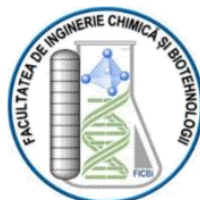


UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE
POLITEHNICA BUCUREȘTI
FACULTATEA DE INGINERIE CHIMICĂ ȘI BIOTEHNOLOGII
ȘCOALA DOCTORALĂ: INGINERIE CHIMICĂ ȘI
BIOTEHNOLOGII



REZUMATUL TEZEI DOCTORAT

**NANOÎNCAPSULĂRI DE NUTRACEUTICE ÎN SISTEME
LIPIDICE NANOSTRUCTURATE PENTRU DEZVOLTAREA
DE SUPLIMENTE ALIMENTARE AVANSATE**

**NANOENCAPSULATION OF NUTRACEUTICALS IN
NANOSTRUCTURED LIPID SYSTEMS FOR OBTAINING
ADVANCED FOOD SUPPLEMENTS**

Doctorand:

Ing. Manasia (Iordache) I. Teodora-Alexandra

Coordonator științific:

Prof. Dr. Univ. Lăcătușu Ioana

**București
-2023-**

Cuvinte cheie: nanoîncapsulare, sistemele lipidice nanotransportor (NLC), optimizare, principii bioactive, caracterizare morfo-structurală, evaluare terapeutică

Cuprins

(numerotarea corespunde paginajului aferent tezei de doctorat)

PARTEA I. CERCETARE BIBLIOGRAFICĂ

INTRODUCERE.....	9
1. NANOSTRUCTURI LIPIDICE – SISTEME EFICIENTE DE TRANSPORT ȘI DISTRIBUȚIE A INGREDIENTELOR ACTIVE SINTETICE ȘI/SAU NATURALE.....	15
1.1. Caracteristici generale NLC: definiție, compoziție, structură	21
1.2. Metode și tehnici de preparare a sistemelor NLC	25
1.3. Caracteristici specifice și avantaje ale sistemelor NLC.....	34
2. APLICABILITATEA SISTEMELOR NANOSTRUCTURATE ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ.....	35
2.1. Potențiale beneficii ale sistemelor lipidice nanostructurate (NLC, SLN) în industria alimentară...36	
2.2. Încapsularea nutraceuticilor în sisteme lipidice (SLN și NLC)	39
2.2.1. Nutraceutice: definiție, caracteristici	39
2.2.2. Tipuri de nutraceutice încapsulate în NLC	41
3. SURSE VEGETALE PRECURSOARE DE PRINCIPII ACTIVE UTILIZATE PENTRU ÎMBUNĂTĂȚIREA STĂRII DE SĂNĂTATE A POPULAȚIEI FEMININE.....	52
3.1. Extractul de <i>wild yam/yam sălbatic</i>	52
3.1.1. Aspecte compoziționale și structurale ale extractului de yam sălbatic	52
3.1.2. Proprietăți terapeutice ale extractului de yam sălbatic	55
3.2. Extractul de <i>Glycyrrhiza glabra</i>	58
3.2.1. Compoziția fitochimică a amestecului vegetal.....	58
3.2.2. Beneficii pentru sănătate exercitate de extractul de <i>GlyG</i>	60
3.3. Extractul de <i>Polygonum cuspidatum</i>	61
3.3.1. Compușii majoritari din componența extractului de <i>Polygonum cuspidatum</i>	61
3.3.2. Proprietăți curative ale extractului de <i>Polygonum cuspidatum</i>	63
3.4. Extractul de <i>Cimicifuga racemosa</i> (<i>Black Cohosh</i>)	64
3.4.1. Caracteristici și compoziție extract de <i>Cimicifuga racemosa</i>	64
3.4.2. Utilizări ale extractului în prevenirea și/sau tratarea diferitelor afecțiuni	65

PARTEA II. CERCETĂRI ORIGINALE

II. JUSTIFICAREA TEMEI DE CERCETARE.OBIECTIVELE CERCETĂRII.....	69
4. PARTE EXPERIMENTALĂ.....	72
4.1. Materii prime utilizate pentru prepararea sistemelor de distribuție de tip NLC.....	72
4.1.1. Lipide solide	73
4.1.2. Uleiuri vegetale.....	75
4.1.3. Surfactanți	80

4.1.4. Principii active	83
4.2. Obținerea sistemelor de distribuție de tip NLC	84
4.3. Metode și tehnici de caracterizare utilizate pentru investigarea structurală și morfologică a NLC liberi și/sau încărcăți cu diferite principii active	87
4.3.1. Spectroscopia de corelație fonică (DLS)	87
4.3.2. Microscopie electronică de transmisie (TEM)	88
4.3.3. Determinarea potențialului electrocinetic (potențialul zeta)	89
4.3.4. Calorimetria de scanare diferențială (DSC)	90
4.3.5. Determinarea eficienței de încapsulare a principiilor active, prin spectroscopie UV-Vis	90
4.3.5.1. Determinarea eficienței de încapsulare a <i>Polygonum cuspidatum</i> în NLC	91
4.3.5.2. Optimizarea metodei de determinare a polifenolilor din probe reale de NLC	96
4.3.6. Determinarea eficienței de încapsulare a principiilor active conținute în NLC, prin analiza HPLC	98
4.4. Metode și tehnici de caracterizare folosite pentru evaluarea unor proprietăți specifice ale NLC liberi și a celor încărcăți cu principii active	100
4.4.1. Metode folosite pentru studiul eliberării <i>in vitro</i> a principiilor active din NLC	100
4.4.2. Cinetica proceselor de eliberare <i>in vitro</i>	102
4.4.3. Teste <i>in vitro</i> de evaluare a citotoxicității	103
4.4.4. Determinarea <i>in vitro</i> a activității antioxidante (metodele chemiluminiscenței și TEAC)	105
4.4.5. Atribuirea <i>in vitro</i> a activității antiinflamatorii (tehnica ELISA)	107
4.5. Analiza statistică a datelor experimentale	108
5. STUDII PRELIMINARE DE OBȚINERE A NLC	109
5.1. Identificarea unor compoziții optime pentru obținerea de NLC stabile și cu dimensiuni prestabilite	109
5.1.1. Caracterizare dimensională. Determinarea stabilității fizice în timp	111
5.1.2. Influența parametrilor operaționali HSH și HPH asupra obținerii de NLC	117
5.2. Concluzii parțiale	120
6. ROLUL COMPLEX AL NLC-URILOR CE ÎNCAPSULEAZĂ DOUĂ PRINCIPII VEGETALE INDIVIDUALE/DUALE, DSG ȘI GLYG, ÎN SCOPUL SPORIRII EFICIENȚEI TERAPEUTICE A ACESTORA.....	122
6.1. Sinteza și caracterizarea NLC_I/II_DSG, respectiv a NLC ce co-încapsulează DSG și extract de lemn dulce (GlyG)	123
6.1.1. Caracterizarea morfo-structurală a NLC libere, individuale, NLC_I/II_DSG/GlyG și mixte, NLC_I/II_DSG_GlyG.....	124
6.1.2. Determinarea stabilității fizice pentru sistemele individuale și duale	127
6.1.3. Evaluarea structurală a miezului lipidic înainte și după încapsularea principiilor active naturale	128
6.1.4. Determinarea eficienței de încapsulare și a capacității de încărcare cu DSG și GlyG	131
6.2. Evaluarea potențialului terapeutic al NLC_I/II_DSG, respectiv NLC_I/II_DSG_GlyG(4)	133
6.2.1. Evaluarea <i>in vitro</i> a potențialului citotoxic (MTS și RTCA)	133
6.2.2. Determinarea <i>in vitro</i> a activității antioxidante	137
6.2.3. Studii de eliberare <i>in vitro</i> a DSG și GlyG din sistemele lipidice nanostructurate	139
6.2.4. Testarea <i>in vitro</i> a activității antiinflamatorii	148
6.3. Concluzii parțiale	149
7. PROVOCĂRI ÎN COOPTAREA ÎN CADRUL ACELUIAȘI SISTEM LIPIDIC NANOSTRUCTURAT A DOI COMPUȘI BIOACTIVI (LIPOFIL ȘI HIDROFIL), CU SCOPUL CREȘTERII BIODISPONIBILITĂȚII.....	152
7.1. Optimizarea sistemelor lipidice nanotransportor pentru cooptarea DSG și Yam	152
7.1.1. Stabilitatea în timp a dispersiilor coloidale lipidice	154
7.1.2. Analiza morfologică a sistemelor nanotransportor încărcate cu DSG și Yam	158

7.2. Comportamentul termic al nanotransportorilor cu și fără principii vegetale, utilizând calorimetria de scanare diferențială	159
7.3. Determinarea eficienței de încapsulare a celor două principii vegetale, DSG și Yam	161
7.4. Analize <i>in vitro</i>, în vederea demonstrării proprietăților terapeutice deținute de sistemele NLC_DSG_Yam.....	163
7.4.1. Determinarea <i>in vitro</i> a activității antioxidante (analiza TEAC și metoda chemiluminiscentei)	163
7.4.2. Evaluarea profilului de eliberare <i>in vitro</i> a DSG, din sistemele NLC care conțin DSG și extract de Yam sălbatic	166
7.4.3. Evaluarea <i>in vitro</i> a citotoxicității sistemelor NLC.....	167
7.4.3.1. Evaluarea <i>in vitro</i> a citotoxicității sistemelor NLC asupra celulelor HUVEC (analiza MTS)	167
7.4.3.2. Evaluarea <i>in vitro</i> a citotoxicității sistemelor NLC asupra celulelor HUVEC (RTCA)	169
7.4.4. Determinarea <i>in vitro</i> a acțiunii antiinflamatorii a sistemelor NLC.....	170
7.5. Concluzii parțiale	172

8. INFLUENȚA COOPTĂRII *POLYGONUM CUSPIDATUM* ALĂTURI DE DSG ÎN NLC, ASUPRA PROPRIETĂȚILOR ANTIOXIDANTE ȘI A EFECTULUI ANTIINFLAMATOR

174

8.1. Eficientizarea compoziției sistemelor nanostructurate	175
8.2. Prepararea și caracterizarea morfo-structurală a NLC ce conțin DSG, PCus, respectiv amestec de principii vegetale	177
8.3. Modificări structurale în NLC_UAr și NLC_UIn, în urma încorporării de principii active vegetale.....	182
8.4. Eficiența de încapsulare a celor 2 principii bioactive asociate în nanotransportori lipidici, individuali și duali	185
8.5. Studii <i>in vitro</i> de eliberare susținută a DSG și a PCus din NLC_DSG, NLC_PCus, respectiv NLC_DSG_PCus	186
8.5.1. Studii de modelare cinetică a profilului de eliberare controlată.....	188
8.6. Studii <i>in vitro</i> pentru determinarea activității antioxidante	191
8.7. Testarea <i>in vitro</i> a citotoxicității nanosistemelor individuale și duale	192
8.8. Determinarea efectului antiinflamator pentru sistemele NLC-individuale și duale (ce conțin DSG, PCus și amestec de principii vegetale)	196
8.9. Concluzii parțiale	199

9. PROPRIETĂȚI FUNCȚIONALE SUPERIOARE REZULTATE PRIN ASOCIEREA DIOSGENINEI ȘI A EXTRACTULUI DE *CIMICIFUGA RACEMOSA* ÎN NANOTRANSPORTORI LIPIDICI.....

200

9.1. Obținerea sistemelor lipidice nanotransportor, încărcate cu DSG/CymR, respectiv amestec de DSG și CymR	201
9.2. Caracterizarea dimensională și morfologică a sistemelor nanotransportor individuale și duale ..	202
9.3. Determinarea potențialului electrocinetic pentru sistemele nanotransportor dezvoltate	206
9.4. Modificări structurale ale NLC după captarea principiilor active vegetale, observate prin analiza calorimetrică de scanare diferențială	207
9.5. Determinarea eficienței de încapsulare a DSG și CymR în nanotransportori lipidici	210
9.6. Evaluarea <i>in vitro</i> a eliberării principiilor vegetale bioactive (DSG și CymR) din sistemele nanostructurate obținute	212
9.6.1. Cinetica procesului de eliberare a principiilor active	215
9.7. Cuantificarea <i>in vitro</i> a activității de captare și inhibare a radicalilor liberi, manifestată de sistemele NLC individuale și mixte	229
9.8. Monitorizarea <i>in vitro</i> a citotoxicității exercitată de sistemele NLC individuale și mixte, cu conținut de DSG, CymR și respectiv, amestec de principii active.....	232
9.8.1. Evaluarea citotoxicității vs. proliferarea celulelor normale EA.hy926	233

9.9. Studiarea efectului antiinflamator exercitat de sistemele NLC individuale, NLC-UAr/UIn-DSG/<i>CymR4</i> și mixte, NLC-UAr/UIn-DSG-<i>CymR4</i>	237
9.10. Concluzii parțiale	240
10. CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	243
10.1. Concluzii finale	243
10.2. Contribuții originale	249
10.3. Direcții viitoare de dezvoltare a acestei cercetări aplicate	251
MULȚUMIRI	253
PUBLICAȚII REPREZENTATIVE ÎN DOMENIUL TEZEI DE DOCTORAT	254
LISTĂ PRESCURTĂRI	256
LISTĂ FIGURI	258
LISTĂ TABELE	263
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ (CERCETARE DOCUMENTARĂ ȘI CERCETĂRI ORIGINALE)	264

Introducere

În contextul modificării continue a obiceiurilor alimentare, a necesității suplirii unor deficiențe nutritive sau vindecării anumitor afecțiuni, nanotehnologia, cu precădere nanoîncapsularea de principii active în sisteme eficiente de distribuție, a devenit un domeniu larg abordat de cercetătorii din sfera nanotehnologiei. Menită să asigure protecția principiului activ de interes în fața agresiunii diferiților factori, să sporească eficiența de încapsulare, să asigure eliberarea compusului la locul de acțiune, să potențeze activitatea biologică a acestuia, nanoîncapsularea a căpătat din ce în ce mai multă amploare. În ceea ce privește compoziția de încapsulat, se poate evidenția tendința spre alegerea compușilor naturali, extrași din surse vegetale, meniți să diminueze efectele secundare (uneori cu potențial toxic) ale compușilor de sinteză. Acești compuși prezintă pe lângă aspectul nutritiv și o latură farmacologică, participând activ la prevenirea și/sau vindecarea anumitor afecțiuni, drept pentru care au fost încadrați în categoria nutraceuticelor. În literatura de specialitate sunt prezentate o serie de sisteme nanostructurate de natură lipidică, ce au servit la încapsularea nutraceuticelor, spre exemplu lipozomi, niozomi, nanoemulsii, microemulsii sau nanoparticule lipidice. Acestea din urmă, din categoria cărora fac parte nanoparticulele lipidice solide (Solid Lipid Nanoparticles = SLN) și transportorii lipidici nanostructurați (Nanostructured Lipid Carriers = NLC) prezintă avantaje majore, față de alte sisteme de distribuție. Câteva din plusurile sistemelor lipidice includ abilitatea de captare a compușilor hidro- și liposolubili și de îmbunătățire a absorbției în organism (sporirea biodisponibilității compusului activ), stabilitate chimică și fizică ridicate, utilizarea de ingrediente biodegradabile in vivo, eliberare controlată a compușilor activi, toxicitate redusă și metode de obținere adecvate, inclusiv la nivel industrial. Un aspect intens dezbătut cu care se confruntă știința și populația feminină aflată în perioada menopauzală este dacă terapia hormonală de substituție (cu administrare de hormoni de sinteză, estrogen și/sau progesteron de sinteză), aplicată în tratamentul simptomelor menopauzale este sau nu sigură și eficientă. Deși anumite studii dovedesc eficacitatea acestei terapii de substituție, în altele sunt semnalate efecte secundare asociate, în special la femeile cu risc cardiovascular ridicat, afecțiuni tromboembolice sau iminență de cancer (sân, endometrial). În plus, individualitatea fiecărei femei, percepțiile socioculturale pot fi alte motive pentru care unele refuză ingestia de hormoni sintetici, preferând terapii alternative.

În acest context, prezenta teză de doctorat, *Nanoîncapsulări de nutraceutice în sisteme lipidice nanostructurate pentru dezvoltarea de suplimente alimentare avansate*, are în vedere identificarea unor soluții terapeutice alternative, bazate pe validarea unor principii active vegetale (prezente sub formă nano- în diferite sisteme de distribuție de natură lipidică) care prezintă efecte estrogenice și alte acțiuni terapeutice complementare, pentru dezvoltarea de suplimente alimentare. Astfel, teza abordează obținerea, caracterizarea fizico-chimică, precum și evaluarea in vitro a proprietăților specifice ale unor sisteme de distribuție nanostructurate din categoria transportorilor lipidici nanostructurați (NLC), capabile să încapsuleze diferite principii naturale provenite din surse vegetale – individuale sau aflate în amestec (sub formă de extracte vegetale). Scopul este asociat cu îmbunătățirea biodisponibilității ambelor extracte din plante (prin asigurarea unei eliberări susținute și constante a celor doi compuși bioactivi), protejarea acestora împotriva degradării gastrointestinale (evitând metabolismul primar),

cuplând în același timp ambele tipuri de acțiuni terapeutice, antiinflamatorii și efecte antioxidante. Principiile vegetale studiate, selectate pe baza beneficiilor terapeutice semnalate în diferite cercetări publicate în ultimii ani (prin rezultatele analizelor in vitro, testelor in vivo și a studiilor preclinice) sunt: *Diosgenină* (DSG), *extract de yam sălbatic* (Yam), *extract de Glycyrrhiza glabra* (GlyG), *extract de Polygonum cuspidatum* (PCus) și *extract de Cymicifuga racemosa* (CymR).

Teza de doctorat formulată sub denumirea de „Nanoîncapsulări de nutraceutice pentru dezvoltarea de suplimente alimentare avansate”, este structurată pe 10 capitole, divizate în 2 părți, cercetarea bibliografică și cercetări originale.

PARTEA I. Cercetarea bibliografică cuprinde 3 capitole:

o *Capitolul 1* prezintă aspectele compoziționale, caracteristicile structurale și avantajele sistemelor NLC, precum și un „state of the art” privind eficiența sistemelor de distribuție în transportul ingredientelor active naturale sau sintetice.

o Potențialul aplicativ al nanoparticulelor lipidice de tip NLC și SLN în industria alimentară, respectiv beneficiile acestor sisteme în distribuția de nutraceutice, sunt detaliate în *Capitolul 2*.

o *Capitolul 3* încadrează principalele aspecte ale compușilor vegetali sau ale amestecurilor fitochimice cercetate în prezenta teză de doctorat, respectiv: surse de obținere, compoziție chimică, efecte biologice și beneficii terapeutice.

PARTEA a II-a. Cercetările originale debutează cu menționarea obiectivelor cercetării, se continuă cu aspecte privind contribuțiile originale în domeniul obținerii, caracterizării fizico-chimice și evaluării in vitro a anumitor proprietăți biologice ale unor sisteme lipidice nanotransportor care cooptează diferite principii active de origine vegetală și se finalizează cu concluziile aferente cercetărilor întreprinse.

o *Capitolul 4* prezintă tehnicile și metodele utilizate pentru caracterizarea sistemelor lipidice nanotransportor ce înglobează principiile active selectate în cercetare.

o *Capitolul 5* expune studiile preliminare de obținere a NLC liberi (fără conținut de principii active), a NLC ce încapsulează un singur principiu activ, precum și a sistemelor NLC care cooptează diferite principii active duale (mixte). Aici sunt încadrate etapele de optimizare în ceea ce privește obținerea de nanosisteme lipidice, ex: selectare raport optim între lipide, surfactanți și/sau co-surfactanți, cantitate principiu activ, parametrii de operare în timpul procesării prin omogenizare la presiune înaltă (tehnica HPH) etc.

o *Capitolul 6* prezintă rezultatele originale obținute în urma preparării și caracterizării unor sisteme NLC (cu conținut de ulei de luminița nopții și ulei de soia), individuale, dar și mixte, sisteme de distribuție ce înglobează drept principii active, diosgenina (DSG) și extractul de *Glycyrrhiza Glabra* (GlyG). Caracterizarea fizico-chimică a NLC este completată de evaluarea in vitro a potențialului terapeutic al NLC_GlyG(ulei de luminița nopții/I și ulei de soia/II), NLC_DSG(I/II), respectiv a sistemelor mixte, NLC ce co-încapsulează simultan DSG și GlyG. Concluziile parțiale sunt sumarizate la finalul capitolului.

o În *capitolul 7* se regăsesc rezultatele cercetărilor aplicate pe sistemele NLC individuale, ce înglobează DSG, respectiv extract de yam sălbatic (Yam), dar și principii vegetale duale, NLC_DSG_Yam. Cercetarea cuprinde caracterizarea fizico-chimică a nanotransportorilor liberi și încărcăți, precum și rezultatele analizelor in vitro de evaluare a potențialului citotoxic, de determinare a activității antioxidante și a celei antiinflamatorii.

o *Capitolul 8* evaluează adaptabilitatea unor noi matrici lipidice constitutive ale NLC (cu conținut de ulei de armurariu și ulei de în, asociate cu monostearat de gliceril și unt de cacao) de a găzdui DSG, un extract de *Polygonum cuspidatum* (PCus, cu conținut ridicat de Resveratrol), respectiv amestec din cele două principii active. Sistemele nou formate au fost caracterizate dimensional, morfologic și structural. Cercetarea este completată de rezultatele analizelor *in vitro*, ex: determinare citotoxicitate, studiu profil de eliberare, evaluare activitate antioxidantă și efect antiinflamator.

o Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unor sisteme nanotransportor care cooptează alte două categorii de principii active vegetale, diosgenină și extract de cohosh negru (*Cymicifuga racemosa*, CymR) sunt reunite în *capitolul 9*. Capitolul cuprinde și aspectele asociate cu evaluarea potențialului citotoxic al NLC, precum și determinarea *in vitro* a proprietăților antioxidante și antiinflamatoare.

o *Capitolul 10* include concluziile finale și principalele contribuții originale.

Teza se finalizează cu enumerarea bibliografiei, părții de cercetare documentară și cea a cercetărilor originale, lista de abrevieri, figuri și tabele. Rezultatele cercetărilor au fost valorificate prin publicarea rezultatelor originale în 4 jurnale internaționale cotate ISI, ce cumulează un FIC = 16.144, respectiv participarea la o conferință internațională (cu trei lucrări reprezentative, două sub formă de poster și o prezentare orală). În plus, s-a depus și o cerere de brevet de invenție pentru patentarea acestor sisteme nanotransportor, capabile să coopteze mai multe principii vegetale bioactive (A 2021/00220/29.04.2021).

II. Justificarea temei de cercetare. Obiectivele cercetării

Având în vedere tendințele globale actuale, utilizarea produselor din plante pentru a furniza ingrediente naturale bioactive care manifestă multiple efecte terapeutice și efecte secundare diminuate sau chiar inexistente, deschide noi perspective în farmacoterapia diverselor boli. Prin urmare, în cadrul prezentei teze intitulată „*Nanoîncapsulări de nutraceutice în sisteme lipidice nanostructurate pentru dezvoltarea de suplimente alimentare avansate*” s-a urmărit încapsularea în diferite matrici lipidice, a mai multor tipuri de principii active, (lipofile și hidrofile), pentru obținerea unor sisteme de distribuție menite să sporească eficiența terapeutică a compușilor captați în miezul lipidic și/sau în învelișul hidrofîl creat de surfactanți. Astfel, principalele obiective au fost:

- I. Obținerea unor sisteme lipidice nanostructurate duale (NLC-uri cu răspuns terapeutic multiplu), prin înglobarea de principii active vegetale care manifestă acțiuni biologice complementare și/sau sinergice.
- II. Caracterizarea morfo-structurală a noilor sisteme nanostructurate obținute, în scopul demonstrării eficienței și abilității acestora de a coopta ambele categorii de principii vegetale, lipofile și hidrofile.
- III. Evaluarea comparativă a răspunsurilor terapeutice *in vitro* ale NLC cu conținut de principii vegetale, pentru a identifica cele mai bune performanțe terapeutice, prin intermediul specificității sporite și acțiunilor antioxidante și antiinflamatoare maximizate.

5. Studii preliminare de obținere a NLC

5.1. Identificarea unor compoziții optime pentru obținerea de NLC stabile și cu dimensiuni prestabilite

Prezentul capitol oferă un studiu de ansamblu asupra influenței compoziției unui amestec format din 3 surfactanți și co-surfactanți, hidrofilii și amfifili (Tween 20, Fosfatidilcolină și Poloxamer 188) în obținerea de NLC cu dimensiuni prestabilite. În scopul selectării unor compoziții optime de surfactanți – co-surfactanți – lipide, care să asigure formarea unor nanoparticule sferice bine definite, cu diametre medii < 200 nm, s-au realizat mai multe variații ale componentelor de bază (ex: concentrație și raport între surfactanți, tip de ulei vegetal), dar și ale parametrilor de operare (ex: număr de cicluri de omogenizare, presiune de omogenizare, număr de rpm). Inițial, studiile au vizat variația concentrației amestecului de surfactanți, prin selectarea a două concentrații, 2% și 2.5%, precum și urmărirea influenței raportului de greutate între cele trei tipuri de surfactanți. Așa cum reiese din tabelul 2, drept surfactant predominant a fost ales surfactantul neionic Tween 20 (Polisorbat 20/polioxietilen (20) sorbitan monolaurat), cu specificația că % menționate sunt raportate la totalul de 2%, respectiv 2.5% de amestec de surfactanți și co-surfactant folosit pentru obținerea NLC (pentru 100g dispersie apoasă NLC). Pe lângă amestecul de surfactanți și co-surfactanți, pentru formularea miezului lipidic s-a utilizat un amestec de lipide solide (monostearat de gliceril (MSG) și palmitat de cetil (PC)) alături de lipide lichide. Modificarea caracterului solid al miezului lipidic s-a înfăptuit prin utilizarea a două tipuri de uleiuri vegetale, uleiul de luminița nopții (pentru NLC_I), respectiv uleiul de soia (pentru NLC_II) cu ajutorul cărora s-au sintetizat 12 variante experimentale, detaliate în Tabelul 1. Ulterior sintezei, nanotransportorii au fost caracterizați din punct de vedere al diametrelor medii ale particulelor lipidice și a potențialului electrocinetic pentru validarea stabilității în timp.

