

Universitatea Națională de Știință și Tehnologie
POLITEHNICA din București
Facultatea de Inginerie Chimică și Biotehnologii
Școala Doctorală de Inginerie Chimică și Biotehnologii



REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

*Nanotransportori lipidici hibridi ce conțin
diferite principii active fitochimice cu
potențial antitumoral*

Doctorand: Ing. Robert-Andrei ȚINCU

Conducător de doctorat: Prof. Dr. Ioana LĂCĂTUȘU

București

-2025-

Cuprinsul tezei de doctorat

LISTĂ DE ABREVIERI	1
LISTĂ DE FIGURI	3
LISTĂ DE TABELE	7
INTRODUCERE	8
CAPITOLUL I: TRANSPORTORI LIPIDICI NANOSTRUCTURAȚI – SISTEME DE DISTRIBUȚIE A COMPUȘILOR CU ACTIVITATE BIOLOGICĂ.....	13
1.1. SISTEME DE DISTRIBUȚIE A INGREDIENTELOR ACTIVE.....	13
1.2. TRANSPORTORI LIPIDICI NANOSTRUCTURAȚI (NLC) – CARACTERIZARE GENERALĂ	18
1.3. METODE DE OBȚINERE A NLC	22
1.4. APLICAȚII ALE TRANSPORTORILOR LIPIDICI NANOSTRUCTURAȚI ÎN DOMENIUL ONCOLOGIC	28
CAPITOLUL AL II-LEA: STRATEGII DE MODIFICARE A SUPRAFEȚEI NLC PENTRU ÎMBUNĂȚĂȚIREA EFECTULUI DE ȚINTIRE A CELULELOR AFECTATE	33
2.1. CARACTERISTICI ALE CELULELOR CANCEROASE	33
2.2. MECANISME ȘI TIPURI DE ȚINTIRE ANTITUMORALĂ.....	35
2.3. EXEMPLE DE NLC ACOPERIȚI SAU FUNCȚIONALIZAȚI CU DIFERIȚI LIGANZI PENTRU O ACȚIUNE ȚINTITĂ A CELULELOR TUMORALE	37
CAPITOLUL AL III-LEA: SISTEME PE BAZĂ DE ALBUMINĂ CU APLICAȚII ÎN TRATAREA AFECȚIUNILOR ONCOLOGICE	43
3.1. ALBUMINA: CARACTERISTICI GENERALE	43
3.2. PROPRIETĂȚI SPECIFICE ALE ALBUMINEI CE-I CONFERĂ APLICABILITATE ÎN DOMENIUL MEDICAL.....	45
3.4. RECEPTORI CELULARI SPECIFICI ALBUMINEI	49
3.5. SISTEME DE ADMINISTRARE A MEDICAMENTELOR PE BAZĂ DE ALBUMINĂ.....	50
CAPITOLUL AL IV-LEA: PRINCIPII FITOCHIMICE. ASPECTE STRUCTURALE, FARMACOLOGICE ȘI STRATEGII DE ÎMBUNĂȚĂȚIRE A BIODISPONIBILITĂȚII ACESTORA	64
JUSTIFICAREA TEMATICII DE CERCETARE. OBIECTIVE GENERALE	69
CAPITOLUL AL V-LEA: MATERIALE ȘI METODE	72
5.1. MATERII PRIME UTILIZATE ÎN OBȚINEREA SISTEMELOR DE TRANSPORTORI LIPIDICI NANOSTRUCTURAȚI	72
5.2. SINTEZA SISTEMELOR DE DISTRIBUȚIE DE TIP NLC HIBRID.....	77
5.3. CARACTERIZAREA STRUCTURALĂ, MORFOLOGICĂ ȘI FUNCȚIONALĂ A DIFERITELOR SISTEME DE NLC.....	80
5.4. IZOLAREA ȘI CARACTERIZAREA PIPERINEI DIN BOABE DE PIPER NEGRU	99
5.5. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA LAURATULUI DE MENTIL.....	100
CAPITOLUL AL VI-LEA: EXTRAȚIA PIPERINEI ȘI SINTEZA LAURATULUI DE MENTIL	101
6.1. EXTRAȚIA PIPERINEI DIN BOABE DE PIPER NEGRU.....	102
6.2. ANALIZA SPECTROSCOPICĂ A PIPERINEI	106
6.3. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA LAURATULUI DE MENTIL.....	113
CAPITOLUL AL VII-LEA: STUDII PRELIMINARE DE OPTIMIZARE A COMPOZIȚIEI NLC	124
7.1. OPTIMIZAREA FORMULĂRILOR NLC PENTRU ÎNCAPSULAREA PIPERINEI	125
7.2. OPTIMIZAREA FORMULĂRILOR NLC ÎN VEDEREA ÎNCAPSULĂRII EXTRACTULUI POLIFENOLIC DE <i>SAMBUCUS NIGRA</i>	129

CAPITOLUL AL VIII-LEA: TRANSPORTORI LIPIDICI NANOSTRUCTURAȚI ACOPERIȚI CU ALBUMINĂ SERICĂ BOVINĂ CAPABILI SĂ MODIFICE CICLUL CELULAR ÎN DIFERITE TIPURI DE CANCER	136
8.1. OPTIMIZAREA COMPOZIȚIEI DE SURFACTANȚI ȘI A ALBUMINEI PENTRU OBTINEREA A NOI FORMULĂRI BSA – NLC	137
8.2. NANOTRANSPORTORI LIPIDICI ACOPERIȚI CU ALBUMINĂ BOVINĂ SERICĂ ȘI ÎNCĂRCAȚI CU PIPERINĂ.....	143
8.3. TESTAREA <i>IN VITRO</i> A NLC CONVENȚIONALI ȘI A CELOR ACOPERIȚI CU BSA	148
8.4. PROPRIETĂȚILE ANTITUMORALE ALE NLC-PIP ÎN COMPARAȚIE CU NLC-PIP DECORAȚI CU BSA	150
8.5. CONCLUZII.....	162
CAPITOLUL AL IX-LEA: NANOTRANSPORTORI LIPIDICI DECORAȚI CU ALBUMINĂ SERICĂ BOVINĂ PENTRU DISTRIBUIREA EXTRACTULUI DE <i>SAMBUCUS NIGRA</i>	164
9.1. CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A NLC ÎNCĂRCAȚI CU EXTRACT DE <i>SAMBUCUS NIGRA</i>	165
9.2. ANALIZA PRIN SPECTROSCOPIE FTIR ȘI DE FLUORESCENȚA A NLC- <i>SAMBUCUSN</i> -BSA	172
9.3. EVALUAREA <i>IN VITRO</i> A ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE	175
9.4. TESTAREA <i>IN VITRO</i> A EFICACITĂȚII ANTITUMORALE A SISTEMELOR NLC OBTINUTE	178
9.5. CONCLUZII.....	199
CAPITOLUL AL X-LEA: CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	201
10.1. CONCLUZII FINALE	201
10.2. CONTRIBUȚII ORIGINALE.....	206
DISEMINARE REZULTATE	209
BIBLIOGRAFIE	210

LISTĂ DE ABREVIERI

Abreviere	Explicație
ABTS	Acid 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic)
AOT	Diocilsulfosuccinat de sodiu
CI	Indice celular
Cis-Pt	Cisplatin
DCC	Diciclohexilcarbodiimidă
DDS	Sistemele de distribuție a medicamentelor
DLS	Spectroscopie de Corelație Fonică
DMAP	N,N-dimetilaminopiridină
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfoxid
DOX	Doxiciclină
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazină
FTIR	Spectroscopie de Infraroșu cu transformată Fourier
GRAS	Generally Recognized as Safe
HPH	Omogenizare la presiune ridicată
HSB	Omogenizare cu grad înalt de forfecare
MSG	Monostearat de gliceril
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazoliu
NaCl	Clorură de sodiu
NLC	Transportori lipidici nanostructurați
P188	Poloxamer 188
PC	Fosfatidilcolină
PdI	Indice de polidispersitate
PES	Phenazine ethosulfate
PI	Iodură de propidiu
Pip	Piperina
RMN	Rezonanță magnetică nucleară
RTCA	Analiză celulară în timp real
TEM	Microscopie electronică de baleiaj
TW20	Tween 20
UA	Ulei de armurariu
US	Ulei de salvie
Zave	Diametru mediu

LISTĂ DE FIGURI

Figura 1: Analiza TLC a extractului în cloroform (A) și izopropanol (B).....	21
Figura 2: Spectrul FTIR al piperinei izolate	21
Figura 3: Valorile diametrelor medii obținute în urma analizei DLS a probelor de NLC acoperite cu BSA.....	28
Figura 4: Spectrele de emisie fluorescentă ale NLC-II-BSA-1/2/3/4 comparativ cu NLC fără BSA (NLC-II-BSA-0) și BSA.....	29
Figura 5: Imagini STEM ale NLC-III-Pip-BSA-3 care arată formarea coroanei BSA la suprafața particulelor NLC (A-C); Imagini STEM ale NLC-III-BSA-0 care arată morfologia sferică și diametrul în conformitate cu analiza DLS (D,E).....	29
Figura 6: Spectrele de emisie de fluorescență ale NLC-Pip-BSA	30
Figura 7: Profil comparativ de eliberare a Piperinei din NLC cu/fără acoperire cu BSA	31
Figura 8: Viabilitatea celulelor tumorale de color LoVo.....	32
Figura 9: Apoptoza celule tumorale de colon LoVo (A); celule mamare tumorale MCF-7 (B);	33
Figura 10: Activitatea de captare a cationilor radicali ABTS ^{•+} de către NLC-I- și -II- <i>SambucusN</i> cu și fără BSA.....	36
Figura 11: Efectul NLC convenționale și hibride asupra celulelor tumorale LoVo, după 48 de ore.....	37

LISTĂ DE TABELE

Tabelul 1: Atribuirile semnalelor din spectrele RMN ale piperinei	23
Tabelul 2: Atribuirile semnalelor din spectrele RMN ale octanoatului de mentil.....	24
Tabelul 3: Formulări libere de NLC (fără principiu activ încapsulat).....	25
Tabelul 4: Formulări de NLC studiate în vederea utilizării lor ulterioare pentru captarea extractului de <i>Sambucus nigra</i>	26
Tabelul 5: Compoziția probelor de transportori lipidici nanostructurați	28
Tabelul 6: Formulările propuse pentru încapsularea extractului de <i>Sambucus nigra</i>	36

INTRODUCERE

Resursele vegetale ce conțin fracții importante de polifenoli, flavonoide, alcaloizi, terpene etc. reprezintă un potențial vast și încă puțin exploatat pentru beneficiile asociate sănătății. Amestecurile de principii fitochimice din diferite extracte de origine vegetală sunt surse bioactive ce prezintă o gamă largă de activități fiziologice și farmacologice. Datorită acestor bioactivi, principiile fitochimice sunt cunoscute drept remedii tradiționale cu eficacitate terapeutică pentru diferite tipuri de afecțiuni. Potențialul medicinal al acestora este semnalat din ce în ce mai des în literatura de specialitate, de exemplu pentru afecțiuni cardiologice, diabet și disfuncții metabolice. Principiile fitochimice pot manifesta acțiune antidepresivă, activitate antioxidantă dar și o activitate notabilă de stopare și inhibare a tumorilor localizate în anumite zone din organism. Principala bioactivitate a extractelor polifenolice este legată de capacitatea acestora de a elimina radicalii liberi și de a preveni peroxidarea lipidelor, care influențează în mod semnificativ proprietățile de promovare a sănătății. Activitatea antioxidantă contribuie la atenuarea leziunilor cauzate de daune oxidative, cele din urma fiind cunoscute pentru corelația strânsă cu apariția mai multor boli, inclusiv cancer. Cancerul este o boală complexă și polivalentă ce rămâne, în ciuda evoluției tratamentelor, una dintre principalele cauze de deces. Se aproximează că unul din șase decese, la nivel mondial este cauzat de o afecțiune oncologică. Metodele de tratare a cancerului sunt variate și includ chirurgia, chimioterapia, radioterapia, și în curs de dezvoltare, metode precum imunoterapia și tratamentul hormonal. Totuși, tratamentul afecțiunilor tumorale se confruntă adesea cu provocări precum rezistența la medicamente, toxicitate sistemică și eficiență scăzută a agentului terapeutic cauzată de o selectivitate celulară slabă.

Pentru a depăși aceste dificultăți, **sistemele de distribuție a medicamentelor (DDS)** au apărut ca o abordare promițătoare la agenții terapeutici tradiționali [1]. Aceste sisteme de administrare au capacitatea de a spori eficacitatea tratamentului medicamentos prin îmbunătățirea biodistribuției și a farmacocineticii acestora, reducând astfel efectele secundare și crescând concentrația de medicament în țesutul țintă [2]. În funcție de modul în care țintesc țesutul canceros, DDS pot funcționa fie printr-un mecanism pasiv, fie printr-un mecanism activ. Țintirea pasivă presupune acumularea DDS în tumori datorită caracteristicilor fizice și fiziologice ale acestui tip de țesut. Deși des folosit în domeniul nanomedicinii, principalul

dezavantaj al acestui mecanism este lipsa specificității celule tumorale vs. celule sănătoase [3,4]. Pe de altă parte, țintirea activă presupune decorarea suprafeței transportorilor cu liganzi specifici ce se pot lega de receptori supra-exprimați la nivelul celulelor canceroase. Această abordare îmbunătățește specificitatea tratamentului și eficiența de administrare a medicamentului prin transportarea principiului activ, în special către țesuturile tumorale. În plus, are loc și o reducere a toxicității sistemice și a efectelor adverse [5].

Dintre diferitele DDS, sistemele lipidice sunt din ce în ce mai studiate în domeniul farmaceutic, în special pentru capacitatea acestora de a crește biodisponibilitatea medicamentelor cu solubilitate scăzută în apă. Versatilitatea formulărilor lipidice permite sinteza unor sisteme ce pot fi adaptate la indicații medicale specifice, căi de administrare diferite, dar și la cerințe legate de eficiență, stabilitate și toxicitate [6]. Printre sistemele DDS, **transportorii lipidici nanostructurați (Nanostructured Lipid Carriers = NLC)** reprezintă o clasă de nanoparticule lipidice, descrise prima oară în anul 1999 [7], care au demonstrat o adaptabilitate și eficiență crescută în administrarea de diferite ingrediente active farmaceutic. NLC sunt formate dintr-un amestec de lipide solide și lichide, stabilizate cu ajutorul unui înveliș de surfactanți, ce conferă o capacitate ridicată de încărcare a principiilor active. În plus, datorită compoziției atent selectate a miezului lipidic stabilitatea și capacitatea de eliberare controlată a principiilor active încapsulate sunt îmbunătățite. Acestor proprietăți li se adaugă și biocompatibilitatea și biodegradabilitatea, nanosistemele fiind de obicei obținute din materiale GRAS („Generally Recognized as Safe”) [8].

