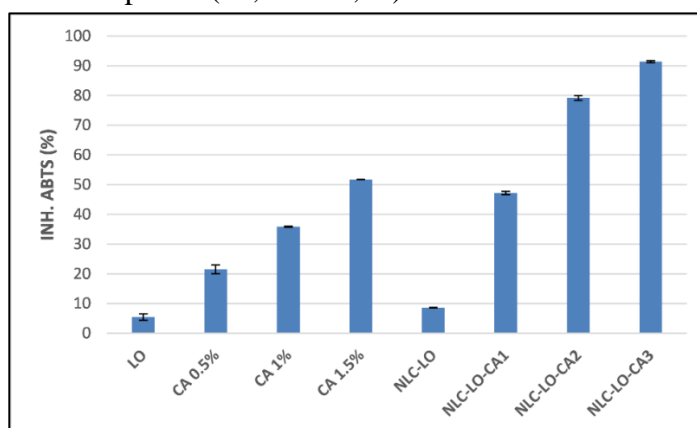


Figura 5.17. Evaluarea comparativă a activității antioxidante în cazul acidului cafeic, NLC-urilor libere și NLC-urilor pe bază de acid cafeic

5.5.2. Studii *in vitro* de eliberare controlată a acidului cafeic

Studiile *in vitro* de eliberare controlată a principiilor active din nanotransportorii lipidici sintetizați au fost puse în evidență cu ajutorul sistemului de celule de difuzie Franz [234].

Profilurile de eliberare controlată a acidului cafeic din sistemele NLC încărcate cu diferite concentrații de acid cafeic (0,5%, 1% și 1,5%) au arătat o comportare diferită. În pofida modelului similar de eliberare întâlnită pentru toate formulările NLC în primele ore ale experimentelor de eliberare, s-a observat o delimitare semnificativă după 5 ore în funcție de procentul inițial de acid

cafeic încărcat în sistemul NLC. În cazul probelor NLC cu acid cafeic **nu a fost evidențiată o eliberare spontană**, după prima oră eliberându-se o cantitate minimă de acid cafeic (aproximativ 8-10% din totalul de acid cafeic eliberat), **ci o eliberare susținută** cu un procent maxim de aproximativ 65% acid cafeic eliberat. Este interesant de remarcat faptul că pe întreaga perioadă de eliberare, cantitățile de acid cafeic eliberate din NLC încărcat cu 0,5% și, respectiv, 1% CA au fost aproape similare (figura 5.18).

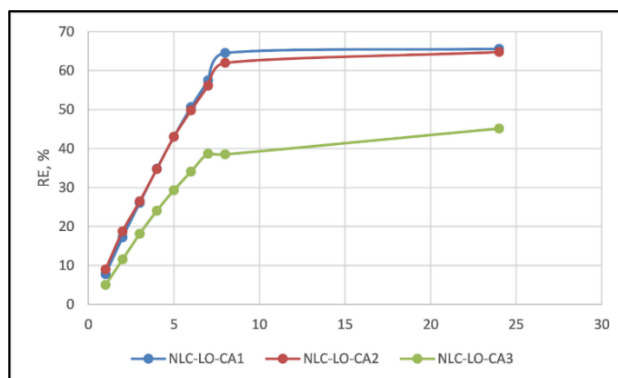


Figura 5.18. Influența nanotransportatorilor lipidici pe bază de ulei de in asupra eliberării acidului cafeic

S-a observat că eliberarea acidului cafeic din NLC este cel mai bine reflectată de cinetica Korsmeyer – Peppas ($R^2 > 0,994$) în toate cazurile studiate. Conform valorii coeficientului de eliberare ($n = 0,5973$, tabelul 5.9), eliberarea acidului cafeic din proba NLC-LO-CA3 urmează un model de difuzie non-Fickian, în timp ce eliberarea acidului cafeic din probele NLC-LO-CA1 și NLC-LO-CA2 se desfășoară după un mecanism de difuzie Fickian ($n < 0,5$) [236]. S-a remarcat o tendință aproape constantă de eliberare a acidului cafeic pe parcursul celor 24 de ore, cu un procent de eliberare de aproximativ 65% CA (în cazul NLC-LO-CA1 și NLC-LO-CA2) și 45% în cazul NLC-LO-CA3. Toate rezultatele experimentale demonstrează că uleiul de in din sistemele NLC a influențat eliberarea controlată a acidului cafeic; acesta este un scop dorit pentru a evita efectul iritant al acidului cafeic și pentru a atinge o concentrație plasmatică eficientă de CA (după o oră). Într-adevăr, eliberarea controlată a CA, pe o perioadă de 24 de ore, ar putea menține o concentrație plasmatică eficientă de acid cafeic.

Tabelul 5.9. Date cinetice obținute la eliberarea controlată a acidului cafeic din sistemele NLC

Formularia NLC	Ordinul zero		Ordinul I		Higushi		Hixson-Crowell		Korsmeyer-Peppas		
	R^2	k_0	R^2	k_1	R^2	k_2	R^2	k_3	R^2	k_4	n
NLC-LO-CA1	0,9966	8,1046	0,9938	0,1353	0,9928	31,528	0,9897	0,0175	0,9967	2,0321	0,4754
NLC-LO-CA2	0,9946	7,5755	0,9972	0,1247	0,9946	29,528	0,9948	0,0161	0,9972	1,8555	0,4462
NLC-LO-CA3	0,9701	5,0423	0,9812	0,0667	0,9905	19,859	0,9823	0,0083	0,9941	2,1039	0,5973

CAPITOLUL 6

SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA SISTEMELOR NANOTRANSPORTOARE ÎNCAPSULATE CU CURCUMINĂ

6.2. CARACTERIZAREA SISTEMELOR NLC LIBERE ȘI ÎNCĂRCATE CU CURCUMINĂ

Obiectivul principal urmărit în cadrul acestui capitol a fost de a sintetiza și caracteriza sisteme NLC preparate cu uleiuri vegetale (ulei de in – LO și ulei de argan – AO) care co-încapsulează curcumina (CRC) – principiu activ natural – și fenilalaninol oleamida (FOA) – principiu activ de sinteză [263], cu scopul de a dezvolta noi sisteme NLC sigure și eficiente. În acest studiu, am sintetizat nanotransportori lipidici pe bază de curcumină (CRC) folosind un amestec de lipide solide (compus din monostearat de glicerol și palmitat de cetil) în asociere cu un mediator lipidic (fenilalaninol oleamidă) și un ulei vegetal (ulei de semințe de in, respectiv, ulei de argan).

6.2.1. Sinteza nanotransportorilor lipidici pe bază de curcumină

În prima etapă a studiului prezentat în acest capitol, am sintetizat sistemele NLC pe bază de ulei vegetal (ulei de in, respectiv, ulei de argan), utilizând concentrația optimizată de amestec de surfactanți (2,5%); am obținut sisteme NLC libere de origine vegetală, care au fost caracterizate din punct de vedere al dimensiunii medii a nanoparticulelor, indicelui de polidispersie și potențialului zeta prin metoda DLS. Am sintetizat șase formulări NLC diferite pe bază de curcumină și FOA, compozițiile noilor sisteme fiind prezentate în tabelul 6.1.

Tabelul 6.1. Compoziția sistemelor NLC preparate cu ulei de in (LO)/ulei de argan (AO) și încapsulate cu curcumină (CRC) și fenilalaninol oleamidă (FOA)

Formulare*	**Amestec de surfactanți (g)	GMS (g)	CP (g)	LO (g)	AO (g)	FOA (g)	*** CRC (g)
NLC-LO	2,5	3,0	3,0	3,0	-	-	-
NLC-AO	2,5	3,0	3,0	-	3,0	-	-
NLC-LO-CRC	2,5	3,0	3,0	3,0	-	-	0,1
NLC-AO-CRC	2,5	3,0	3,0	-	3,0	-	0,1
NLC-LO-FOA-CRC	2,5	3,0	3,0	3,0	-	1,0	0,1
NLC-AO-FOA-CRC	2,5	3,0	3,0	-	3,0	1,0	0,1

6.2.2. Caracterizarea dimensională a nanotransportorilor lipidici încărcăți cu curcumină Diametrul mediu al nanoparticulelor (Zave) și indicele de polidispersie (PdI)

Urmărind comportarea celor șase formulări NLC pe bază de ulei de in/ulei de argan, s-a constatat că toate formulările sintetizate prezintă o distribuție adecvată a dimensiunii particulelor. Dimensiunea nanoparticulelor s-a încadrat între 127,6 nm (pentru proba **NLC-AO-FOA-CRC**) și 157,6 nm (pentru proba **NLC-AO**) (figura 6.2). Aceste rezultate ar putea fi corelate cu prezența uleiului de in/uleiului de argan, care contribuie la scăderea viscozității amestecului lipidic, reducând tensiunea superficială de suprafață. De asemenea, valorile indicelui de polidispersie PdI s-au încadrat între 0,189 (proba NLC-LO) și 0,232 (proba NLC-AO), ceea ce sugerează existența unei populații relativ monodisperse de particule lipidice.

S-a observat o reorganizare a miezului lipidic, obținând diametre mai mici prin încapsularea curcuminei în sistemele NLC. Rezultatul scăderii dimensiunii medii a particulelor Zave poate fi

atribuită unei scăderi a viscozității (care ajută la procesarea HPH, cu particule mai mici), prin combinarea FOA cu celelalte lipide utilizate pentru sinteză.

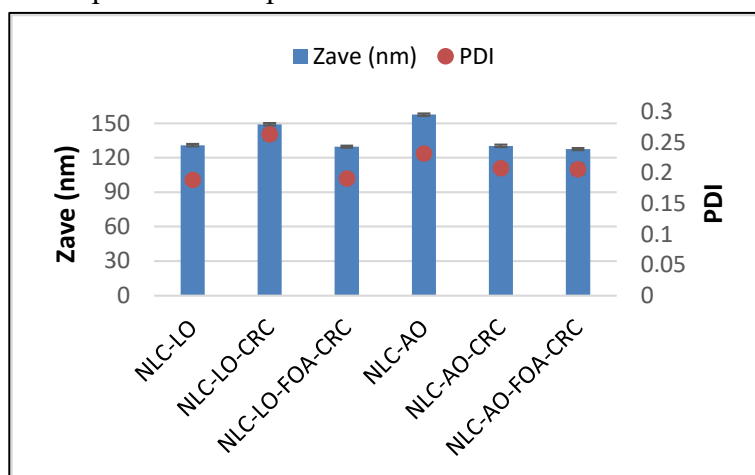


Figura 6.2. Distribuția diametrului mediu și a indicelui de polidispersie în cazul sistemelor NLC-LO/AO-FOA-CRC

Evaluarea stabilității fizice a sistemelor NLC pe bază de curcumină

Rezultatele experimentale au arătat că toate NLC-urile încărcate cu curcumină sunt stabile în timp, cu o valoare medie a potențialului zeta cuprins între -46,6 mV (pentru proba NLC-AO-FOA-CRC) și -55,3 mV (pentru proba NLC-LO-CRC), încapsularea curcuminei în miezul lipidic explicând diferența mică dintre valorile potențialelor zeta ale sistemelor NLC-AO și NLC-LO încărcate cu curcumină (figura 6.4).

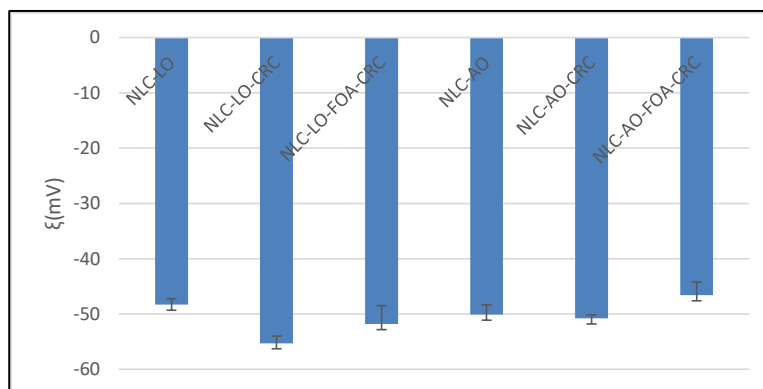


Figura 6.4. Distribuția potențialului electrocinetic în cazul sistemelor NLC libere vs. NLC încărcate cu curcumină și fenilalaninol oleamidă

Datele experimentale au arătat că, pentru toate NLC-urile dezvoltate în prezentul studiu, valorile potențiale zeta au fost mai mici de -40 mV (figura 6.7), astfel încât se așteaptă ca aceste sisteme NLC obținute să manifeste o foarte bună stabilitate fizică pe termen lung.

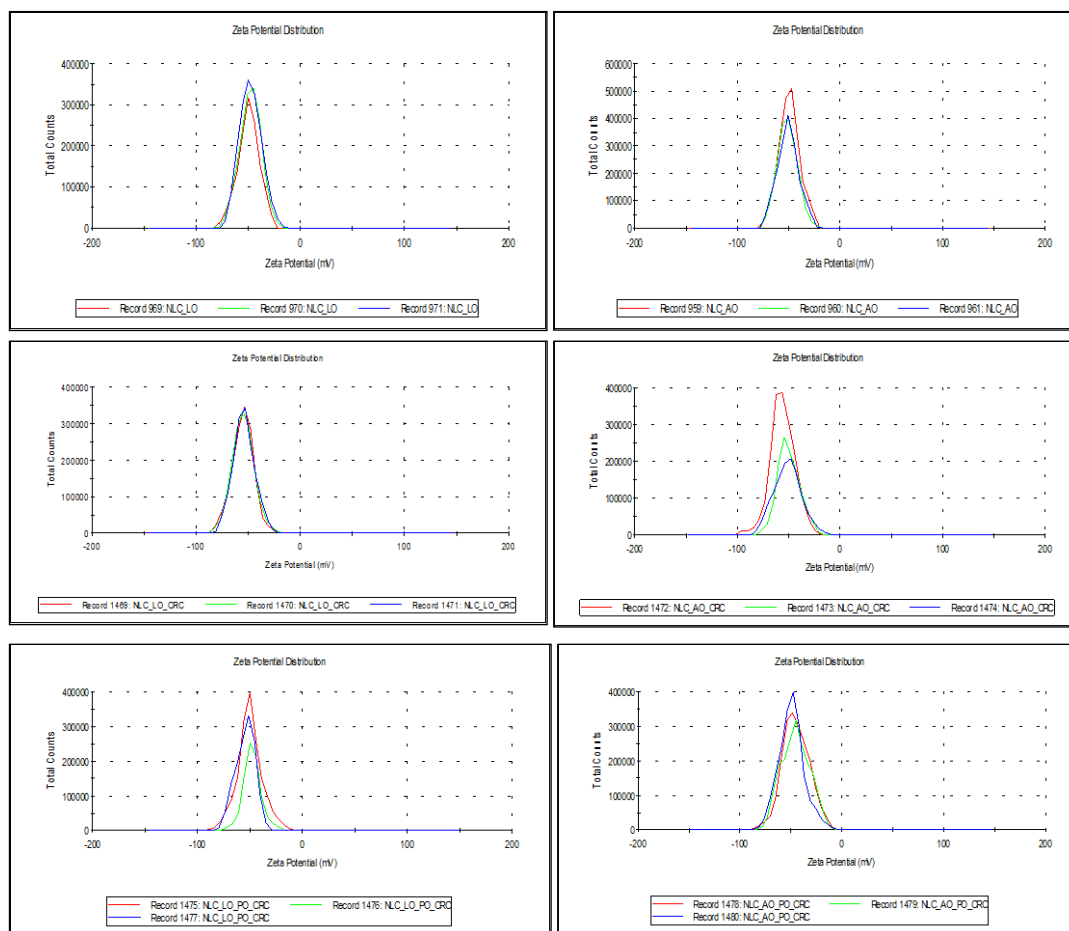


Figura 6.7. Distribuția potențialului zeta pentru sistemele NLC libere vs NLC încărcate cu curcumină

6.3. DETERMINAREA EFICIENȚEI DE ÎNCAPSULARE A CURCUMINEI ÎN SISTEMELE NLC (EE%)

Eficiența de încapsulare (EE%) și EE încărcare (LC%) a curcuminei în sistemele de nanotransportori lipidici preparate pe bază de ulei de in / ulei de argan sunt prezentate în figurile 6.10 și 6.11.

