

Nr. Înregistrare: 481/ 06.12.2023

RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC

Proiect PN-III-P2-2.1-PTE-2021-0303

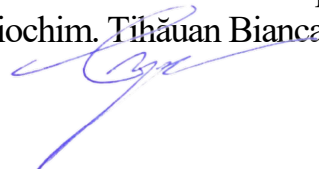
Contract nr. 95PTE/ 2022

Etapa 2023

Sisteme sinergice de principii active destinate cosmeticii regenerative
Acronim: GRACE

Avizat la Coordonator,
S.C. Sanimed International Impex S.R.L.
Reprezentant legal,
Laura Toma-Hideg

Director de proiect,
Dr. Biochim. Tihăuan Bianca-Maria



Acest document este proprietatea organizațiilor participante la proiect și nu poate fi utilizat,
reprodus, distribuit sau diseminat către terți, fără acordul prealabil al autorilor.

PLANUL DE REALIZARE AL PROIECTULUI - Etapa 2023

Anul	Etapa	Obiectivele etapei	Activitățile și subactivitățile derulate	Rezultate livrate în cadrul etapei
2023	Unică	a) Definirea funcționalității fizico-chimice și a compoziției produselor inovatoare. b) Modelarea funcționalității biologice și determinarea parametrilor tehnologici pentru obținerea produselor inovatoare	A2.1. Evaluarea afinității și stoichiometriei de legare în stare lichidă a principiilor active cu ciclodextrine	
			A2.2. Caracterizarea fizico-chimică a hidrogelurilor Col-HA și optimizarea metodelor de includere a complexșilor nou formați	
			A3.3. Prezicerea teoretică a conformațiilor de energie minimă a complexșilor de incluziune	
			A2.4. Sinteza hidrogelurilor Col-HA funcționale obținute prin includerea complexșilor supramoleculari	
			A2.5. Evaluarea analitică a gradului de eliberare a activelor din complexșii de incluziune	
			A2.6. Evaluarea acțiunii hidrogelurilor funcționalizate asupra viabilitatii unor microorganisme procariote și influența asupra unor factori de virulență fenotipici și genotipici	
			A2.7. Analiza <i>in vitro</i> a citotoxicității și a răspunsului inflamator al hidrogelurilor funcționalizate	
			A2.8. Studiul stabilității complexșilor supramoleculari incluși în hidrogeluși și evaluarea gradului de eliberare a activelor	
			A2.9. Obținerea hidrogelurilor funcționale în condiții de producție la nivel micro-pilot	
			A2.10. Diseminarea rezultatelor	

Descrierea științifică și tehnică a rezultatelor proiectului, obținute în etapa 2023

Preambul

Proiectul GRACE vizează dezvoltarea, în cadrul S.C. Sanimed Internațional Impex S.R.L., a unei game integratoare de produse destinate asistenței în regenerarea epidermei afectată de radiațiile solare, radioterapie, escare sau leziuni superficiale. Produsele finale vizate vor consta într-o matrice de bază, alcătuită din biomacromolecule biologice active (colagen și acid hialuronic), în care se vor încorpora sisteme funcționalizate destinate eliberării controlate a principiilor active (curcumină, vitamina A, C, E, acid ferulic) încapsulate în molecule gazdă de tipul ciclodextrinelor. Complexșii nou sintetizați vor fi incluși în formulări de tipul hidrogelurilor, în vederea extinderii portofoliului de produse din sfera cosmetico-medicală ale S.C. Sanimed Internațional Impex SRL, destinate domeniului cosmeticii regeneratoare. În acest sens, proiectul va stimula realizarea de investiții în cercetare – dezvoltare tehnologică din partea companiei beneficiare, precum și consolidarea potențialului de actor al companiei pe piața internă și internațională, înalt concurențială, a produselor dermato-cosmetice. În subsidiar, proiectul va dezvolta parteneriatele tradiționale ale companiei cu instituțiile de cercetare științifică, în scopul racordării cercetării aplicative românești la exigențele mediului socio-economic național și european.

În termeni concreți, proiectul GRACE vizează obținerea unei game compusă din trei produse: hidrogel uni-doza (pentru leziuni superficiale), gel cremă (pentru pielea afectată de radiații) și gel de curățare (pentru eliminarea blândă debriurilor și curățarea leziunilor superficiale).

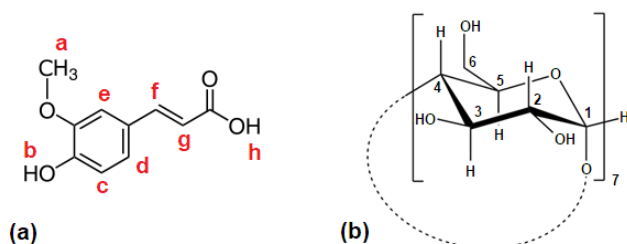
Ideea fructificată în cadrul proiectului derivă din necesitatea utilizării în managementul plăgilor superficiale de la nivelul epidermei a unor produse integratoare, bioactive, cu componente naturale, menite să favorizeze restaurarea barierei epidermale afectată în urma unor agresiuni de mică amploare, a intervențiilor medicale, sau a acțiunii unor factori fizico-chimici nocivi. Proiectul își propune dezvoltarea unei game de produse utilizabile de către non-profesioniști în dermato-cosmetică, sub forma unor soluții self care aplicabile înafara unităților sanitare, fie după externare, în managementul cicatricilor chirurgicale, fie în timpul radioterapiei, fie în cazul unor leziuni minore, situații care necesită continuarea asistenței în zona afectată.