Pe lângă aceste considerente, decorarea sistemelor lipidice de tip NLC cu biopolimeri precum albumina serică, poate constitui o premisa esențială pentru **a construi nanoplatforme optimizate** în vederea creșterii efectelor terapiei fitochimice împotriva cancerului [9]. **Albumina** este principala proteină plasmatică, folosită anterior în obținerea de DDS, datorită non-toxicității și non-imunogenității sale. Aceasta are capacitatea de a se lega de receptori specifici, precum GP60 și SPARC, supra-exprimați pe suprafața celulelor tumorale [10]. Ca atare, prin asocierea NLC cu albumină serică (prin asamblare necovalentă, interacțiuni electrostatice și legături de hidrogen) se obțin sisteme nanohibride, ce valorifică simultan avantajele nanoparticulelor lipidice în administrarea medicamentelor cu capacitățile de țintire tumorală ale albuminei.

Având în vedere toate acestea, **prezența teză de doctorat** abordează o nouă modalitate de administrare țintită a unor fitochimicale, prin utilizarea unor sisteme NLC **decorate cu albumină serică bovină (BSA)**. S-a avut în vedere proiectarea unei noi platforme de distribuție constând în NLC (preparate cu amestecuri de uleiuri vegetale și esteri de mentil) acoperite cu

BSA și încărcate cu **diferite principii fitochimice bioactive** (ex: *Piperina*, extrasa din piper negru; amestec fitochimic îmbogățit în polifenoli, provenit din extractul de *Sambucus nigra*), pentru o internalizare celulară îmbunătățită în diferite categorii de celule tumorale. Prin încapsularea principiilor active fitochimice în nanotransportorii hibridi se are în vedere îmbunătățirea biodisponibilității principiilor active vegetale simultan cu protejarea acestora împotriva degradărilor care pot apărea în timpul metabolismului gastrointestinal și amplificarea efectelor potențial terapeutice. Din cunoștințele noastre, nu există studii în literatură care să abordeze acoperirea NLC-principii vegetale fitochimice cu albumină serică bovină. Prin urmare, **scopul acestei cercetări doctorale** a fost de **a evalua efectul țintit al NLC-Fitochimicale-BSA și al NLC-Fitochimicale nețintit** asupra **viabilității, proliferării și nivelurilor de deteriorare a ciclului celular și apoptoză** în linii celulare de adenocarcinom de colon (LoVo), sân (MCF-7) și ovarian (SKOV-3). Suprimarea celulelor tumorale de către NLC-Fitochimicale și sistemul de distribuție hibrid NLC-Fitochimicale acoperit cu BSA a fost analizată în comparație cu **două medicamente citostatice bine cunoscute**, Cisplatin și Doxorubicină (DOX). În literatura de specialitate nu au fost identificate cercetări prin care să fie evaluată, analizată și comparată acțiunea citotoxică a unui potențial fitochimic antitumoral *versus* medicamentele chimioterapeutice convenționale (de exemplu, cisplatină, doxorubicină).

Teza de doctorat intitulată „**Nanotransportori lipidici hibridi ce conțin diferite principii active vegetale cu potențial antitumoral**” conține 10 capitole, divizate în două părți, cercetare bibliografică și contribuții originale.

PARTEA I – CERCETARE BIBLIOGRAFICĂ are rolul de a expune o analiză cuprinzătoare a literaturii existente în ceea ce privește caracteristicile și abilitatea NLC de a prezenta un potențial relevant în tratamentul afecțiunilor oncologice. Această studiu documentar include patru capitole:

- **Capitolul I** debutează cu o prezentare succintă a sistemelor de distribuție a medicamentelor. Sunt abordate noțiuni de caracterizare generală a principalelor sisteme lipidice, dar și metode de obținere a acestora. Caracteristicile cheie integrate în anumite studii ce explorează potențialul antitumoral al NLC încheie acest prim capitol de literatură.
- **Capitolul al II-lea** face tranziția către sistemele NLC, adică acele formulări de transportori lipidici nanostructurați care prezintă un miez lipidic neuniform (adaptabil pentru integrarea substanțelor active lipofile) și a căror suprafață poate fi modificată cu

diferite molecule de țintire, astfel încât să se poate obține o eficiență terapeutică îmbunătățită, în special în domeniul tratamentelor oncologice. Astfel, pornind de la caracteristicile celulelor canceroase, sunt explicate mecanismele de țintire ale țesuturilor tumorale (pasiv și activ). În finalul capitolului sunt descrise studii de literatură în care sistemele NLC sunt funcționalizate cu scopul de ținti mai eficient celulele canceroase.

- **Capitolul al III-lea** este alocat cunoașterii în profunzime a structurii și proprietăților proteinei BSA, care datorită caracteristicilor sale structurale, biologice și chimice poate fi considerată un ligand eficient de țintire a celulelor tumorale. Pentru susținerea acestei idei sunt prezentate o serie de studii științifice recente în care diferiți agenți chimioterapeutici sunt încapsulați în nanoparticule de albumină, sau în alte sisteme de transport care sunt funcționalizate la suprafață cu BSA.
- În **Capitolul al IV-lea** sunt prezentate principalele aspecte legate de principiile active (piperină și extract polifenolic de *Sambucus nigra*) încapsulate în sistemele NLC descrise în prezenta teză. Capitolul conține informații legate de surse de obținere, compoziție chimică și activitate biologică.

PARTEA a II-a – CONTRIBUȚII ORIGINALE introduce inițial obiectivele cercetării, apoi se continuă cu dezvoltarea contribuțiilor originale în domeniul **obținerii, caracterizării și aplicațiile unor sisteme NLC hibride** ce încapsulează diferite principii active de origine vegetala: **i). piperina** – un principiu activ lipofilic cu efect antitumoral cunoscut, însă a cărei aplicabilitate este serios afectată de insolubilitatea acestuia în apă; **ii). extractul polifenolic de *Sambucus nigra*** – un amestec activ de principii hidrofile, cu multiple beneficii biologice (ex: activitate antioxidantă, efect antiinflamator, acțiune antitumorală etc.) care însă prezintă și el o limitare de utilizare din cauza labilității termice, dar mai ales a mediului biologic (suferă degradări în timpul metabolismului primar).

- **Capitolul al V-lea** prezintă materiile prime, metodele de sinteză și tehnicile de analiză utilizate în capitolele aferente sintezei și caracterizării sistemelor NLC.
- **Capitolul al VI-lea** expune studii privind obținerea unor materii prime ce vor fi ulterior utilizate în sinteza nanotransportorilor hibridi. Astfel, în acest capitol este descrisă izolarea piperinei, principiu activ în sistemele NLC descrise în Capitolul al VIII-lea, din boabe de piper negru și sinteza lauratului de mentil, o componentă a fazei lipidice folosită la formularea sistemelor NLC obținute în Capitolul al IX-lea.

- **Capitolul al VII-lea** detaliază studiile preliminare de optimizare a compoziției lipide – surfactanți, astfel încât să se obțină dispersii apoase de NLC ce prezintă caracteristici structurale adecvate pentru stabilirea unor interacții eficiente cu biopolimerul BSA.
- **Capitolul al VIII-lea** include rezultatele originale privind dezvoltarea și caracterizarea unor NLC convenționale și a unor NLC hibride (cu un conținut ridicat de **unt de cacao și ulei de armurariu**) ce încapsulează piperina. Capitolul abordează o caracterizare dimensională, morfo-structurală și spectroscopică a sistemelor hibride sintetizate. Activitatea terapeutică a acestor nanotransportori este evaluată prin teste *in vitro* de determinare a activității antioxidante, studii de eliberare controlată, precedate de evaluarea citotoxicității asupra a trei linii celulare canceroase: LoVo (de colon cancer), SKOV-3 (cancer ovarian) și MCF-7 (cancer de sân).
- În **capitolul al IX-lea** sunt descrise principalele rezultate obținute în urma sintezei unor NLC hibridi, prin modificarea semnificativă a compoziției miezului lipidic format dintr-un **amestec de unt de cocos, ulei de salvie și laurat de mentil**. Sistemele hibride nanotransportor obținute au fost testate pentru capacitatea lor de a coopta un amestec complex de fitocompuși polifenoli prezenți în extractul de *Sambucus nigra*. Ulterior caracterizării structurale și fizico-chimice, proprietățile anti-tumorale sunt determinate *in vitro* prin teste de citotoxicitate, analiza apoptozei pe liniile celulare LoVo, SKOV-3 și MCF-7 și modificarea ciclului celular.
- **Ultimul capitol (X)** integrează concluziile finale și principalele contribuții originale aduse prin tematica abordată în prezenta teză de doctorat.

Rezultatele cercetărilor originale au fost diseminate prin publicarea a **4 articole în jurnale cotate ISI** (3 în jurnale internaționale și unul național), ce cumulează un factor de impact FIC = 14,4. De asemenea, o parte dintre rezultatele obținute au fost prezentate la o conferință internațională (sub formă de expunere orală) și la o conferință națională (sub formă de poster).

II. CONTRIBUȚII ORIGINALE

OBIECTIVELE CERCETĂRII

În ciuda dezvoltării substanțiale a NLC, efectele adverse ale medicamentelor chimioterapeutice, lipsa capacității de localizare către celulele canceroase și chimiorezistența detectată, s-au dovedit a fi principalele provocări în ceea ce privește eficiența procesului de chimioterapie. Ca atare, **asocierea nanotransportorilor lipidici de tip NLC cu biopolimerul de albumină** într-un mod eficient și optimizat, pentru a construi așa-numite „*nanoplatforme hibride pentru fitochimicale bioactive*” în vederea intensificării efectelor de țintire a celulelor tumorale, reprezintă o abordare nouă, cu un impact pozitiv asupra **îmbunătățirii** biodisponibilității orale și pentru sporirea eficacității antitumorale. În completare, **amestecurile fitochimice** reprezintă surse valorase de principii bioactive care pot manifesta efecte sinergice.

Pornind de la conceptul că celulele tumorale pot fi afectate ținut prin modificarea suprafeței sistemelor de distribuție nanostructurate și având în vedere interesul din ce în ce mai mare pentru substanțele active vegetale (fitochimicale) care promovează sănătatea, **prezentarea teza de doctorat a avut ca SCOP** investigarea adaptabilității unor sisteme **nanotransportor lipidice conventionale (NLC) dar și hibride** (lipido-polimerice, NLC acoperite cu BSA, NLC-BSA) **de a coopta diferite principii bioactive**, pentru a îmbunătăți penetrarea și țintirea unor celule tumorale și a spori eficacitatea terapiei antitumorale. Principiile bioactive selectate în prezenta teză de doctorat sunt: **piperina** – alcaloid extras din piperul negru, cu multiple beneficii farmacologice, care însă sunt limitate datorită proprietăților sale și modului în care este metabolizată, și **extractul de *Sambucus nigra*** - un amestec fitochimic bogat în compuși bioactivi, ce pot constitui o alternativă la terapia oncologică tradițională.

Pentru a susține ipotezele de lucru experimental și a atinge scopul urmărit în prezenta teză de doctorat, au fost parcurse câteva **OBIECTIVE** care au vizat:

- I.** Izolarea și caracterizarea unui principiu bioactiv din piperul negru, *Piperina*. Sinteza și caracterizarea *lauratului de mentil*.
- II.** Optimizare obținere NLC convențional și NLC decorat cu polimer; caracterizarea și urmărirea diferiților parametri de formulare, stabilitate și concentrație de biopolimer.
- III.** Obținerea și caracterizarea morfo-structurală a NLC convenționali și a NLC acoperiți cu BSA, încărcăți cu piperină și respectiv cu extract de soc negru/*SambucusN*

(NLC-Pip, NLC-Pip-BSA, NLC-*SambucusN*, NLC-*SambucusN*-BSA), în ceea ce privește dimensiunea particulelor, morfologie, potențial Zeta, eficiența încapsulării fitochimicalelor, FT-IR și spectroscopie de fluorescență.

- IV. Evaluarea unor activități biologice prin determinarea *in vitro*** a unor proprietăți specifice precum activitate antioxidantă, profil de eliberare, citotoxicitate, influența asupra ciclului celular etc. Atribuirea comparativă a efectului antitumoral al diferitelor categorii de NLC (viabilitate celulară, proliferare, nivel de deteriorare a ciclului celular și apoptoză) a fost realizată prin utilizarea unor linii de celule tumorale, ex: celule de cancer de sân MCF-7, colon LoVo și celule de adenocarcinom ovarian SKOV-3, iar eficacitatea lor a fost comparată cu medicamentele de chimioterapie convenționale, Doxorubicină și Cisplatin. Din cunoștințele noastre, **acest studiu este primul care explorează potențialul combinatoriu al *Sambucus Nigra* și al transportatorilor lipidici nanostructurați decorați cu albumină ca noi nanopurtători durabili pentru a susține terapia țintită anti-tumorală, în special pentru **terapia sinergică a colonului, ovarian și/sau de sân.****

CAPITOLUL AL V-LEA

MATERIALE ȘI METODE

5.1. Materiale și reactivi

Pentru obținerea sistemelor de tip NLC liber (fără principiu activ), a celor încărcate cu diferitele principii active, dar și a celor acoperite cu BSA, s-au folosit următorii compuși și materii prime:

- **Lipide solide:** Monostearat de gliceril (MSG), unt de cacao, unt de cocos. MSG a fost achiziționat de la Cognis GmbH (Monheim am Rhein). Untul de cacao și cel de cocos au fost cumpărat de la Plafar, având drept producător compania Green Sense.
- **Lipide lichide:** Ulei de armurariu (UA), Ulei de salvie (US), Laurat de mentil. Uleiurile au fost achiziționate de la Texron Plimon S.L.U. (Barcelona, Spania). Lauratul de mentil a fost sintetizat și caracterizat în laborator (vezi capitolul al VI-lea).
- **Surfactanți:** Dioctil sulfosuccinat de sodiu (AOT), lecitină (PC), Tween 20 (TW20), colat de sodiu (NaCh), Poloxamer 188 (P188). TW20 a fost furnizat de Merck (Darmstadt, Germania). NaCh, P188 și AOT au fost achiziționate de la Sigma Aldrich Chimie GmbH (Munich, Germania). Lecitina a fost furnizată de Alfa Aesar (Karlsruhe, Germania)
- **Modificatori de suprafață:** albumină bovină serică (BSA) achiziționată de la Sigma Aldrich Chimie GmbH (Munich, Germania)
- **Principii active:** piperina, extract de *Sambucus Nigra*. Piperina a fost extrasă și caracterizată în laborator (vezi capitolul al VI-lea). Extractul de *Sambucus Nigra* a fost furnizat de compania A.C. Helcor, Baia Mare, Romania.

În timpul caracterizării fizico-chimice a NLC obținuți s-au folosit următorii reactivi și solvenți: clorură de sodiu, etanol, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), reactiv Folin-Ciocalteu, acid galic, acid 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) (ABTS), dimetilsulfoxid (DMSO), persulfat de potasiu au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich Chemie GmbH.