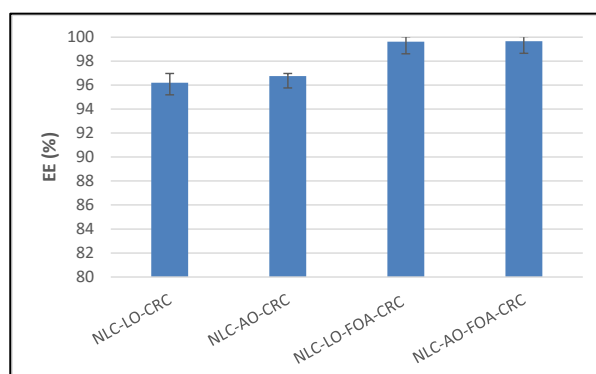


Figura 6.10. Eficiența încapsulării (EE%) curcuminei în sistemele NLC pe bază de ulei de in/ulei de argan și FOA

Capacitatea de încărcare (LC%) a curcuminei în faza lipidică este bine corelată cu rezultatele eficienței de încapsulare, LC% având valori cuprinse între 7,05% (pentru proba NLC-LO-CRC) și 8,62% (pentru proba NLC-LO-FOA-CRC) (figura 6.11).

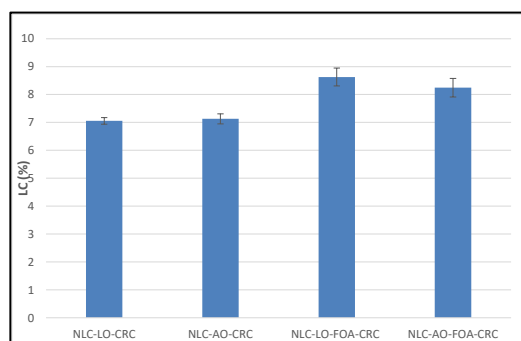


Figura 6.11. Capacitatea de încărcare a curcuminei în sistemele NLC pe bază de ulei de in/ulei de argan și FOA

Valorile eficienței de încapsulare EE% a curcuminei în probele NLC au fost mai mari de 96%, aceste rezultate fiind explicate prin încapsularea eficientă a curcuminei în rețeaua lipidică formată din fenilalaninol oleamidă în asociere cu uleiuri vegetale, valorile varind de la 96,2% (în cazul probei NLC-LO-CRC) la 99,66% (în cazul probei NLC-AO-FOA-CRC).

Studiul privind încapsularea curcuminei în sistemele NLC sintetizate a condus la rezultate optime ale eficienței de încapsulare. În cazul acestor sisteme NLC încărcate cu curcumină și co-încărcate cu fenilalaninol oleamidă, rezultatele bune ale eficienței de încapsulare pot fi explicate prin compatibilitatea ridicată a celor două principii active, curcumina și fenilalaninol oleamida, cu amestecul de lipide constând din ulei de in/ ulei de argan, monostereat de glicerol și palmitat de cetil.

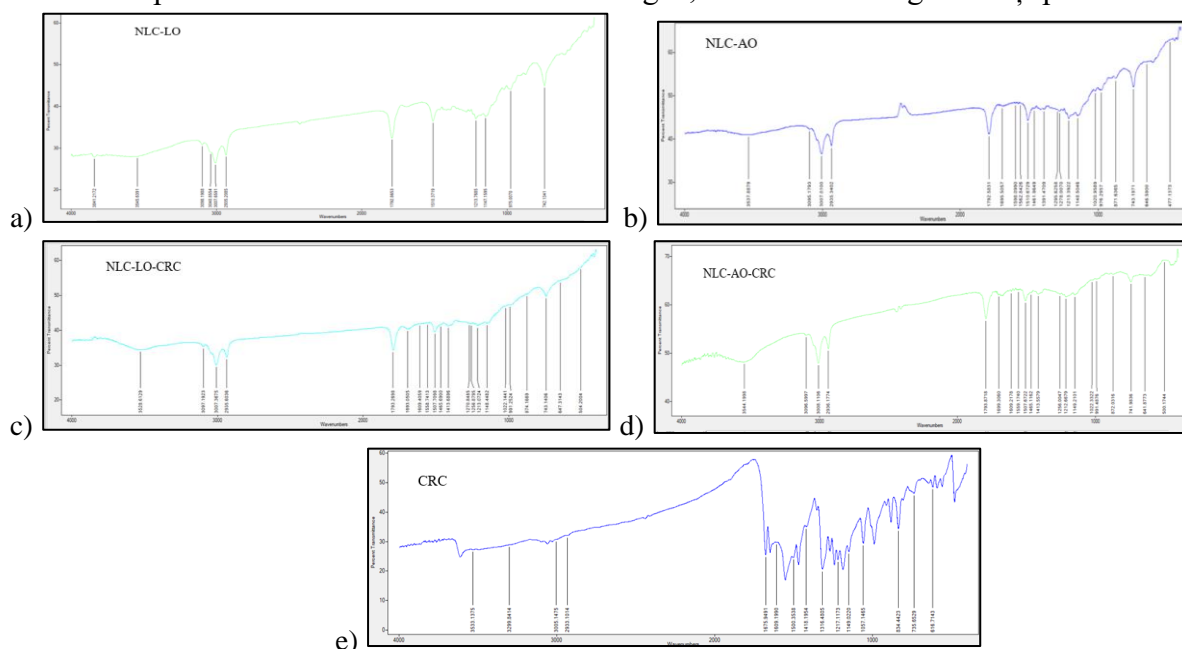


Figura 6.12. Spectrele FT-IR ale curcuminei, sistemelor NLC-LO/AO, NLC-LO/AO-CRC

Încapsularea curcuminei în sistemele NLC pe bază de ulei de in/ulei de argan a fost pusă în evidență cu ajutorul spectroscopiei în infraroșu cu transformată Fourier, utilizând un spectrofotometru FT-IR 620 Jasco; spectrele FT-IR obținute pun în evidență modificările structurale ca urmare a încapsulării curcuminei (figura 6.12).

6.4. EVALUAREA PROPRIETĂȚILOR BIOLOGICE ALE SISTEMELOR NLC PE BAZĂ DE CURCUMINĂ

6.4.1. Testarea *in vitro* a activității antioxidante

Uleiurile vegetale utilizate în noile sisteme NLC, uleiul de in și uleiul de argan, reprezintă surse importante de antioxidanți.

Activitatea antioxidantă *in vitro* atât a sistemelor NLC-AO/LO-CRC cu sau fără fenilalaninol oleamidă, cât și a sistemelor NLC libere, curcuminei și fenilalaninol oleamidei a fost determinată prin metoda ABTS, utilizând un spectrofotometru UV-VIS de tip V670 [228].

Activitatea de reducere a radicalilor cationici ABTS⁺ obținuți *in situ* a demonstrat potențialul antioxidant al curcuminei în asociere cu uleiul de in / uleiul de argan și cu fenilalaninol oleamida. Efectul antioxidant al sistemului NLC liber poate fi atribuit nivelului ridicat de acid α -linolenic din uleiul de in și de acid linoleic din uleiul de argan. Încapsularea curcuminei în sistemele NLC preparate cu ulei de in sau cu ulei de argan a condus la îmbunătățirea activității antioxidante, valorile procentelor de inhibiție a radicalilor ABTS⁺ fiind de 61,62% în cazul probei NLC-LO-CRC și 64,2% în cazul probei NLC-AO-CRC. Prezența curcuminei și a fenilalaninol oleamidei în sistemele NLC sintetizate a condus la creșterea activității antioxidante, valorile procentelor de inhibiție fiind de 69,37% pentru proba NLC-AO-FOA-CRC și 75,73% pentru proba NLC-LO-FOA-CRC (figura 6.13).

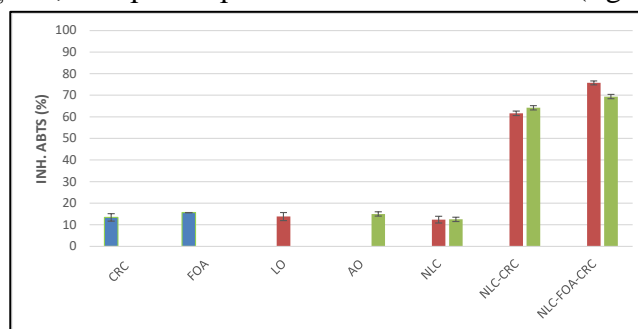


Figura 6.13. Activitatea antioxidantă a sistemelor NLC sintetizate vs. curcumină, fenilalaninol oleamidă și uleiuri vegetale

O privire comparativă a datelor reprezentate în figura 6.14 demonstrează efectul sinergic manifestat de curcumină și ulei vegetal, ulei de in / ulei de argan, ambele principii active naturale încapsulate în același sistem de nanotransportori lipidici. Procentul de inhibiție a radicalilor ABTS⁺ este de 6 ori mai mare în cazul sistemelor NLC-CRC și NLC-FOA-CRC comparativ cu cel obținut în cazul sistemelor NLC libere, curcuminei native și uleiului de in/ uleiului de argan (figura 6.14).

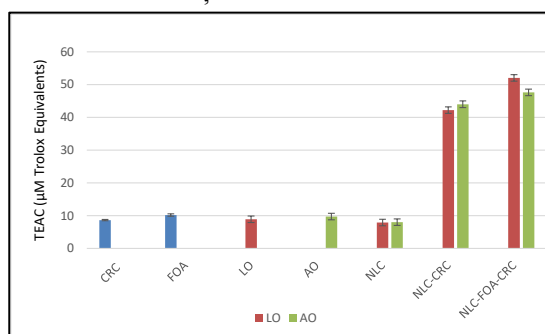


Figura 6.14. Evaluarea comparativă a activității antioxidante a curcuminei, fenilalaninol oleamidei, uleiului de in/argan și a sistemelor NLC libere/încărcate cu curcumină

6.4.2. Studii *in vitro* de eliberare controlată a curcuminei

Conform profilelor de eliberare (figura 6.15), în grupul sistemelor NLC încărcate cu curcumina s-a observat o eliberare lentă a curcuminei; după 24 de ore de eliberare *in vitro*, s-a constatat că procentul de curcumina eliberată în cazul probei NLC-AO-FOA-CRC a fost de 17,1% și în cazul probei NLC-LO-FOA-CRC de 32%.

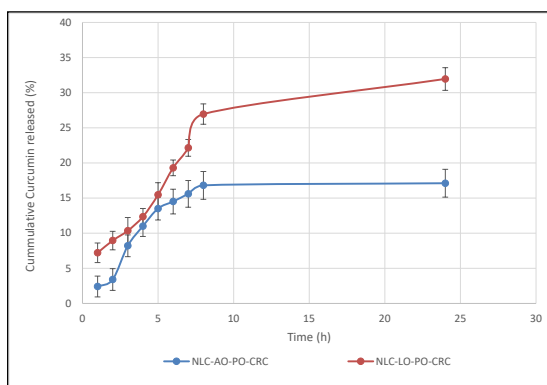


Figura 6.15. Influența naturii nanotransportorilor lipidici pe bază de ulei de in/argan și FOA asupra eliberării curcuminei

Eliberarea curcuminei din sistemul NLC-LO / AO-FOA-CRC a prezentat un profil de eliberare controlată care a avut loc în două etape. Eliberarea inițială (pe parcursul primelor 8 ore de experimente) ar putea fi legată de eliberarea unei cantități mici de curcumina adsorbit la stratul de suprafață al sistemului NLC și de difuzia pasivă a curcuminei. După 8 ore de experimente, un procent 16,8% de curcumina a fost eliberată în cazul probei NLC-AO-FOA-CRC și de 26,9% curcumina în cazul probei NLC-LO-FOA-CRC. Mai mult, profilul de eliberare prelungită după 8 ore ar trebui asociat cu curcumina încorporată în nucleul intern al sistemului NLC care este eliberată lent odată cu degradarea sistemului NLC. O posibilă explicație pentru eliberarea lentă a curcuminei din sistemul NLC-AO-FOA-CRC comparativ cu sistemul NLC-LO-FOA-CRC ar putea fi o afinitate crescută între curcumina, fenilalaninol oleamidă și ulei de argan datorită conjugării π stabilite între resturile fenilice care determină eliberarea întârziată a medicamentului din rețeaua lipidică.

Tabelul 6.4. Date cinetice obținute la eliberarea controlată a curcuminei din sistemele NLC

Formularia NLC	Ordinul zero		Ordinul I		Higushi		Hixson-Crowell		Korsmeyer-Peppas		
	R ²	k ₀	R ²	k ₁	R ²	k ₂	R ²	k ₃	R ²	k ₄	n
NLC-AO-FOA-CRC	0,9423	2,181	0,95	0,0242	0,9698	8,6244	0,9511	0,0029	0,9513	2,0502	0,4877
NLC-LO-FOA-CRC	0,9298	2,669	0,9123	0,032	0,857	9,9885	0,9095	0,0039	0,8918	1,2032	0,8311

Conform coeficienților de corelație (tabelul 6.4), s-a observat că eliberarea curcuminei din sistemele NLC sintetizate se realizează după o cinetică de ordinul zero în cazul probei NLC-LO-FOA-CRC ($R^2 = 0,9298$) și după un model Higuchi în cazul probei NLC-AO-FOA-CRC ($R^2 = 0,9698$). După primele 8 ore de experimente, constanta de viteză ($k = 8,62$) este mai mare în cazul probei NLC-AO-FOA-CRC decât în cazul probei NLC-LO-FOA-CRC ($k = 2,18$), ceea ce întărește ipoteza anterioară privind eliberarea mai rapidă a curcuminei din sistemul NLC bazat pe ulei de in comparativ cu sistemul NLC bazat pe ulei de argan.