Activitățile derulate și rezultatele obținute în Etapa 2023

A2.1. Evaluarea afinității și stoichiometriei de legare în stare lichidă a principiilor active cu ciclodextrine

Activitatea a avut ca scop analiza și interpretarea constantelor de asociere a pricipiilor active față de ciclodextrine și evaluarea stoichiometriei de legare pe baza datelor experimentale (1H RMN, ITC), precum și a gradului de complexare (RMN, difracție de raze X, IR și DSC).

Caracterizarea complexelor de incluziune prin spectroscopie ¹H NMR

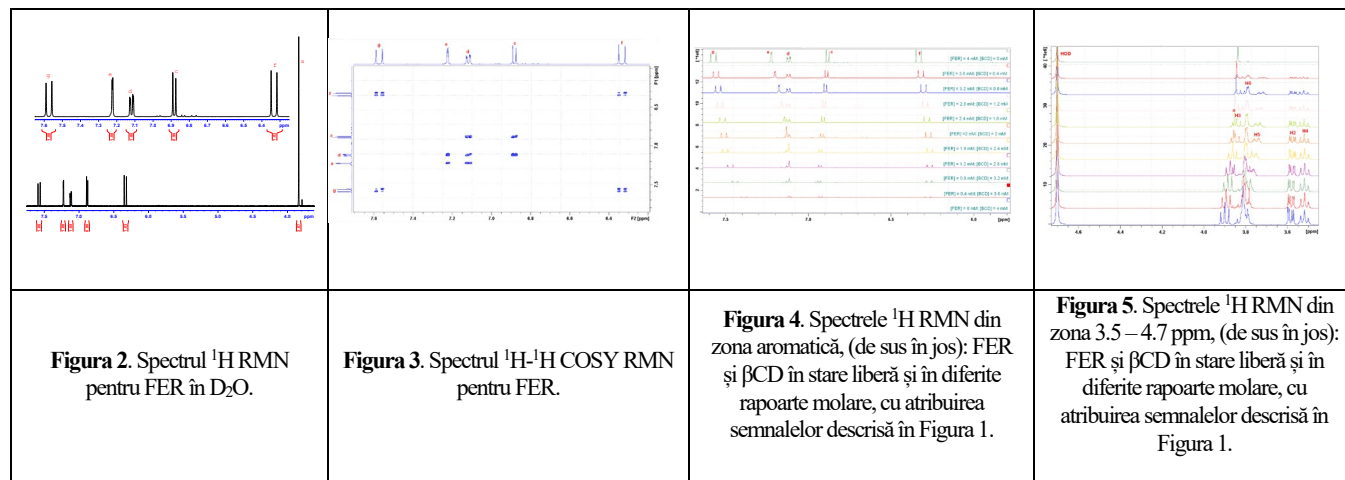


Analiza complexului de incluziune format dintre acidul ferulic (FER) și βCD s-a realizat pe diluții din soluții stoc de FER și βCD, cu concentrație de 4 mM în D₂O (apă deuterată 99,8 % D, folosită în prepararea probelor apoase. Procedul a constat în amestecarea celor două soluții la volum constant în diverse proporții astfel încât să fie acoperit un domeniu complet ($0 < r < 1$) de fracții molare $r = [X]/([G] + [H])$. X = H sau G iar [H] și [G] sunt concentrațiile moleculei gazdă (βCD) respectiv oaspete (FER). În acest mod concentrația totală $[H]_t + [G]_t = 4$ mM a fost menținută constantă pentru fiecare probă. Acest set de probe va fi folosit și pentru evaluarea constantei de asociere K.

Figura 1. a) Structura moleculei FER; b) structura moleculară a unitatii de glucoză din βCD. Numerotarea corespunde pozițiilor protonilor la care se va face referire în studiul RMN.

Toate măsurătorile ¹H NMR au fost efectuate cu spectrometrul Bruker AVANCE III care operează la o frecvență de 500.13 MHz pentru proton, echipat cu un cap de probă de bandă largă cu detecție inversă (BBO).

Procesul de incluziune a moleculelor de FER în cavitatea βCD a fost evidențiat de către modificarea deplasărilor chimice ale unor protoni caracteristici atât moleculei oaspete cât și moleculei gazde, în comparație cu deplasările chimice ale aceluiași protoni în componenții aflați în stare liberă.