Tabel 1. Tipuri de NLC-uri obținute și compoziția în lipide, surfactanți și co-surfactanți

Nr. Crt.	Denumire probă NLC	Lipide, g				Surfactant și co-surfactant, g		
		MSG	PC	I	II	Tw20	Polx188	Fosf
Nanotransportori sintetizați cu ulei de luminița nopții								
1.	NLC_I_2%_1	3.5	3.5	3.0	-	1.40	0.30	0.30
2.	NLC_I_2%_2	3.5	3.5	3.0	-	1.60	0.20	0.20
3.	NLC_I_2%_3	3.5	3.5	3.0	-	1.70	0.15	0.15
4.	NLC_I_2,5%_1	3.5	3.5	3.0	-	1.75	0.375	0.375
5.	NLC_I_2,5%_2	3.5	3.5	3.0	-	2.00	0.250	0.250
6.	NLC_I_2,5%_3	3.5	3.5	3.0	-	2.125	0.187	0.187
Nanotransportori sintetizați cu ulei de soia								
7.	NLC_II_2%_1	3.5	3.5	-	3.0	1.40	0.30	0.30
8.	NLC_II_2%_2	3.5	3.5	-	3.0	1.60	0.20	0.20
9.	NLC_II_2%_3	3.5	3.5	-	3.0	1.70	0.15	0.15
10.	NLC_II_2,5%_1	3.5	3.5	-	3.0	1.75	0.375	0.375
11.	NLC_II_2,5%_2	3.5	3.5	-	3.0	2.00	0.250	0.250
12.	NLC_II_2,5%_3	3.5	3.5	-	3.0	2.125	0.187	0.187

Tabel 2. Rapoartele folosite între cele 3 tipuri de amestecuri de surfactanți și co-surfactanți pentru optimizarea procesului de obținere a nanotransportorilor

Nr. Crt.	Denumire formulare nanostructurată	Tw20 (% w/w)*	Fosf (% w/w)*	Polx188 (% w/w)*
1.	NLC_I/II_1	70	15	15
2.	NLC_I/II_2	80	10	10
3.	NLC_I/II_3	85	7.5	7.5

Notă: *% din totalul de 2%, respectiv 2.5% de amestec de surfactanți și co-surfactant folosit pentru obținerea NLC (raportat la 100g dispersie NLC)

Figurile 1, 2 prezintă restrâns o imagine de ansamblu asupra diametrelor medii ale particulelor, respectiv ale potențialelor zeta pentru sistemele sintetizate cu diferite concentrații de surfactanți (rapoarte de greutate variabile, a se vedea tabel 2), respectiv uleiuri vegetale distincte. Rezultatele înregistrate au punctat faptul că un amestec format din 2.5% surfactanți și co-surfactant, aflați într-un raport, **Tw20 : Polx188 : Fosf = 70 : 15 : 15**, pentru ambele tipuri de uleiuri, ulei de luminița nopții și ulei de soia, a condus la obținerea unor valori oportune, diametrele medii regăsindu-se sub valoarea de 150 nm, gradul de distribuție al populației lipidice fiind relativ îngust și stabilitatea fizică ridicată. În această manieră:

- pentru NLC_I, $Z_{ave} = 143.8 \pm 1.74$ nm, $PdI = 0.23 \pm 1.74$ și $\xi = -48.8 \pm 0.95$ mV,
- pentru NLC_II, $Z_{ave} = 134.3 \pm 1.65$ nm, $PdI = 0.18 \pm 1.65$ și $\xi = -46.5 \pm 0.35$ mV.

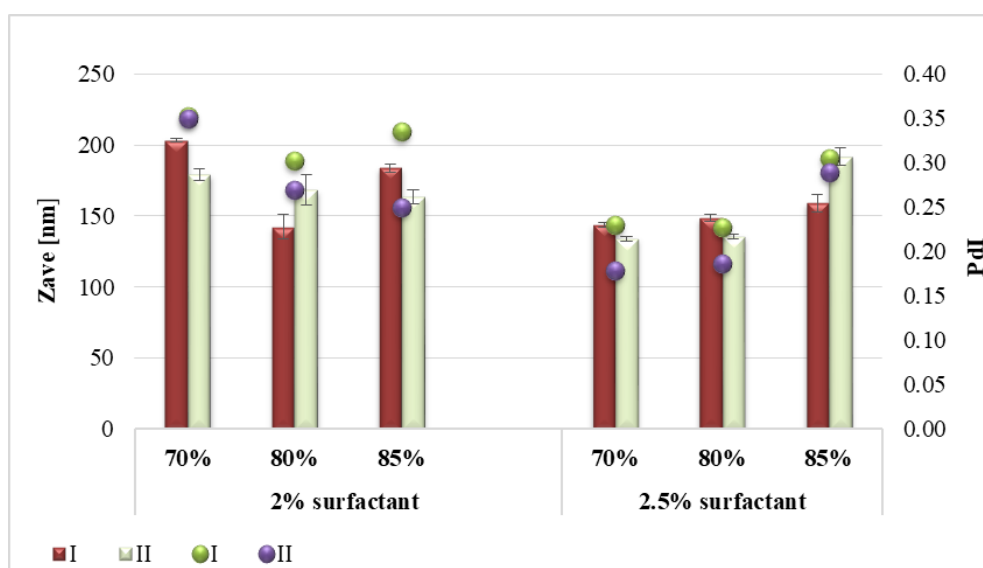


Figura 1. Evaluarea comparativă a Z_{ave} (■) și a PdI (●) pentru NLC_I și NLC_II, preparate cu 2%, respectiv 2.5% amestec de surfactanți și co-surfactant (aflați în rapoarte compoziționale diferite, majoritar fiind Tw20).

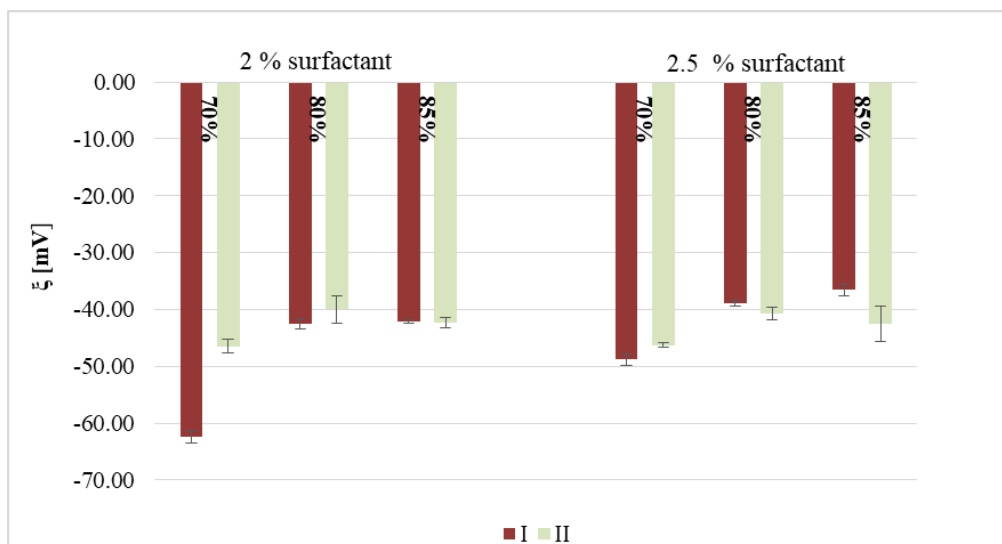


Figura 2. Evaluarea comparativă a valorilor ξ pentru cele 3 compoziții de amestec de surfactanți (ce cumulează împreună un total de 2%, respectiv 2.5%), determinate pentru sistemele NLC_I și NLC_II

După identificarea unei compoziții adecvate în ceea ce privește miezul lipidic stabilizat de amestecul de surfactanți și co-surfactant, procesul de optimizare a continuat cu modificarea parametrilor de proces. Astfel, au suferit variații, 2 parametri din cadrul procesului de omogenizare la presiune ridicată: presiunea de omogenizare (400 și 500 bar) și numărul de cicluri (4, 6, 8 cicluri de omogenizare), respectiv modificarea numărului de rotații pe minut (*rpm*) (8.000 ÷ 17.000) din cadrul procesului de omogenizare prin forfecare (HSH), în vederea spargerii eficiente a picăturilor lipidice (Iordache, T.-A., 2022).

Conform graficelor reprezentate mai jos, deși aplicarea unui număr mai mare de cicluri de omogenizare, ex. 8 cicluri conduce la valori mai scăzute ale diametrelor particulelor, Fig. 3, valorile ideale obținute prin reunirea *Zave* – *PdI* – ξ , au subliniat superioritatea sistemului caracterizat de aplicarea a 6 cicluri omogenizare la procesarea prin HPH, 500 bar (corespunzătoare unui timp de procesare prin HPH de 3 min. și 20 sec.); *Zave* = 180.9 ± 0.95 nm, *PdI* = 0.27 ± 0.02 și $\xi > -48$ mV.

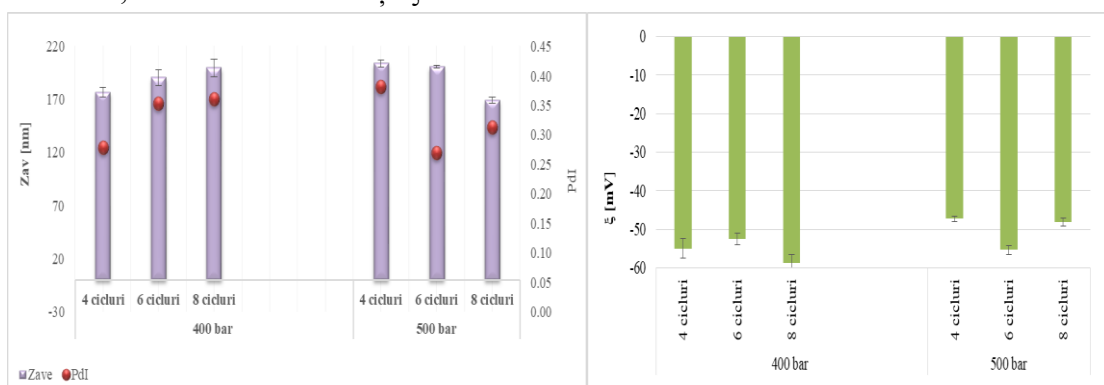


Figura 3. Comparație între valorile *Zave* și ale *PdI*, obținute prin variația numărului de cicluri de omogenizare și respectiv modificarea presiunii (etapa de procesare prin HPH); Variația potențialului electrocinetic

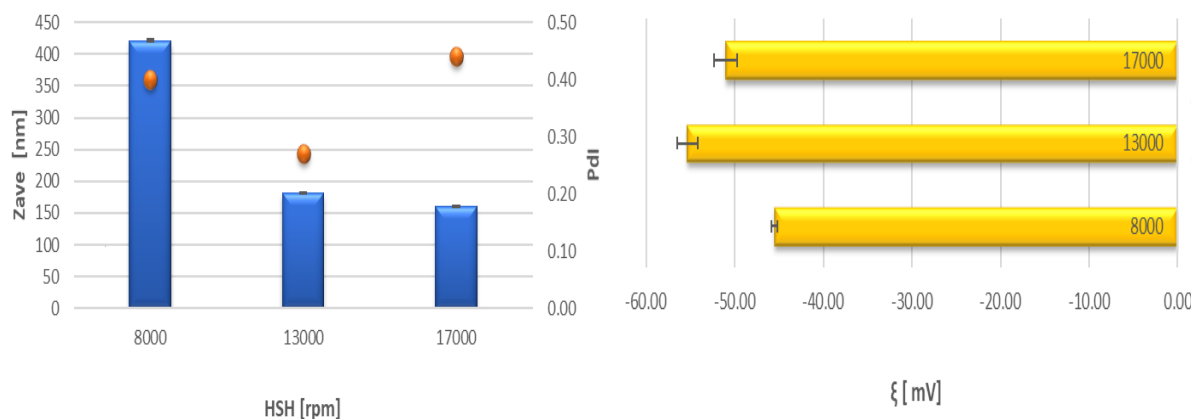


Figura 4. Dimensiunea medie a particulelor, indicii de polidispersitate și potențialele electrocinetice obținute în urma varierii numărului de *rpm* (etapa de procesare prin HSH)

Urmărirea influenței *rpm* a sugerat o diminuare semnificativă a *Zave*, pe măsura creșterii numărului de *rpm* de la 8.000 la 17.000 *rpm*. În ciuda faptului că cel mai mic diametru mediu a fost obținut în cazul sistemului lipidic supus la 17.000 *rpm*, totuși creșterea indicelui de polidispersitate ($PdI > 0.4$) sugerează existența unui interval larg de distribuție a nanotransportorilor lipidici, respectiv detectarea unui grad ridicat de polidispersitate, care antrenează instabilitatea sistemelor. Acest ultim aspect, corelat și cu valoarea potențialului zeta (Fig. 4) întăresc ideea operării HSH în etapele ulterioare, la o valoare maximă de 13.000 *rpm* (Iordache, T.-A., 2022).

5.1. Concluzii

Prin sumarizarea informațiilor obținute în cadrul procesului de optimizare a compoziției și a parametrilor operaționali de bază, varianta ideală pentru obținerea ulterioarelor sisteme de nanotransportori lipidici implică: i) folosirea unui amestec de 2.5% surfactanți și co-surfactant (aflați într-un raport compozițional de Tw20 : Polx188 : Fosf = 70 : 15 : 15, raportați la obținerea a 100 g dispersie apoasă NLC); ii) operarea în etapa de procesare prin HSH la 13.000 *rpm* (timp de 1 min.); iii) 6 cicluri de omogenizare (corespunzătoare unui timp de 3 min. și 20 sec.), la 500 bar, pentru etapa de procesare prin HPH.

6. Rolul complex al NLC-urilor ce încapsulează două principii vegetale individuale/duale, DSG și *GlyG*, în scopul sporirii eficienței terapeutice a acestora

6.1. Sinteza și caracterizarea NLC_I/II_DSG, respectiv a NLC ce co-încapsulează DSG și extract de lemn dulce (*GlyG*)

În cadrul acestui capitol se urmărește dezvoltarea unor nanotransportori lipidici ce conțin diferite principii bioactive din plante (amestecuri fitochimice selectate din două categorii de principii lipofile și hidrofile), precum și demonstrarea eficacității lor terapeutice. Cele două principii vegetale de natură lipofilă și hidrofilă, cooptate în același sistem lipidic nanostructurat sunt diosgenina, DSG (activ natural, lipofil, din extractul de yam sălbatic, *sp. Dioscorea villosa*) și extract de lemn dulce, *GlyG* (amestec vegetal hidrofil, standardizat în 10% acid glicirizic).

Sinteza a implicat existența a două faze, *o fază apoasă* (ce include surfactanți și principii active hidrofile, extract de lemn dulce/*GlyG*) și *o fază lipidică* (ce conține amestecul de lipide și principiul lipofil, diosgenină/DSG), obținerea unei emulsii (emulsionare în topitură) și ulterior, procesarea acesteia prin omogenizare cu grad înalt de forfecare (HSH) și omogenizare la presiune ridicată (HPH), s-au obținut 14 sisteme nanotransportor (Tabel 3). Sistemele au fost caracterizate privind variația diametrului mediu al particulelor, a intervalului de distribuție al mărimii acestora, cât și a potențialului zeta.

Tabel 3. Lipide, surfactanți și principii active ce intră în componența nanotransportorilor lipidici cu DSG, *GlyG*, respectiv DSG și *GlyG*

*Notă: NLC_I – sisteme obținute cu ulei de luminița nopții; NLC_II – sisteme conținând ulei de in

Nr. crt.	Denumire formulare nanostructurată	Lipide, g				Surfactanți, g			Principii active	
		MSG	PC	I	II	Tw 20	PC	Polx 188	DSG, g	<i>GlyG</i> , g
1.	NLC_I	3.5	3.5	3.0	-	1.75	0.375	0.375	-	-
2.	NLC_I_DSG	3.5	3.5	3.0	-				0.5	-
3.	NLC_I_ <i>GlyG</i> (4)	3.5	3.5	3.0	-				-	2
4.	NLC_I_DSG_ <i>GlyG</i> (1)	3.5	3.5	3.0	-				0.5	0.5
5.	NLC_I_DSG_ <i>GlyG</i> (2)	3.5	3.5	3.0	-				0.5	1
6.	NLC_I_DSG_ <i>GlyG</i> (3)	3.5	3.5	3.0	-				0.5	1.5
7.	NLC_I_DSG_ <i>GlyG</i> (4)	3.5	3.5	3.0	-				0.5	2
8.	NLC_II	3.5	3.5	-	3.0				-	-
9.	NLC_II_DSG	3.5	3.5	-	3.0				0.5	-
10.	NLC_II_ <i>GlyG</i> (4)	3.5	3.5	-	3.0				-	2
11.	NLC_II_DSG_ <i>GlyG</i> (1)	3.5	3.5	-	3.0				0.5	0.5
12.	NLC_II_DSG_ <i>GlyG</i> (2)	3.5	3.5	-	3.0				0.5	1
13.	NLC_II_DSG_ <i>GlyG</i> (3)	3.5	3.5	-	3.0				0.5	1.5
14.	NLC_II_DSG_ <i>GlyG</i> (4)	3.5	3.5	3.0	-				0.5	2

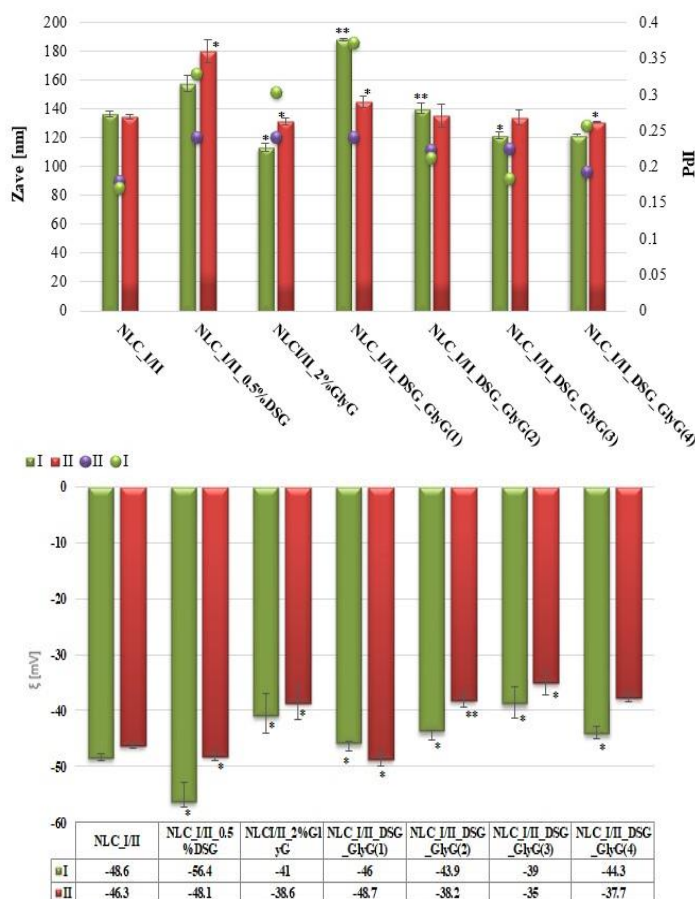
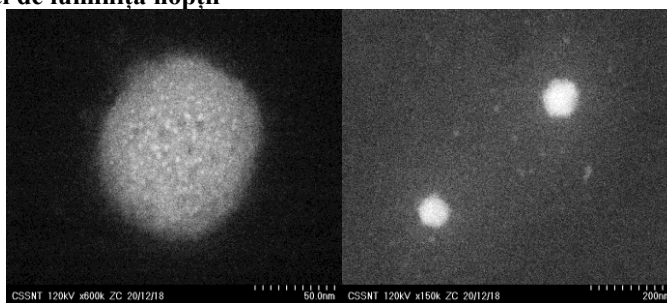


Figura 5. Variația Zave, PdI și potențialului zeta pentru nanotransportorii încapsulând cele două principii vegetale (*GlyG* și *DSG*), obținuți din uleiurile vegetale I/II;

Comparația efectuată între nanotransportorii încapsulați cu principii active vegetale individuale și duale, respectiv cei liberi, subliniază faptul că NLC_I/II prezintă dimensiuni similare, ~135 nm și indici de polidispersitate în jurul valorilor de 0.17 – 0.18. Referitor la nanotransportorii încapsulați cu principii active vegetale, dimensiunile medii ale populației lipidice prezintă o variație în domeniul 115 și 185 nm și indici de polidispersitate care se situează în intervalul 0.18 ÷ 0.37. Potențialul electrocinetic al nanotransportorilor sintetizați s-a regăsit în intervalul -39 ÷ -56 mV pentru NLC_I, respectiv -35 ÷ -48 mV pentru NLC_II. Valorile ridicate subliniază existența unui fenomen de repulsie electrostatică fapt care previne apariția fenomenelor de alterare a nanotransportorilor, indiferent de natura compusului încapsulat vizat.

Analiza morfologică a evidențiat existența unor morfologii interne distincte, în funcție de tipul de ulei vegetal întrebunțat la sinteza nanotransportorului. Astfel, în cazul nanotransportorilor sintetizați cu ulei de soia (Fig. 6B), s-au vizualizat particule sferice cu diametre cuprinse în intervalul 50 ÷ 180 nm, fără alte modificări în structura internă, în schimb, pentru cel de-al doilea tip de nanotransportor, în care s-a utilizat ulei de luminița nopții (Fig. 6A, au putut fi observate în miezul lipidic incluziuni de nanosfere cu diametre < 5nm.

A. NLC mixt cu ulei de luminia nopții



B. NLC mixt cu ulei de soia

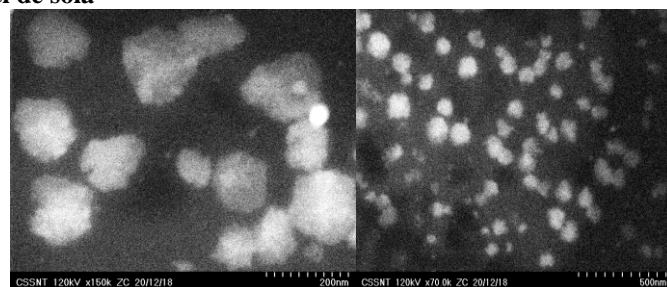


Figura 6. Analiza morfologică a nanotransportorilor mixti, obținuți cu cele două uleiuri vegetale

6.1.4. Evaluarea structurală a miezului lipidic înainte și după încapsularea principiilor active naturale

Din analiza calorimetrică de scanare diferențială, Fig. 7 se evidențiază trei vârfuri endoterme corespunzătoare lipidelor din amestecurile fizice (MSG + PC + I, respectiv MSG + PC + II), $56.5 \div 62.5^{\circ}\text{C}$ pentru MSG, 52.3°C pentru PC, respectiv intervalul cu temperaturi $< 50^{\circ}\text{C}$, specific acizilor grași nesaturați din componența uleiurilor vegetale. Aceleași vârfuri endoterme au fost vizualizate în structura NLC-urilor, însă cu o amplitudine mai mică și într-un domeniu mai larg de temperatură, $42 \div 60^{\circ}\text{C}$. Această lărgire poate fi cauza unei structuri mult mai complexe și dezorganizate, fapt care sugerează compatibilitatea ridicată între lipidele utilizate în cadrul procesului de sinteză și structura amorfă a miezului lipidic. Pentru NLC_I/II_GlyG(4), se evidențiază o lărgire mai mică a picului endoterm, ceea ce întărește ideea prezenței extractului hidrofîl în stratul de surfactant, ce ulterior induce o alterare aproape nesemnificativă a miezului lipidic. La polul opus, cea mai mare extindere a picurilor endoterme a fost înregistrată pentru sistemele nanotransportor care încapsulează ambele tipuri de principii active.