Rezultatele experimentale de eliberare au demonstrat faptul că sistemul NLC pe bază de ulei de in a jucat un rol important în eliberarea controlată a curcuminei. Acest fenomen ar putea fi eficient pentru a elimina efectul iritant al curcuminei asupra tractului gastrointestinal și ar putea fi util și pentru obținerea unei concentrații plasmatiche eficiente de curcumină – care poate fi menținută o perioadă lungă de timp prin eliberarea susținută pe parcursul a 24 de ore.

CAPITOLUL 7

SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA SISTEMELOR NANOTRANSPORTOARE ÎNCAPSULATE CU PIPERINĂ

7.2. CARACTERIZAREA SISTEMELOR NLC LIBERE ȘI ÎNCĂRCATE CU PIPERINĂ

În cadrul acestui capitol am urmărit ca obiectiv principal sintetiza și caracterizarea unor nanotransportori lipidici preparați cu ulei vegetal/mineral (ulei de luminița nopții – ULN /ulei de parafină – UP) care încapsulează piperina (PIP) drept principiu activ natural, cu scopul de a dezvolta noi formulări farmaceutice utile în tratarea anumitor afecțiuni. Prezentul studiu de cercetare s-a bazat pe sinteza sistemelor NLC pe bază de piperină utilizând un amestec de lipide solide (format din monostearat de glicerol și palmitat de cetil) în asociere cu ulei vegetal/mineral bioactiv (ulei de luminița nopții/ulei de parafină).

7.2.1. Sinteza sistemelor NLC pe bază de piperină

Pentru sinteza nanotransportorilor lipidici am folosit o fază lipidică formată din amestec de monostearat de glicerol și palmitat de cetil în raport 1:1 și ulei vegetal / mineral (ulei de luminița nopții / ulei de parafină) și o fază apoasă formată din amestec de surfactanți – Tween 20:L- α -fosfatidilcolină: Poloxamer Sinperonic PE/F68 = 75:15:15 (m/m/m). Am sintetizat șase formulări NLC diferite pe bază de piperină, compozițiile noilor sisteme NLC fiind prezentate în tabelul 7.1.

Tabelul 7.1. Compoziția sistemelor NLC preparate cu ulei de luminița nopții (ULN) / ulei de parafină (UP) și încapsulate cu piperină (PIP)

Formulare*	**Amestec de surfactanți (g)	GMS (g)	CP (g)	UP (g)	ULN (g)	PIP (g)
NLC-UP	2,5	3,0	3,0	3,0	-	-
NLC-ULN	2,5	3,0	3,0	-	3,0	-
NLC-UP-PIP 1%	2,5	3,0	3,0	3,0	-	1,0
NLC-LN-PIP 1%	2,5	3,0	3,0	-	3,0	1,0
NLC-UP-PIP 1,5%	2,5	3,0	3,0	3,0	-	1,5
NLC-LN-PIP 1,5%	2,5	3,0	3,0	-	3,0	1,5

*Masa probei sintetizate = 100 g dispersie apoasă NLCs
**Amestec de surfactanți (2,5 %): 1,75 g Tween 20 + 0,375 g Poloxamer + 0,375 g lecitină
***Piperina – compusul activ, se introduce direct în faza lipidică, ținând cont de Solubilitate.

7.2.2. Caracterizarea dimensională a nanotransportorilor lipidici încărcăți cu piperină

Această caracterizare a avut ca scop principal evaluarea cât mai exactă a caracteristicilor dimensionale ale sistemelor NLC sintetizate. În cadrul acestei etape sunt prezentate determinările

privind diametrul mediu (Zave) al nanoparticulelor, indicele de polidispersie (PdI), dar și potențialul zeta care oferă informații despre stabilitatea fizică a nanoparticulelor.

Diametrul mediu al nanoparticulelor (Zave) și indicele de polidispersie (PdI)

Formulările NLC-UP/LN-PIP au prezentat dimensiuni optime ale nanoparticulelor, cu valori Zave mai mici de 200 nm. De exemplu, valorile Zave ale probei NLC-UP-PIP 1% și NLC-LN-PIP 1% sunt de 122,9 nm și, respectiv, 121,9 nm, în timp ce formulările NLC-UP-PIP 1,5% / NLC-LN-PIP 1,5% și NLC-UP / NLC-ULN sunt de 119,2 nm / 124,3 nm și 129,2 nm / 137,7 nm (figura 7.3). S-a observat o reorganizare a miezului lipidic, obținându-se diametre mai mici prin încapsularea piperinei în sistemele NLC. Rezultatul scăderii dimensiunii medii a particulelor Zave poate fi atribuit unei scăderi a viscozității (care ajută la procesarea HPH, cu particule mai mici), prin asocierea uleiurilor vegetale cu celelalte lipide utilizate pentru sinteză.

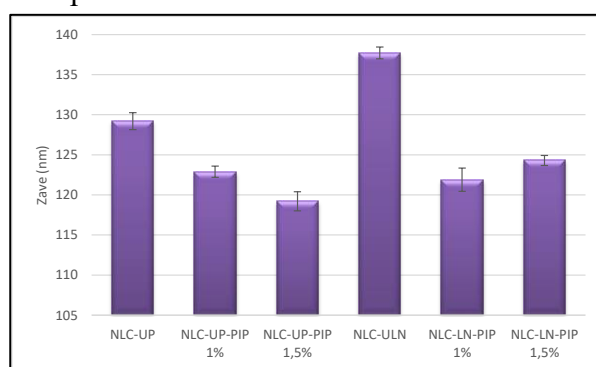


Figura 7.3. Distribuția diametrului mediu în cazul sistemelor NLC-UP/LN-PIP

Pe de altă parte valorile indicelui de polidispersie sunt optim corelate cu valorile dimensiunii medii a nanoparticulelor în cazul tuturor probelor NLC pe bază de piperină. Valorile PdI ale probei NLC-UP-PIP 1% și NLC-LN-PIP 1% sunt de 0,173 și, respectiv, 0,169, în timp ce formulările NLC-UP-PIP 1,5% / NLC-LN-PIP 1,5% și NLC-UP / NLC-ULN sunt de 0,157 / 0,184 și 0,223 / 0,199. S-a constatat că cea mai mică valoare a indicelui de polidispersie ($0,157 \pm 0,014$) a fost atribuită sistemelor NLC sintetizate cu ulei de parafină și piperină 1,5%, iar cea mai mare valoare ($0,223 \pm 0,006$) a fost atribuită sistemelor NLC sintetizate cu ulei de parafină, neîncapsulate.

Sistemele NLC preparate cu ulei de luminița nopții / parafină neîncapsulate cu piperină prezintă o dimensiune medie optimă a nanoparticulelor și un indice de polidispersie PdI cu valori mai mici de 0,25 (figura 7.5 a, b), cu precizarea că diferența dintre dimensiunea medie a nanoparticulelor preparate cu ulei de parafină ($129,2 \text{ nm} \pm 1,1$) și dimensiunea medie a nanoparticulelor preparate cu ulei de luminița nopții ($137,7 \text{ nm} \pm 0,7$) poate fi explicată pe baza compoziției chimice diferite a celor două uleiuri, uleiul de luminița nopții fiind îmbogățit în acizi grași nesaturați (preponderent acid linoleic și acid γ -linolenic).

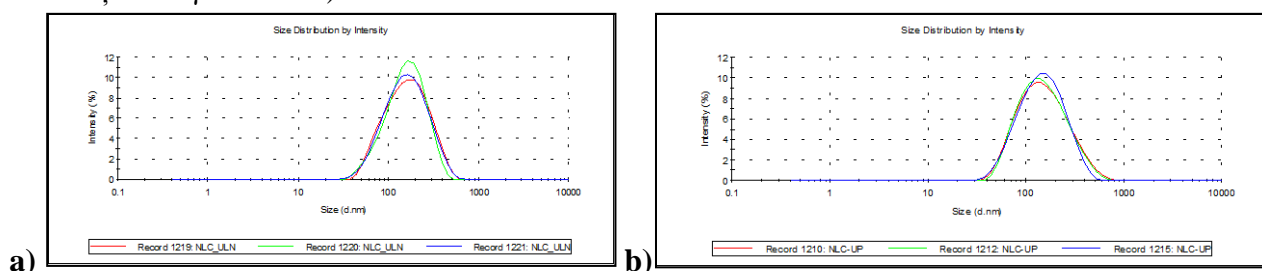


Figura 7.5. Distribuția dimensiunii medii a nanoparticulelor a) în cazul probei NLC-ULN, b) în cazul probei NLC-UP

Sistemele NLC preparate cu ulei de luminița nopții / ulei de parafină încapsulate cu piperină de concentrație 1% prezintă o dimensiune medie optimă a nanoparticulelor și un indice de polidispersie PdI cu valori mai mici de 0,25 (figura 7.6 a, b), existând o diferență mică între dimensiunea medie a nanoparticulelor preparate cu ulei de parafină (122,9 nm \pm 0,7) și dimensiunea medie a nanoparticulelor preparate cu ulei de luminița nopții (121,9 nm \pm 1,4). **S-a observat că încapsularea piperinei (1%) în matricea lipidică a nanotransportorilor pe bază de ulei de luminița nopții / ulei de parafină a îmbunătățit dimensiunea medie a nanoparticulelor.**

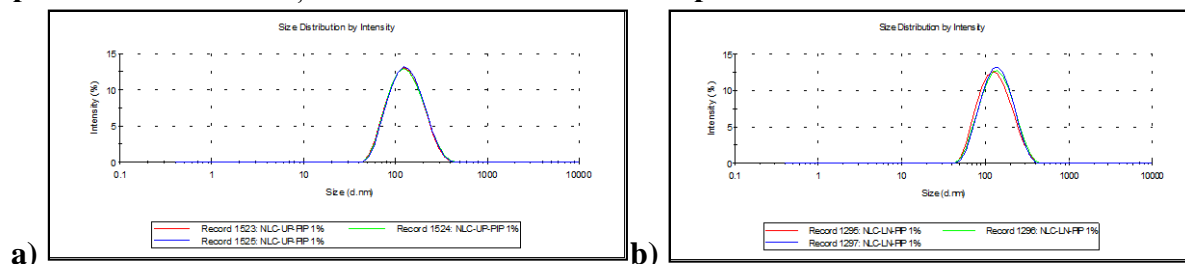


Figura 7.6. Distribuția dimensiunii medii a nanoparticulelor

a) în cazul probei NLC-UP-PIP 1%, b) în cazul probei NLC-LN-PIP 1%

În cazul sistemelor NLC preparate cu ulei de luminița nopții / parafină încapsulate cu piperină de concentrație 1,5 % s-au obținut, de asemenea, valori optime ale dimensiunii medii a nanoparticulelor și ale indicelui de polidispersie PdI (figura 7.7 a, b), cu o diferență nesemnificativă între dimensiunea medie a nanoparticulelor preparate cu ulei de parafină (119,2 nm \pm 1,1) și dimensiunea medie a nanoparticulelor preparate cu ulei de luminița nopții (124,3 nm \pm 0,6). **S-a observat că încapsularea piperinei în concentrație mai mare (1,5%) în matricea lipidică a nanotransportorilor pe bază de ulei de luminița nopții / ulei de parafină a îmbunătățit și mai mult dimensiunea medie a nanoparticulelor.**

În concluzie, prin încapsularea unei cantități mai mari de piperină s-a remarcat o scădere mai accentuată a dimensiunilor medii ale NLC-urilor pe bază de ulei de parafină / ulei de luminița nopții, fenomen explicat prin afinitatea piperinei pentru miezul lipidic și prin rearanjarea lanțurilor acizilor grași din structura uleiurilor vegetale care permit înglobarea unei cantități mai mari de principiu activ, determinând astfel scăderea dimensiunii medii a sistemelor NLC.

Evaluarea stabilității fizice a sistemelor NLC pe bază de piperină

Rezultatele experimentale au arătat că toate NLC-urile încapsulate cu piperină prezintă stabilitate fizică în timp, valoarea medie a potențialului zeta fiind cuprins între -45,3 mV (pentru proba NLC-UP-PIP 1%) și -57 mV (pentru proba NLC-ULN), încapsularea piperinei în miezul lipidic explicând diferența mică dintre valorile potențialelor zeta ale sistemelor NLC-UP și NLC-ULN încărcate cu piperină. Sarcinile negative ale NLC-urilor se datorează amestecului de surfactanți și compoziției uleiurilor utilizate. Distribuțiile potențialelor zeta ale NLC-urilor dezvoltate, NLC-uri libere și NLC-uri încărcate cu piperină, sunt prezentate în figura 7.7.

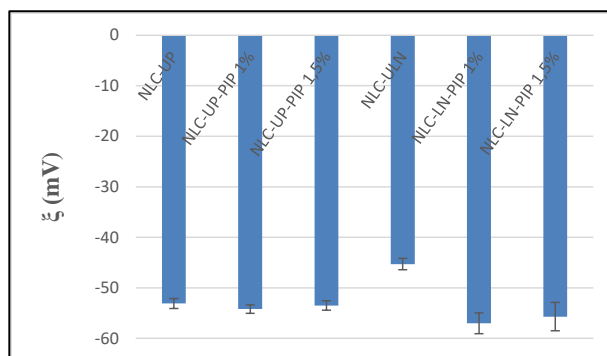


Figura 7.7. Distribuția potențialului electrocinetic în cazul sistemelor NLC libere vs. NLC încapsulate cu piperină

Încapsularea piperinei în sistemele NLC considerate a condus la creșterea stabilității probelor. Referitor la sistemele NLC încapsulate cu cantitatea mai mare de piperină (1,5%) se poate demonstra stabilitatea prin valorile potențialului zeta ($-53,5 \text{ mV} \pm 0,929$ în cazul sistemului NLC-UP-PIP 1,5 % și $-55,7 \text{ mV} \pm 2,81$ în cazul NLC-LN-PIP 1,5%) (figura 7.10 a, b).

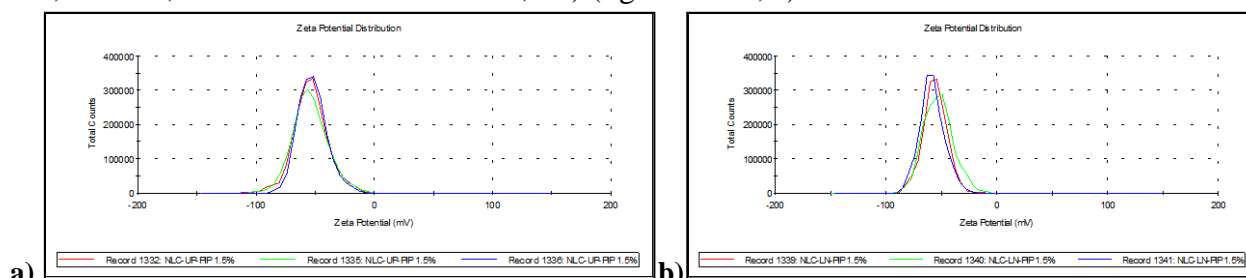


Figura 7.10. Distribuția potențialului electrocinetic în cazul probei
a) NLC-UP-PIP 1,5%
b) NLC-LN 1,5%

Datele experimentale prezentate anterior pun în evidență faptul că natura substanțelor active încapsulate în interiorul matricei lipidice din sistemul NLC are o puternică influență asupra stabilității particulelor coloidale; valorile potențialului zeta ale sistemelor NLC sintetizate mai electronegative decât -50 mV (excepție în cazul probei NLC-ULN cu o valoare de $-45,3 \text{ mV} \pm 1,12$) demonstrează stabilitatea excelentă în timp a NLC-urilor sintetizate.