În Figura 2 este prezentat spectrul ¹H RMN pentru FER, atribuirea semnalelor s-a făcut cu ajutorul spectrului bidimensional ¹H-¹H COSY RMN (Correlated Spectroscopy) prezentat în Figura 3, în care se pot pune în evidență interacțiunile intramoleculare dintre semnalele următorilor protoni: H(c) cu H(d), H(d) cu H(e) și H(g) cu H(f). Comparând spectrele din Figurile 4 și 5, se pot observa ușoare variații ale deplasărilor chimice ($\Delta\delta$) pentru diferiți protoni ai FER, respectiv H3 și H5 din βCD, evidențiind existența interacției moleculare dintre FER și interiorul cavității βCD, acest fapt fiind o indicație clară a formării complexului de incluziune FER:βCD.

Variația deplasărilor chimice $\Delta\delta = \delta_F - \delta_{obs}$ observată ne permite să utilizăm metoda variației continue în vederea determinării stoichiometriei complexului de incluziune format. În cazul nostru, această metodă se bazează pe variația indusă a deplasărilor chimice, care este direct legată de concentrația complexului de incluziune format. Astfel, dacă o mărime fizică care conține $\Delta\delta$, este reprezentată în funcție de fracția molară a moleculei gazdă sau oaspete r , (grafic Job), valoarea maximă va apare la $r_{vit} C = m/(m+n)$, unde m și n sunt rapoartele molare ale FER, respectiv ale βCD în complexul format. Această metodă a fost aplicată pentru protonii He, Hc și Hf care aparțin moleculei oaspete (FER), respectiv pentru protonii H3 și H5 care aparțin moleculei gazdă (βCD). În acest caz, graficele Job prezintă un maxim la $r = 0.5$ (Figura 6), indicând astfel existența unui complex de incluziune cu stoichiometria 1:1.

Pentru a determina gradul de legare intermoleculară între FER și βCD, a fost evaluată constanta de asociere K, care în cazul unui complex de incluziune având stoichiometria 1:1, poate fi evaluată printr-o fitare neliniară a variației observate a deplasărilor chimice ale semnalelor ¹H RMN ale FER și βCD în funcție de concentrațiile lor, conform algoritmului descris în etapa anterioară pentru complexul molecular Vit C și βCD. Astfel, constanta de asociere obținută are valoarea $K = 4.39 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, având factorul de corelare $R = 0.991$. Aceste valori indică o fitare foarte bună a datelor experimentale.

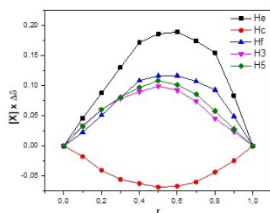


Figura 6. Graficele Job corespunzătoare variației chimice induse

Pentru a evidenția complexul molecular FER:βCD, a fost folosit un experiment bidimensional de tip ¹H-¹H ROESY RMN. În studiul de față, din spectrul 2D ROESY rezultă informații suplimentare despre modul de complexare și despre geometria structurii. O regiune extinsă a spectrului ROESY al complexului FER:βCD este prezentată în Figura 7. Spectrul 2D RMN prezintă mai multe „cross-peaks” - picuri care caracterizează interacțiuni intermoleculare între protonii H3 și H5 ai β-CD cu protoni din structura FER: (He, Hd, Hc – protoni aromatici), Hg și Hf, demonstrând astfel includerea FER în cavitatea βCD.

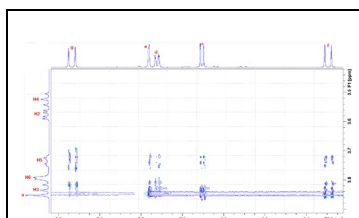


Figura 7. Spectrul 2D ROESY ¹H-¹H RMN (regiune extinsă) al complexului de incluziune FER:β-CD.

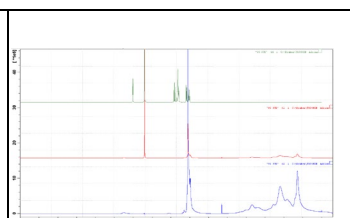


Figura 8. De sus în jos: Spectrele ¹H RMN pentru βCD, Vit E și Vit E cu suprimarea apei (secvență de puls *zgpg30*), în stare liberă.

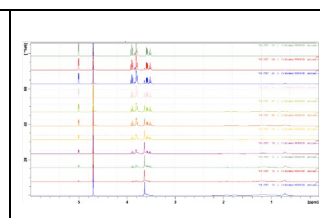


Figura 9. Spectrele ¹H RMN din zona 0 – 6 ppm (de sus în jos): βCD și Vit E în stare liberă și în diferite rapoarte molare.

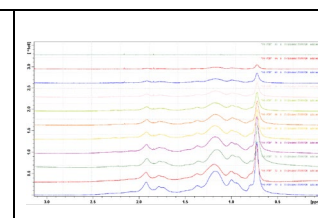


Figura 10. Spectrele ¹H RMN din zona 0 – 3 ppm (de sus în jos): βCD și Vit E în stare liberă și în diferite rapoarte molare.