Linii celulare tumorale au fost achiziționate de la American Type Culture Collection (ATCC). În timpul testărilor biologice *in vitro* s-au folosit următorii reactivi: DOX, mediu de cultură DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), Cisplatină (Cis-Pt), L-Glutamină (Glu), soluție tampon fosfat (PBS)/1mM EDTA, Penicilină (100 unități/mL), Ser fetal bovin (SFB), iodură de propidiu (PI) și Rnase A achiziționate de la Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

5.2. Sinteza transportorilor NLC de tip hibrid

Pentru sinteza sistemelor NLC s-a folosit metoda pre-emulsiei în topitură cuplată cu omogenizarea la presiune ridicată. Pe scurt, **faza lipidică** topită (ce conține amestecul de lipide și principiile active lipofile) și **faza apoasă** (ce conține surfactanții și principiile active hidrofile) au fost amestecate la aceeași temperatură (72 °C). Pre-emulsia rezultată a fost păstrată sub amestecare energetică la 72 °C timp de 20 de minute, apoi supusă unei etape de omogenizare cu grad înalt de forfecare (HSH) și apoi unei etape de omogenizare la presiune ridicată (HPH) timp de 3 minute și 17 secunde la 500 bar. Pentru îndepărtarea apei și obținerea NLC sub formă solidă, nanoemulsiile obținute anterior sunt supuse procesului de liofilizare folosind un echipament Alpha 1-2 LD Freeze Dry System, Germania, ulterior congelării timp de 24 de ore la -25 °C. Parametrii de liofilizare au avut loc la 55 °C și 0,05 mbar timp de 55 de ore.

Pentru obținerea sistemelor hibride, adică acele sisteme în care suprafața transportorilor lipidici nanostructurați este acoperită cu albumina bovină serică, un volum de dispersie obținută în urma HPH este amestecat sub agitare cu un volum de soluție de BSA de diferite concentrații, apoi agitate până se ajunge la temperatura camerei.

5.3. Caracterizarea structurală, morfologică și funcțională a sistemelor de NLC

Sistemele NLC sintetizate au fost caracterizate din punct de vedere structural, morfologic, dar și din punct de vedere al activității biologice. Astfel, au fost determinați parametrii care determină dimensiunea particulelor și stabilitatea coloidală (DLS și potențial Zeta) și morfologia particulelor (TEM). De asemenea, interacțiunile din diferitele componente ale sistemelor au fost evaluate prin metode spectroscopice. Funcționalitatea sistemelor obținute a fost apreciată prin teste de eliberare *in vitro*, prin măsurarea activității antioxidante, dar și prin teste pe trei tipuri de celule tumorale (colon – LoVo, mamă – MCF-7 și ovarian – SKOV-3).

5.3.1. Determinarea mărimii și distribuției de dimensiuni

Determinarea diametrului mediu al particulelor (Zave) și a indicelui de polidispersitate (PdI) s-a efectuat folosind un instrument Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments Inc., Worcestershire, UK) echipat cu un laser cu stare solidă ($\lambda = 690$ nm) ce înregistrează sub un unghi de împrăștiere de 90°, la o temperatură de $25 \pm 0,1$ °C. Pentru a evita efectele de împrăștiere repetată, probele au fost diluate obținând astfel un semnal optim. Dimensiunea particulelor a fost obținută prin medierea distribuției intensităților rezultate în urma a trei măsurători individuale.

5.3.2. Determinarea potențialului Zeta

Potențialul Zeta a fost măsurat folosind instrumentul instrument Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments Inc., Worcestershire, UK). Analiza a fost efectuată în celule capilare specifice, iar dispersiile au fost diluate cu apă distilată, iar apoi cu soluție NaCl 0,9% pentru a atinge o conductivitate de 50 $\mu\text{S/cm}$. Încărcătura electrică a sistemelor a fost determinată pe baza ecuației Helmholtz – Smoluchowski (ecuația 5.1), unde μe – mobilitate electroforetică, η – viscozitatea mediului și ε – constanta dielectrică.

$$\zeta = \frac{\mu e \cdot \eta}{\varepsilon} \quad (5.1)$$

5.3.3. Analiza morfologiei particulelor

În cadrul acestei teze câteva sisteme de NLC și NLC hibride care au prezentat caracteristici optime în ceea ce privește structura și proprietățile, au fost selectate pentru analiza microscopică, în cadrul căreia s-a utilizat un aparat Hitachi HD 2700 ce îmbină microscopia de baleiaj cu cea de transmisie. Pregătirea probelor constă în diluarea dispersiilor cu apă distilată și apoi depozitarea acestora pe rețele standard TEM de cupru cu strat subțire de carbon, iar studiile au fost efectuate utilizând aparatul în modul TEM, dar și în modul contrast Z sau HAADF (High Angle Annular Dark Field Mode).

5.3.4. Spectroscopie de infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)

În timpul studiilor descrise în această teză, spectrele IR ale transportorilor liofilizați au fost înregistrate cu un spectrometru Bruker Vertex 70, echipat cu dispozitiv orizontal pentru reflexie atenuată (ATR) și cristal de diamant, pe o fereastră spectrală de 4000-400 cm^{-1} .

5.3.5. Spectroscopie de fluorescență

Spectrele de fluorescență au fost înregistrate folosind un Spectrofluorometru Jasco FP-650 (Tokio, Japonia) echipat cu un microcomputer pentru înregistrarea datelor. Probele au fost excitate cu radiație având o lungime de undă de 285 nm.

5.3.6. Determinarea eficienței de încapsulare a principiilor active prin spectroscopie UV-Vis

În prezenta lucrare, au fost determinate prin spectroscopie UV-Vis eficiențele de încapsulare pentru principiile active fitochimice, respectiv piperină și extractul de *Sambucus Nigra*. În acest scop s-a utilizat un spectrofotometru UV – Vis Jasco V670 (Tokio, Japonia).

Determinarea eficienței de încapsulare a piperinei

Determinarea piperinei prin spectroscopie UV-Vis are la bază realizarea curbei de calibrare a acesteia în domeniul de concentrații 1 – 10 µg/mL, prin măsurarea probelor etalon (probe de concentrație cunoscută) la lungimea maximului de absorbție $\lambda = 342$ nm, în alcool etilic, față de o probă martor ce conține doar etanol.

Pentru determinarea piperinei încapsulate în nanotransportori s-a utilizat următoarea procedură experimentală: 0,5g NLC liofilizat au fost dispersați într-un volum minim de etanol (1 mL). Probele au fost supuse centrifugării (într-o centrifugă Sigma 2K15, Osterode am Harz, Germania), la 13000 rpm, timp de 15 minute. Ulterior, s-a analizat prin spectroscopie UV-Vis, cantitatea de piperina din supernatant și folosind ecuația de regresia a curbei de calibrare s-a determinat concentrația piperinei. Această concentrație a fost ulterior transformată în masă de piperină încapsulată.

Determinarea eficienței de încapsulare a extractului de *Sambucus Nigra* prin metoda Folin-Ciocalteu

Pentru determinarea experimentală a cantității de polifenoli încapsulată în NLC, s-a realizat inițial curba de calibrare cu acid galic. În acest scop, într-un balon cotat de 100 mL, s-a preparat o soluție stoc de concentrație 200 mg/L, apoi prin diluție s-au obținut soluțiile etalon cu concentrații cuprinse între 10 și 100 mg/L. Pentru realizarea reacției cu reactivul F.-C., în baloane cotate de 5 mL, 0,5 mL soluție de acid galic și 0,5 mL soluție reactiv Folin-Ciocalteu 10% au fost omogenizați timp de 4 minute, apoi au fost adăugați 4 mL de soluție de Na₂CO₃ 7,5%. Soluțiile obținute au fost păstrate la întuneric timp de o oră, pentru definitivarea reacției. Ulterior probele au fost analizate cu ajutorul spectrofotometrului Jasco V-650, la $\lambda = 765$ nm.

Pentru determinarea polifenolilor din NLC metodologia experimentală optimizată include următoarele etape:

- ✓ 0,15 g NLC liofilizat au fost suspendați în 1 mL de apă distilată, cu agitare ușoară
- ✓ centrifugare (5 min, 15.000 rpm)
- ✓ recoltare 0,5 mL supernatant NLC care au fost tratați cu 2,5 mL soluție de reactiv F.-C. 10%; 2 min. agitare
- ✓ adăugarea a 2 mL soluție de Na₂CO₃ 7,5%
- ✓ definitivare reacție 1h, la întuneric
- ✓ înregistrarea spectrelor de absorbție la $\lambda = 765$ nm.

5.3.6. Evaluarea *in vitro* a capacității de inhibare a radicalilor liberi

În vederea determinării *in vitro* a activității antioxidante ale NLC sintetizați în această teză s-au folosit două metode spectrale, DPPH și ABTS.

Metoda DPPH

Din punct de vedere practic metoda presupune amestecarea unei soluții etanolice de DPPH de concentrație 40 µg/mL cu o soluție etanolică de NLC de concentrație 10 mg/mL, urmată de un timp de incubare de 30 de minute. Soluția finală a fost analizată folosind un spectrofotometru Jasco V-650, la $\lambda = 517$ nm, iar capacitatea de inhibare a radicalilor DPPH a fost calculată folosind relația 5.8, unde A_p – absorbanta probei analizate, iar A_M – absorbanta matorului. Probele mator au fost obținute înlocuirea soluției de NLC cu etanol.

$$Inh(\%) = \left(1 - \frac{A_p}{A_M}\right) \cdot 100 \quad (5.8)$$

Metoda ABTS

Metoda de analiză are la bază modificarea culorii probei, datorită anihilării $ABTS^{+}$, modificare ce poate fi urmărită spectrofotometric la o lungime de undă $\lambda = 734$ nm. Radicalii au fost generați prin amestecarea unei soluții apoase de ABTS 7mM cu o soluție apoasă de $K_2S_2O_8$ 2.45 mM în raport volumetric 1:1. Pentru definitivarea reacției, amestecul celor două soluții a fost menținut la frigider peste noapte, apoi normalizată prin diluare cu etanol până la o absorbanta de 0,7 la $\lambda = 734$ nm ($ABTS_N$).

Odată ce radicalii cationici cu timp de viață lung au fost obținuți, pentru testarea probelor NLC s-a amestecat un volum de soluție etanolică de NLC liofilizat de concentrație 5 mg/mL cu un volum de soluție $ABTS_N$. Măsurătorile au fost efectuate cu ajutorul spectrofotometrului Jasco V-650 după 4 minute de agitare, la $\lambda = 734$ nm.

5.3.7. Evaluarea *in vitro* a profilului de eliberare al principiului activ

Profilul de eliberare *in vitro* al piperinei a fost evaluat folosind metoda sacilor de dializă. Astfel, 5 mL de dispersie NLC într-un sac de dializă (MW = 12-14 kDa) ce este sigilat și introdus într-un vas ce conține 50 mL de mediu receptor (etanol:apă = 1:1), aflat sub agitare magnetică continuă la 37 °C și 300 rpm (Figura 5.19B). Eliberarea a fost monitorizată timp de 5 ore, prin prelevarea periodică a câte 0,5 mL de mediu receptor ce au fost analizați prin spectroscopie UV-Vis pentru determinarea concentrației de piperină. După fiecare prelevare, cei 0,5 mL de probă au fost înlocuiți cu 0,5 mL mediu receptor proaspăt.

5.3.8. Testarea *in vitro* a citotoxicității (metoda MTS)

Pentru determinările *in vitro* au fost folosite plăci cu baza plată cu 96 de godeuri (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) și kit-ul CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Progenia, Madison, WI, USA). Fiecare godeu a fost cultivat cu 10^4 celule în 100 μ L, timp de 24 de ore la finalul cărora supernatantul a fost înlăturat. În continuare celulele au fost tratate 24/48 de ore cu concentrații crescătoare de NLC. La sfârșitul timpului de incubare, 20 μ L de reactiv de colorare conținând MTS și PES (phenazine ethosulfate) au fost adăugate în fiecare godeu. Plăcile au fost incubate, în continuare, 4 ore la 37 °C, cu agitare ușoară la fiecare 15 minute. Reducerea compusului tetrazolic la formazan a fost evaluată spectrofotometric la $\lambda = 492$ nm folosind un cititor de godeuri Dynex (Dynex Technologies MRS, Chantilly, VA, USA).

Viabilitatea celulelor a fost calculată prin comparare cu celulele netratate (considerate 100% viabile) folosind ecuația 5.9, unde: $Abs_{\text{celule tratate}}$ – absorbanta celulelor tratate, $Abs_{\text{celule netratate}}$ – absorbanta celulelor netratate, $Abs_{\text{mediu de cultură}}$ – absorbanta mediului de cultură.

$$\text{Viabilitate celulară, \%} = \frac{Abs_{\text{celule tratate}} - Abs_{\text{mediu de cultură}}}{Abs_{\text{celule netratate}} - Abs_{\text{mediu de cultură}}} \cdot 100 \quad (5.9)$$

5.3.9. Analiza în timp real a citotoxicității (metoda RTCA)

Celulele au fost însămânțate în 16 plăci E-Plates (ACEA Biosciences, USA) ce conțin 100 μ L mediu de cultură format din DMEM suplimentat cu L-glutamină 2mM și ser fetal bovin 10%. Curbele de creștere au fost înregistrate automat în timp real de către sistemul xCELLingence până la atingere unui CI mai mare ca 1 (în general 24 de ore). Ulterior formulările NLC au fost adăugate și curbele au fost înregistrate folosind programul informatic RTCA 2.1.2. Prin monitorizarea variației CI în timp se poate genera profilul specifice fiecărui medicament ce este dependent de mecanismul biologic de acțiune al principiului activ.

5.3.10. Analiza apoptozei prin citometrie în flux

În cadrul studiilor expuse în această a fost folosit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, produs de Becton Dickinson Biosciences. În acest sens, 10^5 celule au fost suspendate într-un tub, în 100 μ L soluție tampon, apoi au fost colorate simultan, la întuneric, cu 5 μ L Annexin V – FITC și 5 μ L PI timp de 15 minute. Ulterior colorării, 400 μ L de soluție tampon au fost adăugați în tub pentru a obține o concentrație optimă citometriei în flux. Procentele de

evenimente apoptotice au fost măsurate pe baza datelor înregistrate de către un citometru în flux de tipul FACS Canto II (Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, CA, USA). Folosind programul informatic DIVA 6.2 s-au putut decela celulele viabile (răspuns negativ FTIC și negativ PI; FTIC-PI-) de celulele necrotice (FTIC+PI+) și celulele aflate în apoptoză timpurie (FTIC+PI-) de cele aflate în apoptoză târzie.

5.3.11. Analiza ciclului celular prin citometrie în flux

Pentru analiza ciclului celular, 10^6 celule fixate în etanol au fost spălate cu PBS, apoi suspendate în 350 μ L PBS. Au fost adăugați 50 μ L soluție RNase A 10 mg/mL și celule au fost incubate la 37 °C timp de 10 minute. Ulterior s-au adăugat 100 μ L soluție PI 100 mg/mL și incubate încă 10 minute la 37 °C. Probele au fost analizate folosind citometrul FACS Canto II, iar analiza datelor a fost făcută folosind programul informatic ModFIT.

5.4. Izolarea și caracterizarea piperinei din boabe de piper negru

Instalația de extracție a fost formată dintr-un balon cu fund rotund, prevăzut cu un extractor Thielepappe, încălzire și agitare magnetică. Deasupra extractorului a fost montat un refrigerent ascendent. În balonul cu fund rotund au fost introduși 300 mL solvent de extracție, în timp ce în extractor au fost introduse 60 g de piper negru proaspăt măcinat pe un strat de vată. Solventul a fost încălzit la reflux, timp de 6 ore, iar debitul de curgere din extractor a fost reglat astfel încât stratul de piper să fie tot timpul imersat în solvent. La sfârșitul timpului de extracție, extractul alcoolic a fost evaporat la sec. Reziduul obținut a fost dizolvat în 20 de mL soluție de KOH în izopropanol 0,1 g/mL. Piperina a fost precipitată din soluția izopropanolică folosind apă distilată. După o operație de filtrare, piperina a fost purificată prin operația de recristalizare din izopropanol.