7.3. DETERMINAREA EFICIENȚEI DE ÎNCAPSULARE (EE%) A PIPERINEI ÎN SISTEMELE NLC

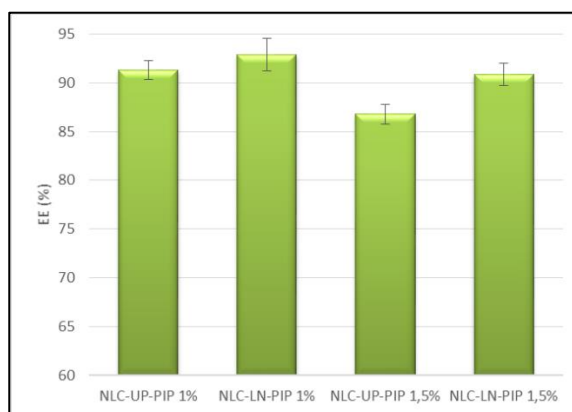


Figura 7.13. Eficiența încapsulării (EE%) piperinei în sistemele NLC pe bază de ulei de parafină / ulei de luminița nopții

Eficiența de încapsulare (EE%) a piperinei în sistemele de nanotransportori lipidici preparate pe bază de ulei de parafină / ulei de luminița nopții este prezentată în figura 7.13.

Valorile eficienței de încapsulare EE% a piperinei în probele NLC sintetizate au fost mai mari de 86%, aceste rezultate fiind explicate prin încapsularea eficientă a piperinei în rețeaua lipidică pe bază de uleiuri vegetale, valorile variind de la 86,77% (în cazul probei NLC-UP-PIP 1,5%) la 92,89% (în cazul probei NLC-LN-PIP 1%). S-a constatat că proba NLC pe bază de ulei de parafină încapsulată cu 1% piperină prezintă o eficiență de încapsulare ușor mai mică decât în cazul probei NLC pe bază de ulei de luminița nopții, neexistând diferențe semnificative între cele două formulări. Încapsularea unei cantități mai mari de piperină (1,5%) a condus la valori ale eficienței de încapsulare de 86,77% în cazul probei NLC-UP-PIP 1,5% și de 90,85% în cazul probei NLC-LN-PIP 1,5%; diferența dintre eficiențele de încapsulare poate fi explicată prin aceea că excesul de piperină (0,5%) nu a mai putut fi încapsulat în matricea lipidică și a rămas în exteriorul miezului lipidic.

Studiul privind încapsularea piperinei în sistemele NLC sintetizate a condus la rezultate optime ale eficienței de încapsulare, care pot fi explicate prin compatibilitatea ridicată a principiului activ – piperina – cu amestecul de lipide constând din ulei de parafină/ ulei de luminița nopții, monostereat de glicerol și palmitat de cetil.

7.4. EVALUAREA PROPRIETĂȚILOR BIOLOGICE ALE SISTEMELOR NLC PE BAZĂ DE PIPERINĂ

Activitatea antioxidantă a sistemelor NLC pe bază de piperină și eliberarea controlată a piperinei din sistemele NLC au fost evaluate prin studii *in vitro*, conform celor prezentate în continuare.

7.4.1. Testarea *in vitro* a activității antioxidante

Determinarea *in vitro* a activității antioxidante prin metoda ABTS

Activitatea antioxidantă a sistemelor NLC libere poate fi atribuită compoziției chimice a celor două uleiuri utilizate în etapa de sinteză. Încapsularea piperinei în sistemele NLC preparate cu ulei de parafină sau cu ulei de luminița nopții a condus la îmbunătățirea activității antioxidante, valorile procentelor de inhibiție a radicalilor ABTS^{•+} fiind de 27,99% în cazul probei NLC-UP-PIP 1%, 31,73% în cazul probei NLC-UP-PIP 1,5%, 34,3% în cazul probei NLC-LN-PIP 1% și 38,49% în cazul probei NLC-LN-PIP 1,5%.

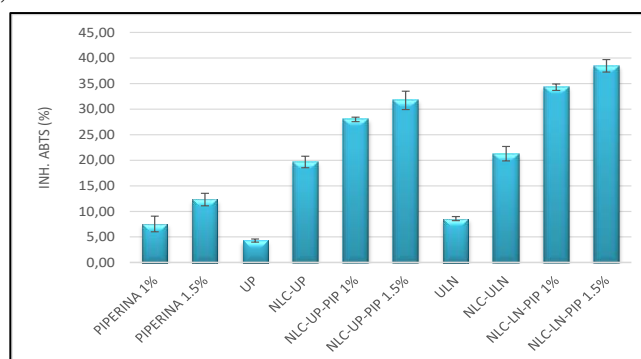


Figura 7.15. Activitatea antioxidantă a sistemelor NLC-UP/LN-PIP vs. piperină, ulei de parafină și ulei de luminița nopții (metoda ABTS)

Prezența piperinei în cantitate mai mare în sistemele NLC sintetizate a condus la creșterea activității antioxidante, valorile procentelor de inhibiție pentru probele cu 1,5% piperină fiind mai mari decât în cazul probelor NLC cu 1% piperină. De asemenea, s-a observat un efect antioxidant mai

puternic în cazul probelor NLC pe bază de ulei de luminița nopții comparativ cu efectul antioxidant al probelor pe bază de ulei de parafină, indiferent de concentrația de piperină utilizată în sinteză; acest rezultat poate fi explicat pe baza compoziției uleiului de luminița nopții – bogat în acizi grași nesaturați (acid linoleic, acid γ -linolenic, acid oleic) (figura 7.15).

O altă etapă importantă a cercetării a fost evaluarea activității antioxidante a piperinei neîncapsulate, uleiului de parafină, uleiului de luminița nopții, sistemelor NLC libere în comparație cu activitatea antioxidantă a sistemelor NLC încărcate cu piperină, utilizând metoda TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). O privire comparativă a datelor reprezentate în figura 7.16 demonstrează efectul sinergic manifestat de piperină și uleiul de luminița nopții / uleiul de parafină, ambele principii active naturale încapsulate în același sistem de nanotransportori lipidici. Procentul de inhibiție a radicalilor $ABTS^{+*}$ este de 5 ori mai mare în cazul sistemului NLC-LN-PIP 1% comparativ cu cel obținut în cazul piperinei 1%.

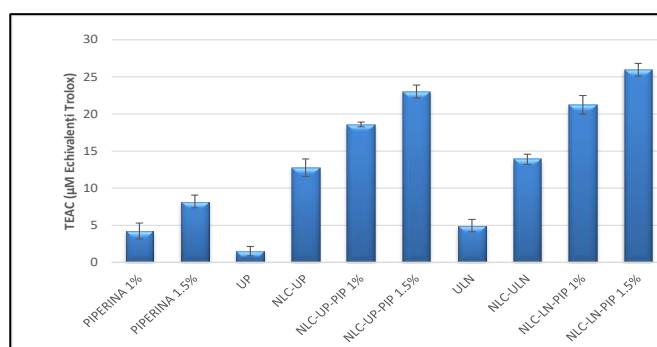


Figura 7.16. Evaluarea comparativă a activității antioxidante a piperinei, uleiului de luminița nopții /parafină și a sistemelor NLC libere/încărcate cu piperină

Capacitatea de captare a radicalilor cationici $ABTS^{+*}$ în cazul probelor NLC încărcate cu piperină a variat într-o manieră dependentă de concentrația de piperină din probă, astfel activitatea antioxidantă cea mai pronunțată a fost remarcată în cazul NLC-urilor cu un conținut de 1,5% piperină.

Determinarea *in vitro* a activității antioxidante prin metoda chemiluminescenței

Activitatea antioxidantă evaluată prin metoda chemiluminescenței a condus la rezultate asemănătoare cu cele obținute prin metoda ABTS, astfel toate probele de NLC ce încapsulează 1,5% piperină prezintă capacitatea de captare a radicalilor de viață scurtă ai oxigenului (ROS) cea mai mare (76,11% în cazul probei NLC-UP-PIP 1,5% și 82,62% în cazul probei NLC-LN-PIP 1,5%) comparativ cu probele NLC neîncapsulate cu piperină (39,83% în cazul probei NLC-UP și 41,40% în cazul probei NLC-ULN) sau cu compușii individuali (46,99% pentru piperina 1%, 62,46% pentru piperină 1,5%, 16,05% pentru UP și 24,92% pentru ULN) (figura 7.17). **Este de remarcat faptul că probele NLC sintetizate prezintă afinitate mai mare de captare a radicalilor de viață scurtă implicați în procesele oxidative decât a radicalilor de viață lungă.**

Încapsularea piperinei în asociere cu un compus lipofil activ (ulei de luminița nopții sau ulei de parafină) în același sistem nanotransportor a condus la o activitate antioxidantă amplificată, cu un domeniu larg de acțiune atât pentru radicalii de viață scurtă (ROS) cât și pentru radicalii de viață lungă ($ABTS^{+*}$), ceea ce face ca sistemele NLC dezvoltate să poată fi folosite cu succes în tratamentul anumitor afecțiuni precum obezitatea.

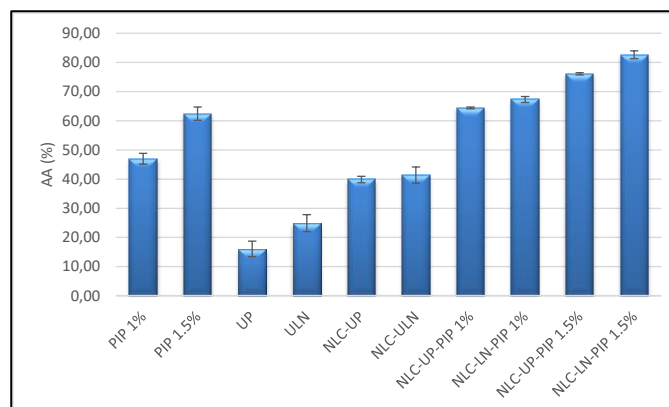


Figura 7.17. Activitatea antioxidantă a sistemelor NLC-UP/LN-PIP vs. piperină, ulei de parafină și ulei de luminița nopții (metoda chemiluminescenței)

7.4.2. Studii *in vitro* de eliberare controlată a piperinei

Așa cum se vizualizează în figura 7.18, cele două categorii de nanotransportori se comportă net diferit, în ceea ce privește eliberarea piperinei. Este interesant de notat faptul că sistemul NLC preparat cu ulei de parafină manifestă o eliberare rapidă a principiului activ, atingând un procent de eliberare mai mare de 65% încă din primele 8 ore de experimente, comparativ cu sistemele NLC preparate cu ulei de luminița nopții, pentru care procentul de eliberare nu a depășit 20%. Eliberarea rapidă a piperinei din sistemul NLC preparat cu ulei de parafină poate fi atribuită unui transfer de masă a piperinei mult mai rapid, care survine ca urmare a unei incompatibilități structurale a piperinei între liniaritatea conferită de alcanii din uleiul de parafină, unei solubilități reduse a piperinei în uleiul de parafină, dar și a unei viscozități mai scăzute a matricei lipidice formate din lipidele solide asociate cu uleiul de parafină. În schimb, cele două sisteme NLC pe bază de ulei de luminița nopții prezintă modelul de îmbogățire a miezului lipidic cu principiu activ, datorită abilității amestecurilor de lipide de a forma rețele puternic dezordonate, cu multiple imperfecțiuni între lanțurile hidrocarbonate ale TAG din compoziția uleiului de luminița nopții.

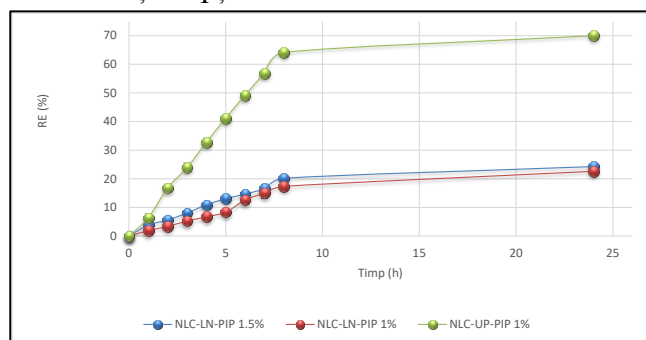


Figura 7.18. Influența nanotransportorilor lipidici pe bază de ulei de luminița nopții / ulei de parafină asupra eliberării piperinei

Aceste rezultate evidențiază o barieră clară între influența unui ulei mineral *versus* cea a unui ulei vegetal în conceperea unui sistem nanotransportor eficient, cu eliberare susținută de principii active. Astfel, **prin acest studiu s-a dovedit relevanța utilizării uleiurilor vegetale, în detrimentul uleiurilor minerale.**

Conform coeficienților de corelație, s-a observat că eliberarea piperinei se realizează după o cinetică de tipul Korsmeyer-Peppas în cazul probelor NLC pe bază de piperină și ulei de luminița nopții ($R^2 = 0,9992$ în cazul probei NLC-LN-PIP 1,5% și $R^2 = 0,9838$ în cazul probei NLC-LN-PIP

1%) și o cinetică de ordinul zero în cazul probei pe bază de piperină și ulei de parafină ($R^2 = 0,9984$ în cazul probei NLC-UP-PIP 1%) (tabelul 7.5).

Tabelul 7.5. Date cinetice obținute la eliberarea controlată a piperinei din sistemele NLC

Formularea NLC	Ordinul zero		Ordinul I		Higushi		Hixson-Crowell		Korsmeyer-Peppas		
	R^2	k_0	R^2	k_1	R^2	k_2	R^2	k_3	R^2	k_4	n
NLC-LN-PIP 1,5%	0,9935	2,2793	0,9916	0,0259	0,9722	8,7889	0,9911	0,003	0,9992	1,6153	0,619
NLC-LN-PIP 1%	0,976	2,2669	0,9702	0,0251	0,9247	8,6006	0,9693	0,003	0,9838	2,1732	0,469
NLC-UP-PIP 1%	0,9984	8,2036	0,9889	0,1351	0,9883	31,815	0,9837	0,0174	0,9928	2,1802	0,458

Sistemele NLC pe bază de ulei de luminița nopții au prezentat o eliberare conform mecanismului Korsmeyer-Peppas, având $n = 0,62$ (NLC-LN-PIP 1,5%) și $n = 0,47$ (NLC-LN-PIP 1%). Mecanismul de eliberare a piperinei este anormal ($0,43 < n < 0,85$), nanoparticulele lipidice prezentând morfologie sferică [274]. Difuzia “non-fickiană” (sau anormală) implică în prima etapă modificarea matricei, etapă urmată de dizolvarea stratului de surfactanți și co-surfactanți din matricea lipidică și difuzia substanței active; în acest caz eliberarea piperinei depinde simultan de modificarea matricei, dar și de fenomenele de difuzie.