În vederea studierii procesului de complexare dintre vitamina E (Vit E) și βCD în soluție prin RMN, ținând cont de gradul de solubilitate, au fost preparate două soluții stoc de Vit E și βCD, fiecare având o concentrație de 10 mM în D₂O (apă deuterată 99,8 % D, folosită în prepararea probelor apoase diluate. Așa cum reiese din figurile 8, 9 și 10, nu se pot observa variații ale deplasărilor chimice (Δδ) pentru protoni ai Vit E, și nici pentru protoni din βCD, neputând evidenția interacția moleculară dintre Vit E și βCD prin spectroscopie ¹H RMN pe probe lichide.

Calorimetria de titrare izotermă: caracterizarea complexării

Măsurătorile au fost efectuate pe un nanocalorimetru de tip NanoITC^{2G} (New Castle, Delaware, USA) la 25°C, iar analiza datelor cu software-ul NanoAnalyze (TA Instruments, New Castle, DE, USA), care furnizează grafice ale variației de entalpie per mol de injectant (kJ mol⁻¹) în funcție de raportul molar al amestecului. Datele calorimetrice corectate au fost analizate pe baza unui model de legare independent, pentru a determina valorile constantei de asociere (K) și stoichiometria legării (n), precum și modificările de entalpie și entropie (ΔH și ΔS) ale reacției. Valoarea variației energiei libere (ΔG) a fost calculată ulterior folosind următoarea ecuație: ΔG = ΔH – TΔS.

Prezentăm în continuare termogramele reprezentative utilizate în investigarea eficienței asocierii moleculare în urma interacțiunii vitaminei E (Figura 11) respectiv a acidului trans ferulic (Figura 12) cu βCD. În ambele cazurile investigate procesele de interacțiune sunt de tip exoterm.

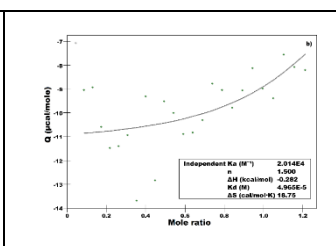
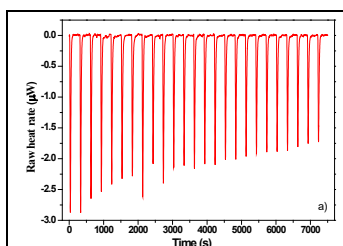


Figura 11. (a) Datele primare obținute prin injectarea soluției de vitamina E (4mM) distribuită în 10μL per injecție în soluție de βCD (1mM) la 25°C. (b) Dependența căldurii eliberate per injecție de raportul molar al partenerilor de reacție. Linia continuă corespunde curbei de fitare.

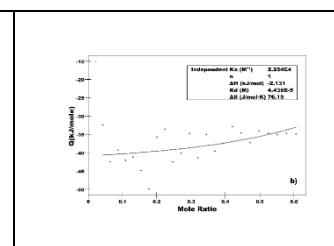
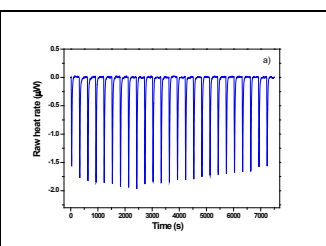


Figura 12. (a) Datele primare obținute prin injectarea soluției de acid trans ferulic (2mM) distribuită în 10μL per injecție în soluție de βCD (1mM) la 25°C. (b) Dependența căldurii eliberate per injecție de raportul molar al partenerilor de reacție. Linia continuă corespunde curbei de fitare.

Parametrii termodinamici ai procesului de legare au fost determinați pe baza datelor reprezentate în figurile de mai sus prin aplicarea unui model independent și sunt prezentați în Tabelul 1 de mai jos.

	KM ⁻¹	ΔHKJ/mol	ΔGKJ/mol	ΔSJ/molK	n
Vitamina E/βCD	2.007*10 ⁴	-1.176	-24.51	78.42	1.5
Trans Acid ferulic/βCD	2.254*10 ⁴	-2.131	-24.83	76.19	1

Valoare negativă a ΔG sugerează formarea complexelor de incluziune în soluție apoasă fiind energetic favorabil. Procesele de incluziune dintre vitamina E, respectiv a acidului trans ferulic și β CD sunt reacții exoterme ($\Delta H < 0$) cu componentă entropică favorabilă ($\Delta S > \Delta H$). Un alt factor care contribuie la valoarea negativă a variației de entalpie este eliberarea moleculelor de apă din cavitatea ciclodextrinei și includerea moleculei gazdă. Poziția diferită a grupurilor substituente de pe nucleul aromatic face diferența între dimensiunea diametrului moleculei gazdă, care influențează hidrofora interacțiunea dintre moleculele gazdă-oaspete și determină modificări ale funcțiilor termodinamice. Efectul entropiei ΔS al complexelor gazdă-oaspete este pozitiv și prezintă o contribuție semnificativă la variația negativă a energiei libere Gibbs în comparație cu efectele căldurii. Valoarea negativă a variației de entalpie $\Delta H < 0$ împreună cu valoarea pozitivă a variației de entropie $\Delta S > 0$ confirmă faptul că la procesele de legare contribuie atât interacțiunile de tip hidrofor cât și cele de tip electrostatic. Analiza datelor termodinamice indică faptul că procesele de legare sunt determinate în principal de efectul hidroforic prin eliberarea unei molecule de apă din cavitatea β -CD care contribuie pozitiv la entropie.