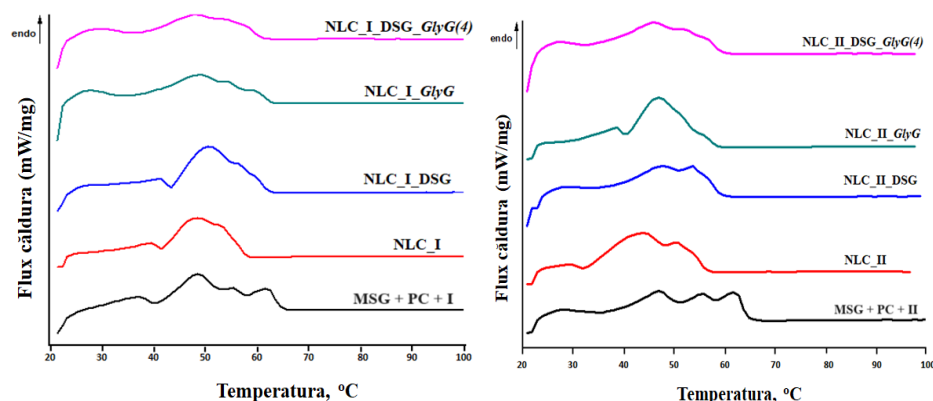


Figura 7. Profilul comparativ al analizei termice (obținut prin calorimetrie de scanare diferențială, DSC) pentru NLC_I/NLC_II, liberi și cei încărcăți cu un singur principiu activ, respectiv amestec de DSG și *GlyG*

6.1.5. Determinarea eficienței de încapsulare și a capacității de încărcare cu DSG și *GlyG*

Analiza de determinare a eficienței de încapsulare a dezvăluit abilitatea celor două tipuri de sisteme nanostructurate, sintetizate cu cele două tipuri de uleiuri vegetale, I și II, de a capta în cadrul aceluiași sistem nanotransportor, ambele categorii de compuși bioactivi, cu afinități distincte (față de miezul lipidic, DSG sau față de învelișul hidrofil, creat de surfactanți, *GlyG*). În urma determinărilor HPLC, în ciuda naturii hidrofile a *GlyG*, s-au obținut eficiențe de încapsulare/captare (EE%) foarte ridicate pentru acidul glicirizic, $EE_{(NLC_I_GlyG(4))} = 96.5\% \pm 0.57$, respectiv $EE_{NLC_II_GlyG(4)} = 95.8\% \pm 0.54$. În ceea ce privește eficiența de încapsulare a compusului lipofil, DSG, afinitatea acestuia pentru amestecul de lipide, în special pentru sistemele NLC obținute cu ulei de luminița nopții, este demonstrată de valorile determinate: $EE_{NLC_I_DSG} = 89.5 \pm 2.55\%$, respectiv $EE_{NLC_II_DSG} = 85.7 \pm 3.38\%$.

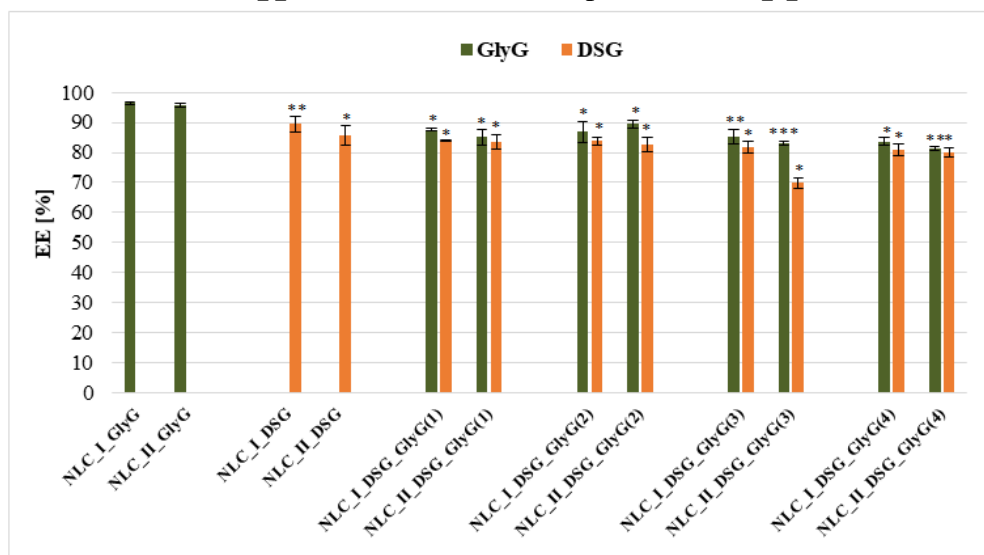


Figura 8. Valori ale eficienței de încapsulare/de captare a principiilor active (DSG și acid glicirizic) în NLC-urile preparate cu I și II.

6.2. Evaluarea potențialului terapeutic al NLC_I/II_DSG, respectiv NLC_I/II_DSG_GlyG(4)

6.2.1. Evaluarea *in vitro* a potențialului citotoxic (MTS și RTCA)

Tehnica MTS a constat în tratarea culturile celulare HUVEC pentru 24h, respectiv 48h cu concentrații crescătoare de NLC, în domeniul $3.125 \div 200 \mu\text{g/mL}$. Rezultatele obținute au evidențiat faptul că viabilitatea celulelor endoteliale HUVEC este dependentă de concentrația de NLC aplicată, o influență semnificativă fiind detectată la concentrații $> 100 \mu\text{g/mL}$. În urma primului tratament de 24h, viabilitatea celulară a depășit 65%, la concentrații $< 50 \mu\text{g/mL}$, cu mici excepții, fapt ce sugerează un efect citotoxic scăzut generat de tratamentul cu NLC_I/II_DSG_GlyG(4). Prelungirea tratamentului cu încă 24h a condus la o îmbunătățire a viabilității celulare, determinându-se valori $> 80\%$ în intervalul de concentrații $25 \div 50 \mu\text{g/mL}$. Acest aspect sugerează prezența unor fenomene de regenerare celulară, cele mai eficiente sisteme în termeni de viabilitate vs. citotoxicitate fiind NLC-urile duale; de exemplu, pentru NLC_II_DSG_GlyG(4), rata de supraviețuire a celulelor endoteliale HUVEC a fost de 81.9%.

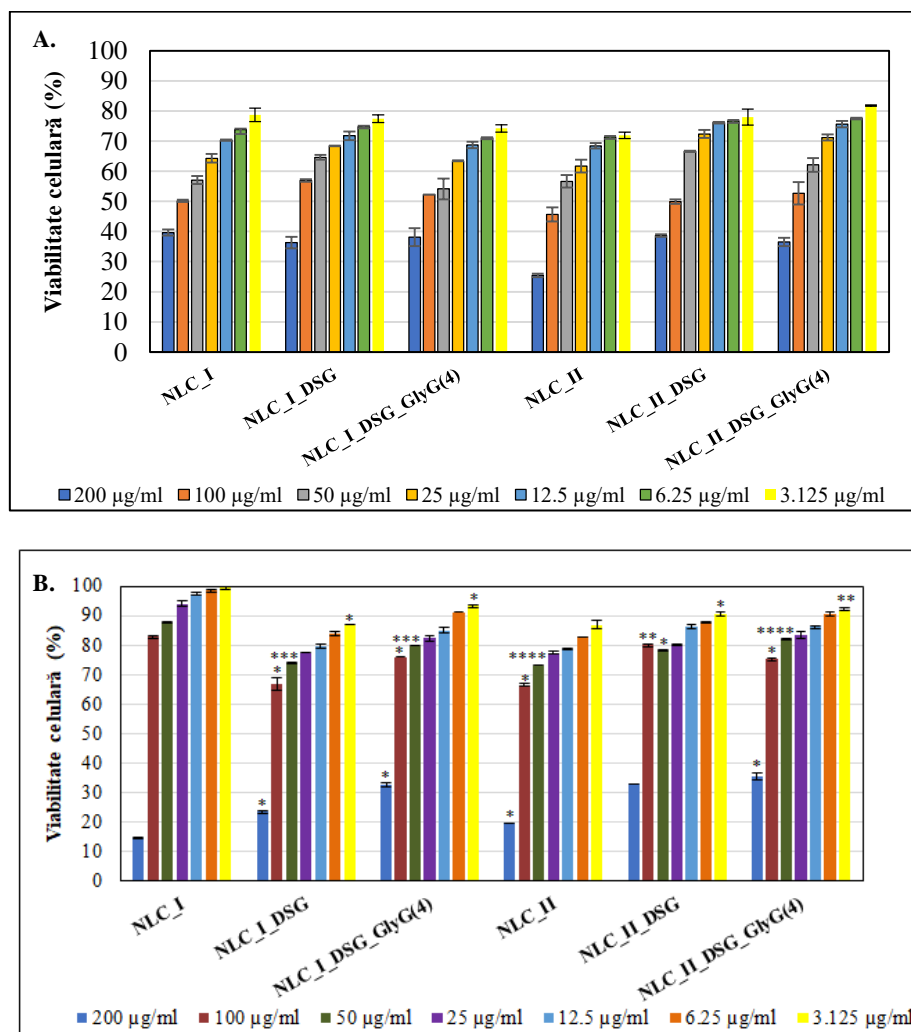


Figura 9. Evaluarea caracterului citotoxic al NLC-urilor obținute, asupra liniei celulare HUVEC, pe o perioadă de 24h (A), respectiv 48h (B);

Evoluția în timp real a proliferării vs. citotoxicitatea, generată în urma tratării cu diferite concentrații de NLC (liberi și încărcăți cu principii active, DSG și *GlyG*) a fost urmărită prin analiza RTCA, caracterizată prin măsurarea unui indice celular, în orice moment, care indică timpul de tratament cu concentrația de NLC care determină o viabilitate/citotoxicitate de 50% (IC₅₀). Folosirea acestei tehnici a servit la identificarea unui domeniu de concentrații sigur/non-citotoxic, cuprins în intervalul 25 ÷ 100 μg/mL. Valorile IC₅₀ caracteristice sistemelor mixte, NLC_I_DSG_*GlyG*(4)/NLC_II_DSG_*GlyG*(4) de 152.82 ± 2.14, respectiv 159.92 ± 1.61 μg/mL au punctat efectul citotoxic minim exercitat de acestea.

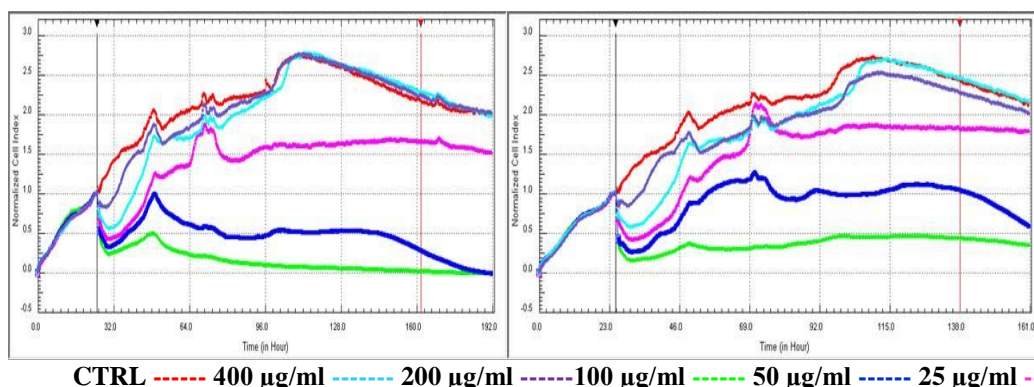


Figura 10. Acțiunea citotoxică vs. proliferativă indusă de tratamentul NLC_I/II, liberi și încărcăți cu DSG și *GlyG*, asupra celulelor endoteliale normale (analiza în timp real, RTCA)

6.2.2. Determinarea *in vitro* a activității antioxidante

În cazul utilizării analizei spectrofotometrice TEAC, ce vizează inhibarea radicalilor de viață lungă, pentru sistemele NLC_I/II_*GlyG*(4), o activitate de inhibare a radicalului cationic ABTS⁺ de 64.38% ± 0.47, respectiv 60% ± 0.87. De partea opusă se găsesc sistemele sintetizate cu ambele tipuri de uleiuri și diosgenină, NLC_I/II_DSG, care exercită o activitate inhibitorie modestă, de ~ 13.4%. Totuși, în ciuda acestui fapt, prin asocierea celor două principii active în cadrul aceluiași sistem de distribuție, se observă o îmbunătățire semnificativă prin comparație cu nanotransportorii liberi, NLC_I/II.

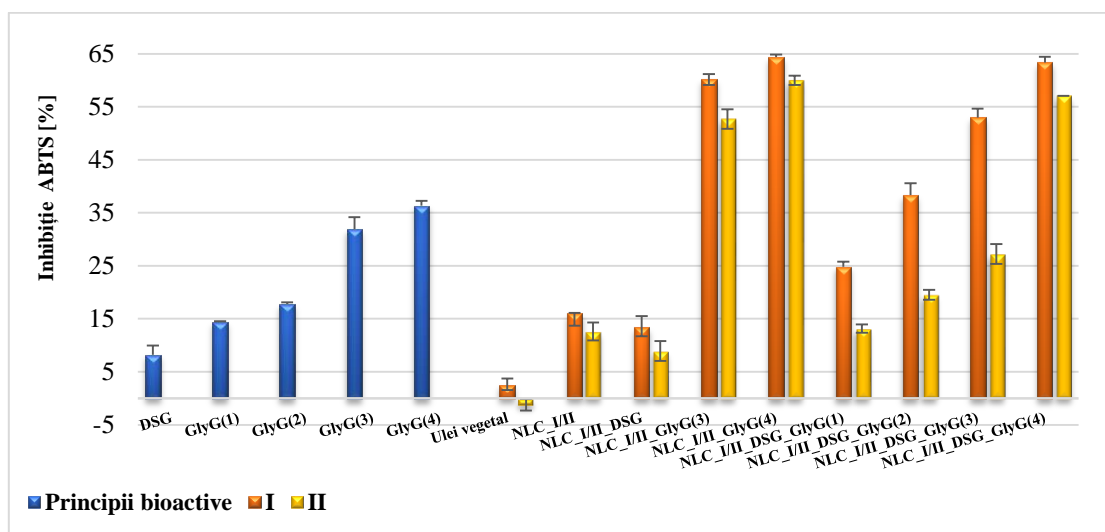


Figura 11. Variația capacității de inhibiție a radicalului ABTS⁺ de către sistemele NLC ce conțin un singur principiu activ (*GlyG* sau DSG) vs. cele care cooptează ambele principii active (*GlyG* și DSG);

Așa cum reiese din figura 12, deși captarea individuală a DSG, respectiv a *GlyG* în nanotransportori produce un efect antioxidant moderat, cooptarea simultană a acestora conduce la o creștere vizibilă a abilității de a capta radicalii liberi oxigenați, atingându-se valori de ~98%. Dacă pentru nanotransportorii liberi, NLC_I/II, valorile activității antioxidante au fost în jur de 59%, pentru NLC_I/II_DSG_ *GlyG*(2, 3, 4), intervalul de captare a radicalilor ROS a prezentat valori între 91 ÷ 96%.

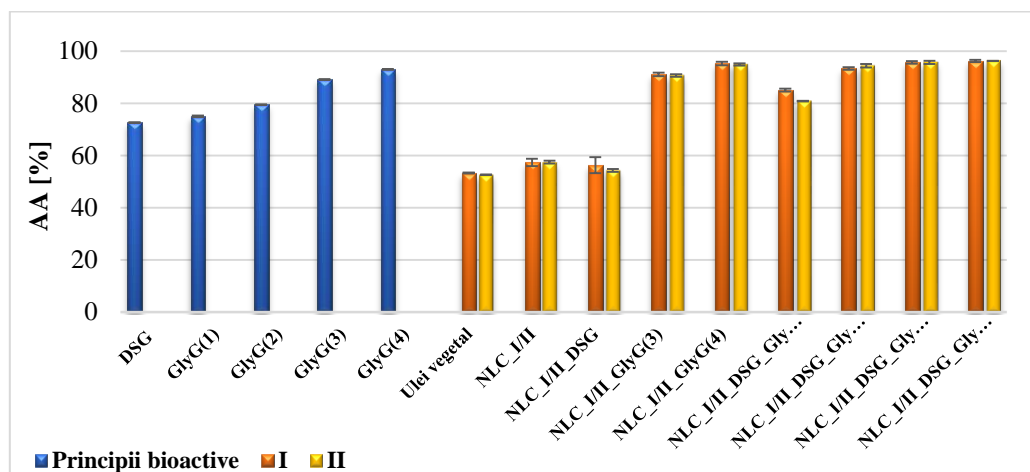


Figura 12. Activitatea antioxidantă in vitro a sistemelor nanostructurate, prin tehnica chemiluminiscenței;

6.2.3. Studii de eliberare *in vitro* a DSG și *GlyG* din sistemele lipidice nanostructurate

Rezultatele obținute prin studierea profilelor de eliberare a celor doi componenți bioactivi din nanotransportori au dezvăluit faptul că, pentru ambele categorii de nanotransportori cu conținut de *GlyG*, NLC_I/II_ *GlyG*(4), eliberarea acidului glicirizic s-a produs complet după 5h. Explicația rezidă în distribuția preferențială a fitocompușilor hidrofili din extract/*GlyG* la suprafața NLC. Diosgenina, deopotrivă, a manifestat un trend de eliberare mult mai lent, 50%, într-un interval de 5h, în condițiile în care eliberarea acidului glicirizic s-a realizat în procent maxim, în același interval. Eliberarea mai lentă a DSG din NLC este direct influențată de captarea DSG în nanocompartimentele din miezul nanosferelor lipidice și de solubilitatea scăzută față de mediul receptor.

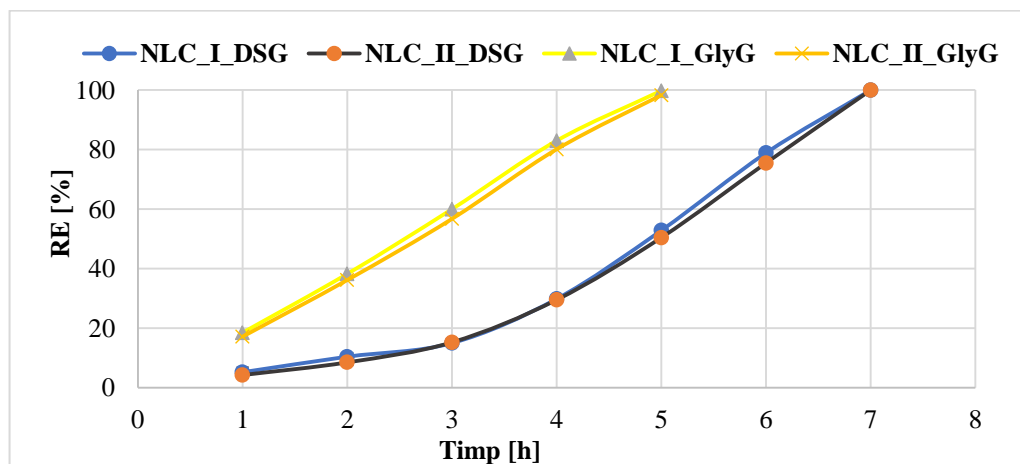


Figura 13. Profilul eliberării controlate a principiilor active din nanotransportorii individuali, NLC_I/II_DSG/*GlyG*(4) a celor două categorii de principii active, DSG și *GlyG*

În cazul sistemelor **NLC-duale**, *NLC_I/II_DSG_GlyG(4)*, se constată o eliberare mai lentă a ambilor componenți bioactivi lipofili și hidrofilii, ex. DSG în 8h, iar *GlyG* în 7h în *NLC_I_DSG_GlyG(4)*, Fig. 14.

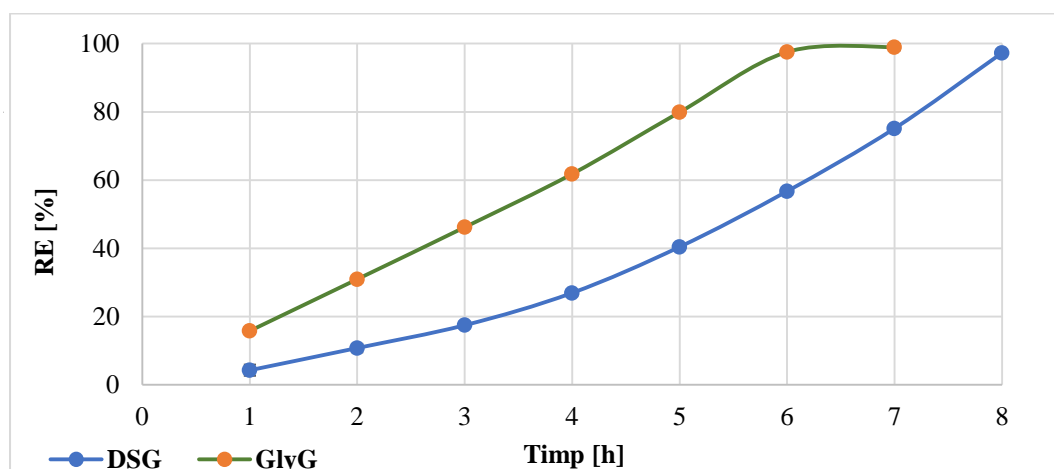


Figura 14. Profilul eliberării principiilor active din nanotransportorul mixt: *NLC_I_DSG_GlyG(4)*;

6.2.4. Testarea *in vitro* a activității antiinflamatorii

Rezultatele *in vitro* obținute în urma analizei ELISA, care evaluează expresia citokinelor proinflamatorii *TNF- α* și *IL-6*, după tratarea celulelor normale HUVEC cu cele două concentrații de NLC (50, 200 μ g/ml), a evidențiat apariția unui efect puternic antiinflamator, care a fost dependent atât de doza aplicată, cât și de tipul de principiu activ vegetal încapsulat în NLC. Tratamentele cu 200 μ g/ml NLC au dus la o scădere a nivelurilor markerilor inflamatori *TNF- α* și *IL-6*, comparativ cu doza de 50 μ g/ml, unde a fost înregistrată o creștere semnificativă a procentului de inhibare a ambelor categorii de citokine proinflamatorii eliberate în urma tratamentului.

Prin compararea efectului antiinflamator al NLC asupra eliberării citokinei *TNF- α* *versus* nivelul interleukinei 6 (*IL-6*), s-a detectat o diferență semnificativă între procentele de *IL-6* și *TNF- α* , mult mai eficientă fiind inhibarea eliberării *TNF- α* , aceasta având valori de peste 70% în cazul NLC încărcate cu principii duale.

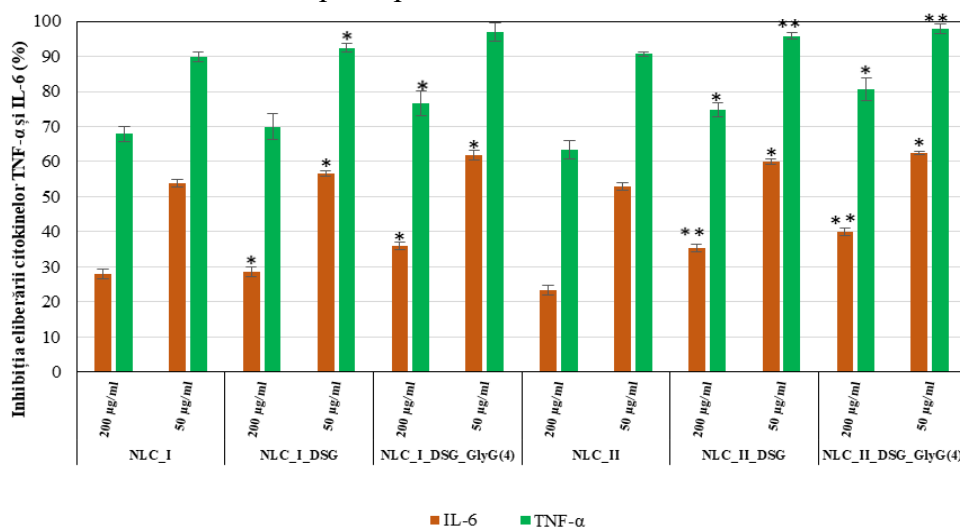


Figura 15. Evaluarea prin tehnica ELISA a efectului tratamentelor cu *NLC_DSG* și *NLC_DSG_GlyG* asupra eliberării citokinei *TNF- α* comparativ cu *IL-6*, de către celulele normale HUVEC

6.3. Concluzii parțiale

În urma studiilor efectuate în cadrul acestui capitol de experimetări, cercetări care au vizat asocierea diosgeninei și extractului de *Glycyrrhiza glabra*, cu cele două uleiuri vegetale, s-au obținut valori similare în cazul diametrului particulelor lipidice, pentru ambele categorii de nanotransportori NLC_I/II liberi.. În cazul celor încărcăți, cei cu *GlyG* au înregistrat valori ceva mai oportune. Stabilitatea fizică s-a dovedit net superioară în cazul nanotransportorilor cu ulei de luminița nopții, față de cei cu ulei de soia.

Distribuția preferențială a celor două principii bioactive a fost susținută de considerentele rezultate din calorimetria de scanare diferențială și din studiile de eliberare *in vitro* (DSG fiind captat în faza lipidică, în timp ce *GlyG* a prezentat afinitate pentru învelișul hidrofîl, generat de surfactanți). Analiza cromatografică a evidențiat abilitățile remarcabile ale nanotransportorilor lipidici de a capta ambele tipuri de principii vegetale, eficiența dovedindu-se mai mare de 80% pentru DSG, respectiv aproape de 90% pentru *GlyG*. Siguranța în utilizare și toxicitatea redusă au fost confirmate de tehnicile MTS și RTCA, domeniul de concentrații 25 ÷ 100 μg/mL dovedindu-se non-toxic în tratamentele efectuate asupra liniei celulare HUVEC.