Sistemul NLC-UP-PIP 1% prezintă o cinetică de eliberare de ordinul 0, prezentând o eliberare mai susținută decât în cazul sistemelor pe bază de ulei de luminița nopții, având o constantă de viteză mai mare decât în cazul sistemelor pe bază de ulei de luminița nopții. Acest comportament este explicat pe baza diferenței compoziționale dintre cele două uleiuri. Eliberarea după o cinetică de ordinul zero este caracteristică eliberării unei substanțe active la viteză constantă indiferent de concentrația inițială de substanță activă, acesta fiind scopul tuturor mecanismelor de eliberare controlată a medicamentelor. Aceasta conduce, în principiu, la cel mai bun control al concentrației plasmatice și oferă mai multe avantaje, inclusiv îmbunătățirea confortului pacientului și reducerea frecvenței administrării medicamentului.

CAPITOLUL 8

SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA SISTEMELOR NANOTRANSPORTOARE ÎNCAPSULATE CU CAPSAICINĂ

8.2. CARACTERIZAREA SISTEMELOR NLC LIBERE ȘI A SISTEMELOR ÎNCĂRCATE CU CAPSAICINĂ

În prezentul studiu am propus un nou concept în terapia obezității, prin încapsularea simultană în același sistem NLC a unui compus vegetal cu efect antiobezitate – **capsaicina** (Cap) – și a unui regulator lipidic endogen – **oleoiletanolamida** (OEA) / **fenilalaninol oleamida** (FOA) – analog structural al fenilalaninolului cu acidul oleic, considerând că asocierea efectelor biologice ale compușilor activi naturali cu cele ale lipidelor endogene în același sistem de distribuție este o abordare directă pentru dezvoltarea unor produse farmaceutice mai sigure și mai bine tolerate în terapia obezității cu aplicabilitate țintită.

Prezenta cercetare s-a bazat pe trei strategii inovatoare care ar putea conduce la dezvoltarea de noi formulări farmacologice cu efecte asupra îmbunătățirii tolerabilității gastrice și specificității înalte față de celulele endoteliale adipoase: (1) reducerea toxicității medicamentelor de sinteză cu efect antiobezitate prin folosirea lipidelor endogene OEA / FOA în asociere cu principalele substanțe active

naturale din extractul de ardei roșu (Cap) și din uleiul de in (acidul α -linolenic); (2) creșterea biodisponibilității principiilor active antiobezitate prin încapsularea acestora în nanotransportori lipidici preparați cu ulei de in – cu rol antiinflamator și hipotrigliceridemic; (3) inducerea unui efect antiobezitate îmbunătățit prin co-încapsularea principiilor active și eliberarea treptată de capsaicină din sistemul NLC.

8.2.1. Sinteza sistemelor NLC pe bază de capsaicină

Nanotransportorii lipidici pe bază de ulei vegetal au fost încapsulați cu concentrații diferite de capsaicină (1%, 2%), menținând constantă concentrația amestecului de surfactanți (2,5%) și concentrația de mediator lipidic (1%) (tabelul 8.1).

Tabelul 8.1. Compoziția sistemelor NLC preparate cu ulei de in (LO) și încapsulate cu capsaicină (Cap) și OEA / FOA

Formulare*	**Amestec de surfactanți (g)	GMS (g)	CP (g)	LO (g)	OEA (g)	FOA (g)	Cap (g)
NLC-LO	2,5	3,0	3,0	3,0	-	-	-
NLC-OEA	2,5	3,0	3,0	3,0	1,0	-	-
NLC-OEA-Cap1	2,5	3,0	3,0	3,0	1,0	-	1,0
NLC-OEA-Cap2	2,5	3,0	3,0	3,0	1,0	-	2,0
NLC-FOA	2,5	3,0	3,0	3,0	-	1,0	-
NLC-FOA-Cap1	2,5	3,0	3,0	3,0	-	1,0	1,0
NLC-FOA-Cap2	2,5	3,0	3,0	3,0	-	1,0	2,0

8.2.2. Caracterizarea dimensională a nanotransportorilor lipidici încărcăți cu capsaicină Diametrul mediu al nanoparticulelor (Zave) și indicele de polidispersie (PDI)

Formulările NLC-LO-OEA / FOA-Cap au prezentat dimensiuni relativ mici ale particulelor, cu valori ale diametrelor medii (Zave) ale nanoparticulelor sub 230 nm (figura 8.2). Aceste particule de dimensiuni nanometrice sunt potrivite pentru administrarea orală, deoarece permit absorbția de către enterocite și conduc la o acțiune sinergică extinsă a principiilor active. Toate sistemele NLC sintetizate au prezentat valori optime ale indicelui de polidispersie, încadrându-se între 0,16 (pentru proba **NLC-LO**), 0,22 (pentru proba **NLC-LO-FOA-Cap1**) și 0,26 pentru sistemul NLC-LO-FOA-Cap2, prezentând o dispersie îngustă în jurul dimensiunii medii, indicând un comportament monomodal adecvat.

Încapsularea capsaicinei în sistemul NLC pe bază de OEA a condus la o ușoară scădere a diametrelor medii ale nanoparticulelor sistemelor NLC încărcate cu capsaicină. În cazul sistemelor NLC pe bază de OEA s-a observat o diferență mică între diametrele medii ale nanoparticulelor (154 nm pentru NLC-LO-OEA, 145 nm pentru NLC-LO-OEA-Cap1 și 150 nm pentru NLC-LO-OEA-Cap2), fiind relevante următoarele aspecte: 1. determinarea statistică a lui Zave prin metoda DLS; 2. apariția fenomenelor de rearanjare structurală a rețelei lipidice după încapsularea capsaicinei; 3. apariția cristalizării în timpul procesului de solidificare a topiturii lipidice. Nivelurile diferite de încapsulare a capsaicinei conduc la nucleația lipidelor, care influențează distribuția necontrolată a dimensiunii NLC încărcate cu capsaicină, fenomen care conduce în final la cristalizarea nanotransportorilor lipidici cu distribuția diferită a dimensiunii nanoparticulelor.

În ceea ce privește cele două concentrații de principiu activ cu efect antiobezitate utilizat, concentrația de 2% de capsaicină a condus la obținerea unei dimensiuni medii a particulelor semnificativ mai mare în comparație cu cea obținută cu capsaicină 1%, ca în cazul sistemelor NLC-LO-FOA-Cap. Acest lucru ar putea fi atribuit conținutului mai mare de capsaicină și punctului său de

topire mai ridicat (comparativ cu cel al amestecului de lipide, 45-50°C versus 62-65°C pentru capsaicină), rezultând o fază dispersată mai viscoasă, fenomen care îngreunează dispersia reciprocă a fazelor, cu apariția particulelor mai mari.

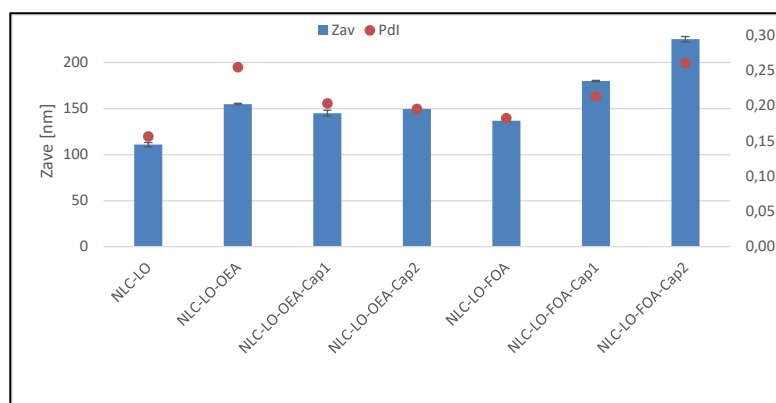


Figura 8.2. Distribuția diametrului mediu în cazul sistemelor NLC-LO și NLC-LO-OEA/FOA-Cap1/Cap2

În concluzie, prin încapsularea unei cantități mai mici de capsaicină s-a remarcat o scădere a dimensiunilor medii ale NLC-urilor pe bază de ulei de in, fenomen explicat prin afinitatea crescută a capsaicinei pentru miezul lipidic și prin rearanjarea lanțurilor acizilor grași din structura uleiului de in (50,59% acid α -linolenic, 24,33% acid oleic, 14,34% acid γ -linoleic, 5,19% acid palmitic, 4,34% acid acid stearic, 0,8% acid cis-vaccenic, 0,11% acid α -linoleic, 0,09% acid arahic, 0,09% acid 11-eicosaenoic) care permit înglobarea unei cantități optime de principiu activ, determinând astfel scăderea dimensiunii medii a sistemelor NLC.

Evaluarea stabilității fizice a sistemelor NLC pe bază de capsaicină

Rezultatele experimentale au arătat că toate NLC-urile încapsulate cu capsaicină prezintă stabilitate fizică în timp, valoarea medie a potențialului zeta fiind cuprins între -42,8 mV (pentru proba NLC-LO-OEA-Cap1) și -58,5 mV (pentru proba NLC-LO-FOA-Cap2), încapsularea capsaicinei în miezul lipidic explicând diferența mică dintre valorile potențialelor zeta ale sistemelor NLC-LO-OEA-Cap1/Cap2 și NLC-LO-FOA-Cap1/Cap2. Aceste valori negative ale potențialelor zeta nu constituie un impediment în procesul de absorbție a capsaicinei la nivelul adipocitelor (figura 8.5).

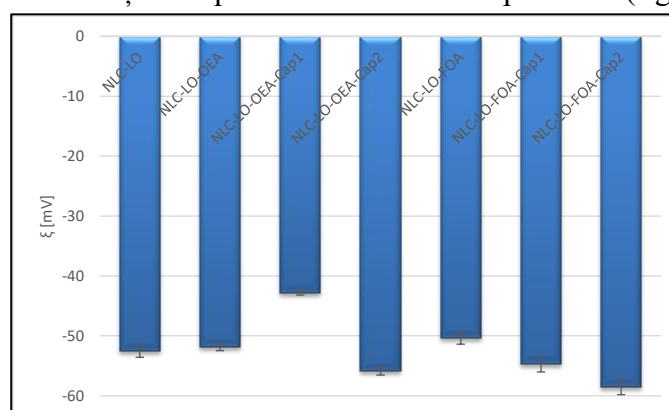


Figura 8.5. Distribuția potențialului electrocinetic în cazul sistemelor NLC-LO-OEA/FOA-Cap1/Cap2

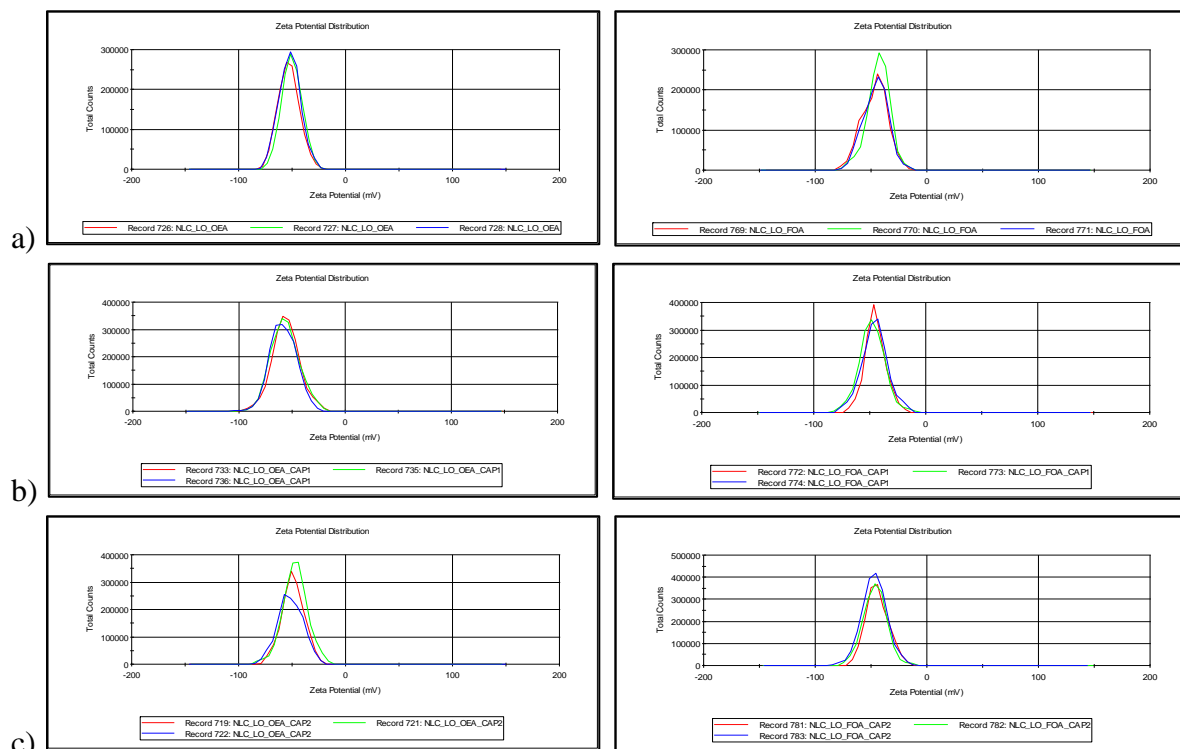


Figura 8.6. Distribuția potențialului electrocinetic în cazul probei

a) NLC-LO-OEA / FOA

b) NLC-LO-OEA / FOA-Cap1

c) NLC-LO-OEA / FOA-Cap2

În cazul sistemelor NLC pe bază de ulei de in încapsulate cu lipidul endogen OEA / FOA și capsaicină de concentrații diferite (1%, 2%), profilurile potențialului zeta (figura 8.6 a, b și c) prezintă o distribuție unimodală și o suprapunere perfectă a picurilor, **întărind afirmația că probele NLC încapsulate cu lipid endogen și capsaicină prezintă o stabilitate excelentă în timp.**

8.3. CARACTERIZAREA STABILITĂȚII TERMICE A SISTEMELOR NLC PE BAZĂ DE CAPSAICINĂ

Miezul lipidic al nanotransportorilor lipidici este important pentru a favoriza proprietățile de eliberare controlată. Caracteristicile fizice și comportamentul cristalin sau amorf al sistemelor NLC sintetizate au fost puse în evidență prin *calorimetrie de scanare diferențială* (DSC) [336].