Din tabel se poate observa că atât vitamina E cât și acidul trans ferulic prezintă afinitate ridicată față de β CD, constantele de asociere obținute găsindu-se în același ordin de mărime și la valori apropiate. De asemenea, stochiometria complexelor de incluziune dintre vitamina E respectiv acidul trans ferulic cu β CD este 1:1 respectiv 2:1. Această discrepanță de stochiometrie poate fi atribuită structurii lor diferite.

Evaluarea activității antimicrobiene

Determinarea cantitativă a activității antimicrobiene s-a realizat prin metoda microdiluțiilor, care permite determinarea concentrațiilor minime inhibitorii (CMI). Suspensiile bacteriene ale tulpinilor standardizate *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 25992, *Candida albicans* ATCC 10321, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 au fost realizate din culturi tinere de 18-24 h, cultivate pe mediu Müller-Hinton, respectiv Sabouraud și ajustate la o densitate de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL, utilizând standardul nefelometric 0,5 McFarland.

Probele reprezentate de β -ciclodextrine încărcate cu vitamine și acid ferulic prezintă o activitate antimicrobiană bună, fiind obținute CMI-uri la concentrațiile inițiale testate, și anume, 5mg/mL pentru β -ciclodextrină complexată cu Vitamina A (BvA), 2 mg/mL pentru β -ciclodextrină complexată cu Vitamina E (BvE), 8mg/mL pentru β -ciclodextrină complexată cu Vitamina A (BvC) și 5mg/mL pentru β -ciclodextrină complexată cu Acid ferulic (BaF), cu excepția tulpinilor *Ps.aeruginosa* și *S.agalactiae* care s-au dovedit a fi susceptibile tratamentului cu CD și la concentrații mai mici. Ținând cont de faptul că aceste concentrații corespund procentelor la care au fost introduse activele în formulele finale de hidrogel și emulsie, un efect sinergic cu restul componentelor și sistemul de conservare al acestora este vizat. Chenerele roșii din figura 13 indică CMI-urile obținute.

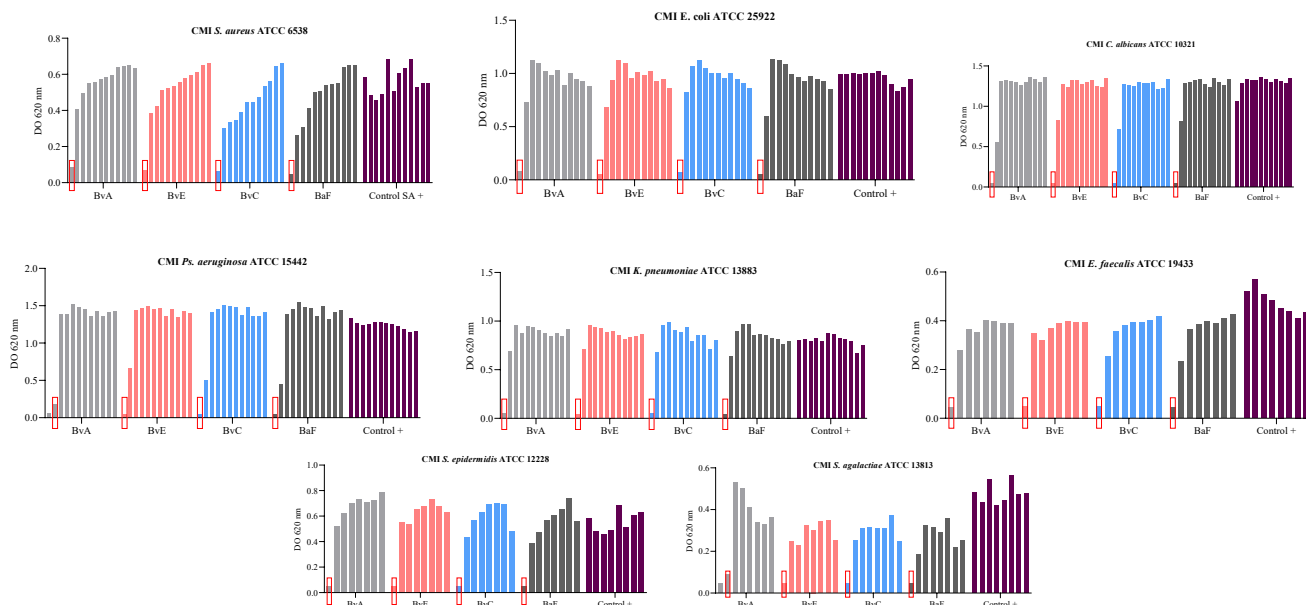


Figura 13. Concentrațiile minime inhibitorii obținute pentru activele reprezentate de β -ciclodextrine încărcate cu vitamine, în prezența tulpinilor *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 25992, *Candida albicans* ATCC 10321, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813