Analiza TLC s-a făcut prin depunerea unei cantități mici de probă pe plăcuțe de silicagel și eluarea acestora cu un amestec de toluen : acetat de etil = 7 : 3.

Punctul de topire al Piperinei s-a determinat prin termoanaliză cu ajutorul unui microscop "Polytherm A" (microscop cu încălzire prin plită Boëtius) conectat la un dispozitiv de încălzire cu control de temperatură de la Wagner&Munz, München, Germania.

Analiza FTIR a fost realizată folosind aparatul Bruker VERTEX 70.

Spectrele RMN au fost înregistrate utilizând spectrometrul Bruker AVANCE III HD 600 MHz (Bruker, Rheinstetten, Germany) ce funcționează la frecvența de rezonanță de 600,12 MHz pentru nucleul ^1H , echipat cu un cap de probă z-gradient cu detecție inversă multinucleară (BBI) de 5 mm.

5.5. Sinteza și caracterizarea lauratului de mentil

Sinteza esterului mentilic al acidului lauric a fost realizată folosind metoda Neises modificată [11]. 0,01 mol de acid gras și 0,001 mol de N,N-dimetilaminopiridină (DMAP) au fost dizolvate în 25 mL de clorură de metilen. S-a adăugat apoi 0,01 mol de mentol și soluția a fost răcită la 0 °C. Ulterior, s-a introdus 0,01 mol de N,N-diciclohexilcarbodiimidă (DCC) și amestecul rezultat a fost agitat la 0 °C timp de 5 minute și apoi la temperatura camerei timp de 3h. Precipitatul a fost filtrat, iar supernatantul a fost evaporat sub vid (10 mmHg) pentru a obține un reziduu. Reziduul a fost ulterior dizolvat într-o cantitate mică de clorură de metilen, iar orice precipitat suplimentar care s-a format a fost îndepărtat prin filtrare. Soluția a fost spălată de două ori cu 25 mL de acid clorhidric 0,5 N, urmată de uscare sub presiune redusă. Produsul brut a fost purificat prin cromatografie pe coloană de silicagel. Eluția a fost efectuată folosind un amestec gradient de EE/EP. Evaporarea solventului din fracția eluată cu un raport 1:9 de solvenți, a condus la un compus analitic pur.

Analizele TLC s-au efectuat prin eluție cu EE:EP = 1:3, iar plăcuțele au fost dezvoltate, după caz fie prin imersare în soluție de verde de brom crezol, fie prin imersare în soluție alcoolică de acid fosfowolframic, urmată de încălzire pe plită până la apariția spoturilor negre.

Analiza spectroscopică a fost realizată într-o manieră similară cu cea utilizată în cazul piperinei.

CAPITOLUL AL VI-LEA

Extracția piperinei și sinteza lauratului de mentil

Acest capitol prezintă obținerea unor materii prime, ce au fost utilizate ulterior pentru sinteza sistemelor NLC. Astfel, piperina a fost utilizată drept principiu activ în formulările descrise în capitolul al VII-lea, iar lauratul de mentil a făcut parte din faza lipidică a unor sisteme descrise în capitolul al VIII-lea.

6.1. Extracția piperinei din boabe de piper negru

Obținerea piperinei, principalul alcaloid cu proprietăți biologice din plantele de *Piper nigrum* și *Piper longum*, s-a efectuat printr-o operație de extracție solid-lichid, folosind în locul metodei clasice Soxhlet, un extractor Thielepappe. Construcția acestei piese permite o curgere continuă a solventului proaspăt prin substrat, permițând o extracție mai rapidă, ce utilizează și o cantitate mai mică de solvent. Principalele etape ale acestui proces sunt: măcinarea boabelor de piper, extracția propriu-zisă, concentrarea extractului și saponificarea impurităților acide, precipitarea piperinei sub forma unui solid fin alb-gălbui și recrystalizarea acesteia în formă pură din alcool izopropilic sub formă de cristale cu punct de topire de 127 – 128 °C.

În ceea ce privește selecția solventului, s-au testat cloroformul și alcoolul izopropilic. Cei doi solvenți prezintă o diferență majoră în ceea ce privește selectivitate. În Figura 5A se observă că, deși conform literaturii [12] solubilitatea piperinei în cloroform este ridicată (588 mg/mL), selectivitatea acestuia în timpul procesului de extracție este scăzută, astfel încât analiza TLC a extractului arată prezența a 5 compuși principali. Pe de altă parte, izopropanolul este un solvent foarte selectiv, din care izolarea piperinei s-a realizat ușor cu un randament de izolare de aproximativ 3% (comparativ cu metoda Soxhlet, când randamentul de izolare a fost mai mic de 1% pentru același timp de extracție)

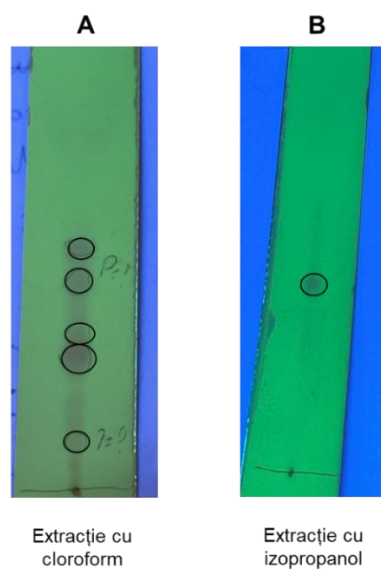


Figura 1: Analiza TLC a extractului în cloroform (A) și izopropanol (B)

6.2. Analiza spectroscopică a piperinei

Confirmarea structurii și purității cristalelor de piperină s-a realizat prin spectroscopie de infraroșu și spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară.

Spectrul ATR-FTIR (Figura 2) pune în evidență prezența tuturor benzilor caracteristice structurii piperinei (de exemplu: benzile de la 1579 cm^{-1} și 1522 cm^{-1} confirmă prezența sistemului de duble legături conjugate).

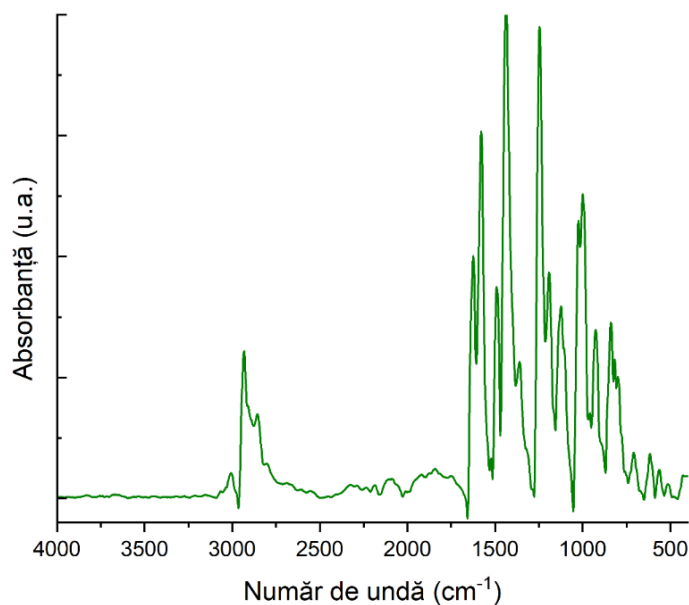


Figura 2: Spectrul FTIR al piperinei izolate

Pentru o analiză completă s-au înregistrat și spectrele de RMN clasice de tip ^1H -RMN și ^{13}C -RMN, cât și cele bidimensionale precum COSY (**H**omonuclear **C**orrelation **S**pectroscopy), HMQC (**H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**oherence) și HMBC (**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation) pentru o atribuire cât mai precisă a fiecărui semnal din spectrele unidimensionale.

Spectrul ^1H -RMN conține 3 regiuni distincte, în funcție de substructura piperinei din care fac parte (benzodioxol, piperidină sau sistemul dienic). Spectrul de carbon a fost în coformitate cu formula moleculară a piperinei și a permis identificarea carbonului amidic. În plus tehnicile 2-D au permis atribuirea exactă a fiecărui. Tabelul 1 prezintă sumarul atribuirilor făcute.

Tabelul 1: Atribuirile semnalelor din spectrele RMN ale piperinei

Indice	^{13}C (δ [ppm])	^1H (δ [ppm], m, J[Hz], I)	COSY	HMBC
1	165,39	-	-	4, 9
2	148,15	-	-	8, 10, 11
3	148,07	-	-	
6	130,99	-	-	10, 5/7
4	142,43	7,39 (ddd, $J = 14,7$; 9,2; 1,1 Hz, 1H)	5/7, 9	5/7
5	138,17	6,75 – 6,68 (m, 2H)	4	4, 8, 11
7	125,33			4, 8, 9
8	122,45	6,88 (dd, $J = 8,1$; 1,7 Hz, 1H)	10	7, 10, 11
9	120,03	6,43 (d, $J = 14,6$ Hz, 1H)	4	4, 5
10	108,44	6,77 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H)	8	8, 11
11	105,63	6,97 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H)	-	7, 8
12	101,23	5,96 (s, 2H)	-	-
13/14	46,87/43,20	3,52 (br. s, 2H)/3,63 (br. s, 2H)	15/16	15, 16, 17
15/16	26,70/25,59	1,61 – 1,54 (m, 4H)	13/14	13, 14, 17
17	24,62	1,69 – 1,62 (m, 2H) /	13/14	13, 14, 15, 16

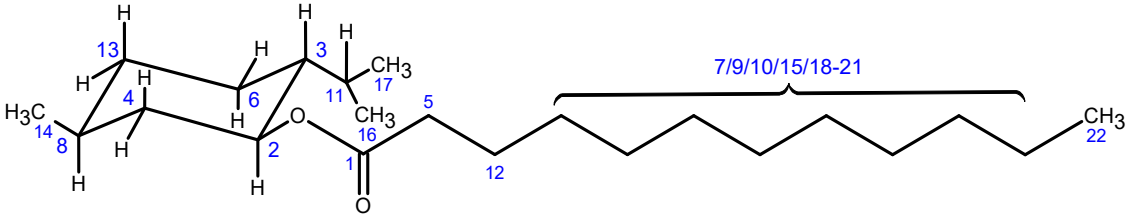
6.3. Sinteza și caracterizarea lauratului de mentil

Sinteza lauratului de mentil s-a realizat folosind esterificarea Steglich, ce folosește drept agent de cuplare didciclohexilcarbodiimda (DCC) și N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) drept

catalizator, deoarece această reacție are loc în condiții mai blând comparativ cu esterificarea clasică Fischer ce poate duce la reacții secundare.

Instalația este formată de dintr-un balon cu fund rotund prevăzut cu agitare magnetică și septum. Modul de lucru este și el la fel de simplu, presupunând amestecarea reacțanților inițial la 0 °C apoi la temperatura camerei, urmată de filtrare, neutralizarea compuşilor și în final cromatografie pe coloană pentru obținerea esterului pur. Sinteza a decurs cu randament de aproximativ 88%, iar analizele spectrale au arătat obținerea unui compus pur. Tabelul 2 prezintă atribuirile semnalelor din spectrele RMN obținute în urma unei analize similare cu cea folosite în cazul piperinei.

Tabelul 2: Atribuirile semnalelor din spectrele RMN ale octanoatului de mentil

			
Indice	¹³ C (δ[ppm])	¹ H (δ[ppm], m, J[Hz], I)	COSY
1	173,49	-	-
2	73,87	4,67 (td, <i>J</i> = 10,9, 4,4 Hz, 1H)	4e, 4a, 3
3	47,04	1,36 (tt, <i>J</i> = 11,9; 11,1; 3,5; 2,9 Hz, 1H)	2, 13a
4	40,97	a: 0,95 (q, <i>J</i> = 12,0 Hz, 1H)	4a, 4e, 8
		e: 2,03 – 1,93 (m, 1H)	2, 13e, 4a
5	34,78	2,27 (td, <i>J</i> = 7,3; 1,1 Hz, 2H)	12
6	34,30	a: 1,72 – 1,64 (m, 2H)	3, 6e, 13e
		e: 0,91 – 0,81 (m, 10H)	-
8	31,91	1,53 – 1,44 (m, 1H)	4a, 14
11	26,25	1,90 – 1,81 (m, 1H)	3, 16, 17
12	25,16	1,63 – 1,58 (m, 2H)	5
13	23,43	a: 1,05 (qd, <i>J</i> = 14,1; 12,5; 4,3 Hz, 1H)	13e, 6e, 6a, 3
		e: 1,72 – 1,64 (m, 2H)	3, 6e
14	22,68	0,91 – 0,81 (m, 10H)	-
16	20,76	0,91 – 0,81 (m, 10H)	-
17	16,29	0,75 (d, <i>J</i> = 7,0 Hz, 3H)	11, 16
18	14,11	0,91 – 0,81 (m, 10H)	-
7/9/10/15/ 18-21	31,38/29,61/29,60/29,49/29,34/29,2/ 29,14/22,03	1,33 – 1,22 (m, 16H)	-

Observație: Notățiile a și e se referă la atomii de hidrogen aflați în poziții axiale, respectiv ecuatoriale.

CAPITOLUL AL VII-LEA

Studii preliminare de optimizare a compoziției NLC

Conform literaturii de specialitate [13,14], selecția surfactanților joacă un rol esențial în controlul dimensiunii particulelor și asigură stabilitatea fizică a sistemului coloidal. Astfel, în acest capitol sunt prezentate studiile ce au fost efectuate cu scopul de a optimiza amestecurile de surfactant folosite în formulările NLC astfel încât acestea să prezinte caracteristici ce vor duce la obținerea unei dispersii coloidale cu dimensiuni potrivite, cu stabilitate ridicată și care să asigure o legare a BSA cât mai eficientă.

7.1. Optimizarea formulărilor NLC pentru încapsularea piperinei

Pentru identificarea unei compoziții optime surfactanți : amestec lipidic, care să poate încapsula piperina, s-au supus evaluării inițiale patru formulări conform Tabelului 3. Aceste formulări au fost propuse astfel încât raportul masic între lipidele solide și cele lichide să fie constant 7:3, iar amestecul de surfactanți să reprezinte 2% din formularea finală. În plus se poate observa variația raportului între cele 3 tipuri de surfactanți.