Termogramele sistemelor NLC-LO, NLC-LO-OEA/FOA-Cap1/Cap2 sunt descrise în figurile 8.7 și 8.8, fiind evidențiată perturbarea rețelei lipidice după încapsularea mediatorilor lipidici și a capsaicinei.

Complexitatea miezului lipidic conținând lipide solide amestecate cu ulei de in este evidențiată prin apariția a trei vârfuri endoterme în intervalul 45-47°C (45°C), 53-55°C (53°C) și 59-61°C (61°C) în cazul amestecului fizic al lipidelor, complexitate atribuită palmitatului de cetil (54°C) și monostearatului de glicerol (57-65°C). Aceste vârfuri endoterme de topire relativ ascuțite ale lipidelor din probă au indicat că materiile prime folosite erau aproape cristaline. Utilizarea uleiului de in pentru formarea miezului lipidic complex al sistemelor NLC a condus la obținerea de nanotransportori cu rețea dezordonată, aspect evidențiat de alura de vârf endotermic, toate probele NLC încapsulate prezentând o regiune de vârf endotermic, în intervalul de topire de 45-50°C (o regiune endotermă largă cu un vârf

localizat la 45°C și a unui umăr în jurul valorii de 50°C). Evenimentele endotermice largi între 40 și 55°C indică natura amorfă caracteristică sistemelor NLC dezvoltate.

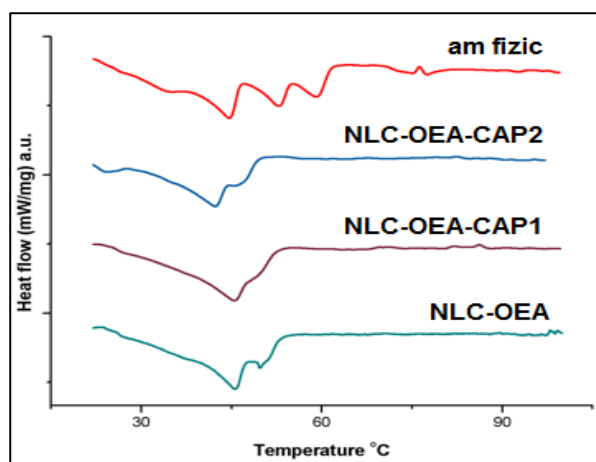


Figura 8.7. Termogramele DSC ale sistemelor NLC-LO-OEA-Cap1/Cap2

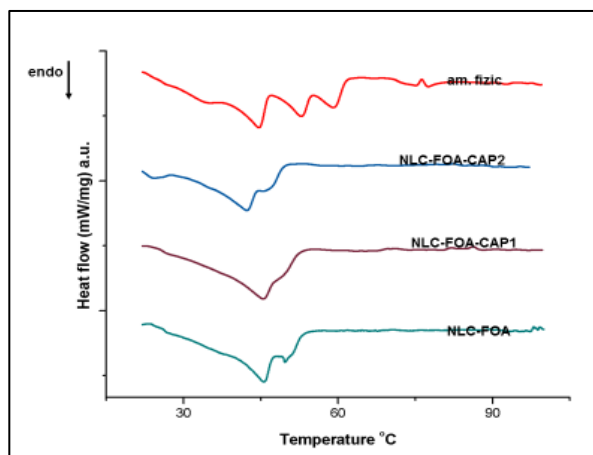


Figura 8.8. Termogramele DSC ale sistemelor NLC-LO-FOA-Cap1/Cap2

8.4. DETERMINAREA EFICIENȚEI DE ÎNCAPSULARE (EE%) ȘI A CAPACITĂȚII DE ÎNCĂRCARE (LC%) A CAPSAICINEI (CAP), OLEOILETANOLAMIDEI (OEA) ȘI FENILALANINOL OLEAMIDEI (FOA)

Pentru a determina eficiența de încapsulare (EE%) a capsaicinei, OEA și FOA în nanotransportorii lipidici a fost utilizată metoda HPLC. Astfel, o cantitate de 0,05 g de probă NLC-LO-OEA / FOA-Cap liofilizată a fost dispersată în 1,5 mL acetonitril (ACN), agitată ușor și apoi centrifugată timp de 15 minute la 15000 rpm (Sigma 2K15, Germania). Supernatantul rezultat care conține compușii activi neîncapsulați a fost analizat folosind cromatograful de lichide de tip Jasco 2000 echipat cu un detector UV la $\lambda = 220$ nm și cu o coloană cromatografică Nucleosil C18 ($25 \times 0,4$ mm). Faza mobilă a fost compusă din ACN:H₂O (70:30) (V:V) și debitul a fost de 1 mL / min. De asemenea, s-a ținut cont de timpii de retenție în cazul capsaicinei (3,93 minute), OEA (17,5 minute) și FOA (26,5 minute).

Datorită solubilității scăzute în apă a substanțelor active (Cap, OEA și FOA), a existat o competiție între acomodările ambelor substanțe active în miezul lipidic al sistemului NLC. Toate formulările NLC au prezentat valori ridicate ale eficienței de încapsulare, EE% depășind 92% în cazul

OEA / FOA, corespunzătoare încărcărilor unor concentrații de medicamente apropiate de concentrațiile teoretice. Aceste rezultate au arătat că atât oleoiletanolamida, cât și fenilalaninol oleamida au fost încapsulate eficient în miezul lipidic al sistemelor NLC, obținând valori ale eficienței de încapsulare cuprinse între $90,9\% \pm 0,37$ / $92,3\% \pm 0,15$ pentru OEA și $94,8\% \pm 0,29$ / $96,4\% \pm 0,78\%$ pentru FOA (figura 8.9). Aceste rezultate obținute pot fi strâns legate de compatibilitatea ridicată a OEA și FOA cu amestecul de lipide format din ulei de in, monostearat de glicerol și palmitat de cetil.

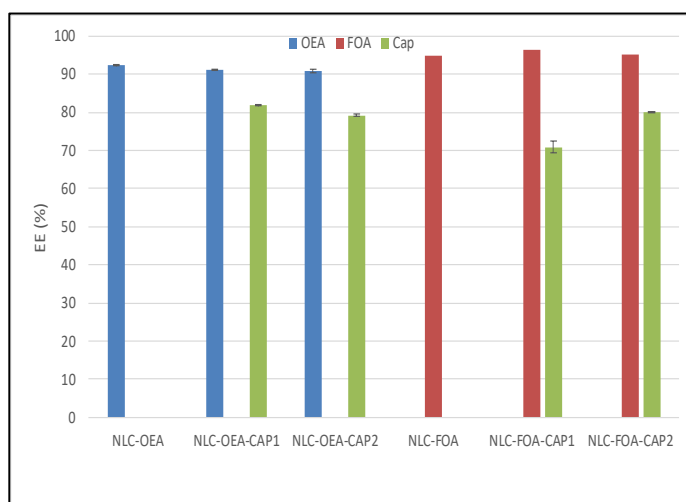


Figura 8.9. Eficiența încapsulării substanțelor active (capsaicină, OEA, FOA) în interiorul nanotransportorilor lipidici pe bază de ulei de in

S-a obținut o eficiență de încapsulare adecvată în cazul capsaicinii, dar cu valori mai mici decât cele obținute în cazul lipidelor endogene (OEA și FOA), constatându-se că valorile EE% variază de la $70,9 \pm 1,57$ la $80 \pm 0,1$ în cazul sistemelor NLC-LO-FOA-Cap1 și NLC-LO-FOA-Cap2 și de la $79,2 \pm 0,27$ la $81,9 \pm 0,18$ în cazul sistemelor NLC-LO-OEA-Cap1 și NLC-LO-OEA-Cap2.

Două aspecte principale care ar putea fi atribuite valorilor EE% determinate pentru capsaicină:

1. solubilitatea scăzută a capsaicinii în apă ($10,3 \text{ mg / L}$, la 25°C) care asigură încapsularea adecvată a substanței active; 2. încapsularea a mai mult de 90% de mediator lipidic –OEA sau FOA – care are o structură destul de voluminoasă, neexistând suficient spațiu pentru încapsularea unei cantități semnificative de capsaicină.

Studiul privind încapsularea capsaicinii în sistemele NLC sintetizate a condus la rezultate optime ale eficienței de încapsulare, care pot fi explicate și prin compatibilitatea ridicată a principiului activ natural – capsaicina – cu amestecul de lipide constând din ulei de in, monostearat de glicerol și palmitat de cetil.

8.5. EVALUAREA *IN VITRO* A PROPRIETĂȚILOR BIOLOGICE ALE SISTEMELOR NLC PE BAZĂ DE CAPSAICINĂ

8.5.1. Testarea *in vitro* a activității antioxidante

Inhibiția activității radicalilor $\text{ABTS}^{+\cdot}$ generați *in situ* a confirmat efectul antioxidant semnificativ al sistemelor NLC-LO-OEA / FOA încărcate cu capsaicină și efectul antioxidant moderat al sistemelor NLC-LO-OEA / FOA neîncărcate cu capsaicină. Sistemul NLC-LO, neîncărcat cu substanță activă, a prezentat o acțiune antioxidantă redusă cu un procent de inhibiție a radicalilor $\text{ABTS}^{+\cdot}$ de numai $9,4\% \pm 1,1$, efectul antioxidant al sistemului NLC-LO putând fi explicat prin

conținutul ridicat de acid linolenic, acid ω -3, regăsit în uleiul de in. Prezența celor doi mediatori lipidici – OEA și FOA – în același sistem NLC preparat cu ulei de in a condus la o îmbunătățire a activității antioxidante, mai ales în cazul NLC-LO-FOA, cu valori ale procentului de inhibiție a ABTS⁺ de $16,7\% \pm 0,39$.

S-a observat că, în prezența capsaicinei sau sistemelor NLC-LO-OEA / FOA-Cap, procentul de inhibiție a radicalilor ABTS⁺ a variat într-o manieră dependentă de concentrația capsaicinei, fiind important tipul formulării NLC (figura 8.11). Rezultatele obținute au demonstrat că această capacitate de a elimina radicalii liberi a fost statistic mai mare pentru sistemele NLC încărcate cu capsaicină comparativ cu cea a capsaicinei neîncapsulate – prezentând o activitate antioxidantă de $45\% \pm 1,20$, în timp ce aceeași concentrație de capsaicină încărcată în sistemul NLC-LO-OEA a prezentat o activitate remarcabilă de eliminare a radicalilor ABTS⁺, cu un procent al inhibiției de $76,1\% \pm 2,18$.

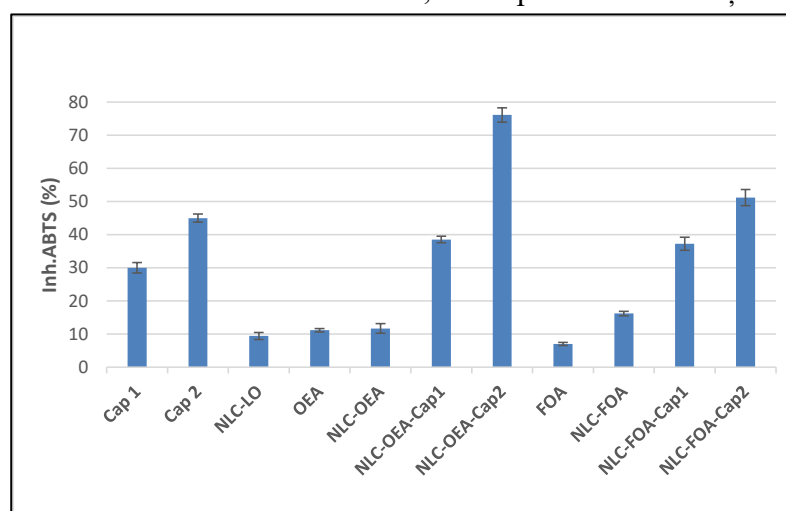


Figura 8.11. Evaluarea comparativă a activității antioxidante a capsaicinei, sistemelor NLC-LO-OEA / FOA și NLC-LO-OEA / FOA-Cap

Potențialul de inhibiție a radicalilor liberi ABTS⁺ observat a fost mai mare în cazul sistemelor NLC-LO-OEA / FOA - Cap comparativ cu cel al capsaicinei, fenomen care ar putea fi atribuit efectului de dimensiune indus prin nanoîncapsulare și grupărilor funcționale diferite din structura capsaicinei care sunt responsabile pentru reducerea și captarea radicalilor cationici sau care pot dona hidrogen radicalilor liberi și astfel inhibă reacția în lanț a radicalilor liberi în prima etapă de inițiere [340]. Studiile *in vivo* și *in vitro* au demonstrat că asocierea cu capsaicina are un rol important în protejarea celulelor endoteliale și macrofagelor în procesul de oxidare a LDL (lipoproteine cu densitate mică) prin acțiune antioxidantă directă [341, 342] și în protecția împotriva deteriorării oxidative, reducând speciile reactive de oxigen la nivel celular și crescând activitatea antioxidantă a enzimelor precum superoxid dismutaza, catalaza, glutathion-S-transferaza [343, 344]. În ceea ce privește efectul de dimensiune, este bine cunoscut faptul că reducerea dimensiunii compusului bioactiv are efecte pronunțate asupra proprietăților fizice și biologice care pot fi semnificativ amplificate față de cele ale formei native corespunzătoare [345].

8.5.2. Studii *in vitro* de eliberare controlată a capsaicinei

Din prezentarea generală a profilurilor de eliberare controlată (figura 8.12), se poate observa că nanotransportorii lipidici dezvoltati supuși testelor *in vitro* de eliberare au asigurat o eliberare lentă

a capsaicinii, cu un procent de 40% de capsaicină eliberată după 24 de ore de experimente *in vitro* în cazul sistemelor NLC-LO-OEA-Cap1 / Cap2 și de doar 9% în cazul sistemelor NLC-FOA-Cap1/Cap2.

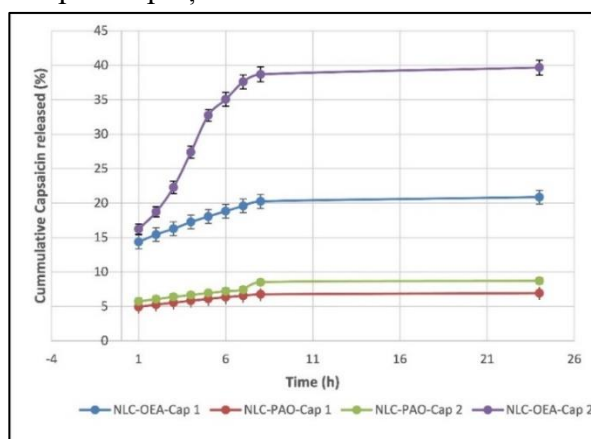


Figura 8.12. Influența nanotransportorilor lipidici pe bază de ulei de in asupra eliberării capsaicinii

Comportamentul remarcat în procesele de eliberare controlată poate fi atribuit structurii voluminoase a mediatorului lipidic – OEA – și analogului său – FOA –, care împiedică în mod semnificativ migrarea capsaicinii prin sistemul NLC. Interesant este faptul că sistemele NLC pe bază de OEA au arătat o eliberare mai rapidă a capsaicinii comparativ cu sistemele NLC bazate pe FOA, un fenomen care poate fi strâns corelat cu structura ramificată a FOA. Eliberarea substanței active din nanoparticule a decurs în trei etape [348]. În prima etapă s-a observat o eliberare în rafală cauzată de dizolvarea sau de adsorbția medicamentului pe suprafața nanoparticulelor. În a doua etapă, gradientul de concentrație dintre nanoparticule și mediul de eliberare a condus la difuzia substanței active. În a treia etapă s-a remarcat degradarea materiilor prime ale nanoparticulelor din care substanța activă încapsulată este eliberată susținut. În prezentul studiu, în cazul sistemelor NLC-LO-FOA-Cap, nu a fost observată o eliberare în rafală a substanței active; de asemenea, a fost detectată o eliberare mai rapidă a capsaicinii în cazul sistemelor NLC-LO-OEA-Cap1 / Cap2.