Activitatea antimicrobiană intrinsecă a CD-urilor [1], [2] și mai ales efectul obținut după înglobarea unor antioxidanți puternici, transformă acești complexe în super-sisteme antimicrobiene, cu potențiale aplicații medicale și alimentare. Aplicațiile ca sisteme de livrare în industria produselor cosmetice sunt mai limitate [3], aspecte care întăresc caracterul inovativ al proiectului GRACE.

A2.2. Caracterizarea fizico-chimică a hidrogelurilor Col-HA și optimizarea metodelor de includere a complexelor nou formați

Hidrogelurile, respectiv scaffold-urile collagenice obținute până în prezent în cadrul Sanimed prezintă o serie de particularități nedorite legate de stabilitate, fiind, în general, ușor degradabile termic, având rezistență mecanică scăzută și dificultăți în controlul ratelor de biodegradare, aspecte asociate distrugerii gradului de reticulare natural și al structurii de ansamblu a acestuia ca urmare a procesului de obținere [4]. Datorită acestor particularități, în biotehnologie se utilizează reticularea bioproduselor pe bază de collagen cu scopul consolidării structurii acestora. Reticularea este procesul chimic sau fizic prin care lanțurile polimerice sunt unite între ele. Acest proces îmbunătățește proprietățile mecanice ale

scaffold-urilor de collagen de prin formarea unei rețele de matrice densă [5]. În cadrul acestei activități, complexul oligozaharidic collagen-acid hialuronic (Collagen-HA) a fost obținut prin reticularea *in situ* utilizând sistemul EDC-NHS (EDC: 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimidă și NHS: N-hidroxisuccinimidă). Complexul reticular Collagen-HA a fost confirmat folosind Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (Spectrometru FTIR).

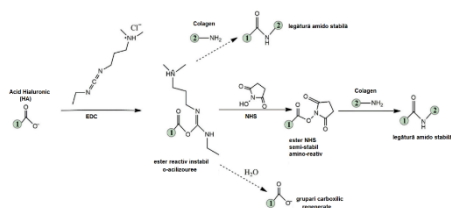


Figura 14. Ilustrarea schematica a reacției de reticulare Collagen-HA în prezența EDC/NHS.

Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a complexelor de incluziune în stare solidă
Prepararea complexului de incluziune dintre vitamina A/palmitatul de vitamina A și β-ciclodextrină

Data fiind liposolubilitatea vitaminei A (VitA), și solubilitatea în apă a β-ciclodextrinei (βCD), solventii utilizați pentru prepararea complexului de incluziune a celor două substanțe sunt etanolul și apa. S-a avut în vedere prepararea unui complex de incluziune în raport molar/masic de 1:1, făcând uz de diferite condiții de lucru și metode de preparare. Amestecul obținut a fost congelat, iar solventul a fost îndepărtat prin liofilizare, rezultând o pulbere de culoare gălbuie (*e-6.4-VitA-βCD_w:w/1:1_FD*). Pulberile rezultate în urma procesului de liofilizare au fost supuse analizei prin difracție de raze X, spectroscopie de infraroșu și calorimetrie cu scanare diferențială. În urma analizei difractogramelor obținute prin Difracție de raze X pentru cei doi complecși și a comparării lor cu substanțele de pornire (vitamina A și β-ciclodextrina), se observă apariția unor noi intensități de difracție de unde rezultă formarea celor doi complecși de interes.

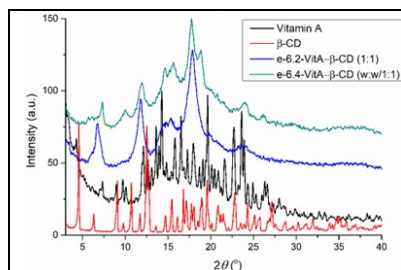


Figura 15. Difractogramele de raze X pe pulberi ale vitaminei A, β-ciclodextrinei și complexelor de incluziune ale acestora.

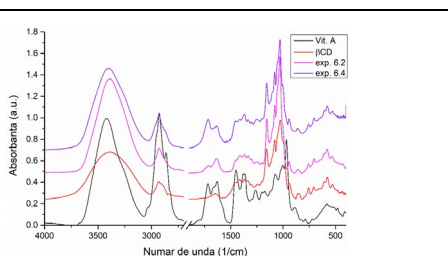


Figura 16. Spectrele FTIR ale vitaminei A, β-ciclodextrinei și complexelor de incluziune ale acestora.