Tabelul 3: Formulări libere de NLC (fără principiu activ încapsulat)

Nume probă	Fază lipidică			Fază apoasă		
	MSG (g)	UC (g)	UA (g)	AOT (g)	PC (g)	TW20 (g)
NLC-surf.1	3,5	3,5	3	0,5	0,5	1
NLC-surf.2	3,5	3,5	3	0,7	0,3	1
NLC-surf.3	3,5	3,5	3	0,3	0,7	1
NLC-surf.4	3,5	3,5	3	0	0,3	1,7

Selecția formulărilor optime s-a bazat pe utilizarea datelor obținute în urma analizelor DLS și de potențial electrocinetic. De exemplu, NLC-surf. 1 formează o dispersie stabilă cu diametre ale particulelor de aproximativ 183 nm, relativ constante în timp. Pe de altă parte, NLC-surf. 2 duce la obținerea unei dispersii cu dimensiuni mai mari, care în decurs de o săptămână crește și mai mult sugerând apariția proceselor de agregare. Această ipoteză este confirmată și de valoarea PdI. Remarcabile au fost rezultatele obținute în cazul NLC-surf. 3

care se dovedește a fi una dintre cele mai stabile formulări din cele testate, datorată conținutului ridicat de PC, care conform literaturii [15] îmbunătățește stabilitatea miezului lipidic. Surprinzătoare sunt și rezultatele obținute în cazul NLC-surf. 4 care, deși a avut potențialul Zeta mai scăzut decât celelalte formulări, a fost cea mai uniformă dispersie dintre toate sistemele testate.

În concluzie, compoziția amestecului de surfactanți influențează semnificativ stabilitatea și caracteristicile formulărilor NLC. **NLC-surf. 3 și NLC-surf. 4 se dovedesc ca fiind cele mai stabile formulări datorită raporturilor optimizate de agenți tensioactivi, ce echilibrează eficient stabilizarea sterică și electrostatică.** Aceste două formulări au fost apoi supuse acoperiri cu BSA, rezultatele experimentale fiind descrise în capitolul al VIII-lea.

7.2. Optimizarea formulărilor NLC în vederea încapsulării extractului polifenolic de *Sambucus nigra*

Similar cu metodologia expusă în cazul sistemelor testate pentru încapsularea piperinei, și pentru încapsularea extractului polifenolic de *Sambucus nigra* au fost propuse tot patru formulări inițiale, conform Tabelului 4. Amestecul de surfactanți a fost în principal format din NaCh, TW20 și PC, însă în două dintre acestea o cantitate redusă de TW20 a fost înlocuită cu P188, ce datorită structurii sale, poate induce împiedicări sterice suplimentare și poate avea un efect sinergic în reducerea dimensiunii particulelor [16].

Tabelul 4: Formulări de NLC studiate în vederea utilizării lor ulterioare pentru captarea extractului de *Sambucus nigra*

Nume probă	Fază lipidică			Fază apoasă				C _{SI} * (mg/mL)
	MSG (g)	CB (g)	US (g)	NaCh (g)	PC (g)	TW20 (g)	P188 (g)	
NLC-1	3,5	3,5	3	0,2	0,3	2	-	3,8
NLC-2	3,5	3,5	3	0,3	0,7	1,5	-	7,7
NLC-3	3,5	3,5	3	0,2	0,3	1,7	0,3	3,8
NLC-4	3,5	3,5	3	0,3	0,7	1,35	0,15	7,7

* C_{SI} – concentrația de surfactanți ionici, raportată la volumul final al dispersiei, 130 mL

Rezultatele analizei dimensiunilor de particule arată că în cazul formulărilor cu o concentrație mare de surfactanți ionici, se obțin particule cu diametre mai mici ce se mențin chiar și după două săptămâni la frigider (de exemplu, în cazul NLC-2 s-au obținut particule cu diametrul imediat după sinteză de 128 nm vs. 122 nm după două săptămâni). Pe de altă parte,

în cazul formulărilor cu conținut redus de surfactanți ionic scăzut, se obțin particule cu dimensiuni mai mari, cu tendință de creștere în timp (de exemplu, în cazul NLC-1 s-au obținut particule cu diametrul imediat după sinteză de 165 nm vs. 175 nm după două săptămâni). Aceste rezultate sunt întărite și de valorile PDI, dar și de cele ale potențialelor Zeta, unde formulările NLC-2 și NLC-4 prezintă valori absolute mai mari, comparativ cu NLC-1 și NLC-3.

Toate cele 4 formulări au fost acoperite cu BSA, prin amestecarea unui volum de dispersie cu un volum de soluție apoasă de BSA 40 mg/mL, în raport 3:1 (v/v), respectiv 1:1 (v/v). Rezultatele arată că legarea BSA de suprafața NLC nu influențează semnificativ dimensiunile particulelor aflate în suspensie. Pe altă parte, valorile potențialului Zeta suferă schimbări majore, astfel încât pentru majoritatea dispersiilor se observă o scădere a valorii absolute, datorată neutralizării parțiale ale sarcinilor de la suprafața particulelor.

În concluzie, pentru formarea unui strat proteic dens la suprafața particulelor raportul potrivit între dispersie și soluția de BSA este 1:1.

CAPITOLUL AL VIII-LEA

Transportori lipidici nanostructurați acoperiți cu albumină serică bovină capabili să modifice ciclul celular în diferite tipuri de cancer

În acest capitol este descrisă obținerea și testarea transportorilor lipidici nanostructurați simpli/hibridi în care a fost încapsulată piperina. Acest subiect este important deoarece nanosistemele de administrare al acestui alcaloid permit îmbunătățirea efectelor fitofarmaceutice, care prin administrare sub formă liberă, sunt limitate datorită solubilității scăzute în apă, a efectului extensiv de prim pasaj și toxicității la concentrații ridicate. Potențialul antitumoral al NLC încărcat cu piperină (cu și fără BSA) a fost evaluat asupra viabilității, proliferării și influenței ciclului celular ale celulelor de tip LoVo (cancer de colon), MCF-7 (cancer de sân) și SKOV-3 (cancer ovarian), și comparat cu două medicamente citostatice bine cunoscute, cisplatin (Cis-Pt) și Doxorubicină (DOX).

8.1. Optimizarea compoziției de surfactanți și a albuminei pentru obținerea a noi formulări BSA – NLC

Pe baza rezultatelor obținute în secțiunea 7.1, s-au propus spre acoperire cu BSA două formulări, conform Tabelului 5. Acoperirea NLC cu BSA s-a realizat prin amestecarea unui volum egal de NLC și soluție apoasă de BSA de diferite concentrații (între 1 și 20 mg/mL).

Tabelul 5: Compoziția probelor de transportori lipidici nanostructurați

Denumire probă	Faza lipidică, g			Faza apoasă, g		
	MSG	UC	UA	AOT	PC	TW20
NLC-I	3,5	3,5	3	0	0,3	1,7
NLC-II	3,5	3,5	3	0,3	0,7	1

Analiza DLS

În urma evaluării diametrului mediu al nanotransportorilor acoperiți cu BSA (Figura 3), se observă un raport masic de surfactant TW20:PC:AOT = 1:0,7:0,3 duce la formarea de particule cu $Z_{ave} \sim 150$ nm, ce nu variază semnificativ la creșterea cantității de BSA. În ceea ce privește stabilitatea dispersiilor coloidale, toate sistemele sintetizate prezintă valori cuprinse

între -52 mV și -80 mV, cu mențiunea că formulările din seria II (ce conțin TW20-PC-AOT) prezintă caracteristici dimensionale și de stabilitate mai bune decât formulările din seria I.

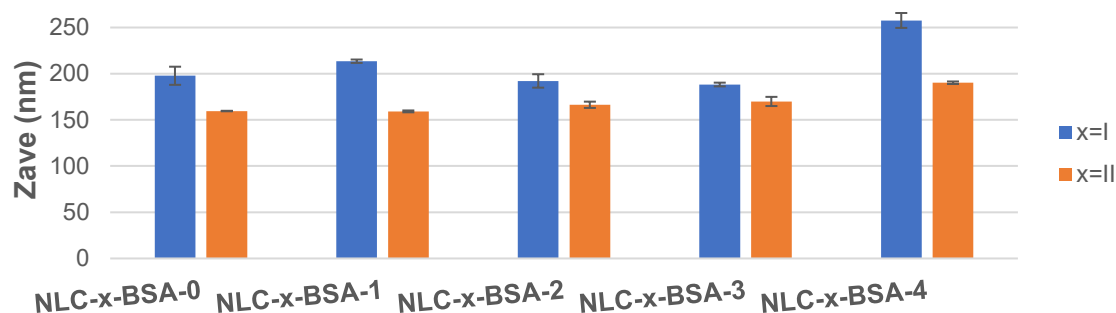


Figura 3: Valorile diametrelor medii obținute în urma analizei DLS a probelor de NLC acoperite cu BSA

**NLC-x-BSA-0 sunt sisteme NLC fără BSA*

Analiza FTIR

Toate spectrele NLC solide au prezentat benzi caracteristice similare, atât pentru BSA cât și pentru componentele fundamentale ale NLC. S-a putut observa creșterea intensității benzilor BSA, odată cu creșterea concentrației, concomitent cu intensificarea benzilor de vibrație de la $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ și $\sim 3450\text{ cm}^{-1}$ (deformarea unghiulară a O-H și N-H) ce este în concordanță cu apariția legăturilor de hidrogen între BSA și grupările funcționale aflate în proximitatea spațială a surfactanților. În plus, în spectrele NLC-BSA, valorile specifice ale benzii amidei I, au fost ușor deplasate în comparație cu BSA pură. Aceste deplasări pot fi atribuite modificărilor structurii proteinei (de exemplu, schimbări în structura secundară – creșterea numărului de regiuni cu conformație de α -helix), precum și apariției unor legături de hidrogen slabe formate între BSA și grupele funcționale ale surfactanților utilizați în prepararea NLC. Modificările în structura proteinei sunt compatibile cu rezultatele din literatura de specialitate [17].

Spectroscopie de fluorescență

Sistemele NLC-II-BSA au prezentat un profil de emisie semnificativ mai puternic decât cel al BSA nativ/pur, dependent de concentrația de proteină utilizată pentru acoperirea NLC (Figura 4). Aceste intensificări pot fi atribuite pe de o parte efectului nanometric, și pe de altă parte datorită cantității de BSA utilizată pentru acoperirea NLC.

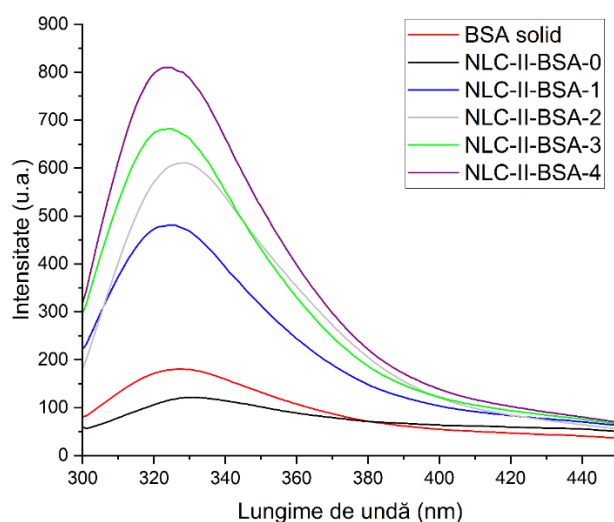


Figura 4: Spectrele de emisie fluorescentă ale NLC-II-BSA-1/2/3/4 comparativ cu NLC fără BSA (NLC-II-BSA-0) și BSA.

8.2. Nanotransportori lipidici acoperiți cu albumină bovină serică și încărcăți cu piperină

Dimensiune și aspecte morfologice

Toate NLC-urile hibride preparate au prezentat o dimensiune medie < 140 nm, considerată adecvată pentru nanotransportori destinați administrării de medicamente. În plus, stabilitatea fizică a fost menținută la un nivel ridicat pentru toate NLC-Pip acoperite cu BSA, valorile potențialelor Zeta înregistrate fiind în jur de -60 mV. Morfologia sferică a NLC-Pip-BSA și a NLC-Pip neacoperite cu BSA a fost observată în micrografiile STEM (Figura 5).

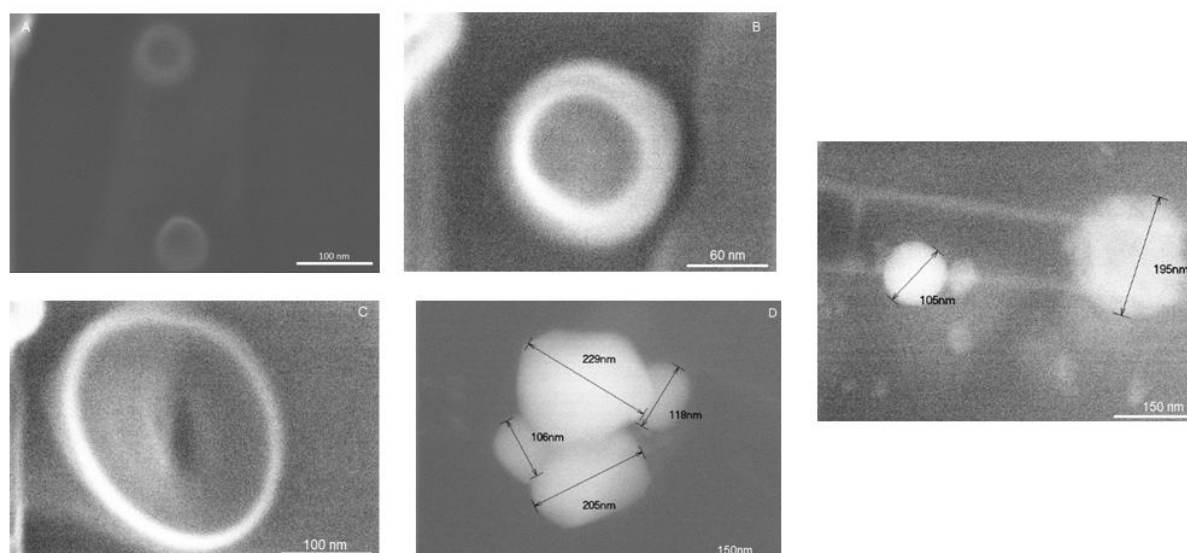


Figura 5: Imagini STEM ale NLC-III-Pip-BSA-3 care arată formarea coroanei BSA la suprafața particulelor NLC (A-C); Imagini STEM ale NLC-III-BSA-0 care arată morfologia sferică și diametrul în conformitate cu analiza DLS (D,E)

Caracterizare spectrală

Spectrele FTIR sunt similare cu cele ale probelor care nu au fost încărcate cu piperină. Pe de altă parte, în spectrele de fluorescență se pot observa diferențe majore (Figura 6). În primul rând, are loc dispariția maxim de emisie de la 325 nm, corespunzător BSA, fenomen numit stingerea fluorescenței ce se referă la orice proces care reduce intensitatea fluorescenței unei probe, cum ar fi reacții din starea excitată, transferuri de energie, formare de complecși în stare fundamentală sau fenomene de coliziune [18]. Simultan se observă apariția unui maxim de emisie fluorescentă, dependentă de concentrația de BSA, la aproximativ 430 nm, ce este de fapt emisia fluorescentă a piperinei. Aceste schimbări sugerează un transfer de energie de la BSA către Pip prin interacțiuni intermoleculare de tip dipol-dipol.