Ambele categorii de nanotransportori co-încapsulați au dovedit abilități semnificative de anihilare/combateră a ambelor tipuri de radicali, cationici de viață lungă (ABTS^{•+}), 63.4% ABTS^{•+} și radicalii oxigenați de viață scurtă (ROS), AA% variind între 91 ÷ 96%.

Efectul antiinflamator al NLC dezvoltate a fost dependent de doză: tratamentele cu concentrațiile de 50 μg/mL determină o inhibare mai accentuată a eliberării citokinelor IL-6 și TNF-α, comparativ cu 200 μg/mL. Drept exemplificare, inhibarea **TNF-α**: 90.6% (NLC_II) *versus* 97.9% (NLC_II_DSG_*GlyG*(4)). Pentru interleukina **IL-6**, NLC_II a condus la o inhibare a acesteia de 52.8% spre deosebire de 62.5% în NLC_II_DSG_*GlyG*(4).

Capitolul 7. Provocări în cooptarea în cadrul aceleiași sistem lipidic nanostructurat a doi compuși bioactivi (lipofil și hidrofil), cu scopul creșterii biodisponibilității

În acest capitol se are în vedere obținerea unor sisteme lipidice nanotransportor, stabilizate cu un amestec de surfactanți, predominant ionic, în vederea unei integrări simultane și eficiente a saponinei steroidice, diosgenina (DSG) și a extractului de yam sălbatic (*Yam*) în miezul lipidic, dar și în învelișul hidrofil generat de amestecul de surfactanți, în vederea îmbunătățirii biodisponibilității *in vivo* a celor două principii active de origine vegetală.

7.1. Optimizarea sistemelor lipidice nanotransportor pentru cooptarea DSG și *Yam*

Etapa de optimizare a vizat prepararea unor compoziții variabile de surfactanți în vederea înclinării balanței spre un amestec de surfactanți preponderent ionic. În acest scop, s-a substituit unul din surfactanții utilizați în cadrul sistemului anterior, fosfatidilcolina (amfifil) cu un altul, colatul de sodiu (anionic). Alegerea variantei optime s-a realizat după evaluarea dimensională și cea a sarcinilor de suprafață în cazul a trei NLC-uri obținute prin operarea unor variații % între surfactanți/co-surfactant, anume: Colat de sodiu: Tween 20 : Poloxamer188: 50:35:15 (A); 70:20:10 (B); 80:15:5 (C), folosind ca ulei vegetal experimental-demonstrativ, uleiul de soia (2), păstrând procentul total de 2.5% amestec surfactat și co-surfactant, în compoziția formulării apoase.

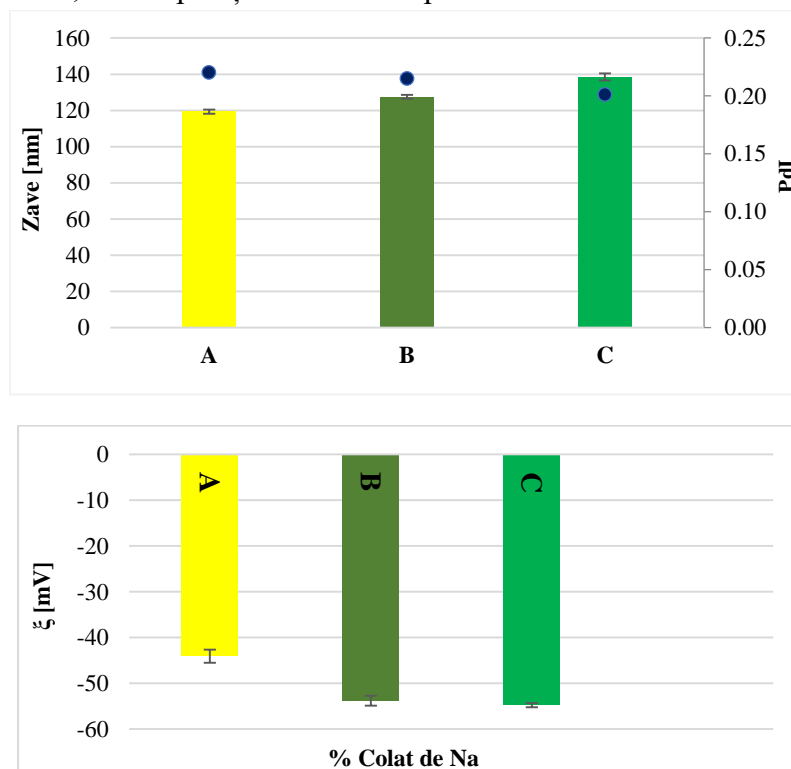


Figura 16. Variația dimensiunilor medii, a indicilor de polidispersitate (●) și a potențialelor electrocinetice corespunzătoare particulelor lipidice obținute prin varierea procentelor între Tw20: ColNa : Polx188

În această manieră, diametrele medii $120 \div 140$ nm, Pdl ~ 0.2 și potențialele electrocinetice variind între $-43 \div -55$ mV, au punctat superioritatea variantei A, 50:35:15 între Colat de sodiu: Tween 20: Poloxamer 188 pentru sinteza ulterioarelor sisteme reunite în tabelul 4.

Tabel 4. Compoziția nanotransportorilor sintetizați, în termeni de lipide, surfactanți și principii active, DSG și Yam, g

Nr. Crt.	Denumire formulări nanostructurate	Lipide (10%), g			Amestec surfactanți (2.5%), g			Principii bioactive, g	
		MSG	PC	(1)/(2)*	Polx 188	Tw20	ColNa	DSG	Yam
1.	NLC_1	3.5	3.5	3	0.375	0.875	1.25	-	-
2.	NLC_DSG_1							0.5	-
3.	NLC_Yam_1							-	0.5
4.	NLC_DSG_Yam_1							0.5	0.5
5.	NLC_2							-	-
6.	NLC_DSG_2							0.5	-
7.	NLC_Yam_2							-	0.5
6.	NLC_DSG_Yam_2							0.5	0.5

Notă: *(1)/(2) – sisteme nanotransportor obținute cu ulei de armurariu/ ulei de în

7.1.1. Stabilitatea în timp a dispersiilor coloidale lipidice. Analiza morfologică a sistemelor nanotransportor încărcate cu DSG și Yam

Măsurătorile care au vizat modificările înregistrate în evoluția particulelor lipidice, privind dimensiunea (Z_{ave}), indicii de polidispersitate (Pdl) și potențialul electrocinetic (ξ), au fost efectuate pe o perioadă de 2 luni. Ambele categorii de sisteme cu ulei de luminița noștii și ulei de soia au înregistrat valori ale diametrelor < 142 nm, cu o distribuție relativ îngustă a populației de lipide, 0.21 și 0.28 și valori ale potențialelor de suprafață în intervalul -40 mV \div -54 mV. Totuși, sistemele preparate cu ulei de soia (2) au dovedit o stabilitate fizică superioară celor cu ulei de luminița noștii (1).

Referitor la analiza morfologică, microscopia de transmisie electronică a dezvăluit formele sferice ale particulelor lipidice, cu diametre < 200 nm și la o magnitudine avansată, prezența unor nanosfere cu dimensiuni sub 5 nm, distribuite uniform și omogen. Aceste considerații sugerează o înglobare unitară a principiilor active în nanocompartimentele create în miezul lipidic de către uleiurile vegetale.

A. NLC_DSG_Yam_1, x150K



B. NLC_DSG_Yam_2, x800K

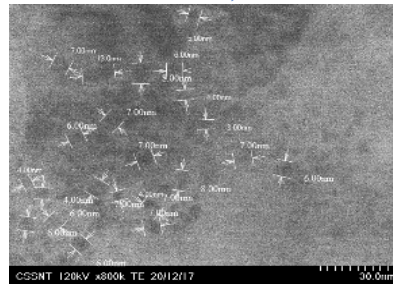


Figura 19. Analiza morfologică a sistemelor nanostructurate cu DSG și Yam, în cazul sistemelor mixte

7.2. Comportamentul termic al nanotransportorilor cu și fără principii vegetale, utilizând calorimetria de scanare diferențială

Conform curbelor endoterme, Fig. 20, cele două amestecuri de lipide pure prezintă 3 vârfuri endoterme 48°C, 55°C și 62°C, caracteristice lipidelor componente. Aceleași vârfuri endoterme prezente în amestecurile fizice au fost regăsite și în formulările NLC, sub forma unei plaje mai largi a intervalului de topire. Această extindere s-ar putea datora: *i.* modificărilor matricii lipidice generate de prezența celor 2 uleiuri vegetale care produc o alterare a structurii cristaline a MSG și PC; *ii.* dimensiunilor submicronice ale NLC_1 și NLC_2. Acest fenomen poate fi pus pe seama efectului Gibbs – Thompson conform căruia diametrul redus al particulelor atrage după sine o scădere a punctului de topire ca urmare a îmbunătățirii energiei libere de la suprafața particulei (Joudeh & Linke, 2022).

În sistemele duale, punctele de topire au înregistrat o scădere cu aprox. 1.5°C comparativ cu NLC-urile libere. De altfel, în cazul NLC_2 (Fig. 20) se observă o îngustare semnificativă a domeniului de topire, ceea ce sugerează o rețea lipidică mai ordonată, favorizată de prezența acizilor grași nesaturați din componența uleiului de soia. În cadrul aceluiasi sistem a fost semnalată o amplificare a gradului de cristalinitate atunci când se realizează captarea celor două principii active.

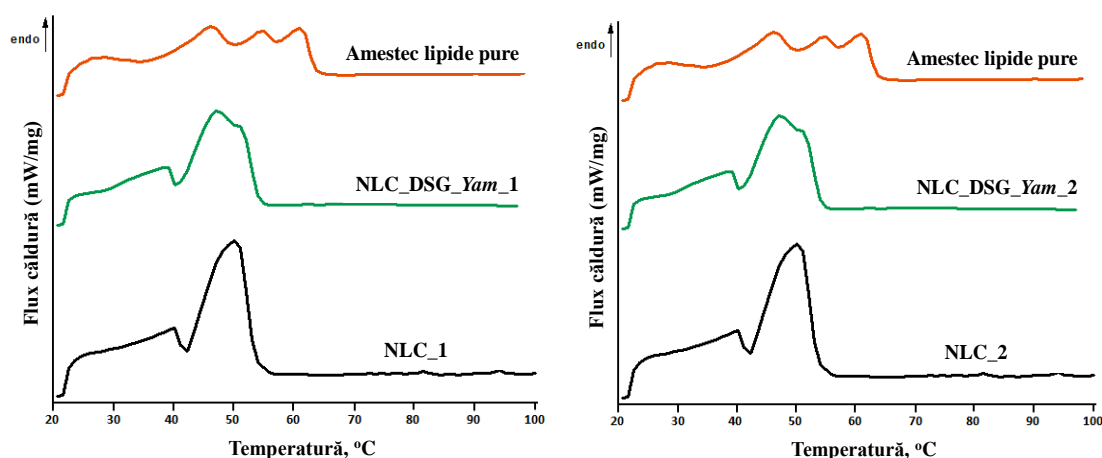


Figura 20. Comportamentul calorimetric (prin DSC) al nanotransportorilor lipidici ce cooptează cele două principii active (DSG și Yam), preparați cu ulei de luminița nopții/de soia, comparativ cu NLC_1/NLC_2

7.3. Determinarea eficienței de încapsulare a celor două principii vegetale, DSG și Yam

Eficiențele de încapsulare (EE%), > 80%, obținute pentru ambele tipuri de sisteme, NLC_1 și NLC_2 au subliniat compatibilitatea ridicată a amestecului de lipide, surfactanți/co-surfactant, cu principiile active selectate în cercetare. Modificarea balenței de la preponderent non-ionic la ionic a condus la o sporire a eficienței de încapsulare. Dacă pentru sistemele individuale, eficiențele de încapsulare pentru DSG și Yam, (Fig. 21) a subliniat valori mai ridicate de 83%, pentru sistemele mixte, NLC_DSG_Yam_1/2 ($EE_{Yam + DSG} = 84\% \pm 3.54$ în cazul NLC_DSG_Yam_1, respectiv $81.2\% \pm 3.93$ pentru NLC_DSG_Yam_2).

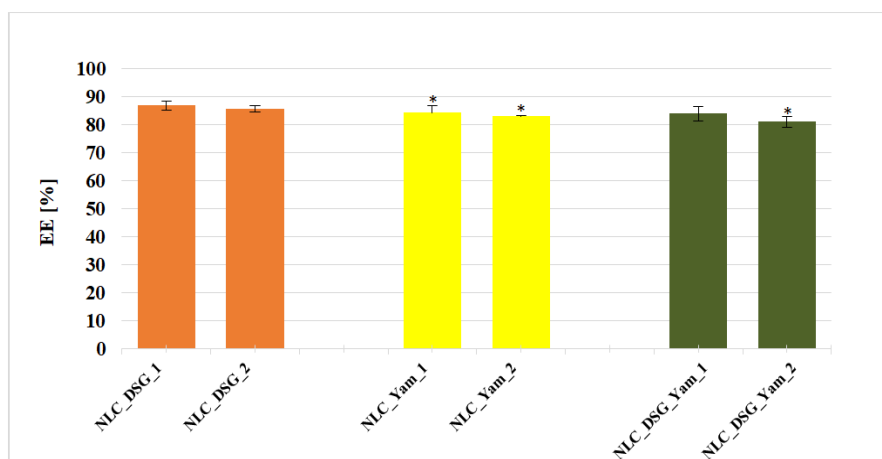
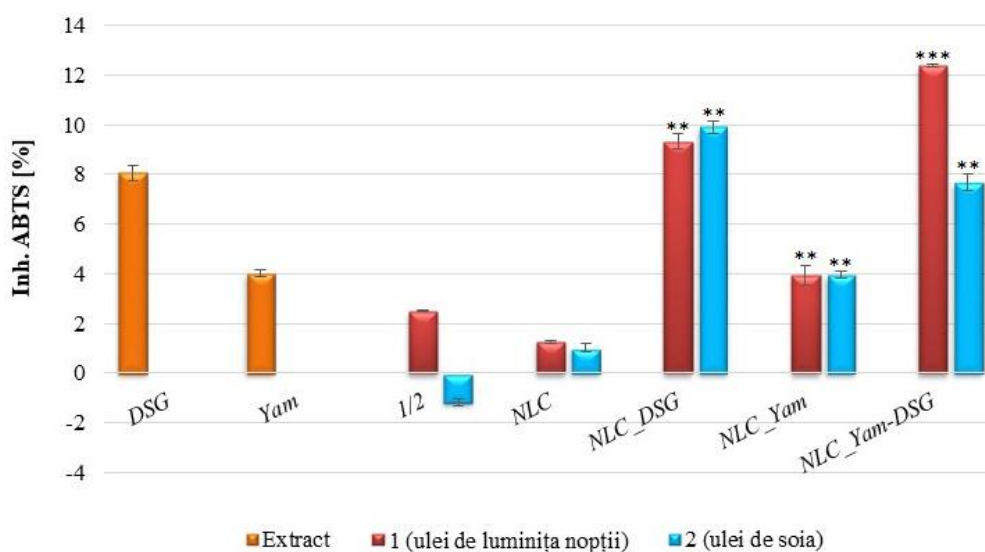


Figura 21. Valorile eficienței de încapsulare pentru sistemele individuale și mixte cu DSG și Yam

7.4. Analize *in vitro*, în vederea demonstrării proprietăților terapeutice deținute de sistemele NLC_DSG_Yam

7.4.1. Determinarea *in vitro* a activității antioxidante (analiza TEAC și metoda chemiluminiscenței)

Rezultatele experimentelor privind capacitatea sistemelor nanotransportor înglobând principii active individuale și duale (DSG și Yam) de a inhiba radicalii liberi, au punctat ca prim aspect o abilitate scăzută de inhibare a radicalilor cationici ABTS, valoarea maximă înregistrându-se pentru sistemul NLC_DSG_Yam_1, 12.4%. Nanoîncapsularea a determinat o sporire a acestei activități cu 1.5%, pentru toate categoriile de sisteme, Fig. 22. Prin comparație, capacitatea de captare a radicalilor liberi oxigenați s-a dovedit superioară, cu precădere în cazul sistemelor care cooptează simultan cele 2 principii active, valorile AA% variind între 82 ÷ 84% (ex. 82% ± 0.74 pentru NLC_DSG_Yam_2 și 84% ± 1.6 pentru NLC_DSG_Yam_1) (Iordache, T.-A., 2021).



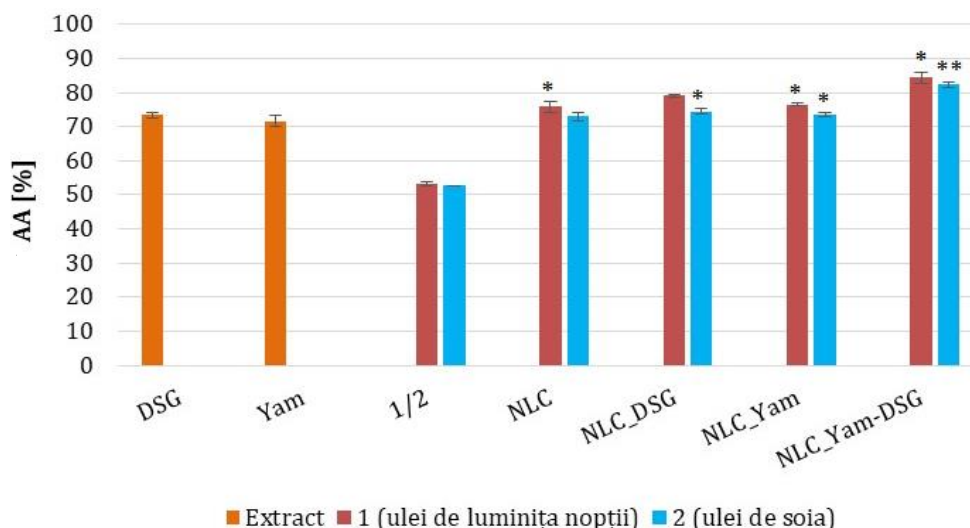


Figura 22. Evaluarea *in vitro* a activității antioxidante a NLC liberi și încărcăți cu principii active vegetale prin metodele TEAC și chemiluminiscentă

7.4.2. Evaluarea profilului de eliberare *in vitro* a DSG, din sistemele NLC care conțin DSG și extract de *Yam* sălbatic

Experimentele care au dorit să sublinieze comportamentul de eliberare al principiilor active cooptate în același sistem de distribuție, au punctat o diferență notabilă între profilul de eliberare al diosgeninei din sistemele individuale *vs.* cele duale. Astfel, în sistemele *NLC-individuale* s-a determinat un procent ridicat de diosgenină eliberată încă de la prima oră (ex: 10.86 % în sistemul *NLC_DSG_1* și 8.12% în sistemul *NLC_DSG_2*), față de cele care conțin ambele principii active unde eliberarea a înregistrat un trend susținut, pe parcursul celor 24h de studiu. În urma studiului, procentele cumulative au dezvăluit valori ridicate pentru DSG, 88.02 ± 1.68 % (*NLC_DSG_Yam_1*) și $85.5 \pm 0.3\%$ (*NLC_DSG_Yam_2*) (Iordache, T.-A., 2021)..

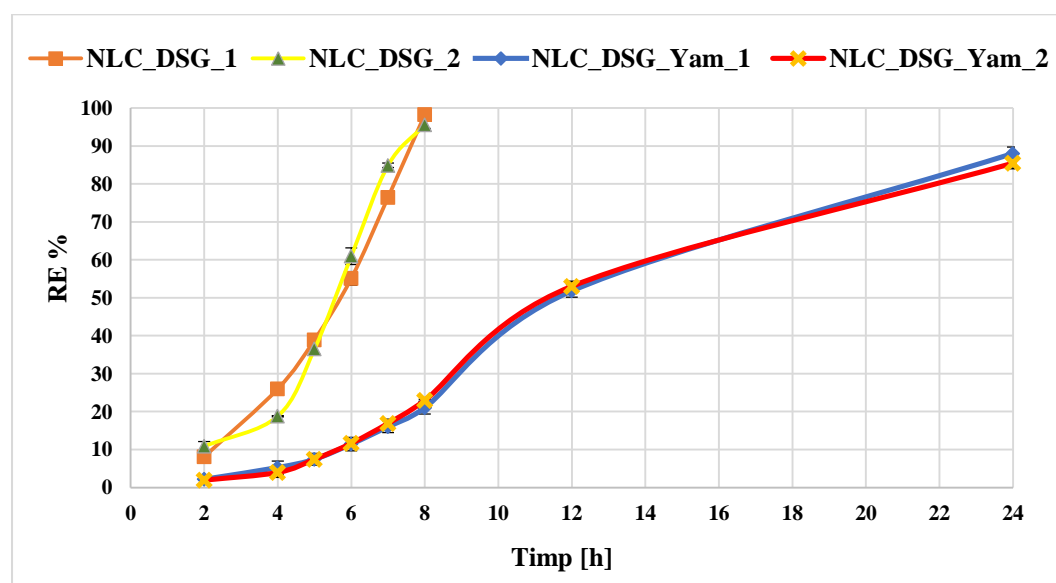


Figura 23. Profilele de eliberare ale DSG din sistemele individuale și duale (ce conțin DSG, *Yam*, respectiv DSG și *Yam*)

7.4.3. Evaluarea in vitro a citotoxicității sistemelor NLC

Viabilitatea celulelor endoteliale HUVEC a fost studiată inițial prin analiza spectrofotometrică MTS.

Tratamentul celulelor HUVEC cu concentrații cuprinse între 3 și 50 $\mu\text{g/mL}$ asigură o viabilitate celulară care se menține la valori $> 70\%$. Aceste rezultate indică un efect de citotoxicitate scăzut al sistemului NLC_DSG_Yam. Prin continuarea tratamentului cu încă 24h, viabilitatea celulară a înregistrat o sporire, valori $> 85\%$ în intervalul de concentrații 50 ÷ 3.125 $\mu\text{g/mL}$, pentru sistemul NLC_DSG_Yam_2. Creșterea procentului de supraviețuire al celulelor endoteliale la un tratament prelungit ar putea fi atribuit proliferării celulare, rezultat al toxicității reduse a NLC, astfel sistemul NLC_DSG_Yam_2 putând fi clasificat ca non-toxic pentru celulele normale endoteliale.

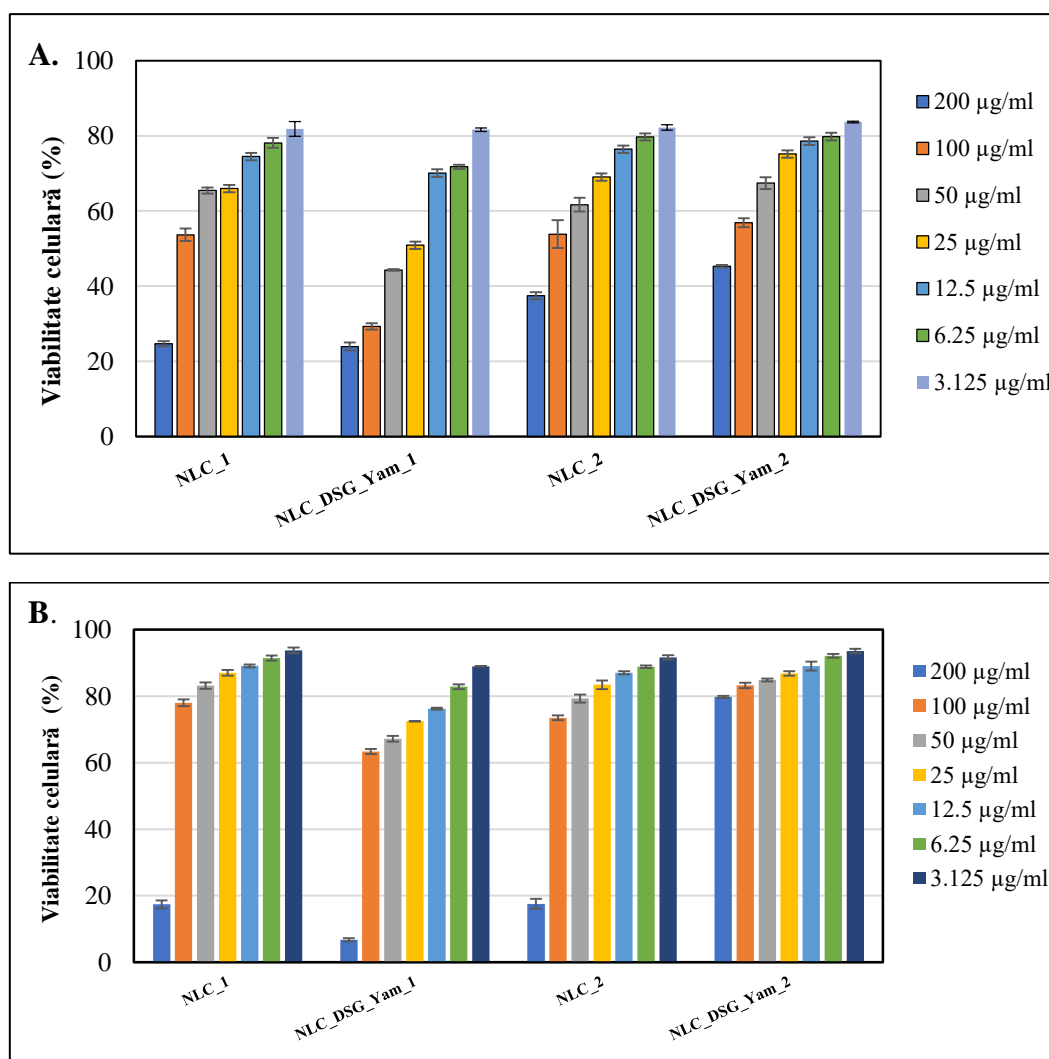


Figura 43. Efectul NLC_DSG_Yam asupra viabilității celulelor normale HUVEC timp de 24h (A) și 48h (B).