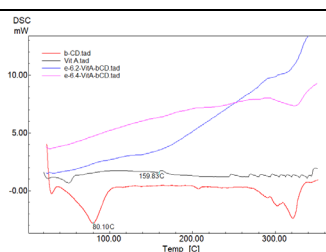


Figura 17. Termogramele DSC ale vitaminei A, β-ciclodextrinei și complexelor de incluziune ale acestora.

Comparând spectrele FTIR ale compuşilor puri, vitamina A și β-ciclodextrina, cu spectrele celor doi complecși se observă deplasarea și modificarea intensităților unor benzi spectrale ca urmare a interacțiunilor care au luat naștere între cei doi compuşii. Aceste modificări sunt mai evidente în cazul complexului *e-6.2-VitA-βCD_1:1_FD*. Curbele DSC ale celor doi complecși de incluziune *VitA-βCD_1:1_FD* obținuți prin experimentele efectuate susțin rezultatele observate prin celelalte două metode de analiză, și anume complexare în condițiile experimentului 6.2.

Ca urmare a rezultatelor obținute în urma analizei complexelor de incluziune preparați prin cele trei metode instrumentale se poate trage concluzia că complexarea cea mai evidentă a avut loc în cazul experimentului *e-6.2-VitA-βCD_1:1_FD*, complexul obținut va fi preparat în cantitate mai mare în cadrul procesului de scalare.

Datorită insolubilității în apă a palmitatului de vitamina A (VitA-P) și solubilității sale în solventi organici (grăsimi, cloroform, eter, etanol), precum și solubilității în apă a β-ciclodextrinei (βCD), solventii utilizați în procesul de preparare trebuie folosiți în proporții adecvate. S-a avut în vedere prepararea unui complex de incluziune în raport molar de 1:1, făcând uz de diferite condiții și metode de preparare. Amestecurile astfel obținute au fost congelate, iar solventul a fost îndepărtat prin liofilizare, rezultând pulberi de culoare albă (*e-6.1-VitA-P-βCD_1:1_FD* și *e-6.3-VitA-P-βCD_1:1_FD*).

Pulberile rezultate în urma procesului de liofilizare au fost supuse analizei prin difracție de raze X, spectroscopie de infraroșu și calorimetrie cu scanare diferențială. Difractogramele obținute pentru cele două probe au fost comparate cu substanțele de pornire (vitamina A palmitat și β-ciclodextrina). În urma analizei se observă formarea celor doi complecși. O cristalinitate mai mare s-a obținut pentru complexul *e-6.3-VitA-P-βCD_1:1_FD*.

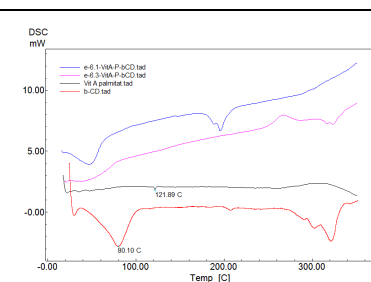
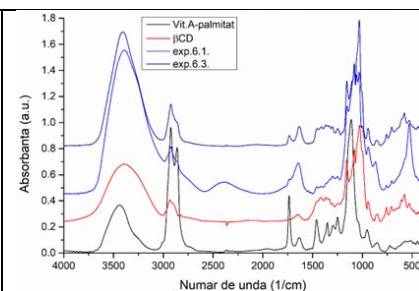
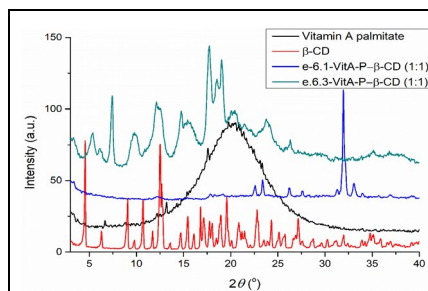


Figura 18. Difractogramele de raze X pe pulberi ale palmitatului de vitamina A, β -ciclodextrinei și complexilor de incluziune ale acestora.

Figura 19 Spectrele FTIR ale palmitatului de vitamina A, β -ciclodextrinei și complexilor de incluziune ale acestora.

Figura 20. Termogramele DSC ale palmitatului de vitamina A, β -ciclodextrinei și complexilor de incluziune ale acestora.

Compararea spectrelor FTIR ale compușilor puri, palmitatului de vitamina A și β -ciclodextrina cu spectrele celor doi complexi preparați în experimentele 6.1. și 6.3. se observă deplasarea și modificarea intensităților unor benzi spectrale ca urmare a interacțiunilor care au luat naștere între cei doi compuși. Aceste modificări sunt mai evidente în cazul complexului *e-6.3-VitA-P- β CD 1:1 FD*. Curbele DSC ale celor doi complexi de incluziune *VitA-P- β CD 1:1 FD* obținuți prin experimentele efectuate susțin rezultatele observate prin celelalte două metode de analiză, și anume complexare în condițiile experimentului 6.3. Ca urmare a rezultatelor obținute în urma analizei complexilor de incluziune preparați prin cele trei metode instrumentale se poate trage concluzia că complexarea cea mai evidentă a avut loc în cazul experimentului *e-6.3-VitA-P- β CD 1:1 FD*, complexul obținut va fi preparat în cantitate mai mare în cadrul procesului de scalare.