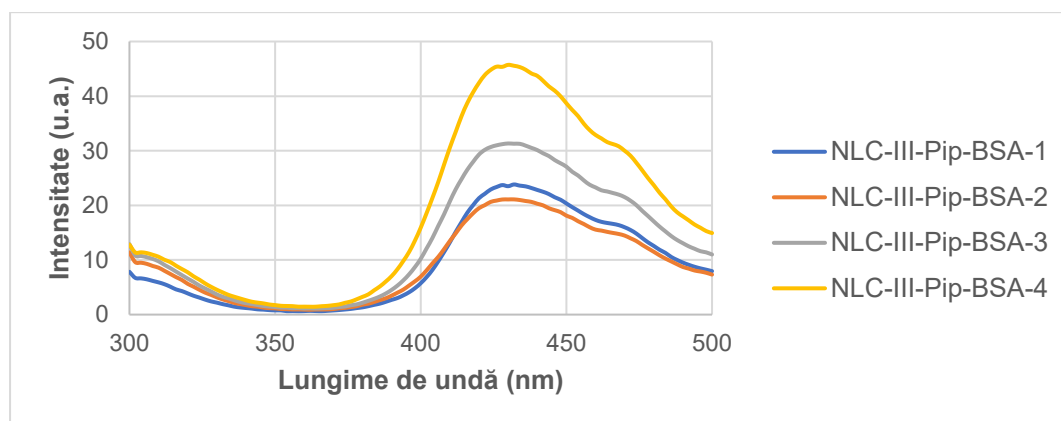


Figura 6: Spectrele de emisie de fluorescență ale NLC-Pip-BSA

8.3. Testarea *in vitro* a NLC convenționali și a celor acoperiți cu BSA

Determinarea *in vitro* a activității antioxidante

Activitatea antioxidantă a transportorilor NLC-III-Pip a fost evaluată folosind metoda DPPH la diferite rapoarte dispersie NLC:DPPH. Rezultatele experimentale arată clar o dependență a capacității de inhibare a radicalilor DPPH de raportul dispersie NLC:DPPH, astfel încât un raport volumetric 4:1 duce la o anihilare a speciilor radicalice de până la ~56%.

Studii de eliberare *in vitro* a Piperinei din sistemele NLC cu și fără acoperire cu BSA

Profilurile de eliberare *in vitro* ale piperinei (Figura 7) arată o eliberare rapidă a piperinei, completă în 5 ore, fapt ce poate fi atribuit suprafeței specifice mari și sarcinii superficiale negative. Folosind mai multe modele cinetice, datele obținute au fost evaluate folosind mai multe modele. Astfel, cinetica eliberării Pip din NLC-III-Pip se potrivește cel mai bine cu modelul *Higuchi*, în timp ce în cazul NLC-III-Pip-BSA cel mai apropiat model este

Peppas-Korsmeyer, iar mecanismul de eliberare al Pip din NLC este guvernat de o difuzie de tip Fickian.

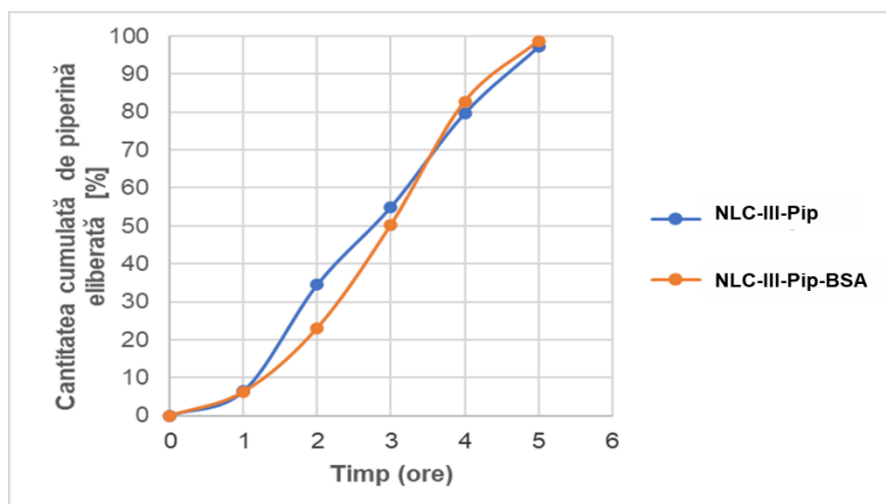


Figura 7: Profil comparativ de eliberare a Piperinei din NLC cu/fără acoperire cu BSA

8.4. Proprietățile antitumorale ale NLC-Pip în comparație cu NLC-Pip decorati cu BSA

Formulările NLC-III-Pip și NLC-III-Pip-BSA-3 au fost evaluate din punct de vedere al funcționalității biologice, prin teste de citotoxicitate (analize MTS și RTCA), apoptoză asupra celulelor tumorale și ciclu celular asupra celulelor normale *versus* celule canceroase mamare, ovariene și de colon (analiză de citometrie în flux).

Citotoxicitatea in vitro determinată pentru liniile celulare tumorale ovariene, mamare și de colon

Având în vedere prezența mai multor compuși fitochimici în nanotransportorii lipidici dezvoltati în acest studiu, pe lângă celulele tumorale testate – de colon, mamare și ovariene, care au fost incubate timp de 24 de ore, s-a urmărit de asemenea influența NLC asupra viabilității unor celulele endoteliale umane normale din vena ombilicală (HUVEC). Eficiența antitumorală a NLC-Pip/NLC-Pip-BSA a fost evaluată comparativ cu două tipuri de medicamente cu activitate chimioterapeutică cunoscută utilizate pentru tratarea mai multor tipuri de cancer – DOX și Cisplatină (Cis-Pt). Toate formulările au arătat un efect dependent de concentrație, citotoxicitatea crescând proporțional cu concentrația NLC-Pip/NLC-Pip-BSA.

În cazul celulelor LoVo, tratamentul cu concentrații de 400 $\mu\text{g/mL}$ că transportorii lipidici nanostructurați induce o moarte celulară avansată de exemplu, 15,73% \pm 0,82 viabilitate celulară pentru NLC-Pip și 21,95% \pm 1,06 pentru NLC-Pip-BSA), comparabilă și chiar mai

pronunțată în cazul NLC-Pip, față de citotoxicitatea indusă de tratamentul cu medicamentul chimioterapeutic Cis-Pt (Figura 8). Rezultatele arată un răspuns citotoxic pronunțat pentru tratamentul cu NLC-Pip de 400 $\mu\text{g/mL}$ al liniilor celulare de cancer mamar MCF-7, de exemplu, viabilitate celulară de $17,18\% \pm 0,35$ pentru NLC-Pip comparativ cu $18,01\% \pm 0,93$ pentru medicamentul chimioterapeutic doxorubicină. Comparativ cu celelalte două linii tumorale, tratamentul cu NLC a condus la o rată de supraviețuire oarecum mai mare, de exemplu, $23,71\% \pm 1,59$ viabilitate celulară pentru NLC-Pip și $41,81\% \pm 1,33$ pentru NLC-Pip-BSA. Cu toate acestea, eficiența citotoxică indusă de NLC a fost mai mare decât toxicitatea indusă de medicamentul chimioterapeutic, Cisplatin (viabilitate celulară de $32,82\% \pm 1,40$).

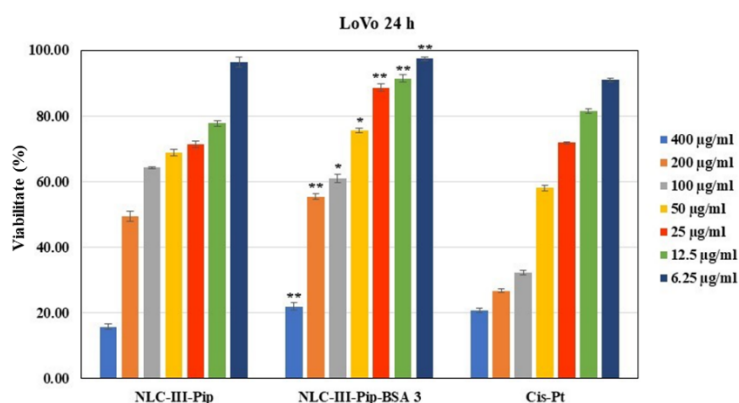


Figura 8: Viabilitatea celulelor tumorale de color LoVo

Rezultatele analizei MTS au fost completate de analiza RTCA ce presupune citirea cantitativă a numărului de celulele și monitorizarea proliferării printr-un control în timp real. În cazul celulelor LoVo, această metodă confirmă citotoxicitatea avansată indusă de NLC-Pip și NLC-Pip-BSA, puțin mai pronunțată pentru NLC-Pip decât pentru NLC-Pip acoperit cu BSA, întrucât concentrațiile de 100 și 200 $\mu\text{g/mL}$ NLC au redus drastic supraviețuirea celulară, în timp ce, pentru celelalte două linii celulare moartea celulară se observă doar pentru concentrații de 200 $\mu\text{g/mL}$.

În plus, indicii IC_{50} determinați pentru fiecare formulare, arată că NLC încărcăți cu piperină au activitate citotoxică împotriva tuturor liniilor celulare de cancer, cu valori apropiate de cele ale medicamentelor citostatice.

Influența NLC-Pip și NLC-Pip-BSA asupra procesului de apoptoză a celulelor tumorale

Evaluarea procesului apoptotic în celulele tumorale arată că prin tratarea celulelor tumorale LoVo timp de 24 de ore cu NLC-Pip (10 $\mu\text{g/mL}$) și NLC-Pip-BSA (100 $\mu\text{g/mL}$) crește apoptoza de 1,5, respectiv de 2 ori, în timp ce în cazul celulelor tumorale MCF-7 acest proces a

fost intensificat de aproximativ 8 ori pentru celulele tratate cu NLC-III-Pip, respectiv de 11 ori pentru celulele NLC-III-Pip-BSA-3 (Figura 9). Tratamentul celulelor tumorale ovariene SKOV-3 pentru 24 de ore cu NLC-III-Pip la o concentrație 10 $\mu\text{g/mL}$ a determinat o creștere de 2 ori mai mare a apoptozei comparativ cu martorul și acționează similar cu NLC-III-Pip-BSA-3 la o concentrație 100 $\mu\text{g/mL}$.

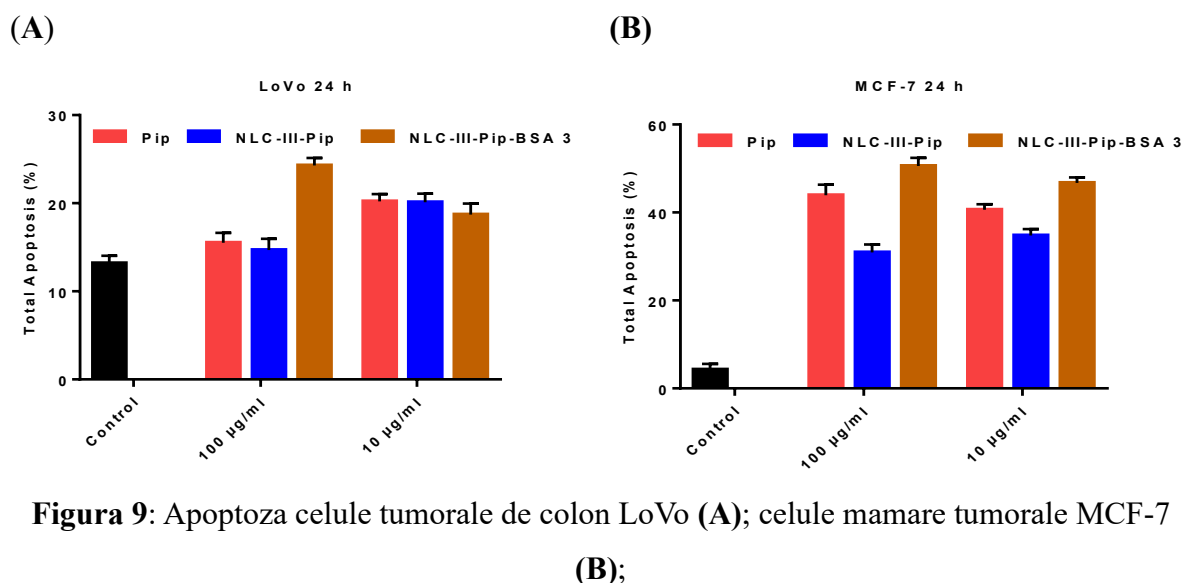


Figura 9: Apoptoza celule tumorale de colon LoVo (A); celule mamare tumorale MCF-7 (B);

Influența NLC hibrizi încărcăți cu piperina asupra ciclului celular al celulelor normale și tumorale

Efectul indus de transportorii lipidici nanostructurați hibrizi asupra ciclului celular al diferitelor celule tumorale a fost analizat comparativ prin citometrie în flux. În cazul celulelor LoVo, după un tratament de 48 de ore concentrații de 100 $\mu\text{g/mL}$ NLC-III-Pip și respectiv NLC-III-Pip-BSA-3 au asigurat o distribuție similară a fazelor ciclului celular. Pentru NLC-III-Pip-BSA-3 a fost semnalată o scădere semnificativă a fazei *S* proliferative, de exemplu, $S = 43,6\%$, comparativ cu martorul, pentru care valoarea lui *S* a fost de $75,07\%$.

Aplicarea NLC-III-Pip-BSA-3 pe celulele tumorale MCF-7 a dus la o scădere a fazei *S* proliferative (de exemplu, $23,76\%$ pentru o concentrație de 10 $\mu\text{g/mL}$ și $21,8\%$ pentru o concentrație de 100 $\mu\text{g/mL}$), comparativ cu martorul ($S = 39,45\%$). Deși tratamentul cu NLC-III-Pip după 24 de ore nu a influențat semnificativ ciclul celular al celulelor MCF-7, după 48 de ore de tratament, NLC-III-Pip (100 $\mu\text{g/mL}$) devine mai eficient în reducerea fazei *S* proliferative.

Tratamentul celulelor tumorale ovariene SKOV-3 cu NLC-III-Pip convențional și hibrid a arătat un efect supresor tumoral remarcabil, evidențiat printr-o scădere semnificativă a fazei *S*. NLC-III-Pip (100 $\mu\text{g/mL}$) și NLC-III-Pip-BSA-3 (100 $\mu\text{g/mL}$) au redus faza *S* a ciclului

celular după 24 de ore de tratament, dar după 48 de ore, efectul maxim de inhibare a fazei S ($S = 1,13\%$) a fost exercitat de NLC-III-Pip ($100 \mu\text{g/mL}$) în comparație cu martorul ($S = 22,4\%$).

8.5. Concluzii

Acest capitol prezintă obținerea și testarea unui DDS nou, de tip NLC acoperit cu BSA pentru o internalizare celulară îmbunătățită a piperinei în diverse celule tumorale. Acoperirea cu BSA s-a realizat prin crearea de interacțiuni de natură necovalentă între învelișul de surfactanți ionici și proteină. Analizele spectrale au arătat că simultan cu legarea BSA proteina suferă o modificare a structurii native. În plus, în cazul sistemelor ce conțin piperină, are loc și o relocare a sursei de fluorescență, fiind observată stingerea fluorescenței albuminei, și apariția maximului de emisie al piperinei.

Testele de citotoxicitate au arătat că NLC sintetizate au indus moartea avansată a celulelor LoVo și MCF-7, comparabil chiar cu medicamentele citostatice, în timp ce analizele de citometrie în flux, arată faptul că, moartea celulară este indusă de mecanisme diferite.