Sistemele NLC-LO-OEA / FOA-Cap au prezentat un profil de eliberare controlată, care a evidențiat un proces în două etape principale, care ar putea fi ilustrate după cum urmează: 1. eliberarea inițială (în primele 8 ore) – care ar putea fi corelată cu eliberarea unei cantități mici de capsaicină încapsulată în stratul de suprafață al NLC-ului și 2. difuzia pasivă a capsaicinii. Mai mult, profilul de eliberare prelungit după 8 ore ar putea fi provocat de încapsularea capsaicinii în miezul lipidic al NLC-ului, eliberarea substanței active realizându-se treptat odată cu degradarea sistemului NLC.

Concentrația de capsaicină din sistemele NLC-LO-FOA a influențat moderat viteza de eliberare (figura 8.13). Sistemul NLC-LO-FOA-Cap1 a eliberat un procent de 6% de capsaicină, iar sistemul NLC-LO-FOA-Cap2 a eliberat un procent de 8% de capsaicină, după primele 8 ore de experimente. De asemenea, după 24 de ore, s-a observat că cel mai lent grad de eliberare a fost obținut în cazul sistemului NLC pe bază de FOA care conține cantitatea mai mare de capsaicină. În cazul sistemului NLC-LO-OEA-Cap, însă, s-a observat o cantitate mare de capsaicină eliberată în special în cazul probei NLC-LO-OEA-Cap2, 16% din totalul de capsaicină fiind eliberată după prima oră de experiment, urmată de o eliberare susținută cu un procent de aproximativ 39% de capsaicină eliberată în 24 de ore. Așa cum am menționat anterior, o posibilă explicație pentru eliberarea lentă a capsaicinii din sistemele de distribuție NLC-LO pe bază de FOA în comparație cu cele pe bază de OEA, ar putea

fi afinitatea crescută între capsaicină și FOA datorită conjugării π - π între radicalii aromatici fenil care determină astfel o eliberare întârziată a substanței active din rețeaua lipidică.

Tabelul 8.4. Date cinetice obținute la eliberarea controlată a capsaicinei din sistemele NLC

Formularea NLC	Ordinul zero		Ordinul I		Higushi		Hixson-Crowell		Korsmeyer-Peppas		
	R ²	k ₀	R ²	k ₁ *10 ²	R ²	k ₂ *10 ²	R ²	k ₃ *10 ²	R ²	k ₄ *10 ²	n
NLC-OEA-Cap1	0,995	0,837	0,996	1,01	0,992	3,94	0,944	3,44	0,996	1,44	0,224
NLC-OEA-Cap2	0,972	3,515	0,978	4,91	0,969	19,04	0,912	16,51	0,976	6,63	0,225
NLC-FOA-Cap1	0,993	0,259	0,995	0,28	0,994	1,08	0,952	0,94	0,994	0,41	0,222
NLC-FOA-Cap2	0,933	0,346	0,935	0,37	0,885	1,41	0,804	1,2	0,934	0,55	0,219

Se observă că eliberarea capsaicinei din sistemele NLC sintetizate se realizează după o cinetică de ordinul întâi (conform coeficienților de corelație, tabelul 8.4) care denotă prezența unor procese controlate de difuzie. În cazul sistemului NLC-LO-OEA-Cap1 constanta de viteză este mai mare decât în cazul sistemului NLC-LO-FOA-Cap1 și NLC-LO-FOA-Cap2, ceea ce întărește ipoteza anterioară cu privire la eliberarea mai rapidă a capsaicinei din sistemul NLC pe bază de OEA. Aceste rezultate demonstrează că sistemele NLC bazate pe ulei de in au jucat un rol important în întârzierea dizolvării capsaicinei; eliberarea lentă a capsaicinei întâlnită în prezenta cercetare ar putea fi un fenomen dorit pentru a evita efectul potențial iritant al capsaicinei asupra mucoasei intestinale. Mai mult, acest comportament poate ajuta la atingerea unui concentrații eficiente de capsaicină în plasmă (după o oră), în timp ce eliberarea controlată pe o perioadă de 24 de ore poate menține concentrația eficientă a capsaicinei în plasmă pentru o perioadă mai lungă de timp.

8.6. TESTAREA *IN VIVO* A PROPRIETĂȚILOR ANTOBEZITATE ALE SISTEMELOR NLC PE BAZĂ DE CAPSAICINĂ

Pentru testarea proprietăților antiobezitate ale sistemelor NLC sintetizate a fost determinată influența tratamentului cu nanoparticule lipidice pe bază de capsaicină, OEA / FOA într-un model experimental de obezitate realizat pe animale de laborator. Animalele experimentale utilizate au fost șoareci masculi *Albino Swiss* procurați de la Biobaza U.M.F. „Carol Davila”, București. Animalele, ținute în condiții standard de laborator, au primit hrană de 2 ori pe zi și apă *ad libitum*. Experimentul s-a desfășurat conform Directivei 2010/63/UE a Parlamentului și Consiliului European privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice și a Ordonanței nr. 37 a Guvernului României din 2/02/2002.

În ceea ce privește descrierea modelului experimental de obezitate, șoarecii *Albino Swiss*, având o greutate de 18±3 g, au fost hrăniți cu un regim alimentar hipercaloric bogat în grăsimi și zaharuri timp de 3 săptămâni, conform modelelor propuse în literatura de specialitate [349, 350]. Animalele de laborator au fost distribuite aleatoriu în **7 loturi de animale obeze** tratate cu sistemele NLC încărcate cu substanță activă cu efect antiobezitate, **un lot de referință de animale obeze** și, în paralel, **un lot de animale cu greutate corporală normală** cărora li s-au administrat alimente standard de două ori pe zi și apă *ad libitum* timp de 3 săptămâni.

Loturilor de animale le-au fost administrate oral probele considerate, timp de 10 zile, dozele formulărilor NLC pe bază de oleoiletanolamidă utilizate în acest studiu corespunzând dozelor terapeutice recomandate administrării per os (10 mg / kg greutate corporală). În cazul administrării orale doza recomandată de FOA (12,5 mg / kg greutate corporală) este echimoleculară cu doza de

OEA recomandată în administrarea *per os*. Regimul hipercaloric s-a menținut pe durata tratamentului la toate loturile, cu excepția lotului de normoponderali care au primit hrană normală. Greutatea corporală a fost monitorizată în zilele 1, 3, 5, 7 și 10 de tratament. Efectul tratamentului asupra senzației de sațietate a fost determinat după 3h de la administrare, comparând lotul de animale obeze cu lotul de control cu greutate normală. La două ore de la ultima administrare, animalele au fost anesteziate și li s-a recoltat sânge în vederea analizării biochimice a colesterolului seric total, trigliceridelor din sânge și a glicemiei, folosind analizorul biochimic Cormay cu kituri specifice de reactivi. Datele experimentale au fost exprimate ca valori medii a trei măsurători \pm deviație standard (SD), semnificația statistică fiind determinată cu ajutorul testului ANOVA și testului de comparație multiplă Dunnett și realizată folosind software-ul GraphPad Prism. Rezultatele obținute au fost considerate semnificative statistic la $p < 0,05$ și ne semnificative statistic la $p > 0,05$.

8.6.1. Variația greutății corporale la animalele de experiență în urma administrării nanotransportorilor lipidici încărcăți cu OEA / FOA și capsaicină

În cazul loturilor de șoareci *Albino Swiss* (loturile 1-7) tratate cu NLC-LO-OEA / FOA-Cap au fost observate fluctuații ale greutății corporale comparativ cu cele două loturi de control (loturile 8, 9) care au prezentat o creștere constantă a greutății pe parcursul celor 10 zile de tratament (figura 8.13).

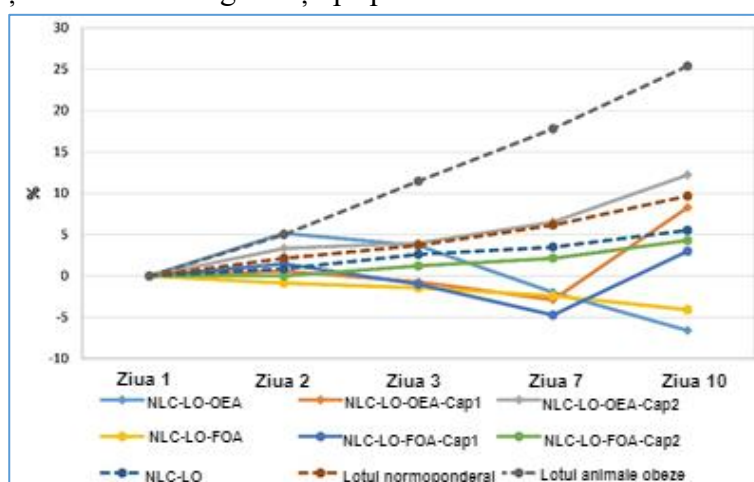


Figura 8.13. Variația greutății corporale după administrarea formulărilor NLC la animalele de laborator *Albino Swiss*, comparativ cu ziua 1

Tratamentul cu NLC-LO-OEA / FOA și NLC-LO-OEA / FOA-Cap a condus la scăderea greutății corporale a șoarecilor *Albino Swiss* în comparație cu lotul de animale obeze. Au fost observate rezultate interesante în cazul loturilor de șoareci tratați cu nanotransportori lipidici care conțin doar mediator lipidic – OEA / FOA. **Au fost înregistrate scăderi semnificative ($p < 0,05$) ale greutății corporale sub greutatea inițială (din ziua 1 a tratamentului) după 3 zile de administrare**, efectul fiind menținut pe parcursul celor 10 zile de tratament.

8.6.3. Influența tratamentului cu NLC-LO-OEA / FOA-Cap asupra profilului lipidic și profilului glicemic

În urma tratamentului cu formulările NLC sintetizate, s-a remarcat faptul că coîncapsularea capsaicinei împreună cu OEA / FOA în nanotransportori lipidici a îmbunătățit profilul lipidic plasmatic comparativ cu sistemul NLC neîncărcat cu capsaicină. Rezultatele obținute sunt dependente

de doză, concentrațiile crescute de capsaicină conducând la o scădere semnificativă a colesterolului, a trigliceridelor și a nivelului de glucoză. Aceste rezultate sunt prezentate ca efect comparativ cu lotul de control normoponderal (figura 8.15 a, b și c).

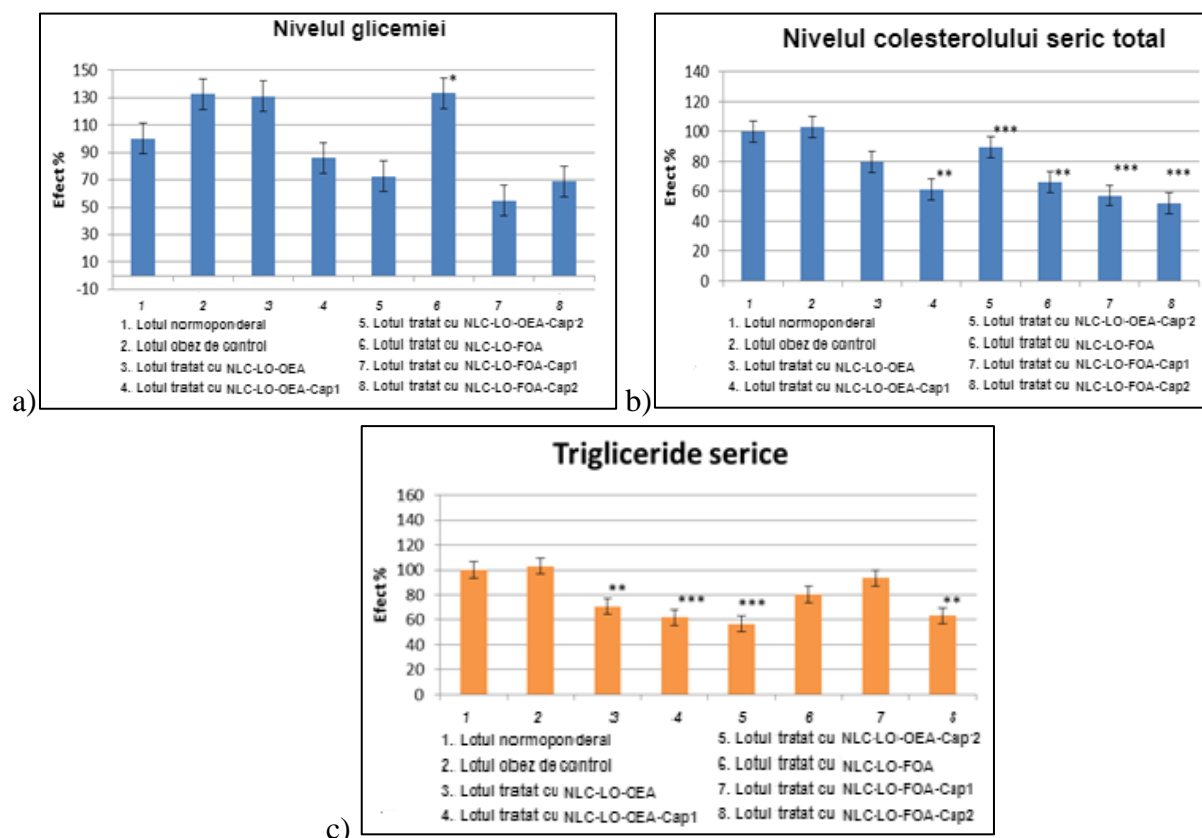


Figura 8.15. Influența tratamentului cu NLC asupra: a) glicemiei, b) colesterolului seric total, c) trigliceridelor serice

Toate aceste rezultate demonstrează că sistemele NLC pe bază de ulei de in, mediatorii lipidici –OEA / FOA – și activ natural –capsaicina – au jucat un rol important în obținerea unui efect sinergic îmbunătățit al principiilor active împotriva obezității, având un impact pozitiv asupra efectului de scădere în greutate, de scădere a nivelurile de colesterol, trigliceride și de glucoză, oferind avantajul îmbunătățirii tolerabilității gastrice a substanțelor active.