Rezultatele obținute pe baza testului RTCA pe celulele endoteliale HUVEC susțin datele din analiza MTS. În urma evaluării citotoxicității vs. proliferării celulelor endoteliale HUVEC, tratate cu concentrații diferite de NLC, de la 200 $\mu\text{g/ml}$ până la 25 $\mu\text{g/ml}$, se observă că la concentrații mari, 200 $\mu\text{g/ml}$, viabilitatea scade semnificativ, fapt ce indică o creștere a

citotoxicității compușilor NLC, la concentrațiile respective, Fig. 25. În schimb, la concentrații mai mici de 100 $\mu\text{g/ml}$, viabilitatea celulară este crescută, comparabilă cu a celulelor netratate (control, curbă roșie). Utilizarea concentrațiilor de 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ NLC, cu câteva excepții, permit obținerea de valori comparabile cu cele ale celulelor netratate, fapt ce indică o lipsă a efectelor citotoxice (Iordache, T.-A., 2021).

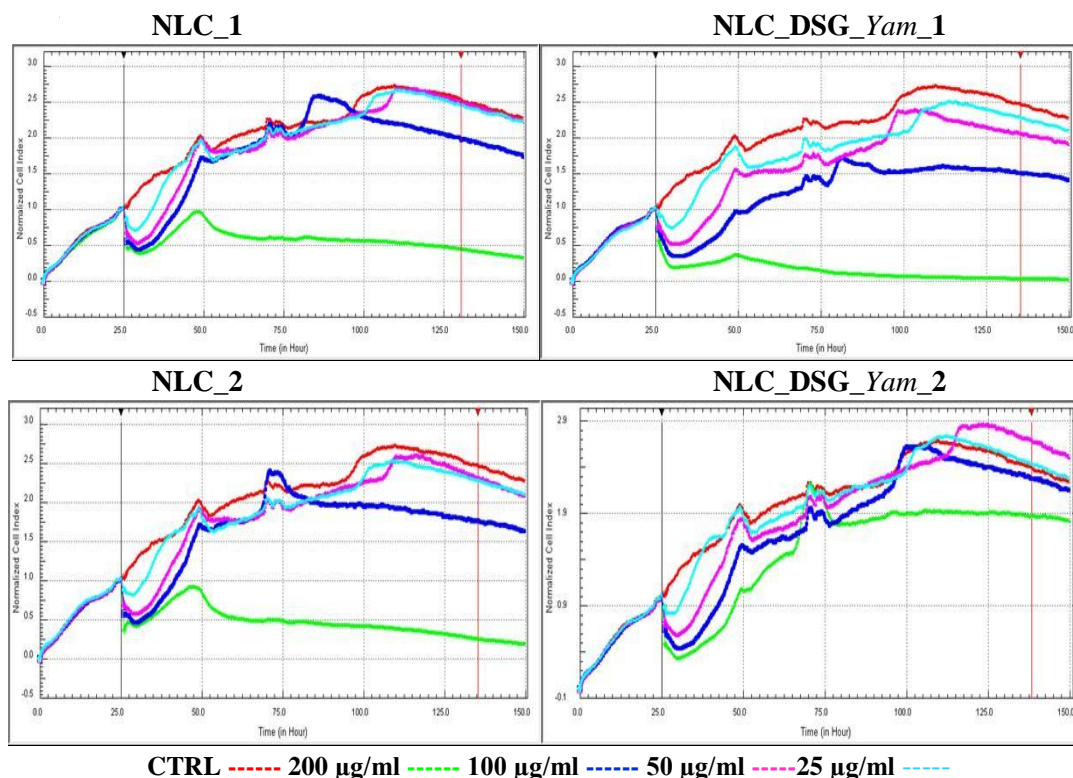


Figura 25. Acțiunea citotoxică vs. proliferativă indusă de sistemele NLC_1/2 libere și NLC_DSG_Yam_1/2 asupra celulelor normale HUVEC

7.4.4. Determinarea in vitro a acțiunii antiinflamatorii a sistemelor NLC

Atribuirea existenței efectului antiinflamator potențial al sistemelor de tip NLC_DSG_Yam s-a realizat prin cuantificarea producției citokinelor IL-6 și TNF- α . S-a observat că prin tratarea celulelor HUVEC cu diferite concentrații de NLC, producția de citokine proinflamatorii TNF- α și IL-6 este puternic inhibată, doza de 50 $\mu\text{g/ml}$ de NLC fiind superioară celei de 200 $\mu\text{g/ml}$, Fig. 26. Această considerație poate fi explicată prin rezultatele tehnicilor MTS și RTCA care au punctat citotoxicitatea ridicată la concentrații ridicate. Dozele ridicate, 200 $\mu\text{g/ml}$ produc o denaturare a celulelor care prezintă o influență directă asupra citokinelor proinflamatorii.

Un alt aspect vizibil este inhibarea mai pronunțată a TNF- α , comparativ cu IL-6, toate NLC analizate prezentând o inhibare a TNF- α mai mare de 80%, la o concentrație de 50 $\mu\text{g/ml}$. În plus, prin compararea celor două tipuri de NLC care conțin ulei de luminița nopții/ 1 sau ulei de soia/ 2, s-a putut observa că inhibarea celor două citokine este mai accentuată în cazul NLC_2, decât în cazul NLC_1. Totuși, cel mai relevant exemplu este inhibarea citokinelor produsă de sistemele dule, NLC_DSG_Yam_1/2, care produc un procent inhibitoriu de 98.2% \pm 1.07 a TNF- α (NLC_DSG_Yam_2), respectiv 90.42% \pm 1.17 (NLC_DSG_Yam_1).

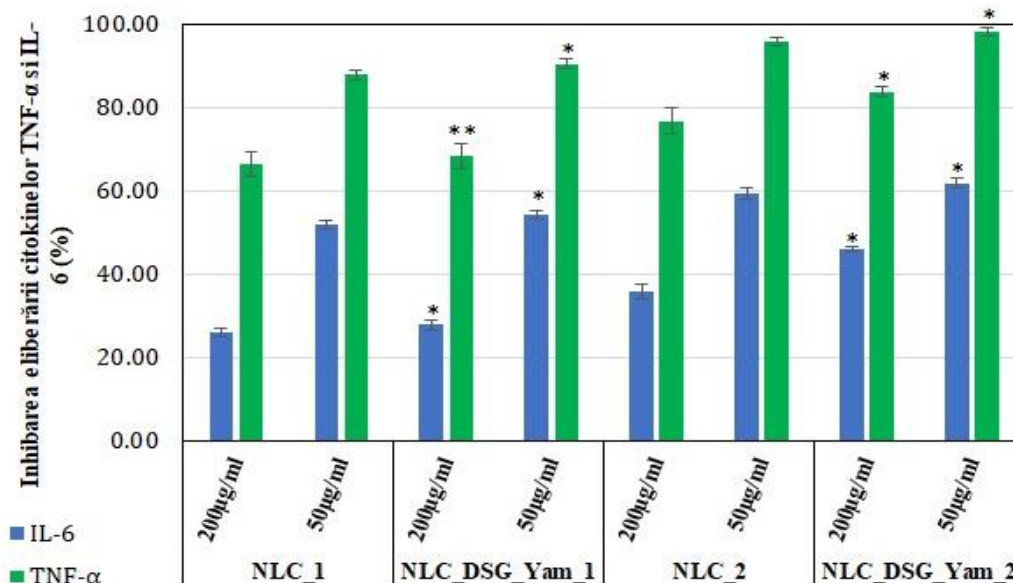


Figura 26. Evaluarea prin tehnica ELISA a efectului tratamentelor cu sisteme nanotransportor de tip **NLC_DSG** și **NLC_DSG_Yam** asupra eliberării citokinelor proinflamatorii TNF- α și IL-6, de către celulele normale HUVEC.

7.5. Concluzii parțiale

Prin utilizarea unui amestec de 2.5% surfactanți, preponderent ionic, aflați într-un raport compozițional de 50% *ColNa*: 35% *Tw20*: 15% *Polx 188*, sistemele nanotransportor **NLC_DSG_Yam_1** și **NLC_DSG_Yam_2**, au înregistrat eficiențe ridicate de încapsulare pentru DSG, o stabilitate fizică oportună, prin prisma valorilor potențialelor electrocinetice, > -35 mV.

În al doilea rând, deși aceste sisteme nanotransportor posedă o abilitate modestă de captare a radicalilor de viață lungă, ABTS⁺ (valoarea maximă de inhibare fiind de doar 12.4%), în ceea ce privește inhibarea radicalilor liberi de tip ROS (generați prin chemiluminiscentă), această capacitate este semnificativ îmbunătățită (ex. $AA_{NLC_DSG_Yam_1/2} = 82 \div 84\%$).

Aspectele legate de siguranța NLC-urilor obținute, monitorizate prin teste *in vitro* MTS și RTCA, au demonstrat că la concentrații mai mici de 50 $\mu\text{g/mL}$, nu apar efecte citotoxice.

În cazul sistemelor **NLC_DSG_Yam_1/2**, s-a remarcat apariția unui trend de eliberare controlat, mult mai lent comparativ cu **NLC_DSG**, care s-a prelungit pe o perioadă de 24h de studiu.

Referitor la efectul antiinflamator al **NLC_DSG_Yam**, se poate puncta faptul că acesta a fost dependent de doza aplicată celulelor endoteliale. Tratamentele cu concentrații de 50 $\mu\text{g/mL}$ au determinat o inhibare mai accentuată a eliberării citokinelor IL-6 și TNF- α , mai degrabă decât cea de 200 $\mu\text{g/mL}$. Captarea simultană a principiilor naturale în cadrul aceluiași nanotransportor a condus la obținerea unui efect antiinflamator amplificat, mult mai accentuat la inhibarea TNF- α : 95.9% (pentru **NLC_2**) *versus* 98.2% (pentru **NLC_DSG_Yam_2**).

8. Influența cooptării *Polygonum cuspidatum* alături de DSG în NLC, asupra proprietăților antioxidante și a efectului antiinflamator

Cercetările integrate în acest capitol au avut ca scop prepararea și caracterizarea unor sisteme nanostructurate care integrează DSG și extract de *Polygonum cuspidatum* (*PCus*), alături de monitorizarea sinergiei extractului de *Polygonum cuspidatum* în prezența DSG, pentru potențialul dublu, antiinflamator și antioxidant.

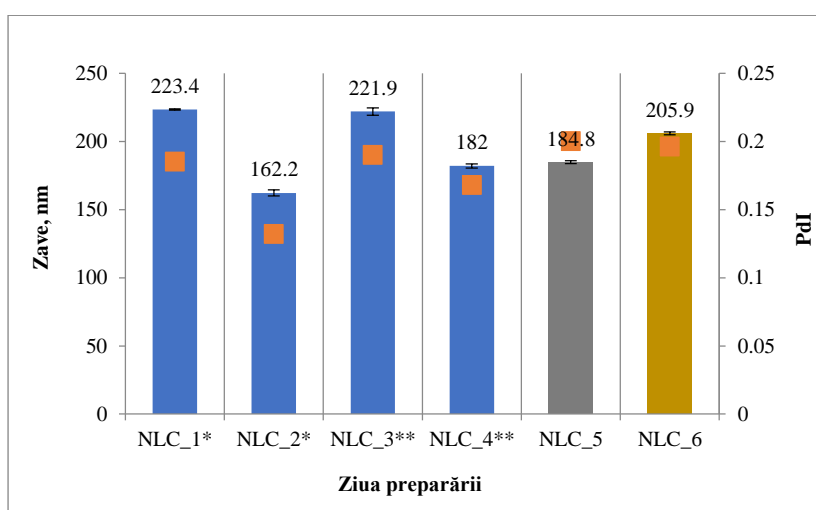
8.1. Eficientizarea compoziției sistemelor nanostructurate

Necesitatea asigurării unei complementarități superioare între amestecul de surfactanți, cel de lipide și principiile active de încapsulat au condus la realizarea diferitelor variante experimentale care au permis alegerea compoziției ideale. Astfel, s-a folosit un sistem de surfactanți (Tween 20 și Span 80, în asociere cu Fosfatidilcolina sau Poloxamer 188), în asociere cu un amestec lipidic, monostearat de gliceril, unt de cacao și ulei de armurariu (UAr), care a condus la obținerea sistemelor nanostructurate, caracterizate dimensional și din punct de vedere al potențialului electrocinetic.

Tabel 5. Compoziția nanotransportorilor liberi obținuți cu ulei de armurariu

Nr. crt.	Denumire nanotransportori lipidici	Lipide solide, 10g			Surfactanți, 2.5%			
		MSG	Unt cacao	UAr	Tw20	Sp80	Fosf	Polx188
1	NLC_1*	4	3	3	1.25	1.25	0	0
2	NLC_2*				1.7	0.8	0	0
3	NLC_3**				1.25	1.25	0	0
4	NLC_4**				1.7	0.8	0	0
5	NLC_5				1.59	0.72	0.19	0
6	NLC_6				1.59	0.72	0	0.19

Notă: * Sp80 a fost adăugat în faza apoasă; **Sp80 a fost adăugat în faza lipidică.



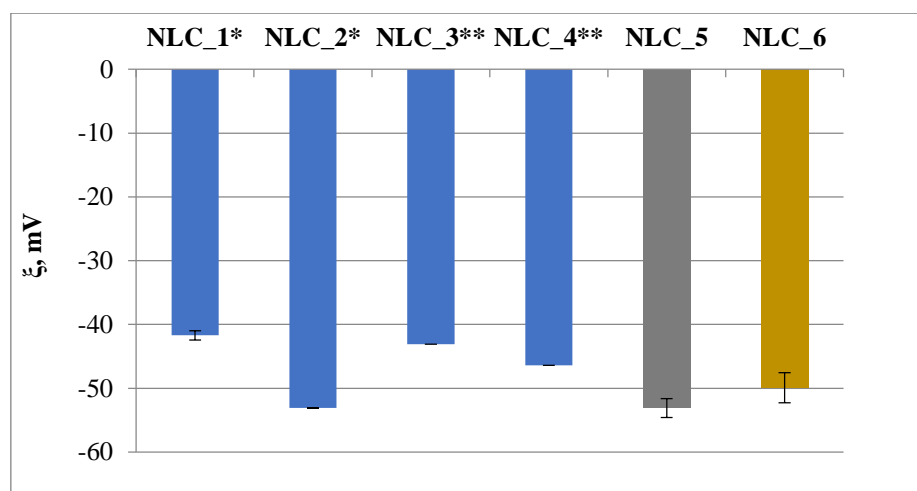


Figura 27. Analiza comparativă privind diametrele medii, indicii de polidispersitate (■) și potențialele electrocinetice ale categoriilor de NLC preparați utilizând matrici lipidice de MSG, unt cacao și UAr (analiza DLS)

În urma analizei comparative, sistemul NLC_2 a condus la obținerea unor valori optime în termeni de $Z_{ave} = 162.2 \pm 2.196$ nm, $PdI = 0.132 \pm 0.015$ și $\xi = -53.1 \pm 0.01$ mV.

Ulterior a fost efectuată și o variație pe baza celui de-al doilea ulei vegetal, cel de in. Variația compozițională pentru probele realizate cu ajutorul uleiului de in a avut în vedere influența co-polimerului, poloxamer 188, respectiv a lecitinei pulbere, asupra dimensiunii și stabilității formulărilor NLC. Analiza dimensională realizată în decurs de 7 zile a subliniat faptul că cele mai oportune valori s-au regăsit în cadrul variantei NLC_7: $Z_{ave} = 146.2 \pm 0.15$ nm, $PdI = 0.148 \pm 0.013$ și $\xi = -43.7 \pm 1.35$ mV.

Tabel 6. Compoziția nanotransportorilor liberi obținuți cu ulei de in

Nr. Crt.	Denumire nanotransportori lipidici	Lipide solide, 10g			Surfactanți, 2.5%			
		MSG	Unt cacao	UIn	Tw20	Sp80	Lecitină pulbere	Polx188
1.	NLC_7	4	3	3	1.70	0.80	0	0
2.	NLC_8				1.75	0.65	0.1	0
3.	NLC_9				1.75	0.65	0	0.1

8.2. Prepararea și caracterizarea morfo-structurală a NLC ce conțin DSG, PCus, respectiv amestec de principii vegetale

Utilizând compoziția optimă determinată în cadrul capitolului anterior, s-au sintetizat 8 categorii de nanotransportori, regăsite în tabelul 7.

Tabel 7. Compoziția detaliată a probelor individuale/mixte cu DSG și PCus

Denumire formulări nanostructurate	Ingrediente formulări nanostructurate						
	Lipide, g (10%)			Surfactanți, g (2.5%)		Principii vegetale active, g	
	MSG	Unt de cacao	UAr/UIn	Tw20	Sp80	DSG, g	PCus, g
<i>Nanotransportori cu ulei de armurariu</i>							
NLC_UAr						-	-
NLC_DSG_UAr	3.5	3.5	3	1.7	0.8	0.5	-
NLC_PCus_UAr						-	0.2
NLC_DSG_PCus_UAr						0.5	0.2
<i>Nanotransportori cu ulei de in</i>							
NLC_UIn						-	-
NLC_DSG_UIn	3.5	3.5	3	1.7	0.8	0.5	-
NLC_PCus_UIn						-	0.2
NLC_DSG_PCus_UIn						0.5	0.2

Nanotransportorii lipidici preparați cu cele două uleiuri au prezentat diametre medii în domeniul 150 ÷ 220 nm, fiind semnalate scăderi semnificative în cazul sistemelor NLC formulate cu ulei de in. Acest aspect se poate datora diferenței de vâscozitate dintre cele două uleiuri sau poate fi explicat prin concentrația variată în acizi grași nesaturați, corespunzătoare celor două uleiuri vegetale care pot genera o rearanjare internă a cozilor hidrofobe din componența miezului lipidic.

În termeni de potențiale zeta, atât pentru sistemele NLC în care au fost încapsulate DSG, PCus, respectiv cele care cooptează ambele categorii de principii bioactive, valorile se situează între -46.5 mV și -64.2 mV. Valorile puternic electronegative ale potențialului electrocinetic demonstrează existența unor fenomene de repulsie electrostatice între particulele lipidice aflate în suspensie apoasă, situație favorabilă pentru prevenirea fenomenelor de coagulare și floculare a nanotransportorilor lipidici încărcăți cu principiile active vegetale selectate. Existența sarcinilor multiple pot fi urmare a distribuției acizilor grași liberi (din componența amestecului de lipide) la interfața ulei/apă prin expunerea grupărilor carboxil la suprafața nanotransportorului.

Tabel 8. Parametrii dimensionali, Z_{ave} , PDI și de stabilitate fizică, determinați pentru cele 8 probe libere, individuale și mixte

Nr. Crt.	Denumire nanotransportori (liberi și încărcăți cu principii vegetale)	$Z_{ave} \pm stdev$, nm	PDI $\pm stdev$	$\xi \pm stdev$, mV
1.	NLC_UAr	170.1 \pm 2.969	0.153 \pm 0.026	-46.5 \pm 0.400
2.	NLC_DSG_UAr	207.1 \pm 3.400	0.169 \pm 0.003	-47.8 \pm 0.850
3.	NLC_PCus_UAr	184.2 \pm 2.718	0.219 \pm 0.004	-64.2 \pm 0.720
4.	NLC_DSG_PCus_UAr	218.2 \pm 0.888	0.114 \pm 0.016	-54.8 \pm 1.000
5.	NLC_UIn	150.5 \pm 2.193	0.144 \pm 0.004	-48.0 \pm 1.600
6.	NLC_DSG_UIn	200.5 \pm 1.715	0.171 \pm 0.013	-47.9 \pm 0.960
7.	NLC_PCus_UIn	164.3 \pm 1.873	0.183 \pm 0.014	-55.4 \pm 2.210
8.	NLC_DSG_PCus_UIn	193.9 \pm 2.951	0.152 \pm 0.019	-52.8 \pm 2.150

Analiza morfologică (Fig. 28) realizată pe NLC-duali a evidențiat prezența nanotransportorilor cu o morfologie sferică, cu diametre ale sferelor cuprinse între 100 și 250 nm, fără aglomerări de particule. Aceste diametre confirmă rezultatele experimentale obținute prin analiza dimensiunii particulelor, DLS.

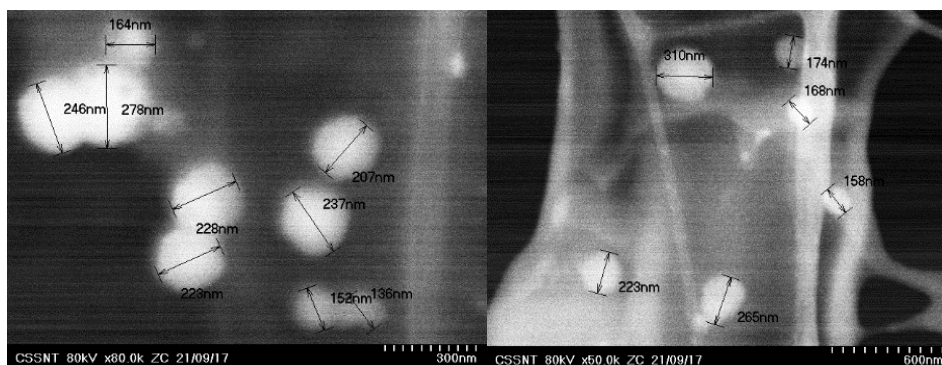


Figura 28. Analiza morfologică a sistemelor duale conținând DSG și PCus, împreună cu ulei de in (stânga) sau ulei de armurariu (dreapta)

8.3. Modificări structurale în NLC_UAr și NLC_UIn, în urma încorporării de principii active vegetale

Procesul de topire al lipidelor, parte din cele două miezuri lipidice ale NLC (preparate cu UIn și UAr) se petrece într-un domeniu endoterm, corespunzător intervalului de temperatură, $60 \div 67$ °C, Fig. 29. Potrivit literaturii, MSG prezintă un interval de topire ce variază de la 57 la 65 °C, în timp ce untul de cacao deține un vârf endoterm în jurul valorii de 36°C. Untul de cacao, așa cum se cunoaște, prezintă 6 stări polimorfe diferite, astfel că un al doilea pic vizibil în intervalul între $28 \div 31.9$ °C poate semnala cea de-a 5-a formă a acestuia (Joshi, 2020). Același vârf se regăsește și în formulările nanostructurate, însă, într-un domeniu de topire mult mai larg. Aceste modificări pot avea drept justificare pe lângă influența compozițională a untului de cacao, formarea unei structuri interne, imperfecte, prin asocierea cu cele două uleiuri.

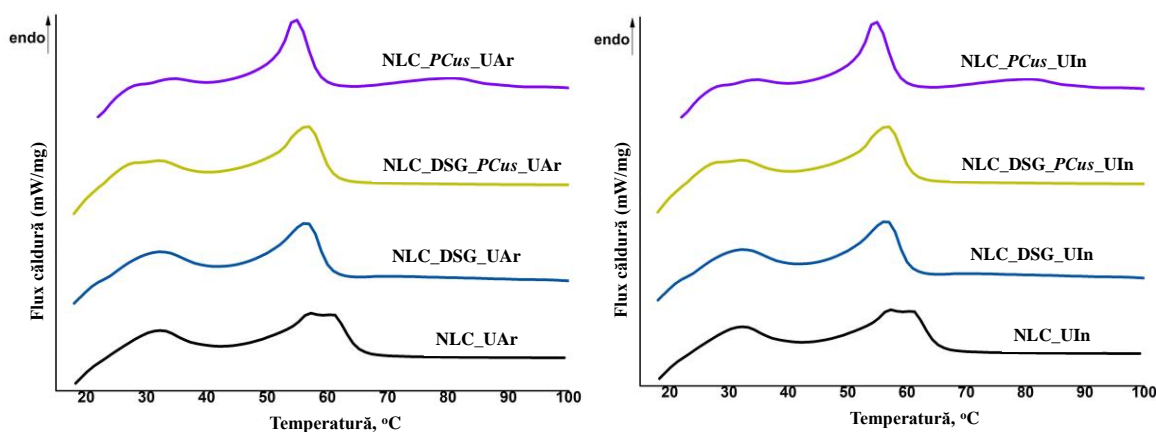


Figura 29. Analiza DSC a NLC individuale și duale, preparate cu UAr (stânga), respectiv cu UIn (dreapta)

NLC încărcat cu DSG și PCus a condus la o scădere a punctului de topire (semnalizată în DSC de vârfuri situate între 55 și 60 °C). Lipidele fizice (MSG, unt de cacao și UIn sau UAr) au prezentat temperaturi de topire de 63.8°C și respectiv 62.7°C, în timp ce NLC-duale au înregistrat puncte de topire de 57°C, respectiv 56°C în NLC_DSG_PCus_UAr și NLC_DSG_PCus_UIn. Scăderea punctului de topire, corelată cu scăderea diametrelor particulelor lipidice este larg dezbătută în literatură, ex. Gokce și colab. atunci când au preparat SLN-resveratrol (Gokce, 2012). Lipidele aduse la scară nanometrică au un punct de topire sub temperatura de topire a lipidelor fizice (de exemplu, o scădere a p.t. cu aprox. 1-

5°C), datorită raportului mai mare dintre suprafața specifică și volumul particulelor cu o dimensiune mai mică (Joudeh & Linke, 2022).