CAPITOLUL AL IX-LEA

Nanotransportori lipidicidecorați cu albumină serică bovină pentru distribuirea extractului de *Sambucus Nigra*

Capitolul al IX-lea prezintă sinteza de NLC hibride care încapsulează extract de soc negru (*Sambucus nigra*), un extract în fitocompuși, în special polifenoli și anotcianine, dar care au o biodisponibilitate foarte scăzută, ceea ce implicit conduce la un potențial terapeutic diminuat. Acest capitol are un grad ridicat de originalitate, deoarece **acest studiu – neexplorat în literatura de specialitate** – prezintă potențialul combinatoriu al *Sambucus Nigra* și al NLC decorați cu albumină drept nanosisteme fitochimice bioactive care pot susține terapia țintită anti-tumorală, cu o eficacitate terapeutică evaluată în paralel cu chimioterapeuticele convenționale, Doxorubicină și Cisplatin.

9.1. Caracterizarea fizico-chimică a NLC încărcăți cu extract de *Sambucus nigra*

Pentru sistemele ce încapsulează *Sambucus nigra* s-au folosit miezuri lipidice, unul format din lipide naturale, precum precum MSG, untul de cocos (CB) și uleiul de salvie (seria NLC-I), iar cea de-a doua este alcătuită dintr-un ester de sinteza (laurat de mentil), asociat cu unt de cocos și monostearat de glicerol (seria NLC-II), stabilizate de un amestec de surfactanți format din colat de sodiu, fosfatidilcolină și Tween 20 (Tabelul 6).

Tabelul 6: Formulările propuse pentru încapsularea extractului de *Sambucus nigra*

Denumire probă	Faza lipidică, g				Faza apoasă*, g			EE, %
	MSG	CB	US	LM	NaCh	PC	TW20	
NLC-I- <i>SambucusN</i>	3,5	3,5	3	-	0,3	0,7	1,5	88,67 ± 4,746
NLC-II- <i>SambucusN</i>	3,5	3,5	1,5	1,5	0,3	0,7	1,5	74,49 ± 6,701

* datorită caracterului hidrofîl, extractul de *Sambucus nigra* (1 g) a fost adăugat în faza apoasă

Caracterizarea DLS a arătat obținerea unor sisteme NLC libere cu diametre de aproximativ 125 nm, ce cresc ușor în timpul procesului de încorporare a extractului fitochimic. Valorile PDI unor populații lipidice cu o distribuție relativ omogenă și monodispersă. În ceea ce privește potențialul Zeta, toate NLC au prezent valori puternic negative. În cazul sistemelor tradiționale valorile potențiale Zeta sunt mai electronegative de -50 mV, în timp ce după acoperirea cu BSA,

aceste valori prezintă o tendință de micșorare a valorii absolute (între -30 și -40 mV), datorită neutralizării sarcinilor superficiale.

9.2. Analiza prin spectroscopie FTIR și de fluorescență a NLC-*SambucusN*-BSA

Analiza FTIR conduce la spectre de formă generală similară, cu benzi de vibrație caracteristice componentelor sistemului. În cazul formulărilor hibride se observă prezența celor două benzi ale BSA la valori diferite de valorile caracteristice BSA pur, ceea ce indică o modificare a structurii secundare. Această observație este în concordanță și cu intensificarea benzilor de vibrație O-H și N-H, ce indică apariția legăturilor de hidrogen.

În ceea ce privește spectroscopia de fluorescență, în cazul sistemelor hibride libere se observă o intensificare a emisiei fluorescente, comparativ cu BSA, caracteristică transportorilor de dimensiuni nanometrice, care permit mai multe centre de interacțiune și, prin urmare, generează un efect de fluorescență mai intens [19]. Prin încărcarea cu extract de *SambucusN* apare o stingere a fluorescenței, ce scade de până la două ori emisia fluorescentă a NLC. Conform literaturii, această scădere are loc datorită formării legăturilor de hidrogen între grupările hidroxil ale polifenolilor și reziduurile de aminoacizi ale BSA [20].

9.3. Evaluare *in vitro* a activității antioxidante

Activitatea antioxidantă *in vitro* a transportorilor sintetizați a fost evaluată folosind metoda ABTS. Activitatea antioxidantă a NLC-I și -II-*SambucusN* a fost semnificativ îmbunătățită prin acoperirea cu albumină. Astfel, puterea maximă de anihilare a radicalilor cationici ABTS^{•+} determinată pentru cele două categorii de NLC-hibridi a fost de $89,81 \pm 4,84\%$ și $86,01 \pm 3,07\%$ pentru NLC-I și -II *SambucusN* acoperite cu biopolimerul BSA, față de $74,47 \pm 1,15\%$ și $81,93 \pm 2,70\%$ determinate pentru NLC-I și -II-*SambucusN* fără BSA (Figura 10).

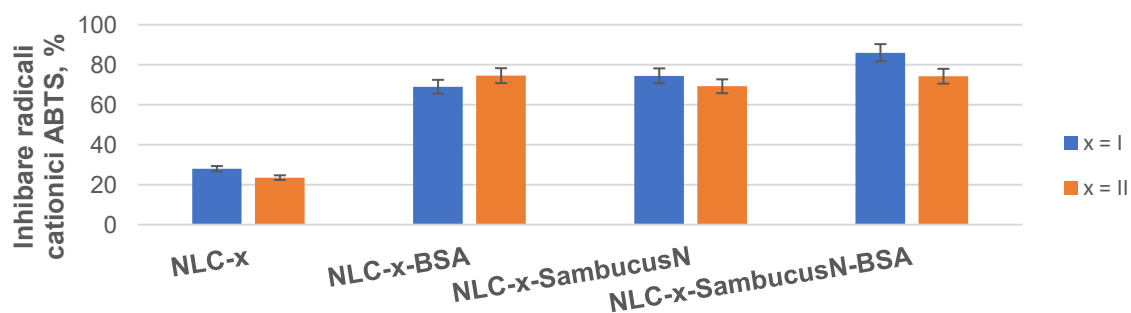


Figura 10: Activitatea de captare a cationilor radicali ABTS^{•+} de către NLC-I- și -II- *SambucusN* cu și fără BSA

Valorile IC_{50} pentru cele două NLC-uri reprezentative, au fost de 1,483 mg/mL (NLC-I-*SambucusN*-BSA) și 0,973 mg/mL (NLC-II-*SambucusN*-BSA). Aceste rezultate relevă activitatea antioxidantă superioară a NLC-II-*SambucusN*-BSA, ce include laurat de mentil în compoziția sa probabil datorită captării mai bune a unor flavonoide lipofile din *SambucusN* în amestecurile lipidice cu ester mentolat.

9.4. Testarea *in vitro* a eficacității antitumorale a sistemelor NLC obținute

Formulările sintetizate au fost evaluate pentru funcționalitatea lor biologică printr-o serie de teste, incluzând analize de citotoxicitate (MTS și RTCA), inducerea apoptozei în celule tumorale și analiza ciclului celular comparativ între celule normale și celule canceroase de sân, ovar și colon, utilizând citometria în flux.

9.4.1. Citotoxicitatea NLC-*SambucusN* convenționale și hibride decorate cu BSA

Testele pe celulele normale HUVEC au arătat că majoritatea formulărilor obținute sunt biocompatibile. Pe de altă parte. În cazul celulelor LoVo (Figura 11), s-a observat o citotoxicitate avansată la tratamentul cu 100 μ g/mL NLC-I-*SambucusN*-BSA pe o perioadă de tratament de 48 h ($21,81 \pm 1,18\%$). În cazul celulelor MCF-7, NLC-I induce moartea celulară avansată, astfel încât după 48 de tratament cu 400 μ g/mL, viabilitatea celulară este $10,32 \pm 0,97\%$. În cazul celulelor SKOV-3, eficiența NLC împotriva proliferării este destul de scăzută.

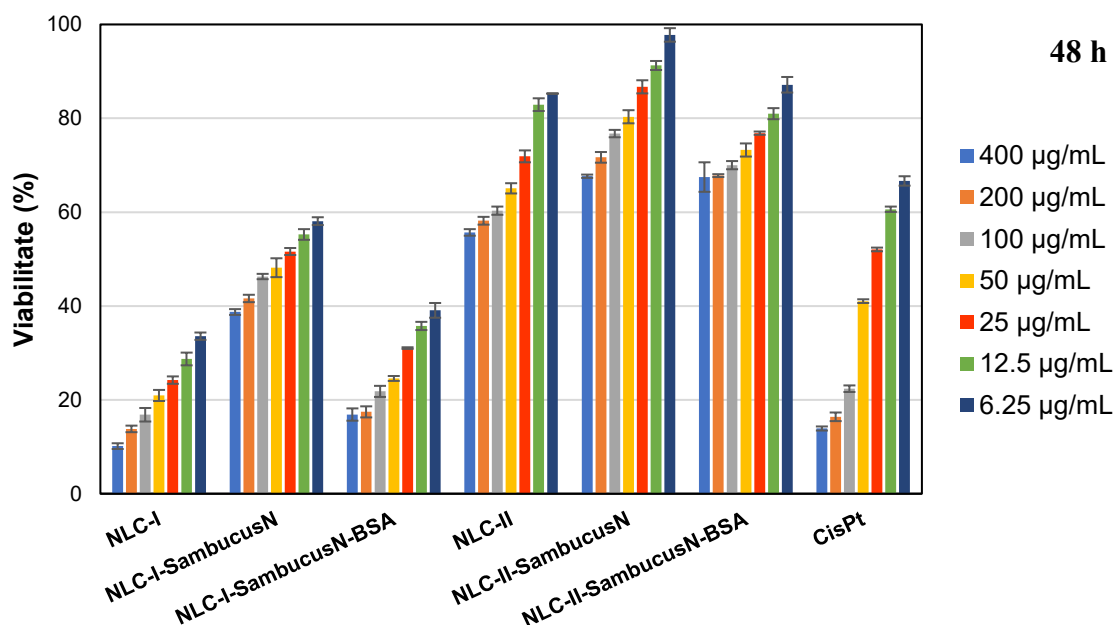


Figura 11: Efectul NLC convenționale și hibride asupra celulelor tumorale LoVo, după 48 de ore

9.4.2. Analiza în timp real a celulelor tumorale tratate cu sistemele NLC-*SambucusN*

Curbele de proliferare înregistrate pe o perioadă extinsă, de la 0 la 243 h, au fost realizate după tratamentul celulelor tumorale LoVo, MCF-7 și SKOV-3 cu concentrații de NLC ce au variat între 12,5 și 200 $\mu\text{g/mL}$.

Cea mai pronunțată acțiune antitumorală a fost manifestată asupra liniei celulare LoVo. Printre NLC analizate, NLC-I-*SambucusN*-BSA a arătat o abilitate net superioară de a stopa proliferarea celulelor tumorale LoVo.

În ceea ce privește celulele tumorale MCF-7, la o concentrație de 200 $\mu\text{g/mL}$, toate formulările produc o citotoxicitate avansată asupra celulelor tumorale, în timp ce la 100 $\mu\text{g/mL}$, NLC-I-*SambucusN* cu și fără BSA este mai eficient în inhibarea proliferării celulelor tumorale MCF-7 dacă durata tratamentului depășește 48 h.

O tendință relativ similară s-a observat și în cazul celulelor SKOV-3, când NLC-I-*SambucusN* a fost cel mai eficient la toate concentrațiile testate. În ceea ce privește NLC-II, ce conține laurat de mentil, NLC-II-*SambucusN* și NLC-II-*SambucusN*-BSA inhibă semnificativ proliferarea celulelor tumorale SKOV-3 la o concentrație de 100 $\mu\text{g/mL}$, respectiv 50 $\mu\text{g/mL}$ și un tratament prelungit de peste 48 h.

9.4.3. Efectul NLC-*SambucusN* decorate cu albumină asupra procesului de apoptoză

Pentru a analiza acțiunea toxică a acestor compuși asupra celulelor normale, NLC a fost aplicat în aceleași condiții pe celule normale HUVEC. Datele arată că NLC-I-*SambucusN*-BSA (24 h) și NLC-II-*SambucusN*-BSA (48 h) protejează celulele normale de intrarea în apoptoză comparativ cu efectul indus de NLC-I și NLC-II, indiferent de timpul lor de acțiune.

Rezultatele obținute în cazul tratamentelor cu NLC-I și II-*SambucusN* cu și fără BSA asupra celulelor tumorale LoVo după 24 h de tratament, au subliniat valori moderate, de aproximativ 18% apoptoză. În schimb, tratamentul celulelor tumorale LoVo timp de 24 sau 48 h cu cele trei categorii de NLC-II, a condus la o creștere a procesului apoptotic de 2 ÷ 4 ori mai mare comparativ cu celulele netratate (control).

Indiferent de concentrația utilizată, toate tipurile de NLC-II se dovedesc a fi mai eficiente în ceea ce privește apoptoza celulelor tumorale MCF-7 decât efectul indus de seria NLC-I, în special pentru tratamentele de 24 h. Un tratament prelungit, de 48 h cu NLC-I și NLC-I-*SambucusN* a avut o eficacitate notabilă în ceea ce privește apoptoza celulelor MCF-7; de exemplu, procesul apoptotic este amplificat de 5 ori, în cazul utilizării a 50 $\mu\text{g/mL}$ NLC, comparativ cu grupul de control.

Rezultatele determinate pentru celulele tumorale SKOV-3 (Figura 9.16D) au arătat că tratamente cu 50 µg/mL NLC-I, NLC-I-*SambucusN* și NLC-I-*SambucusN*-BSA activează procesul de apoptoză a celulelor tumorale ovariene atât după 24 h, cât și după 48 h. NLC-II acționează într-un mod similar, amplificând procesul apoptotic al celulelor tumorale comparativ cu controlul.

9.4.4. Influența NLC-*SambucusN* și NLC-*SambucusN*-BSA asupra ciclurilor celulare

Rezultatele obținute prin citometrie în flux indică faptul că tratamentul cu nanotransportorii lipidici hibridi cu și fără extract de *SambucusN* nu influențează semnificativ fazele ciclului celular în celulele normale HUVEC. Pe de altă parte, celulele tumorale LoVo netratate arată o fază *S* mai mare, ceea ce indică o activitate intensă de proliferare. Când NLC-I, NLC-I-*SambucusN* și NLC-I-*SambucusN*-BSA sunt aplicate la concentrații de 50 µg/mL, ele induc oprirea ciclului celular în faza *G1* a celulelor tumorale LoVo.

În mod similar, tratamentul celulelor tumorale MCF-7 cu 50 µg/mL de NLC-I și NLC-II oprește eficient ciclul celular în faza *G1* și induce o scădere dramatică a fazei *S*. NLC-II-*SambucusN* și NLC-II-*SambucusN*-BSA demonstrează o eficiență mai mare decât seria de NLC de tip I, preparată cu ulei de salvie, atât pentru o perioadă de timp de 24 h cât și pentru 48 h.

Toate tipurile de nanotransportori lipidici și proteino-lipidici acționează prin reducerea fazei *S* a celulelor SKOV-3, însoțită de o creștere a fazei *G2*. Aceste rezultate subliniază faptul că NLC-I și NLC-II ar putea inhiba proliferarea celulelor tumorale SKOV-3 prin blocarea ciclului celular în faza *G2*. Tratamentul celulelor SKOV-3 timp de 48 de ore cu cele trei forme de NLC-I și NLC-II nu modifică semnificativ fazele distribuției ciclului celular.