CAPITOLUL 9. CONCLUZII

9.1. CONCLUZII GENERALE

Rezultatele originale ale etapelor de cercetare efectuate sunt prezentate în cele ce urmează:

- ✓ Pentru sinteza celor 26 de sisteme nanotransportoare lipidice libere și co-încapsulate cu principiile active considerate am utilizat tehnica emulsionării la cald cuplată cu tehnica de omogenizare cu grad înalt de forfecare (HSH) și tehnica de omogenizare la presiune înaltă (HPH).
- ✓ Sistemele NLC sintetizate au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic și morfologic (Zave, PdI, potențial zeta, DSC, UV-VIS) și au fost evaluate din punct de vedere al proprietăților biologice prin studii *in vitro* de evaluare a activității antioxidante, studii *in vitro* a eliberării controlate de substanță activă și studii *in vivo* de evaluare a efectului antiobezitate.

- ✓ Toate formulările NLC pe bază de uleiuri vegetale, libere sau încapsulate cu principii active, au prezentat dimensiuni medii a nanoparticulelor (Zave) optime, cu valori mai mici de 200 nm, și cu o bună stabilitate fizică în timp.
- ✓ Pentru sinteza sistemelor NLC am utilizat un amestec de lipide solide și lichide (uleiuri vegetale), concentrația amestecului de lipide influențând dimensiunea și stabilitatea nanoparticulelor.
- ✓ Matricea lipidică a fost constituită din lipidele solide monstearat de glicerol (GMS) și palmitat de cetil (CP) și lipidele lichide reprezentate de uleiurile considerate în acest studiu (ulei de in / ulei de argan / ulei de luminița nopții / ulei de parafină). Asocierea lipidelor solide cu un lipid lichid a condus la obținerea unei rețele cristaline înalt dezordonate, care a permis încapsularea unei cantități optime de substanță activă, fenomen evidențiat prin dimensiunile medii ale nanoparticulelor și prin stabilitatea sistemelor NLC.
- ✓ Pentru sinteza nanotransportorilor lipidici am utilizat un amestec de surfactanți format din Tween 20, α -Fosfatidilcolină și Poloxamer 188. În etapa de optimizare, am utilizat patru concentrații diferite ale amestecului de surfactanți (2%, 2,5%, 3% și 3,5%), concentrația optimă fiind cea de 2,5%, pentru care am obținut cele mai bune rezultate ale diametrului mediu al nanoparticulelor, indicelui de polidispersie și potențialului zeta.
- ✓ Nanoîncapsularea principiilor active în structura lipidică a sistemelor NLC nu a condus la modificări semnificative ale dimensiunii diametrului mediu, în comparație cu sistemele NLC libere, ceea ce pune în evidență eficacitatea sistemelor dezvoltate.
- ✓ Pentru evaluarea *in vitro* a activității antioxidante, au fost utilizate metoda ABTS și metoda chemiluminescenței, valorile inhibiției radicalilor liberi de viață lungă / scurtă fiind mai mari de 30%/76%. S-a constatat că sistemele NLC încărcate cu principii active au prezentat o activitate antioxidantă amplificată în comparație cu cea a sistemelor NLC libere sau de cea a principiilor active libere.
- ✓ Evaluarea *in vitro* a eficienței de încapsulare s-a realizat prin metodele UV-VIS și HPLC, ținând cont de principiul activ încapsulat. S-au obținut valori foarte bune ale eficienței de încapsulare, mai mari de 80%.
- ✓ S-a constatat o capacitate de încărcare cu substanță activă în strânsă corelație cu eficiența de încapsulare, rezultatele obținute putând fi atribuite bunei acomodări a substanței active în matricea lipidică.
- ✓ Testarea *in vivo* a efectului antiobezitate a fost realizată în cazul probelor NLC pe bază de capsaicină pe șoareci de laborator *Albino Swiss*, studiul evidențind scăderea optimă a greutateii corporale, a nivelului de trigliceride serice, a nivelului de glucoză din sânge, precum și a nivelului de colesterol seric.
- ✓ Compoziția chimică complexă a uleiurilor vegetale utilizate în asociere cu principiile active naturale, dar și cu principiile active de sinteză explică stabilitatea în timp a sistemelor NLC nou sintetizate, de aceea noile formulări sintetizate pot sta la baza dezvoltării unor formulări farmaceutice eficiente și sigure, care pot fi utilizate în terapia antiobezitate.

Formulările NLC încapsulate cu principiile active considerate (acid cafeic, curcumină, piperină, capsaicină) constituie o perspectivă atractivă pentru dezvoltarea viitoare a unor formulări farmaceutice orale inovatoare în scopul gestionării adecvate a greutății pe termen lung.

9.2. CONTRIBUȚII ORIGINALE

Contribuțiile originale cele mai importante aduse prin realizarea tezei de doctorat cu titlul “**Sisteme nanotransportoare pe bază de principii active naturale cu acțiune antioxidantă și antiobezitate**” pot fi sintetizate astfel:

❖ Sinteza, caracterizarea și evaluarea proprietăților unor noi sisteme nanotransportoare pe bază de uleiuri vegetale/minerale (ulei de in, ulei de argan, ulei de luminița nopții/ulei de parafină) în asociere cu un amestec adecvat de lipide solide (monostearat de glicerol și palmitat de cetil).

❖ Încapsularea principiilor active naturale (acidul cafeic, curcumina, piperina, capsaicina) în noile sisteme nanotransportoare, dezvoltând astfel sisteme eficiente de transport care au rolul de a îmbunătăți proprietățile biologice ale acestor principii active.

❖ Co-încapsularea principiilor active naturale cu principii active de sinteză (oleoiletanolamida – OEA și fenilalaninol oleamida – FOA) cu efect antioxidant și antiobezitate, cu scopul creșterii efectelor terapeutice prin sinergie, dar, mai ales, cu scopul reducerii toxicității principiilor active de sinteză.

❖ Nanoîncapsularea principiilor active hidrofiele sau slab lipofile în sistemele de nanotransportori lipidici preparate cu uleiuri vegetale, cu scopul creșterii biodisponibilității principiilor active însoțită de amplificarea activității terapeutice a acestora.

❖ Aducerea la scală nanometrică a unor extracte vegetale și a unor principii active de sinteză

❖ Dezvoltarea de noi sisteme nanotransportoare care prezintă *in vitro* un efect antioxidant îmbunătățit comparativ cu efectul antioxidant al principiilor active neîncapsulate.

❖ Dezvoltarea de noi sisteme nanotransportoare care prezintă *in vivo* un promițător efect antiobezitate, sistemele NLC pe bază de ulei de in, încapsulate cu capsaicină în asociere cu oleoiletanolamida / fenilalaninol oleamida fiind precursorii ale unor formulări farmaceutice sigure și eficiente ce ar putea fi utilizate în terapia obezității.

9.3. PERSPECTIVE DE CERCETARE

Principalele perspective de cercetare pot fi formulate astfel:

➤ Dezvoltarea de noi sisteme nanotransportoare capabile să încapsuleze și alte principii active naturale cu efecte antioxidante și antiobezitate (de exemplu, bromelaina) cu proprietăți optime de încapsulare, stabilitate fizică (depozitare, transport) excelentă și eliberare controlată.

➤ Co-încapsularea principiilor active naturale și cu alte substanțe active de sinteză cu efect antiobezitate, în vederea reducerii efectelor secundare.

➤ Dezvoltarea unor matrici lipidice cu biocompatibilitate înaltă, încapsulate simultan cu mai multe principii active, și testarea *in vitro* și *in vivo* a proprietăților biologice în vederea potențării activității principiilor active prin efect sinergic.

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE ÎN DOMENIUL TEZEI DE DOCTORAT ȘI PARTICIPĂRI LA CONFERINȚE INTERNAȚIONALE

1. I. Lacatușu, N. Badea, D. Udeanu, **L. Coc**, A. Pop, C. Cioates Negut, C. Tanase, R. Stan, A. Meghea, “Improved anti-obesity effect of herbal active and endogenous lipids co-loaded lipid nanocarriers: Preparation, *in vitro* and *in vivo* evaluation”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 99, pp. 12-24, 2019; **FI: 6,259/2019**;
2. **L. M. C. Coc**, I. Lacatusu, N. Badea, M. E. Barbinta-Patrascu, A. Meghea, “Effective Lipid Nanocarriers Based on Linseed Oil for Delivery of Natural Polyphenolic Active”, *J. of Nanomaterials*, vol. 3, pp. 1-9, 2021; **FI: 2,44/2021**;
3. T. A. Iordache, **L. Coc**, A. L. Mihai, N. Badea, I. Lacatusu, A. Meghea, “The influence of vegetable oil and self-organizing agents’ composition on obtaining stable nanostructured lipid carriers”, *U.P.B. Sci. Bull., Seria B* (acceptată);
4. **L. Coc**, I. Lacatusu, N. Badea, D. Udeanu, A. Pop, C. Negut, I. Tanase, R. Stan, A. Meghea, “Nanostructured carriers based on lipid mediators and their therapeutic effects”, 20th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE), Sinaia, Romania, 6-9 September, 2017 (Certificate of Presentation for excellent oral presentation).

FACTOR DE IMPACT CUMULAT: 6,259 + 2,44 = 8,699

Rezumatul de față cuprinde într-o formă concisă conținutul capitolelor 5-8 de contribuții originale. Numerotarea capitolelor, subcapitolelor și a tabelelor corespunde cu cea din teză. Sunt prezentate referințele bibliografice semnificative folosite în lucrare.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1] A. Meghea, I. Lăcătușu, N. Badea, R. Niță, A. Murariu, Sinteza dirijată de nanostructuri pentru materiale cu proprietăți multifuncționale, *Ed. Politehnica Press*, **2009**, pp. 367-370.
- [217] M. Fathi, M. Mirlohi, J. Varshosaz, G. Madani, Novel caffeic acid nanocarrier: production, characterization, and release modeling, *Journal of Nanomaterials*, 3, **2013**, pp. 1-9.
- [220] **L. M. C. Coc**, I. Lacatusu, N. Badea, M. E. Barbinta-Patrascu, A. Meghea, Effective Lipid Nanocarriers Based on Linseed Oil for Delivery of Natural Polyphenolic Active, *J. of Nanomaterials*, 3, **2021**, pp. 1-9.
- [221] F. Q. Hu, S. P. Jiang, Y. Z. Du, H. Yuan, Y. Q. Ye, S. Zeng, Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system, *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*, 45 (3-4), **2005**, pp. 167-173.
- [222] G. Wu, J. Majewski, C. Ege, K. Kjaer, M. J. Weygand, K. Y. C. Lee, Interaction between lipid monolayers and poloxamer 188: an X-ray reflectivity and diffraction study, *Biophysical Journal*, 89 (5), **2005**, pp. 3159-3173.
- [228] S. E. W. Opitz, S. Smrke, B. A. Goodman, C. Yeretizian, Methodology for the measurement of antioxidant capacity of coffee: a validated platform composed of three complementary antioxidant assays, *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, 26, **2014**, pp. 253-264.
- [229] E. Shalaby, S. Shanab, Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*, *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 42 (5), **2013**, pp. 556-564.

- [234] E. H. Gokce, E. K. E. Deller, G. Sandri, M. C. Bonferoni, O. Ozer, Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: evaluation of antioxidant potential for dermal applications, *International Journal of Nanomedicine*, 7, **2012**, pp. 1841-1850.
- [246] J. Bina, V. K. Matam, L. Belur, Biological Properties of Curcumin-Cellular and Molecular Mechanisms of Action, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 44 (2), **2004**, pp. 97-111.
- [274] P. R. Ritger, N. A. Peppas, A simple equation for description of solute release. Fickian and anomalous release from swellable devices, *Journal of Controlled Release*, 5, **1987**, pp. 37-42.
- [336] M. H. Chiu, E. J. Prenner, Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions, *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 3 (1), **2011**, pp. 39-59.
- [340] K. S. Chen, P. N. Chen, Y. S. Hsieh, C. Y. Lin, Y. H. Lee, S. C. Chu, Capsaicin protects endothelial cells and macrophage against oxidized low-density lipoprotein-induced injury by direct antioxidant action, *Chem. Biol. Interact.*, 228, **2015**, pp. 35-45.
- [341] T. Truong, K. S. Jones, Capsaicin reduces PLGA-induced fibrosis by promoting M2 macrophages and suppressing overall inflammatory Response, *J Biomed Mater Res A*, 106 (9), **2018**, pp. 2424-2432.
- [342] K. Murakami, M. Ito, H. H. Htay, R. Tsubouchi, M. Yoshino, Antioxidant Effect of Capsaicinoids on the Metal-catalyzed Lipid Peroxidation, *Biomedical Research-Tokyo*, 22, **2001**, pp. 15-17.
- [343] P. Bencsik, K. Kupai, Z. Giricz, A. Gorbe, I. Huliak, S. Furst, L. Dux, T. Csont, G. Jancso, P. Ferdinandy, Cardiac capsaicin-sensitive sensory nerves regulate myocardial relaxation via S-nitrosylation of SERCA: role of peroxynitrite, *Br. J. Pharmacol.*, 153, **2008**, pp. 488-496.
- [344] R. Gangabthagirathi, R. Joshi, Antioxidant activity of capsaicin on radiation-induced oxidation of murine hepatic mitochondrial membrane preparation, *Research and Reports in Biochemistry*, 5, **2015**, pp. 163-171.
- [345] Ł. Adaszek, D. Gadomska, Ł. Mazurek, P. Łyp, J. Madany, S. Winiarczyk, Properties of capsaicin and its utility in veterinary and human medicine, *Res Vet Sci.*, 123, **2019**, pp. 14-19.
- [348] J. Luan, D. Zhang, L. Hao, C. Li, L. Qi, H. Guo, X. Liu, Q. Zhang, Design and characterization of Amoitone B-loaded nanostructured lipid carriers for controlled drug release, *Drug Deliv*, 20, **2013**, pp. 324-330.
- [349] A. Romano, E. K. Azari, B. Tempesta, A. Mansouri, M. M. Di Bonaventura, D. Ramachandran, T. A. Lutz, G. Bedse, W. Langhans, S. Gaetani, High dietary fat intake influences the activation of specific hindbrain and hypothalamic nuclei by the satiety factor oleoylethanolamide, *Physiol. Behav*, 136, **2014**, pp. 55-62.
- [350] K. Kanasaki, K. Daisuke, Biology of obesity: lessons from animal models of obesity, *Biomed. Res. Int.*, 4, **2011**, pp. 1-11.
- [351] G. Mózsik, Á. Vincze, J. Szolcsányi, Four response stages of capsaicin-sensitive primary afferent neurons to capsaicin and its analog: gastric acid secretion, gastric mucosal damage and protection, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 16, **2001**, pp. 1093-1097.
- [352] K. Srinivasan, Biological activities of red pepper (*Capsicum annuum*) and its pungent principle capsaicin: a review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 56, **2016**, pp. 1488-1500.