8.4. Eficiența de încapsulare a celor 2 principii bioactive asociate în nanotransportori lipidici, individuali și duali

Rezultatele determinărilor cantitative efectuate prin HPLC și UV-Vis au evidențiat afinitatea mai mare a diosgeninei pentru amestecul de lipide format din cele două lipide solide cu ulei de in, ex: $EE_{NLC_DSG_UIn} = 91.64\% \pm 0.30$, față de $EE_{NLC_DSG_UAr} = 86.6\% \pm 2.50$). O posibilă explicație poate fi atribuită solubilității mai bune a DSG lipofil în uleiul din semințe de in. Referitor la captarea *PCus*, s-a putut observa o influență a uleiurilor utilizate asupra % eficienței de încapsulare (ex: $64.10\% \pm 1.50$ (*NLC_PCus_UIn*) *versus* $73.00\% \pm 1.30$ (*NLC_PCus_UAr*)).

Tabel 9. EE% determinată în cazul sistemelor individuale și mixte cu DSG și *PCus*

Nr.Crt.	Denumire formulări nanostructurate	Principii active încapsulate, % ± stdev	
		<i>PCus</i>	DSG
1.	NLC_DSG_UAr	0	86.59 ± 2.50
2.	NLC_DSG_UIn	0	91.64 ± 0.31
3.	NLC_PCus_UAr	73.0 ± 1.30	0
4.	NLC_PCus_UIn	64.1 ± 1.50	0
5.	NLC_DSG_PCus_UAr	63.3 ± 3.71	80.98 ± 0.15
6.	NLC_DSG_PCus_UIn	56.6 ± 1.21	86.98 ± 1.10

8.5. Studii *in vitro* de eliberare susținută a DSG și a *PCus* din NLC_DSG, NLC_PCus, respectiv NLC_DSG_PCus

Studiile eliberării *in vitro*, efectuate prin metoda sacilor de dializă, au punctat distribuția distinctă a celor două principii active, în structura nanotransportorului lipidic. Acest considerent se aplică atât în cazul sistemelor mixte, Fig. 30A, cât și a celor individuale, Fig. 30B. Astfel, compusul hidrofil, *PCus* prezintă un profil de eliberare mult mai rapid, comparativ cu principiul lipofil, DSG. Începând chiar din prima oră a studiului eliberării, s-au determinat procente de 15.3%, respectiv 17.7% resveratrol din *NLC_PCus*, eliberarea maximă (în procente cumulative), atingându-se după 5h. Explicația rezidă în prezența *PCus* în stratul de surfactant, cu care formează legături slabe (legături de hidrogen). La diosgenină, în schimb, captarea fermă a acesteia în nanocompartimentele miezului lipidic și solubilitatea scăzută în mediul receptor justifică profilul mai lent de eliberare, maximul înregistrat fiind la 7h.

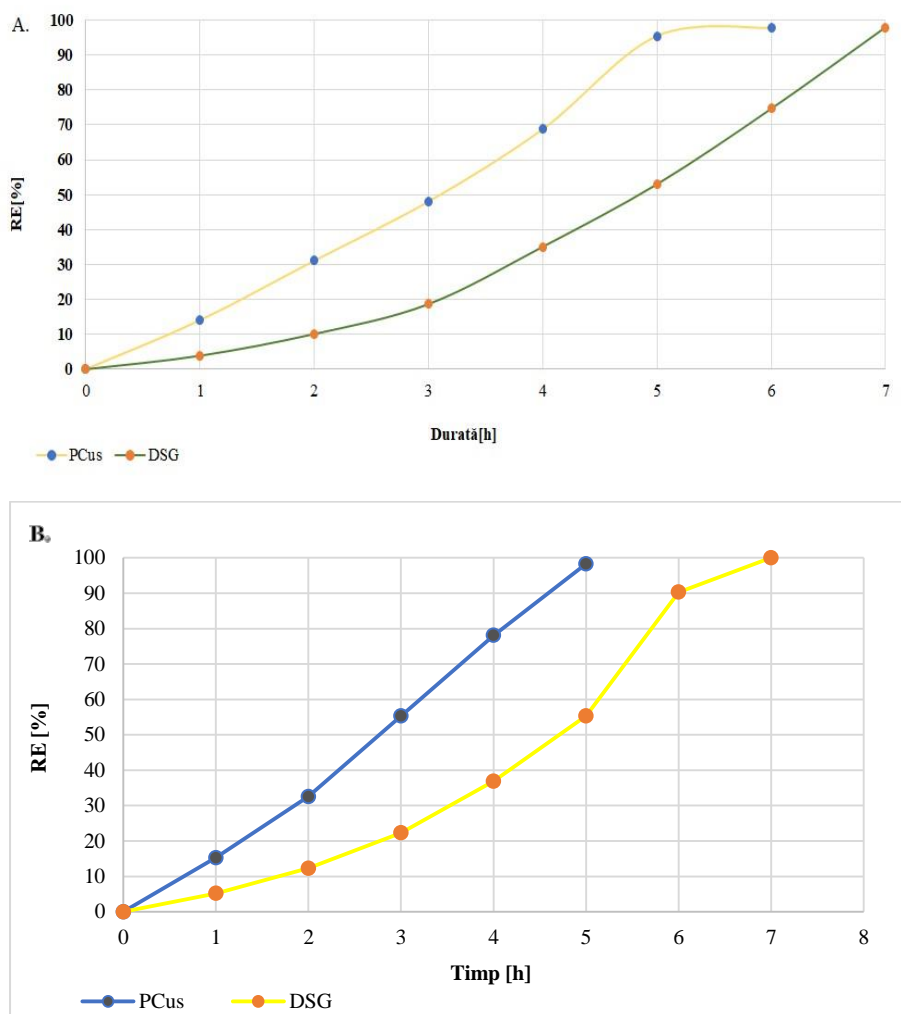


Figura 30. Eliberarea susținută a celor două principii vegetale co-încapsulate în nanotransportorii micști, A. NLC_DSG_PCus_UAr; B. NLC_DSG/PCus_UAr

8.6. Studii *in vitro* pentru determinarea activității antioxidante

Sistemele nanostructurate de tip NLC_DSG, obținute în cadrul acestui capitol, au dovedit o activitate inhibitorie a radicalilor de viață lungă de tip, $ABTS^{+}$, modestă, manifestând o acțiune de contracarare a acestora cuprinsă în intervalul $13 \div 16\%$. Pe de altă parte, sistemele care au încapsulat PCus, în abordare individuală/mixtă, au prezentat o capacitate net superioară de a capta radicalii cationici, valorile acestora fiind cuprinse între 74.5 și 77.9%, Fig. 31. Aceste valori pot fi explicate prin compoziția bogată într-o serie de alți fitocompuși cu proprietăți antioxidante, din cadrul extractului de PCus. În ceea ce privește capacitatea de înlăturare a radicalilor liberi oxigenți generați în sistemul chemiluminiscent, activitatea antioxidantă a fost amplificată în cazul sistemelor individuale cu PCus (ex. $AA_{NLC_PCus_UAr} = 95.65 \pm 0.7\%$, respectiv $AA_{NLC_PCus_UIn} = 97.44 \pm 0.58\%$). În cazul sistemelor cu diosgenină, nu au fost detectate îmbunătățiri prin nanoîncapsulare, semn că aceasta nu are efect în stoparea radicalilor liberi.

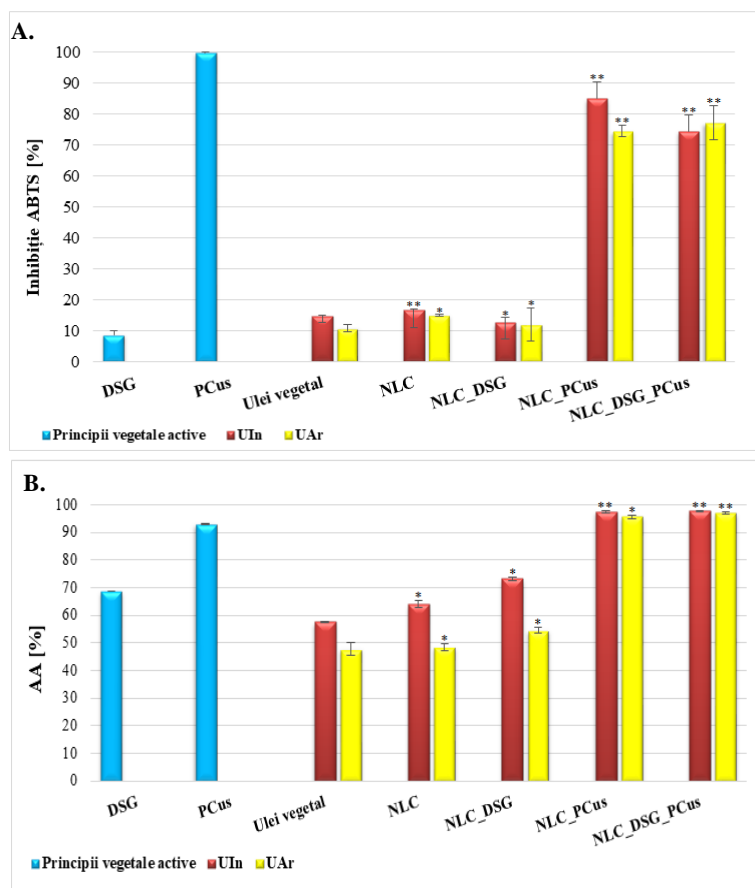
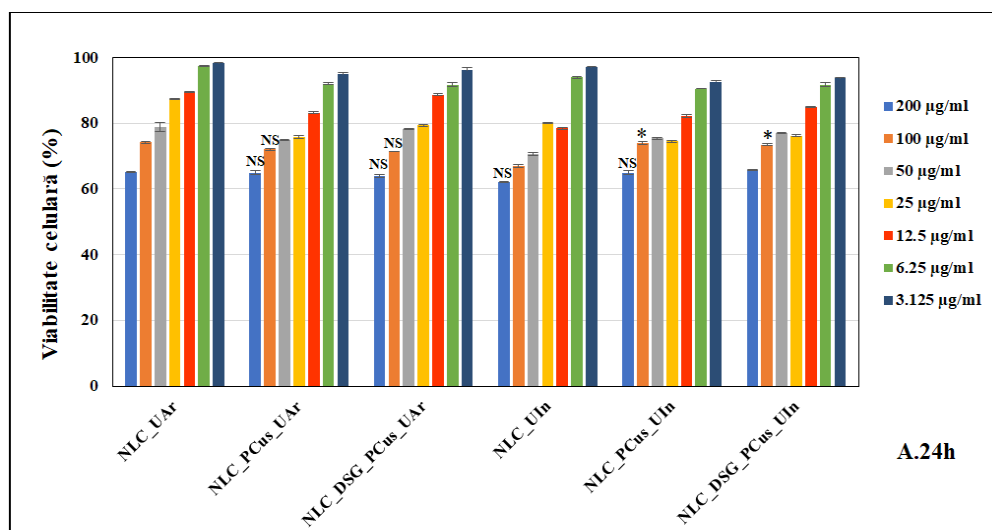


Figura 31. Determinarea capacității de captare a radicalilor de viață lungă, de tip ABTS⁺ de către NLC_libre, NLC_individuale și NLC_mixte (metoda TEAC, A) și înlăturare a radicalilor de viață scurtă prin chemiluminiscentă, B

8.7. Testarea *in vitro* a citotoxicității nanosistemelor individuale și duale

La fel ca în cazul sistemelor precedente, rezultatele MTS au relevat că prin utilizarea unor concentrații cuprinse între 3,125 și 50 μg/mL NLC-fitochimice, viabilitatea celulară a fost menținută la valori ridicate, între 70.6 și 98.3% pentru un tratament de 24h, respectiv 72.1 și 96.7% , corespunzătoare unui tratament de 48h, Fig. 32.



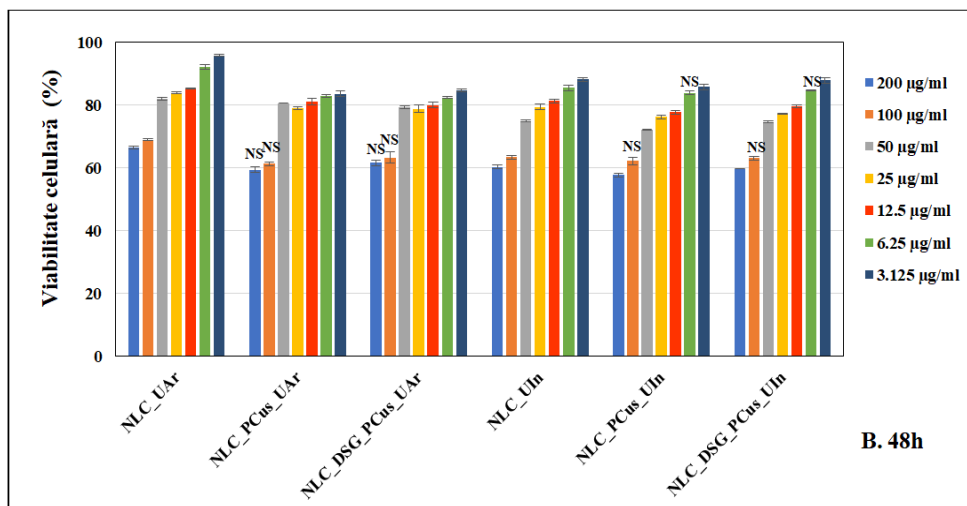


Figura 32. Efectele sistemelor individuale și duale asupra viabilității celulelor normale EA.hy926 după (A. 24h), respectiv (B. 48h)

Testul RTCA care vizează compararea în timp real a capacității proliferative vs. citotoxicității NLC_PCus și NLC_DSG_PCus, a punctat că la concentrații mari, 400 µg/mL și în unele cazuri, 200 µg/mL, viabilitatea scade semnificativ, indicând o creștere a citotoxicității, Fig. 33. În schimb, concentrațiile mai mici de 100 µg/mL asigură un procent de viabilitate celulară comparabil cu cel al celulelor netratate (martor). Acest ultim aspect demonstrează siguranța concentrațiilor cuprinse între 25 și 100 µg/mL NLC.

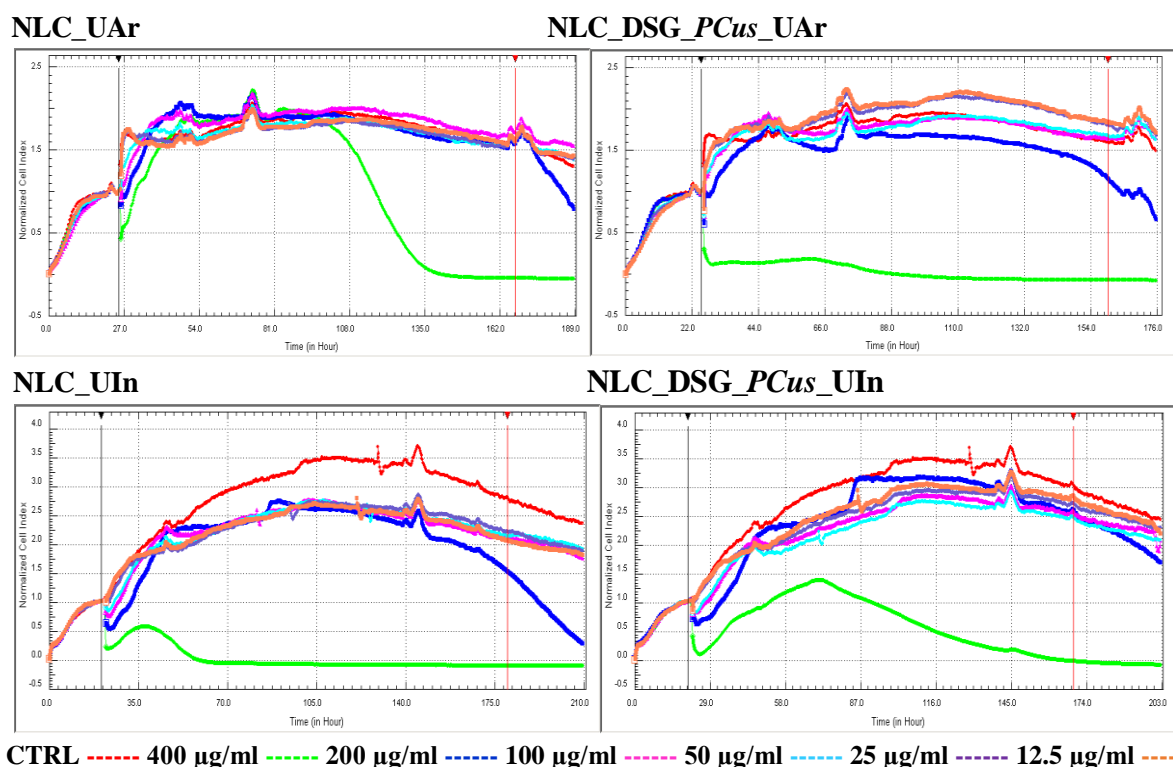


Figura 33. Rezultatele acțiunii proliferative vs. citotoxice induse de nanotransportorii goi și micșți (NLC_UAr/UIn și NLC_DSG_PCus_UAr/UIn)

8.8. Determinarea efectului antiinflamator pentru sistemele NLC-individuale și duale (ce conțin DSG, PCus și amestec de principii vegetale)

Activitatea antiinflamatoare a sistemelor NLC cu conținut de DSG și PCus, în termeni de inhibare a IL-6 și TNF- α a punctat la concentrații de 50 $\mu\text{g/mL}$ o inhibiție a IL-6 de până la 94.9% pentru sistemele cu ulei de armurariu și 94.6% pentru cele cu ulei de in (tratament de 24h) (Iordache T., 2023).

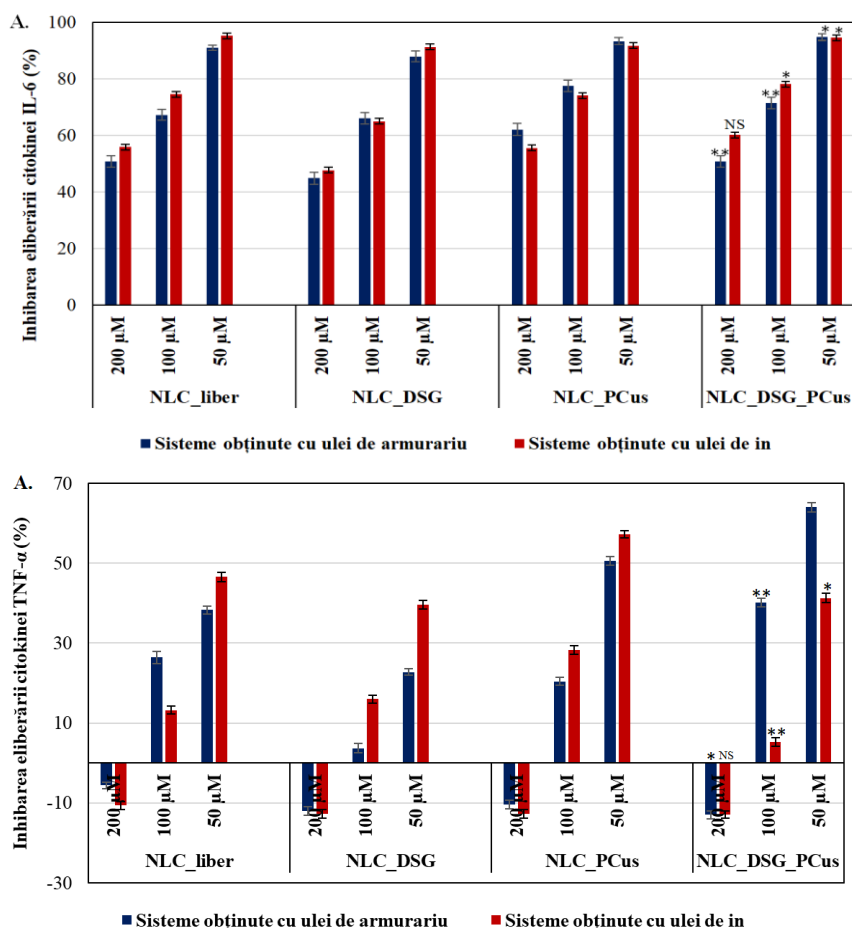


Figura 34. Evaluarea inhibiției citokinelor proinflamatorii IL-6 și TNF- α , după efectuarea tratamentului timp de pentru 24h

Referitor la inhibiția celei de-a doua citokine proinflamatorii, prin compararea NLC-individuale și a celor duale, se punctează eficiența celor ce captează ambele tipuri de principii vegetale (ex. NLC_DSG_PCus_UAr a înregistrat o inhibiție de 73% a TNF- α sau 40% pentru NLC_DSG_PCus_UIn după 24h, Fig. 34).

8.9. Concluzii parțiale

Nanoparticulele lipidice obținute în cadrul prezentului capitol au înregistrat morfologii sferice, cu dimensiuni cuprinse între 100 și 250 nm, cu o distribuție uniformă și restrânsă a populației de lipide (PdI \sim 0.15), stabilitate competitivă ($>$ -46.5 mV) și eficiențe de încapsulare de: 65% pentru PCus și 87% pentru DSG.

Testele de citotoxicitate (MTS și RTCA) au dovedit efectul non-toxic al NLC_DSG_PCus_UAr asupra celulelor liniei EA.hy926 și o activitate antioxidantă sporită în captarea speciilor reactive de oxigen, > 97% pentru NLC_PCus și NLC_DSG_PCus și o abilitate de anihilare de 74.5 ÷ 77.9% a radicalilor ABTS^{•+}.

Conform analizei ELISA, evaluarea tratamentelor cu sistemele NLC_duale, cu DSG și PCus, au reliefat un grad foarte ridicat de inhibare a citokinelor proinflamatorii, IL-6, cuprins între 91.9 și 94.9%. În ceea ce privește inhibarea TNF- α , în acest caz, s-a înregistrat o creștere semnificativă a acesteia prin utilizarea NLC cu ambele principii vegetale.

9. Proprietăți funcționale superioare rezultate prin asocierea Diosgeninei și a extractului de *Cimicifuga racemosa* în nanotransportori lipidici

Caracterizarea dimensională, structurală și evoluția eficacității terapeutice a unor nanotransportori lipidici ce încapsulează alte două categorii de nutraceutice – extract de *Cimicifuga racemosa*, *CymR* (cohosh negru, standardizat în 2.5% glicozide triterpenice) și DSG, constituie obiectivul acestui capitol.

9.2. Caracterizarea dimensională și morfologică a sistemelor nanotransportor individuale și duale

Caracterizarea dimensională și a stabilității fizice a sistemelor conținând diosgenină și extract de *CymR* a evidențiat dimensiuni ale particulelor lipidice cuprinse între 150 și 210 nm. Indicii de polidispersitate, cu valori < 0.17 , au întărit ideea existenței unor populații lipidice relativ monodisperse și omogene. Ca și valori ale potențialul electrocinetic, acestea variază între -43.2 ± 1.67 mV și -56 ± 1.53 mV, Fig. 33a.