9.5. Concluzii

În acest capitol a fost analizat pentru prima dată efectul sinergic al extractului polifenolic de *Sambucus nigra* și al transportorilor lipidici nanostructurați hibridi acoperiți cu BSA, ca sistem țintit de tratament pentru cancerul de colon, sân și ovar. Formulările, bazate pe două tipuri de miezuri lipidice, au prezentat dimensiuni nanometrice omogene și stabilitate coloidală ridicată. Sistemele din seria NLC-I au încorporat mai eficient extractul vegetal și au prezentat o activitate antioxidantă îmbunătățită, potențată de prezența albuminei. Testele *in vitro* au evidențiat un efect citotoxic pronunțat asupra celulelor tumorale (LoVo, SKOV-3, MCF-7), comparabil cu tratamentele convenționale, prin inducerea apoptozei și blocarea ciclului celular în fazele *G1* sau *G2*, în funcție de tipul celular și formulare.

CAPITOLUL AL X-LEA

Concluzii finale și contribuții personale

10.1. Concluzii finale

Cercetările originale, concretizate prin rezultatele expuse de-a lungul capitolelor VI ÷ IX, au dezvoltat următoarele:

În cadrul **Capitolului al VI-lea** „*Extracția piperinei și sinteza lauratului de mentil*” s-au obținut materii prime importante pentru dezvoltarea unor nanosisteme hibride, cu abilități remarcabile pentru terapia țintită anti-tumorală. Astfel, alcaloidul bioactiv – Piperina a fost izolat din boabele de piper negru printr-o metodă de extracție solid-lichid și recristalizată din izopropanol, iar lauratul de mentil a fost obținut printr-o esterificare Steglich. Ambii compuși au fost caracterizați prin metode clasice de chimie organică, iar structurile lor au fost confirmate prin tehnici spectroscopice (FTIR și RMN).

Capitolul al VII-lea “*Studii preliminare de optimizare a compoziției NLC*” a evaluat comportamentul unor compoziții variabile de lipide și surfactanți (ionici, neionici și amfifilici), necesar pentru a echilibra interacțiunile de natură fizică (ex: forțe de natură hidrofobă, atracții electrostatice, legături de hidrogen) și a stabili interacții eficiente cu biopolimerul BSA. Rezultatele analizelor DLS (determinate atât după sinteză, dar și după două săptămâni de depozitare) au aratat că formulările NLC obținute cu concentrație mai mare de surfactanți ionici (NaCh și PC) au tendința să conducă la obținerea de sisteme lipidice nanotransportor cu diametre mai mici, iar pentru o acoperire totală a nanotransportorilor este necesar un raport volumetric între dispersia NLC și soluția de BSA de 1:1.

Capitolul al VIII-lea “*Transportori lipidici nanostructurați acoperiți cu albumină serică bovină capabili să modifice ciclul celular în diferite tipuri de cancer*” a inclus rezultatele originale privind dezvoltarea și caracterizarea unor NLC convenționale și a unor NLC hibride ce încapsulează piperina, pentru o internalizare celulară îmbunătățită în diferite celule tumorale. Sistemele sintetizate au avut dimensiuni cuprinse între 50 și 400 nm, morfologie sferică și potențial Zeta suficient de negativ pentru a asigura o stabilitate corespunzătoare. Eficiența de încapsulare a fost ridicată (~81%), iar analiza spectrală a confirmat interacțiunile hidrofobe și electrostatice între NLC și albumină, și de asemenea a pus în evidență modificările structurale la nivelul BSA ce apar în timpul acestor interacțiuni. Formulările obținute au prezentat citotoxicitate și efecte de stimulare ale apoptozei, în special în celulele LoVo și MCF-7, rezultatele fiind comparabile cu cele ale medicamentelor citostatice. În plus a fost observată o

inhibare semnificativă a fazei S a ciclului celular, punând în evidență un posibil efect de țintire activă a tumorilor. Toate aceste rezultate susțin potențialul acestor nanosisteme ca vectori eficienți pentru administrarea în vivo a piperinei.

Capitolul al-IX-lea „*Nanotransportori lipidici decorați cu albumină serică bovină pentru distribuirea extractului de Sambucus nigra*” prezintă obținerea și caracterizare unor sisteme NLC convenționale, dar și hibride, în care a fost încapsulat extractul de *Sambucus nigra*. Aceste sisteme au prezentat dimensiuni sub 160 nm, distribuție omogenă și o eficiență ridicată de încapsulare a extractului, în special în prezența albuminei. Funcționalizarea cu albumină a dus la îmbunătățirea activității antioxidante și a influențat favorabil răspunsul biologic în testele pe linii celulare tumorale. Nanotransportorii au indus apoptoză și oprirea ciclului celular în celulele de colon, sân și ovar, în unele cazuri având efecte comparabile cu Cisplatina. Aceste rezultate sugerează un potențial promițător pentru utilizarea acestor sisteme în terapii oncologice sinergice și țintite.

10.2. Contribuții originale

Contribuții originale aduse prin cercetarea dezvoltată în prezenta teză de doctorat:

I. Obținerea unor noi sisteme de distribuție, lipido-proteice, cu abilități îmbunătățite de distribuție și eliberare țintită a principiilor active fitochimice. Prezenta teză de doctorat aduce contribuții notabile cu privire la exploatarea amestecurilor fitochimice bioactive, cooptate în sisteme de tip NLC hibride (lipido-proteice), în strategiile terapeutice viitoare pentru îmbunătățirea biodisponibilității și implicit a efectelor terapeutice. Rezultatele obținute încurajează potențialul combinator al NLC decorați cu albumină, încărcăți cu fitochimicale (Piperina, *Sambucus nigra*), ca **platformă eficientă ce susține procesul de distrugere a diferitelor celule tumorale**, fie prin activarea mecanismelor de blocare a ciclului celular la nivelul diferitelor etape care controlează evoluția ciclului celular, fie prin activarea căilor apoptotice.

II. Dovedirea unei eficacități anti-tumorale prin teste *in vitro* de viabilitate celulară, nivel de deteriorare a ciclului celular și apoptoză. Atribuirea comparativă a efectului antitumoral al NLC hibridi dezvoltați a fost realizată asupra unor linii de celule tumorale diferite (celule de cancer de sân/MCF-7, de colon/LoVo și celule de adenocarcinom ovarian/SKOV-3). Eficacitatea lor a fost evaluată în raport cu acțiunea a două medicamente citostatice, Cisplatină și Doxorubicină. Aplicarea NLC-urilor dezvoltate asupra liniilor celulare tumorale, a relevat o internalizare diferită a acestora, funcție de linia celulară tumorală de colon, mamar și ovarian, cu utilizarea potențială a unor căi apoptotice distincte.

Diseminare rezultate

Articole științifice

1. Sabina Ion, Florentina Olănescu, Florina Teodorescu, **Robert Țincu**, Daniela Gheorghe, Vasile I. Pârvulescu, Mădălina Tudorache, „DES-Based Biocatalysis as a Green Alternative for the l-menthyl Ester Production Based on l-menthol Acylation”, *Molecules*, **2022**, 27(6) 5273, doi: 10.3390/molecules27165273 (IF = 4,6)
2. **Robert Țincu**, Mirela Mihăilă, Mirela Bostan, Florina Teodorescu, Daniela Istrati, Nicoleta Badea, Ioana Lăcătușu, „Novel Bovine Serum Albumin-Decorated–Nanostructured Lipid Carriers Able to Modulate Apoptosis and Cell-Cycle Response in Ovarian, Breast, and Colon Tumoral Cells”, *Pharmaceutics*, **2023**, 15(4), 1125, doi: 10.3390/pharmaceutics15041125 (IF = 4,9)
3. **Robert Țincu**, Mirela Mihăilă, Marinela Bostan, Daniela Istrati, Nicoleta Badea, Ioana Lăcătușu, „Hybrid Albumin-Decorated Lipid-Nanocarrier-Mediated Delivery of Polyphenol-Rich *Sambucus nigra* L. in a Potential Multiple Antitumoural Therapy”, *International Journal of Molecular Sciences*, **2024**, 25(20), 11206, doi: 10.3390/ijms252011206 (IF = 4,9)
4. **Robert Țincu**, Ioana Sumedrea, Mădălina Tudorache, Florina Teodorescu, „Enzymatic hydrolysis of fatty acids menthyl esters in the presence of lipase enzyme”, *U.P.B. Scientific Bulletin, Series B*, in press (IF = 0,6)

Conferințe

1. **Robert Țincu**, Florina Teodorescu, Nicoleta Badea, Daniela Istrati, Ioana Lăcătușu, „Novel Hybrid Nanostructured Lipid Carrier for Piperine Encapsulation”, *22nd Romanian Internațional Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 22)*, **7-9.09.2022**, Sinaia, România;
2. **Robert Țincu**, Florina Teodorescu, „Fatty acid menthol esters – synthesis and characterization”, *Conferința Națională de Chimie – ediția XXXVI*, 04-07.10.2022, Călimănești, România.

Bibliografie selectivă

1. Sultana, A.; Zare, M.; Thomas, V.; Kumar, T.S.S.; Ramakrishna, S. Nano-Based Drug Delivery Systems: Conventional Drug Delivery Routes, Recent Developments and Future Prospects. *Med Drug Discov* **2022**, *15*, 100134, doi:10.1016/j.medidd.2022.100134.
2. Chen, Q.; Yang, Z.; Liu, H.; Man, J.; Oladejo, A.O.; Ibrahim, S.; Wang, S.; Hao, B. Novel Drug Delivery Systems: An Important Direction for Drug Innovation Research and Development. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 674, doi:10.3390/pharmaceutics16050674.
3. Zi, Y.; Yang, K.; He, J.; Wu, Z.; Liu, J.; Zhang, W. Strategies to Enhance Drug Delivery to Solid Tumors by Harnessing the EPR Effects and Alternative Targeting Mechanisms. *Adv Drug Deliv Rev* **2022**, *188*, 114449, doi:10.1016/j.addr.2022.114449.
4. Nichols, J.W.; Bae, Y.H. EPR: Evidence and Fallacy. *Journal of Controlled Release* **2014**, *190*, 451–464, doi:10.1016/j.jconrel.2014.03.057.
5. Dutta, B.; Barick, K.C.; Hassan, P.A. Recent Advances in Active Targeting of Nanomaterials for Anticancer Drug Delivery. *Adv Colloid Interface Sci* **2021**, *296*, 102509, doi:10.1016/j.cis.2021.102509.
6. Khaledian, S.; Dayani, M.; Fatahian, A.; Fatahian, R.; Martinez, F. Efficiency of Lipid-Based Nano Drug Delivery Systems in Crossing the Blood–Brain Barrier: A Review. *J Mol Liq* **2022**, *346*, 118278, doi:10.1016/j.molliq.2021.118278.
7. Müller, R.H.; Radtke, M.; Wissing, S.A. Nanostructured Lipid Matrices for Improved Microencapsulation of Drugs. *Int J Pharm* **2002**, *242*, 121–128, doi:10.1016/S0378-5173(02)00180-1.
8. Agrawal, Y.; Petkar, K.C.; Sawant, K.K. Development, Evaluation and Clinical Studies of Acitretin Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Topical Treatment of Psoriasis. *Int J Pharm* **2010**, *401*, 93–102, doi:10.1016/j.ijpharm.2010.09.007.
9. Van de Sande, L.; Cosyns, S.; Willaert, W.; Ceelen, W. Albumin-Based Cancer Therapeutics for Intraperitoneal Drug Delivery: A Review. *Drug Deliv* **2020**, *27*, 40–53, doi:10.1080/10717544.2019.1704945.
10. Asrorov, A.M.; Mukhamedov, N.; Kayumov, M.; Sh. Yashinov, A.; Wali, A.; Yili, A.; Mirzaakhmedov, S.Ya.; Huang, Y. Albumin Is a Reliable Drug-Delivering Molecule: Highlighting Points in Cancer Therapy. *Med Drug Discov* **2024**, *22*, 100186, doi:10.1016/j.medidd.2024.100186.
11. Neises, B.; Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1978**, *17*, 522–524, doi:10.1002/anie.197805221.
12. Milenković, A.; Stanojević, L. Black Pepper: Chemical Composition and Biological Activities. *Advanced Technologies* **2021**, *10*, 40–50, doi:10.5937/savteh2102040M.

13. Elmowafy, M.; Al-Sanea, M.M. Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) as Drug Delivery Platform: Advances in Formulation and Delivery Strategies. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2021**, *29*, 999–1012, doi:10.1016/j.jsps.2021.07.015.
14. Javed, S.; Mangla, B.; Almoshari, Y.; Sultan, M.H.; Ahsan, W. Nanostructured Lipid Carrier System: A Compendium of Their Formulation Development Approaches, Optimization Strategies by Quality by Design, and Recent Applications in Drug Delivery. *Nanotechnol Rev* **2022**, *11*, 1744–1777, doi:10.1515/NTREV-2022-0109/ASSET/GRAPHIC/J_NTREV-2022-0109_FIG_004.JPG.
15. H. Muller, R.; Mader, K.; Gohla, S. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery \pm a Review of the State of the Art. **2000**, *50*, 161–177.
16. Kim, M.H.; Kim, K.T.; Sohn, S.Y.; Lee, J.Y.; Lee, C.H.; Yang, H.; Lee, B.K.; Lee, K.W.; Kim, D.D. Formulation And Evaluation Of Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) Of 20(S)-Protopanaxadiol (PPD) By Box-Behnken Design. *Int J Nanomedicine* **2019**, *14*, 8509, doi:10.2147/IJN.S215835.
17. Wang, W.; Huang, Z.; Li, Y.; Wang, W.; Shi, J.; Fu, F.; Huang, Y.; Pan, X.; Wu, C. Impact of Particle Size and PH on Protein Corona Formation of Solid Lipid Nanoparticles: A Proof-of-Concept Study. *Acta Pharm Sin B* **2021**, *11*, 1030–1046, doi:10.1016/j.apsb.2020.10.023.
18. Zhang, J.; Chen, L.; Zeng, B.; Kang, Q.; Dai, L. Study on the Binding of Chloroamphenicol with Bovine Serum Albumin by Fluorescence and UV-Vis Spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2013**, *105*, 74–79, doi:10.1016/j.saa.2012.11.064.
19. Nishihira, V.S.K.; Rubim, A.M.; Brondani, M.; dos Santos, J.T.; Pohl, A.R.; Friedrich, J.F.; de Lara, J.D.; Nunes, C.M.; Feksa, L.R.; Simão, E.; et al. In Vitro and in Silico Protein Corona Formation Evaluation of Curcumin and Capsaicin Loaded-Solid Lipid Nanoparticles. *Toxicology in Vitro* **2019**, *61*, 104598, doi:10.1016/J.TIV.2019.104598.
20. Yu, X.; Cai, X.; Luo, L.; Wang, J.; Ma, M.; Wang, M.; Zeng, L. Influence of Tea Polyphenol and Bovine Serum Albumin on Tea Cream Formation by Multiple Spectroscopy Methods and Molecular Docking. *Food Chem* **2020**, *333*, 127432, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2020.127432.