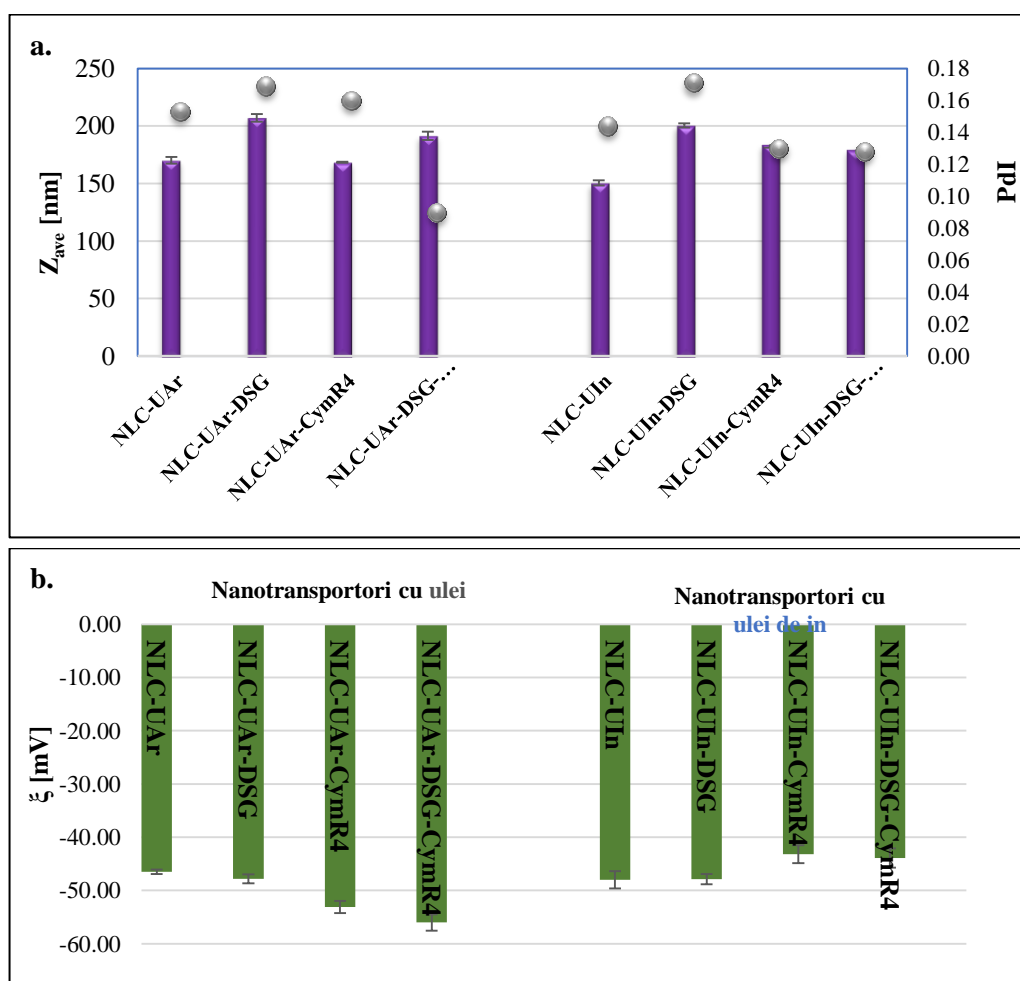


Figura 35. Variația diametrelor medii, a indicilor de polidispersitate (PDI), *a* și a potențialelor zeta, *b*, în funcție de tipul de principiu vegetal încapsulat

9.4. Modificări structurale ale NLC după captarea principiilor active vegetale, observate prin analiza calorimetrică de scanare diferențială

Rezultatele obținute prin studiul comportamentului NLC-urilor supuse unui regim de tratament termic controlat au subliniat o compatibilitate ridicată între lipidele selecționate pentru sinteză, amestecul de surfactanți, implicați în stabilizarea miezului lipidic, respectiv cele două extracte. Picurile evidențiate în graficele prezentate în Fig. 36 sugerează prezența lipidelor, atât a celor solide, cât și a acizilor grași componenți ai uleiurilor vegetale. În nanotransportorii micști, se poate nota prezența aceluiași vârf, însă deviat către valori mai scăzute de temperatură, ca urmare a prezenței celor două principii vegetale și modificărilor interne ale miezului lipidic apărute prin captarea compusului lipofil. În schimb, la sistemele individuale cu *CymR*, vârful prezintă un profil mult îngustat cauză a reținerii acestuia în învelișul de surfactanți, ceea ce conduce la o nealterare a structurii miezului lipidic.

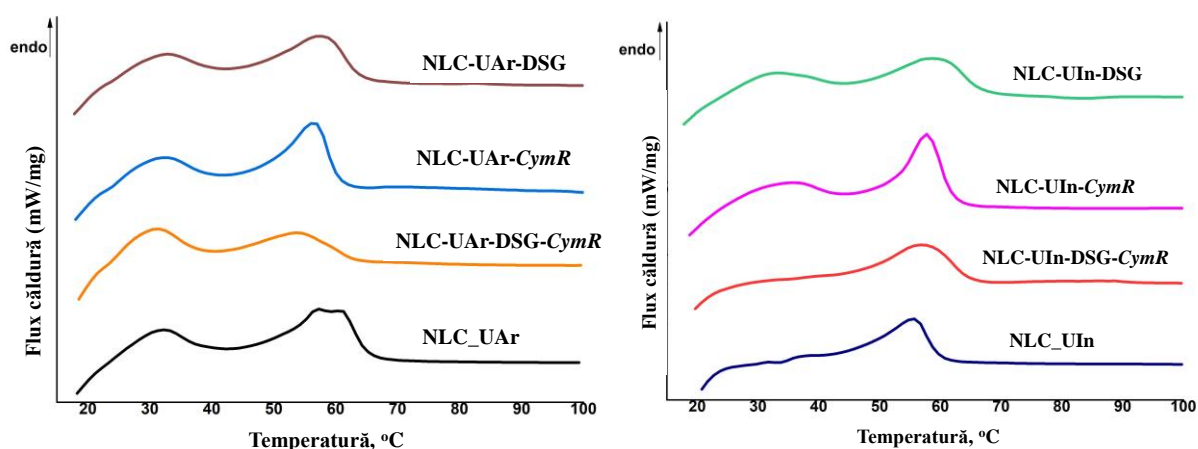


Figura 36. Reprezentarea comparativă a curbelor endoterme ale sistemelor NLC-libere, individuale

9.5. Determinarea eficienței de încapsulare a DSG și *CymR* în nanotransportori lipidici

În cadrul acestui set de experimentări diosgenina a fost cuantificată prin tehnica cromatografică de lichide de înaltă performanță, iar pentru extractul de *Black Cohosh* s-a avut în vedere compoziția bogată în polifenoli, aceștia servind la cuantificarea propriu-zisă a eficienței de încapsulare. Determinarea cantitativă a acestuia din urmă a fost realizată utilizând o metoda spectrofotometrică. Așa cum reiese din Fig. 37, eficiențele de încapsulare cele mai ridicate s-au determinat pentru sistemele NLC-UIn individuale, cu diosgenină, în procente de ~ 92%, în timp ce pentru *CymR*, valoarea maximă fiind de 76.5% în NLC-UIn-dual. Explicația rezidă în afinitatea preferențială a celor două principii pentru cele două faze constituente ale sistemului, miez lipidic și înveliș de surfactant.

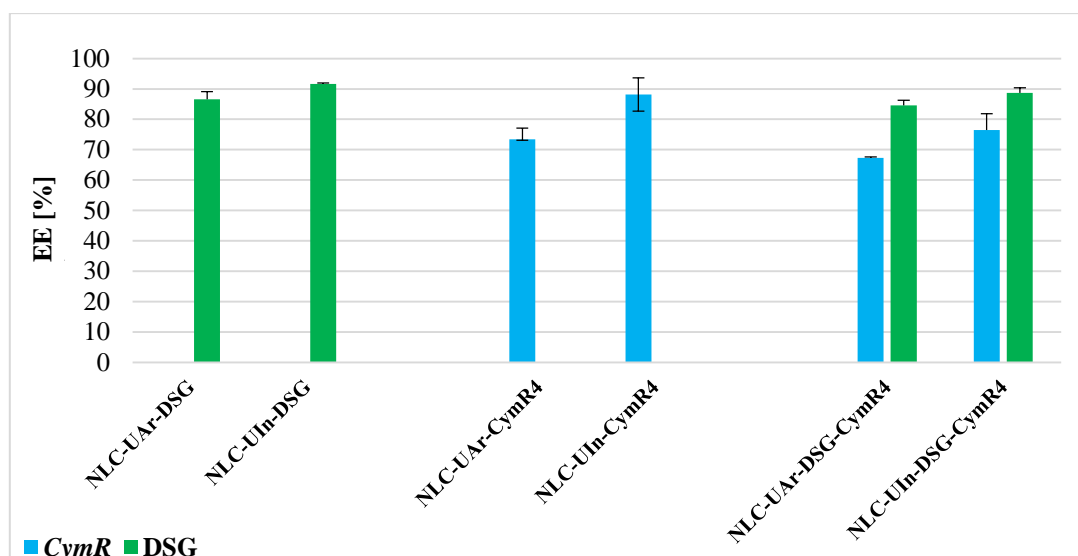


Figura 37. Eficiența de încapsulare a DSG și a extractului de cohosh negru în NLC sintetizate cu cele două uleiuri vegetale (de armurariu, de in)

9.6. Evaluarea *in vitro* a eliberării principiilor vegetale bioactive (DSG și *CymR*) din sistemele nanostructurate obținute

Studiul eliberării *in vitro* a vizat cuantificarea polifenolilor din extractul de cohosh negru, prin UV-Vis, respectiv a diosgeninei prin HPLC, din mediul receptor.

În cazul sistemelor NLC-individuale a fost observat un trend mai lent de eliberare, în primele 2h ore de studiu, proces urmat de o evoluție rapidă, eliberarea în procent maxim atingându-se după 5h pentru *CymR*, respectiv 7h pentru DSG.

Pentru sistemele mixte, în schimb, s-a observat o prelungire a perioadei de eliberare în timp, în cazul ambelor categorii de principii fitochimice, mai accentuată în cazul DSG. Eliberarea de 100% a polifenolilor din *CymR* s-a produs la 4h și 5h, în cazul NLC-mixt, 5h în cazul sistemelor nanotransportor cu UAr și respectiv 6h în cazul NLC preparate cu UIn, Fig. 39. Pentru diosgenina, alura eliberării este similară în cazul ambelor categorii de sisteme.

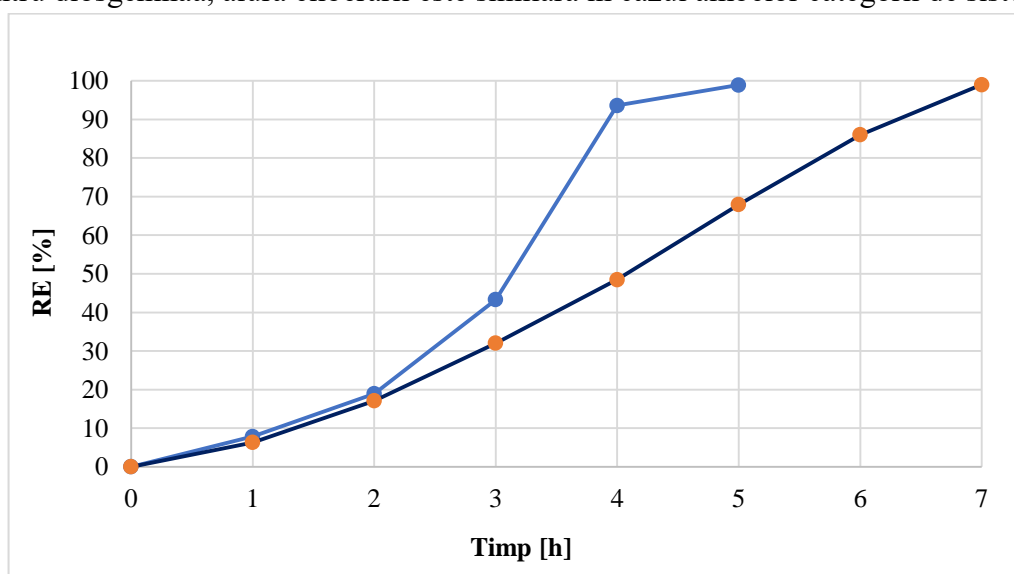


Figura 38. Profilul de eliberare al DSG și al polifenolilor (din *CymR*), prezenți în sistemele NLC individuale: NLC-UIn-DSG și NLC-UIn-*CymR*; albastru – *CymR*, mov - DSG

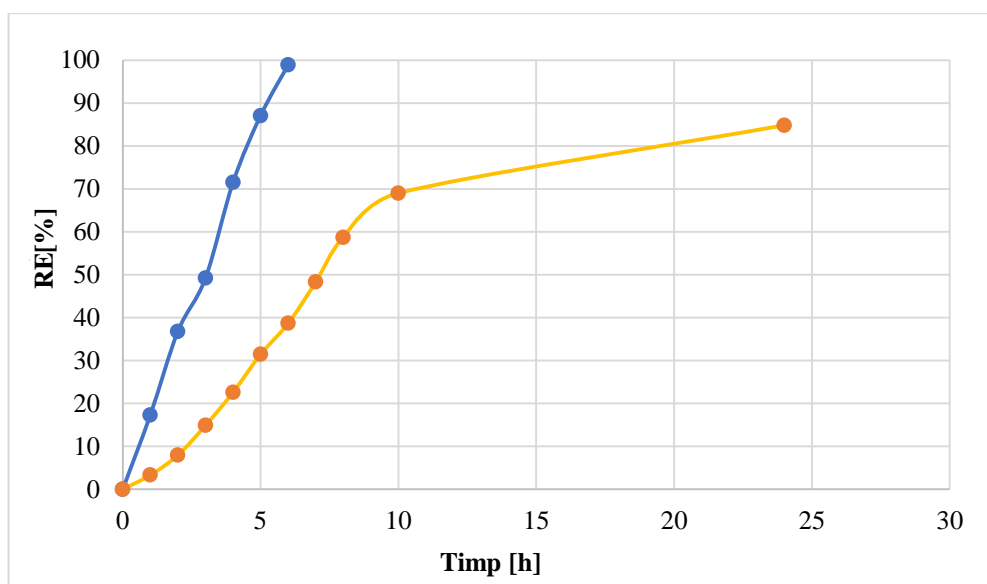


Figura 39. Profilele de eliberare ale DSG și ale polifenolilor (din *CymR*), prezenți în sistemele NLC mixte: NLC-UIn-DSG-*CymR*; albastru – *CymR*, portocaliu – DSG

9.7. Cuantificarea *in vitro* a activității de captare și inhibare a radicalilor liberi, manifestată de sistemele NLC individuale și mixte

În cazul de față, sistemele ce cooptează atât diosgenină și extract de cohosh negru, au înregistrat valori inhibitorii de 20-28%, respectiv 30% pentru sistemele cu ulei de armurariu, anume ulei de in, Fig. 40. Diferența poate fi justificată prin compoziția variată în acizi grași, componenți ai celor două uleiuri vegetale.

Prin nanoîncapsulare, atât în cazul diosgeninei, cât și celui de-ai doilea extract se înregistrează o creștere semnificativă a procentului inhibitoriu ai radicalilor de viață lungă.

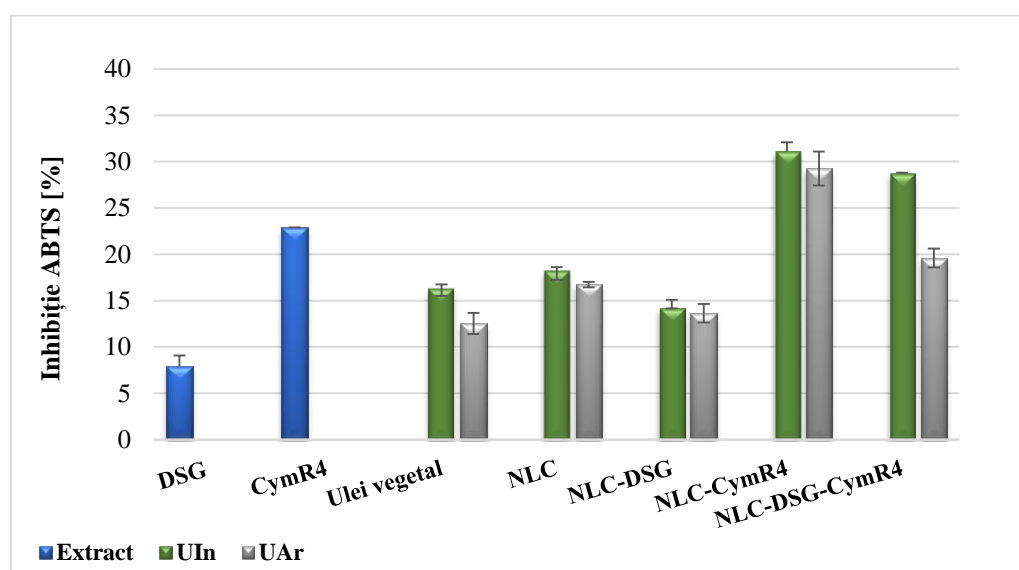


Figura 40. Inhibiției ABTS de către sistemele NLC individuale și mixte

Spre deosebire de metoda spectrofotometrică, rezultatele înregistrate pentru cea de-a doua tehnică, a chemiluminisentei au punctat o eficiență mai bună a principiilor active, în

special a sistemelor ce co-încapsulează diosgenină și extract de *CymR*, de a capta radicalii de viață scurtă. Drept exemplificare stau rezultatele $AA_{NLC-UIn-DSG-CymR4} = 93.2\%$ și $AA_{NLC-UAr-DSG-CymR4} = 88.9\%$.

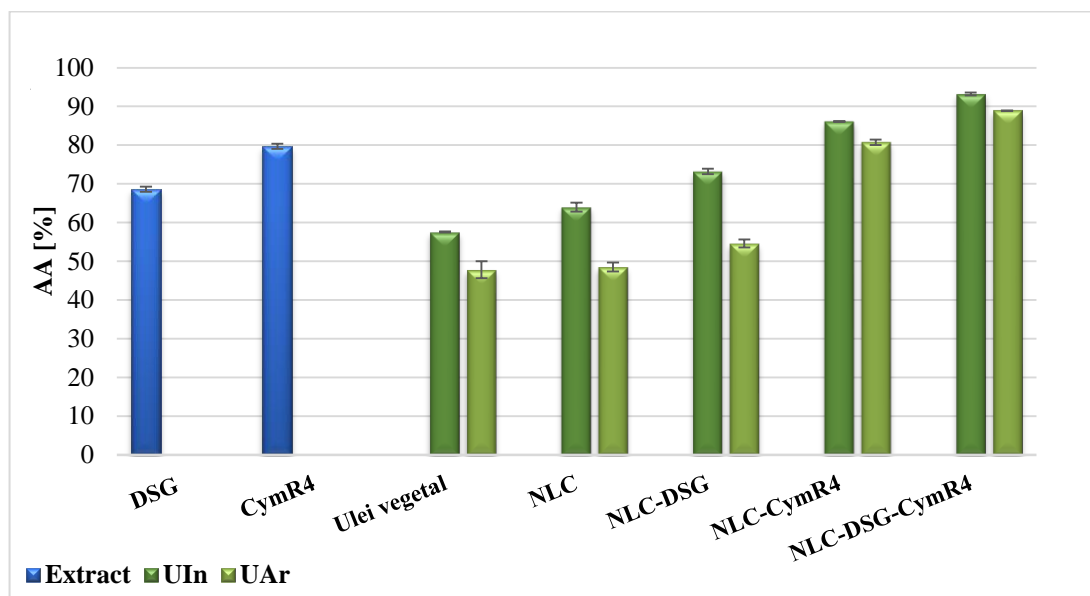


Figura 41. Reprezentarea potențialului antioxidant al sistemelor individuale, NLC-UIn-DSG și NLC-UIn-CymR4 și a celor mixte, NLC-UAr/UIn-DSG-CymR4 (metoda chemiluminiscentei)

9.8. Monitorizarea *in vitro* a citotoxicității exercitată de sistemele NLC individuale și mixte, cu conținut de DSG, *CymR* și respectiv, amestec de principii active

În cadrul etapei de studiu a citotoxicității sistemele nanostructurate înglobând cele două categorii de principii active, sisteme preparate cu UAr, respectiv UIn s-a constatat faptul că uleiul de armurariu prezintă o biocompatibilitate mai bună față de celulele normale EA.hy926, comparativ cu uleiul de in (analiza *in vitro* MTS). Dacă în cazul sistemelor NLC-UAr, valorile viabilității celulare au fost cuprinse între $75.3 \div 80.7\%$ (tratament 24h, cu concentrații de 50 mg/mL NLC), respectiv $80.2 \div 83.7\%$ (tratament 48h, cu concentrații de 50 $\mu\text{g/mL}$ NLC), pentru sistemele NLC-UIn, viabilitatea celulară a suferit ușoare scăderi: $70.6 \div 73.7\%$ (tratament 24h, 50 $\mu\text{g/mL}$, NLC-UIn individuale și mixte) și $73 \div 76.1\%$ (tratament 48h, 50 $\mu\text{g/mL}$, NLC-UIn individuale și mixte). Valorile viabilităților celulare enunțate mai sus evidențiază faptul că un tratament prelungit, de 48h, duce la apariția unui fenomen de regenerare celulară posibil datorat compoziției bogate în fitoconstituenți a extractului de *CymR*.

Acțiunea citotoxică vs. proliferativă indusă de sistemele NLC individuale cu *CymR* asupra celulelor normale EA.hy926, evaluată prin analiza în timp real, RTCA (Fig. 42), relevă faptul că celulele tratate cu concentrații $<100 \mu\text{g/mL}$ de NLC-individuali/duali, au înregistrat valori ridicate ale viabilității celulare. Acest aspect demonstrează o siguranță în utilizare a tuturor categoriilor de NLC, la concentrații cuprinse între 25 și 100 $\mu\text{g/mL}$. S-a observat, de

asemenea că, la concentrații mari, de 400 µg/mL viabilitatea scade semnificativ, indicând o creștere a citotoxicității NLC, la concentrațiile respective, ex. sistemele individuale cu extract de *CymR*, NLC-UAr/UIIn-*CymR*.

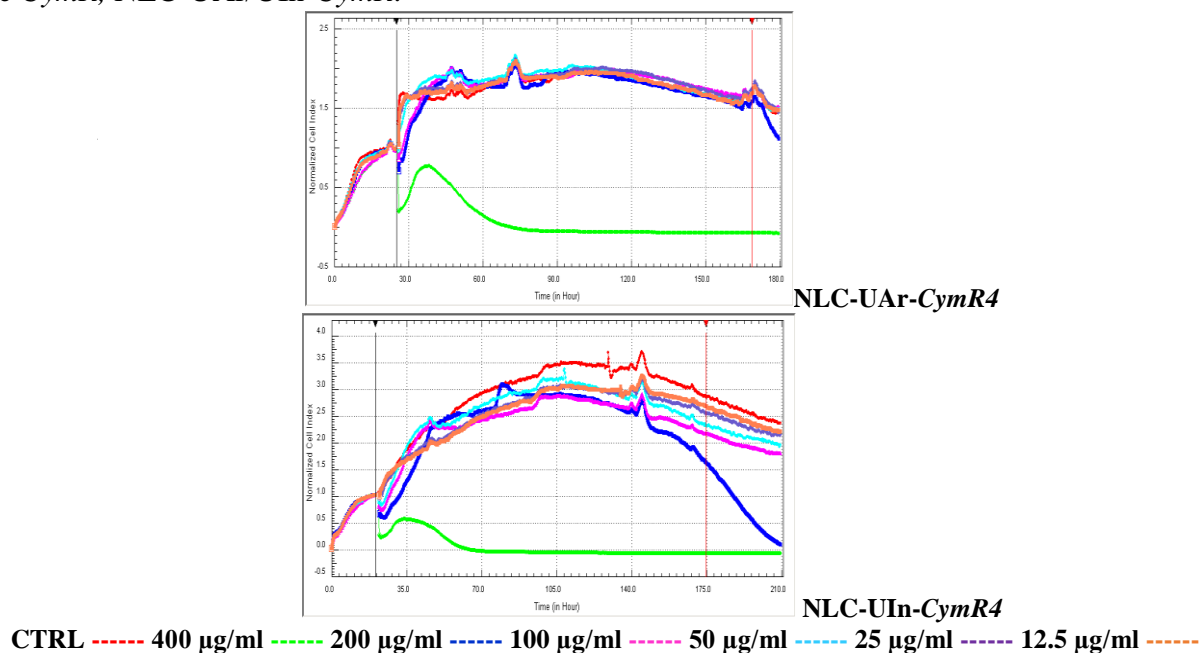
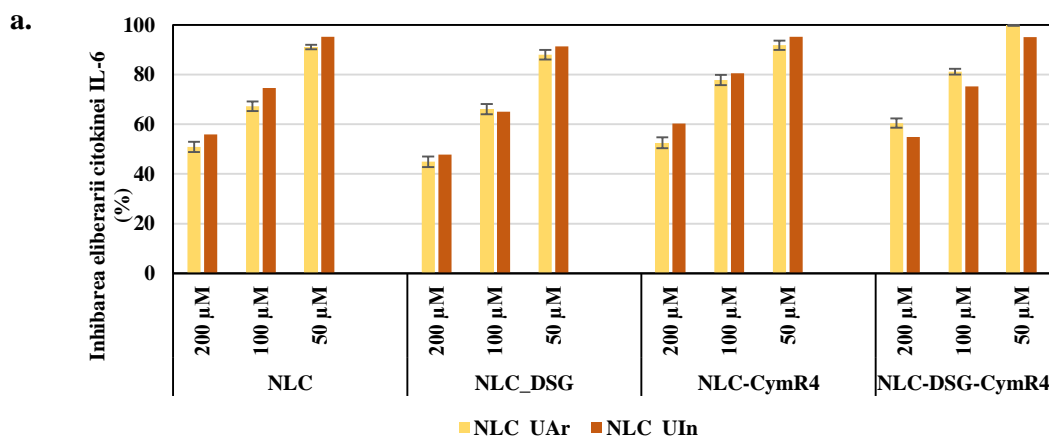


Figura 42. Acțiunea citotoxică vs. proliferativă indusă de sistemele NLC individuale cu *CymR* asupra celulelor normale EA.hy926 (analiza RTCA)

9.9. Studiarea efectului antiinflamator exercitat de sistemele NLC individuale, NLC-UAr/UIIn-DSG/*CymR4* și mixte, NLC-UAr/UIIn-DSG-*CymR4*

Rezultatele analizei de cuantificare a activității antiinflamatorii au evidențiat prezența unui efect puternic antiinflamator manifestat de ambele categorii de sisteme NLC, încărcate cu un singur principiu vegetal (*CymR*, DSG) sau cu principii vegetale mixte (*CymR* și DSG).

Prin efectuarea tratamentelor cu NLC asupra celulelor EA.hy926, s-a constatat o puternică inhibare a ambelor categorii de citokine proinflamatorii. Spre exemplificare, stau nanotransportorii sintetizați ulei de armurariu care au generat grad de inhibare al citokinei proinflamatorii IL-6 variind între 91.1 ÷ 99.8% (tratament de 24h) și 90.5, respectiv 99.5% (tratament de 48h).



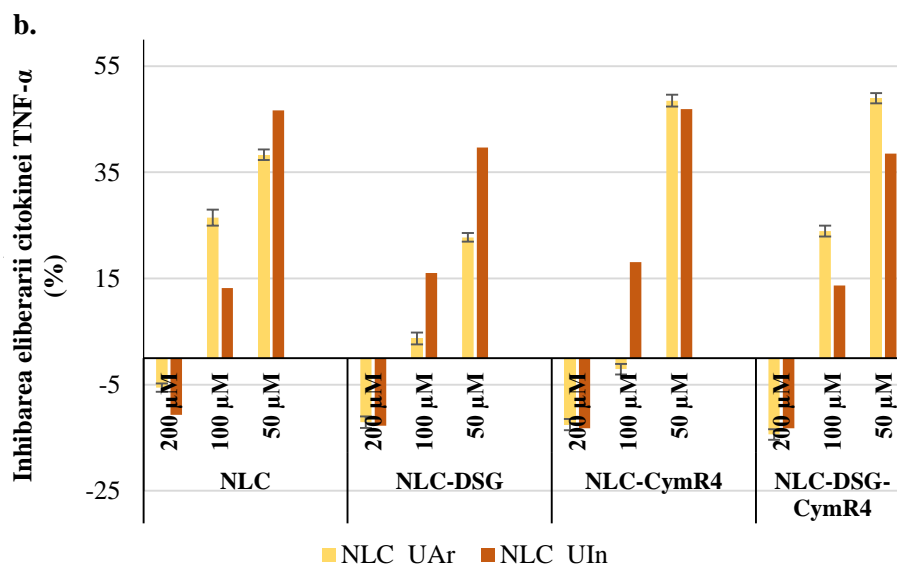


Figura 43. Evaluarea prin tehnica ELISA a efectului tratamentelor cu sisteme nanotransportor de tip NLC-DSG, NLC-CymR și NLC-DSG-CymR asupra eliberării citokinelor **IL-6 (a.)** și **TNF- α (b.)**, de către celulele normale EA.hy926, 24h de tratament

În cazul inhibării citokinei proinflamatorii TNF- α , potențialul antiinflamator al NLC a fost ceva mai limitat, în sensul că % de inhibare nu a depășit 60%, indiferent de tipul de ulei vegetal utilizat. În fig. 41, pct.b se observă un procent maxim de inhibiție, generat de sistemul mixt cu ulei de armurariu, la concentrație de 50 μ M, de 54.6%.

9.10. Concluzii parțiale

Noile sisteme lipidice nanotransportor ce încapsulează diosgenină și/sau extract de *Cimicifuga racemosa/Cohosh Negru*, au prezentat parametri de stabilitate adecvați, asociați cu diametre medii ale particulelor < 200 nm, indici de polidispersitate < 0.17 și potențiale electrocinetice mai electronegative decât -43.2 mV. Încorporarea eficientă și compatibilitatea principiilor vegetale cu amestecul de lipide și surfactanți, au fost dezvoltate prin determinările cantitative ale DSG și CymR încapsulate (analize spectrofotometrice și cromatografice/HPLC), precum și prin analiza calorimetrică de scanare diferențială.

Afinitatea preferențială a celor două principii fitochimice pentru cele două faze constituente ale sistemului nanotransportor a generat o captare a CymR în stratul exterior de surfactanți, cu EE% mai moderate pentru CymR (ex. 76.5% pentru sistemul NLC-UIn-dual). În schimb, afinitatea DSG pentru miezul lipofil creat de lipidele solide împreună cu UIn/UAr a condus la obținerea unor eficiențe de încapsulare ridicate (ex. ~92% corespunzătoare sistemelor individuale cu ulei de in).

Inhibarea radicalilor de viață lungă, cuantificată prin tehnica ABTS, a subliniat un procent inhibitor relativ redus, maxim 30% pentru sistemele NLC mixte și individuale. La polul opus se situează activitatea antioxidantă manifestată de aceste NLC-uri asupra speciilor reactive de oxigen – ROS, de viață scurtă, care a evidențiat valori net superioare de captare a radicalilor liberi (ex: $AA_{NLC-UIn-DSG-CymR4} = 93.2\% \pm 0.40$; $AA_{NLC-UAr-DSG-CymR4} = 88.9\% \pm 0.05$).

Referitor la potențialul citotoxic al concentrațiilor crescătoare de NLC, prin analiza MTS, s-a observat faptul că sistemele NLC preparate cu ulei de armurariu prezintă o biocompatibilitate mai bună față de celulele normale, EA.hy926, comparativ cu NLC preparate cu ulei de in. Valorile viabilității celulare, după un tratament de 24h, au fost cuprinse între $75.3 \div 80.7\%$ pentru un tratament cu $50 \mu\text{g/mL}$ cu sistemele NLC-UAr individuale și duale, respectiv de $70.6 \div 73.7\%$ pentru sistemele NLC-UIn individuale și duale.

Testul RTCA a punctat că la concentrații $< 100 \mu\text{g/mL}$, viabilitatea celulelor normale EA.hy926 este crescută, comparabilă cu cea a celulelor martor, netratate.

Implicarea acestor sisteme de distribuție în procesul antiinflamator a scos în prim plan eficacitatea nanotransportorilor lipidici, la concentrații de $50 \mu\text{g/mL}$, în special a celor micști. Totuși inhibarea interleukinei 6 a înregistrat valori mult mai ridicate, $>92\%$, spre deosebire de cel de-al doilea factor al cărui % de inhibare nu a depășit 64% , fiind vizibil dependent de tipul de ulei vegetal și perioada de tratament aplicată.

10. CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

10.1. Concluzii finale

Cercetările originale realizate în cadrul acestei teze, concretizate prin existența a **5 capitole originale** au dezvăluit următoarele:

Capitolul 5 prezintă studiile de optimizare realizate în scopul obținerii variantei optime pentru sinteza ulterioară a nanotransportorilor încărcăți cu principii active. Studiile de variație (în termeni de concentrație sau raport de greutate între surfactanții implicați în proces, de uleiuri vegetale sau de parametrii operaționali) au evidențiat ca fiind oportună formularea care: a) conține un amestec de 2.5% surfactanți și co-surfactant (aflați într-un raport compozițional de Tw20 : Polx188 : Fosf = 70 : 15 : 15, raportați la obținerea a 100 g dispersie apoasă NLC); b). implică operarea în etapa de procesare prin HSH la 13.000 rpm (timp de 1 min.); c) implică folosirea a 6 cicluri de omogenizare (corespunzătoare unui timp de 3 min. și 20 sec.), la 500 bar, în etapa de procesare prin HPH.

Rezultatele experimentale încadrate în **Capitolul 6** au demonstrat faptul că prin asocierea caracteristicilor compoziționale și structurale a două lipide solide (monostearat de gliceril și palmitat de cetil) împreună cu uleiurile vegetale (ulei de luminița nopții, sp. *Oenothera biennis*, respectiv ulei de soia, sp. *Glycyne max*) și amestecul de surfactanți (format din Tween 20, Fosfatidilcolină și Poloxamer 188), pot fi dezvoltate sisteme lipidice nanotransportor, favorabile cooptării eficiente a două categorii de principii fitochimice, un sapogenin steroidic (diosgenina, DSG) și un amestec fitochimic hidrofil (extract de *Glycyrrhiza glabra*, GlyG). NLC-urile obținute s-au prezentat sub forma unor sfere cu diametre între $50 \div 200 \text{ nm}$, care includ nanocompartimente create de uleiurile I/II.

Distribuția preferențială a celor două principii bioactive a fost argumentată prin cuplarea informațiilor provenite din calorimetrie de scanare diferențială și studiile de eliberare *in vitro* (DSG fiind captat în faza lipidică, în timp ce *GlyG* a prezentat afinitate pentru învelișul hidrofil generat de surfactanți).

Parametrul *eficiența de încapsulare* a subliniat valori ridicate, > 80% pentru DSG și ~90% pentru *GlyG*. Siguranța în utilizare și toxicitatea redusă în tratamentele efectuate asupra liniei celulare endoteliale HUVEC au fost confirmate pentru domeniul de concentrații 25 ÷ 100 µg/mL, prin realizarea a două analize *in vitro* specifice (MTS și RTCA).

Profilul de eliberare *in vitro* a arătat că NLC-fitochimicale mixte permit eliberarea susținută, ceea ce conferă acestor fitocompuși activi să ajungă pe o anumită perioadă de timp la celulele inflamate, unde își au ținta terapeutică.

Ambele categorii de nanotransportori au dovedit abilități semnificative de combatere a radicalilor cationici de viață lungă (ABTS⁺) și a radicalilor oxigenați de viață scurtă (ROS). În plus, încapsularea amestecurilor naturale provenite din plante a condus la obținerea unui **efect antiinflamator amplificat**, mult mai accentuat în inhibarea citokinei proinflamatorii TNF-α: 90.6% (pentru NLC_II) *versus* 97.9% (pentru NLC_II_DSG_*GlyG*).

Capitolul 7 a urmărit obținerea unor NLC stabilizate cu un amestec de surfactanți predominant ionic (colatul de sodiu fiind emulsifiantul principal), în vederea unei integrări simultane și eficiente, a saponinei steroidice, DSG împreună cu extractul de yam sălbatic (*Yam*), în vederea îmbunătățirii biodisponibilității *in vivo* a celor două fitochimice. Sistemele NLC_DSG_*Yam* au înregistrat o stabilitate fizică ridicată, prin prisma valorilor potențialelor electrocinetice, mai electronegative decât -35 mV, diametre medii de 125 nm și randamente ridicate de încapsulare, > 80% pentru DSG.

Cuantificarea *in vitro* a procentelor de captare a radicalilor liberi a evidențiat o abilitate modestă de prindere a radicalilor de viață lungă, ABTS⁺ (valoarea maximă de inhibare fiind de doar 12.4%), în timp ce inhibarea radicalilor liberi de tip ROS a vizat valori semnificativ îmbunătățite, AA: 82 - 84%.

Aspectele legate de siguranța NLC-urilor obținute, monitorizate prin teste *in vitro* MTS și RTCA, au demonstrat că la concentrații de 50 µg/mL NLC, viabilitatea celulară a fost menținută la valori > 80%, ceea ce indică o lipsă a citotoxicității NLC asupra celulelor endoteliale HUVEC.

Similar cu sistemul anterior, acțiunea antiinflamatoare a fost dependentă de doza aplicată, în sensul că o inhibare mai accentuată a eliberării citokinelor IL-6 și TNF-α s-a produs la concentrații de 50 µg/mL NLC. Captarea DSG și *Yam*, în nanotransportorii stabilizați cu amestec de surfactanți, preponderent ionic, a condus la inhibarea mai pronunțată a citokinei proinflamatorii TNF-α (ex: 98.2% ± 1.07), decât a celei de tip IL-6 (ex: 62% ± 1.07), pentru sistemul de distribuție NLC_DSG_*Yam*_2.

În cadrul **Capitolului 8** s-a înfăptuit integrarea eficientă, simultană a unui extract de *Polygonum cuspidatum* (*PCus*) laolaltă cu saponina steroidică DSG. NLC-urile obținute au prezentat morfologii sferice, cu dimensiuni cuprinse între 50 și 250 nm, cu o distribuție uniformă a populației lipidice (PDI ~ 0.15) și stabilitate fizică competitivă. Compoziția bogată în fitoconstituenți hidrofilii din extractul de *Polygonum cuspidatum* a condus la obținerea unor

procente de încapsulare cu valori moderate (ex: $64 \pm 1.5\%$ pentru NLC_PCus_UIn și $73 \pm 1.3\%$ pentru NLC_PCus_UAr. În cazul sistemelor NLC mixte, EE % au fost cuprinse între 91.6% și 87.0% pentru DSG, în timp ce, în cazul PCus valorile eficienței de încapsulare nu au depășit 65%. Analiza calorimetrică a subliniat modificarea semnificativă a miezului lipidic după captarea celor două principii bioactive.

Efectul non-toxic al sistemelor mixte asupra celulelor liniei EA.hy926 a fost dovedit prin rezultatele celor două teste *in vitro* de citotoxicitate, MTS și RTCA.

Sistemele NLC ce au încapsulat extractul de *Polygonum cuspidatum*, în sistem individual sau dual au prezentat o abilitate de captare a radicalilor cationici de tip ABTS⁺ cuprinsă între 74.5 și 77.9%, cele mai eficiente sisteme fiind cele pe bază de ulei de in. Prin cooptarea simultană a celor două principii vegetale – extractul de PCus și DSG – în sistemele lipidice nanotransportor, s-a observat o creștere semnificativă a abilității NLC de a capta radicalii liberi oxigenați, valorile activității antioxidante fiind foarte aproape de îndepărtarea integrală a speciilor ROS, ex: 97-98%.

Studiul *in vitro* de eliberare a scos în evidență existența unui trend mai lent de eliberare a compusului lipofil, DSG, prins în miezul lipidic, comparativ cu PCus care s-a eliberat într-un procent >65% după 3h.

Evaluarea *in vitro* a potențialului antiinflamator al tratamentelor cu sistemele NLC-mixte, cu conținut de DSG și PCus, a demonstrat un grad foarte ridicat de inhibare a citokinelor IL-6, cuprins între 91.9 și 94.9%. Referitor la inhibarea TNF- α , valorile au fost relativ mai scăzute.

Capitolului 9 prezintă dezvoltarea și caracterizarea unor sisteme nanostructurate capabile să încapsuleze diosgenină și/sau extract de *Cimicifuga racemosa/Cohosh negru*. Diametrele medii ale particulelor lipidice au variat între 140 ÷ 210 nm (conform analizei DLS), indicii de polidispersitate < 0.17 și potențialele electrocinetice au fost mai electronegative decât -43.2 mV.

Încorporarea eficientă și compatibilitatea principiilor vegetale cu amestecul de lipide și surfactanți, au fost dezvăluite prin determinările cantitative ale DSG și CymR încapsulate (analize spectrofotometrice și cromatografice/HPLC), precum și prin analiza calorimetrică de scanare diferențială(DSC).

Distribuția preferențială a celor două categorii de principii active (CymR pentru învelișul de surfactanți și DSG pentru matricea miez lipofilă) este în strictă dependență cu eliberarea rapidă a polifenolilor din extractul de CymR, în procent maxim, în primele 5h ale studiului de eliberare *in vitro*, în timp ce diosgenina, urmează un profil de eliberare treptat, extins pe o perioadă de 24h.

Inhibarea radicalilor de viață lungă, cuantificată prin tehnica ABTS, a subliniat un procent inhibitor relativ redus, maxim 30% pentru sistemele NLC mixte și individuale cu CymR, totuși capacitatea de captare a speciilor reactive de oxigen s-a remarcat prin valori ceva mai promițătoare (ex: $AA_{NLC-UIn-DSG-CymR4} = 93.2\%$; $AA_{NLC-UAr-DSG-CymR4} = 88.9\%$).

Analizele MTS și RTCA au punctat faptul că la concentrații < 100 $\mu\text{g/mL}$, viabilitatea celulelor EA.hy926 este crescută, comparabilă cu cea a celulelor martor, netratate.

Implicarea acestor sisteme de distribuție în procesul antiinflamator, prin medierea răspunsului citokinelor proinflamatorii, a scos în prim plan eficacitatea nanotransportorilor lipidici, la concentrații de 50 $\mu\text{g/mL}$, în special a celor micști, ex. $99.80 \pm 0.1\%$ (pentru NLC-UAr-DSG-*CymR4*), inhibare IL-6. Cel de-al doilea factor vizat în procesul inflamator, TNF- α a înregistrat valori ceva mai limitate, în sensul că procentul de inhibare nu a depășit 64%, indiferent de tipul de ulei vegetal sau de principiu vegetal vizat.

10.2. Contribuții originale

Contribuțiile originale, aduse prin prezenta teză de doctorat au vizat obținerea și caracterizarea unor sisteme lipidice nanotransportor (NLC) care cooptează/co-încapsulează diferite amestecuri de plante, bioactive, care pot oferi o alternativă promițătoare pentru distribuirea și eliberarea controlată de fitocompuși (prin direcționare pasivă în diferite zone specifice din organism) în scopul prevenirii/tratării unor boli inflamatoare, dar nu numai.

Aceste cercetări originale au fost concretizate prin:

1. Co-încapsularea de principii active mixte (DSG și *Yam*, *GlyG*, *PCus*, *CymR*) în nanotransportori lipidici preparați prin valorificarea a 4 uleiuri vegetale (ulei de soia, ulei de luminița nopții, ulei de in și ulei de armurariu) în asociere cu lipide solide (monostearat de gliceril, palmitat de cetil, unt de cacao). Notabilă este noutatea acestor cooptări simultane de amestecuri vegetale în același sistem de distribuție nanostructurat; nu există studii în literatura de specialitate care să ateste încapsularea extractelor vegetale selectate și utilizate în cadrul tezei de doctorat.

2. Obținerea unei biodisponibilități crescute și potențial terapeutic îmbunătățit al unor principii active vegetale diferite, din diverse clase fitochimice (ex: saponine steroidice, saponine triterpenice, acizi fenolici etc.) prin cooptarea acestora în sisteme lipidice de distribuție, de tip NLC.

3. Studiul complex al evidențierii profilelor de eliberare *in vitro* a saponinei steroidice (DSG), a saponinei triterpenice (acid glicirizic, prezent în extractul de *GlyG*), a fitoalexinei (resveratrol, prezent în extractul de *PCus*), dar și a polifenolilor (din extractul de *CymR*).

4. Dovedirea lipsei citotoxicității NLC-urilor dezvoltate asupra liniilor celulare vizate, HUVEC și EA.hy926, la concentrații $< 50 \mu\text{g/mL}$.

5. Monitorizarea *in vitro* a acțiunii antioxidante prin TEAC și chemiluminiscentă.

6. Dovedirea eficacității antiinflamatoare a nanotransportorilor lipidici, prin implicarea acestor sisteme de distribuție NLC în medierea răspunsului proinflamator, generat de eliberarea citokinelor proinflamatoare IL-6 și TNF- α .

10.3. Direcții viitoare de dezvoltare a acestei cercetări aplicate

Rezultatele obținute în teza de doctorat denumită „*Nanoîncapsulări de nutraceutice în sisteme lipidice nanostructurate pentru dezvoltarea de suplimente alimentare avansate*” vor

putea servi ca punct de plecare în experimentările ulterioare privind aplicabilitatea pe scară largă a acestor nanosisteme, adresate unui grup specific de subiecți (ex. persoanelor de sex feminin aflate în perioadele pre/post menopauzale). De altfel, un prim pas a fost realizat printr-o colaborare a Facultății de Inginerie Chimică și Biotehnologii (FICBI), din cadrul Universității Naționale de Știință și Tehnologie POLITEHNICA București (UNSTPB), cu un partener privat (A.C. Helcor S.R.L., Baia Mare) în cadrul unui proiect POSDRU „Realizarea unui supliment alimentar inovativ pentru sănătatea femeii la menopauză”. În acest context, probe reprezentative de nanotransportori lipidici au fost condiționate de către compania farmaceutică A.C. Helcor S.R.L. (Fig. 44) sub forma unor capsule solide (cu excipienți de tip fujisil și stearat de magneziu), în vederea dezvoltării ulterioare a unor suplimente alimentare pe bază de NLC-principii fitochimice bioactive care să prezinte multiple beneficii asociate sănătății populației feminine.



Figura 44. Capsule solide cu conținut de NLC-uleiuri vegetale-diosgenină-amestecuri fitochimice (ex: extract de *Yam*)

Mulțumiri

- Colectivului din cadrul Departamentului Centrul de Imunologie al Academiei Române (reprezentat prin Dr. Bioch. Mirela Mihăilă), Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau”, pentru realizarea analizelor de testare *in vitro* a potențialului citotoxic (analize MTS și RTCA) și pentru determinarea *in vitro* a activității antiinflamatoare a NLC-urilor cu conținut de fitochimicale variate.
- Echipei de cercetare din cadrul Companiei A.C. Helcor S.R.L., Baia Mare (Conf. Dr. Anca Pop, Farm. Simona Crișan), pentru oportunitatea de a transforma sistemele de distribuție de tip NLC în produse ce prezintă un potențial ridicat de valorificare pe piața din România.

Publicații reprezentative în domeniul tezei de doctorat

Articole științifice:

1. **Teodora-Alexandra Iordache**, Nicoleta Badea, Mirela Mihaila, Simona Crisan, Anca Lucia Pop, Ioana Lacatusu. *Polygonum cuspidatum* Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Dual Inhibition of TNF- α - and IL-6 Cytokines and Free Radical Species, *Materials*, **2023**, 16(9), 3492, doi: 10.3390/ma16093492; **IF = 3.4**.
2. **Teodora-Alexandra Iordache**, Lucia Coc, Adriana Laura Mihai, Nicoleta Badea, Ioana Lacatusu, Aurelia Meghea. The influence of vegetable oil and self-organizing agents' composition on obtaining stable nanostructured lipid carriers, *U.P.B. Sci.Bull, Seria B*, **2022**, 84, 1; **IF = 0.5**.
3. **Teodora-Alexandra Iordache**, Nicoleta Badea, Mirela Mihaila, Simona Crisan, Anca Lucia Pop, Ioana Lacatusu, Challenges in Coopted Hydrophilic and Lipophilic Herbal Bioactives in the Same Nanostructured Carriers for Effective Bioavailability and Anti-Inflammatory Action, *Nanomaterials*, **2021**, 11, 3035. <https://doi.org/10.3390/nano11113035>; **IF = 5.719**.
4. Ioana Lacatusu, **Teodora Alexandra Iordache**, Mirela Mihaila, Dan Eduard Mihaiescu, Anca Lucia Pop, Nicoleta Badea. Multifaced Role of Dual Herbal Principles Loaded-Lipid Nanocarriers in Providing High Therapeutic Efficacy, *Pharmaceutics*, **2021**, 13, 1511. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091511>; **IF = 6.525**.

(Cerere brevet de invenție). Lăcătușu Ioana, Badea Maria-Nicoleta, Pop Anca Lucia, **Iordache Teodora-Alexandra**, Pop Coriolan, Procedeu de încapsulare duală a două categorii de principii vegetale bioactive în același sistem de distribuție nanostructurat; 2021/00220/29.04.2021.

Lucrări prezentate în conferințe:

1. **Teodora Alexandra Iordache**, Simona Crisan, Anca Pop, Mirela Mihaila, Nicoleta Badea, Ioana Lacatusu, *Optimized approach for developing lipid nanocarriers loaded with active herbal extracts*, 22nd Romanian Internațional Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 22), 7-9.09.2022, Sinaia, România;
2. **Teodora Alexandra Iordache**, Simona Crisan, Anca Pop, Mirela Mihaila, Ioana Lacatusu, Nicoleta Badea, *Use of herbal ingredients for development of anti-inflammatory nanostructured delivery systems*, 22nd Romanian Internațional Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 22), 7-9.09.2022, Sinaia, România;
3. Cristina Ott, Mihaela Tociu, **Teodora Iordache**, Simona Crisan, Anca Pop, Nicoleta Badea, Ioana Lacatusu, *Resveratrol and Diosgenin co-loaded lipid nanocarriers with effective anti-inflammatory action*, 22nd Romanian Internațional Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 22), 7-9.09.2022, Sinaia, România;

Bibliografie selectivă

- Adomèniènè, A., Venskutonis, P. R. (2022). Dioscorea spp.: Comprehensive Review of Antioxidant Properties and Their Relation to Phytochemicals and Health Benefits. *Molecules*, 27(8), 2530. doi:doi: 10.3390/molecules27082530
- Gokce, E., Korkmaz, E., Dellera, E., Sandri, G., Bonferoni, M., Ozer, O. (2012). Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: evaluation of antioxidant potential for dermal applications. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1841-50. doi:DOI: 10.2147/IJN.S29710
- Iordache, T.**, Badea, N., Mihaila, M., Crisan, S., Pop, A., Lacatusu, I. (2023). Polygonum cuspidatum Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Dual Inhibition of TNF- α - and IL-6 Cytokines and Free Radical Species. *Materials*, 16(9), 3492. doi:https://doi.org/10.3390/ma16093492
- Iordache, T.-A.**, Badea, N., Mihaila, M., Crisan, S., Pop, A. L., Lacatusu, I. (2021). Challenges in Coopted Hydrophilic and Lipophilic Herbal Bioactives in the Same Nanostructured Carriers for Effective Bioavailability and Anti-Inflammatory Action. *Nanomaterials*, 11(11), 3035. doi:https://doi.org/10.3390/nano11113035
- Iordache, T.-A.**, Coc, L., Mihai, A. L., Badea, N., Lacatusu, I., Meghea, A. (2022). The influence of vegetable oil and self-organizing agents' composition on obtaining stable nanostructured lipid carriers. *U.P.B. Sci. Bull., Seria B*, 84(1).
- Joudeh Gomaa, E., Fathi, H., Eissa, N., Elsabahy, M. (2022). Methods for preparation of nanostructured lipid carriers. *Methods*, 199, 3-8. doi:https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.05.003
- Joshi, B., Zielbauer, B., Vilgis, T. (2020). Comparative Study on Mixing Behavior of Binary Mixtures of Cocoa Butter/Tristearin (CB/TS) and Cocoa Butter/Coconut Oil (CB/CO). *Foods*, 9(3), 327. doi:https://doi.org/10.3390/foods9030327