Data fiind liposolubilitatea vitaminei E (VitE), și solubilitatea în apă a β -ciclodextrinei (β CD), solventii utilizați pentru prepararea complexului de incluziune a celor două substanțe sunt solventii organici (etanol, acetonă) și apa. S-a avut în vedere prepararea unor complexi de incluziune în raport molar de 1:1 sau 1:2, făcând uz de diferite condiții de lucru și metode de preparare., după liofilizare rezultând pulberi de culoare albă (*e-1.1-VitE- β CD 1:2 copp FD*; *e-1.1-VitE- β CD 1:2 us FD*; *e-2.1-VitE- β CD 1:1 copp FD*; *e-2.2-VitE- β CD 1:1 us FD*; *e-3.1-VitE- β CD 1:1 copp FD*; *e-3.2-VitE- β CD 1:2 copp FD*; *e-5.1-VitE- β CD 1:1 copp FD*; *e-5.2-VitE- β CD 1:2 copp FD*)

Pulberile rezultate în urma procesului de liofilizare au fost supuse analizei prin difracție de raze X, spectroscopie de infraroșu și calorimetrie cu scanare diferențială. Au fost efectuate măsurători de Difracție de raze X pentru opt probe obținute în urma experimentelor de complexare. Prin compararea difractogramele substanțelor de pornire (vitamina E și β -ciclodextrina) și a celor opt probe, se observa formarea unor complecsi de incluziune. După cum se poate observa în figura de mai jos, în cazul probelor 3.1, 3.2, 5.1 și 5.2 rămâne o cantitate de β -ciclodextrina neinteracționată. Acest lucru reiese prin prezența mai multor intensități de difracție ale β -ciclodextrina în difractogramele probelor analizate. Cea mai relevanta intensitate se poate observa la $2\theta = 4.45^\circ$. În schimb, în cazul probelor obținute în experimentele 1.1, 1.2, 2.1 și 2.2, este evidentă formarea complexilor de incluziune.

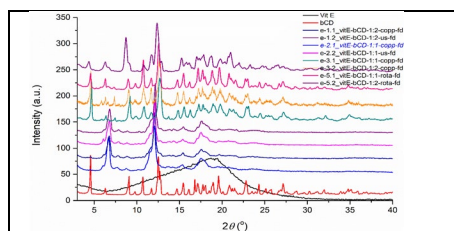


Figura 21. Difractogramele de raze X pe pulberi ale vitaminei E, β -ciclodextrinei și complexilor de incluziune ale acestora.

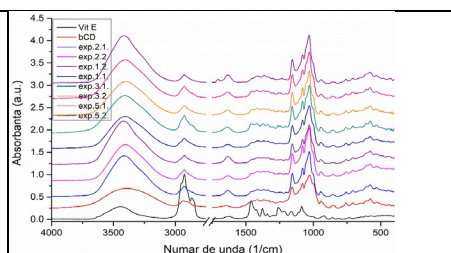


Figura 22. Spectrele FTIR ale vitaminei E, β -ciclodextrinei și complexilor de incluziune ale acestora.

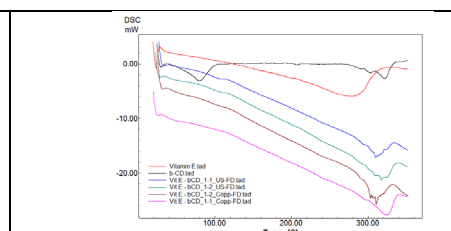


Figura 23. Termogramele DSC ale vitaminei E, β -ciclodextrinei și complexilor de incluziune ale acestora.

Compararea spectrelor FTIR ale compușilor puri, vitamina E și β -ciclodextrina cu spectrele celor opt complexi preparați în experimentele 1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2, 5.1 și 5.2 se observă deplasarea și modificarea intensităților unor benzi spectrale ca urmare a interacțiunilor care au luat naștere între cei doi compuși supuși complexării. Interacțiuni care dovedesc complexarea au fost observate în cazul probelor obținute în experimentele 1.1, 1.2, 2.1 și 2.2, modificările fiind mai evidente în cazul complexului *e-2.1-VitE- β CD 1:1 copp FD*. Au fost supuse analizei DSC probele pentru care s-a dovedit formarea complexului de incluziune prin celelalte metode de analiza efectuate în prealabil. Curbele DSC ale complexilor de incluziune dintre *VitE-P- β CD* obținuți prin experimentele 1.1, 1.2, 2.1 și 2.2 susțin rezultatele observate prin celelalte două metode de analiză. În cazul curbei DSC al complexului obținut în experimentul 2.1 nu se observă semnalul apei, prezente în β CD, probabil din cauză că aceasta a fost dezlocuită de vitamina E prin înglobarea acesteia.

Ca urmare a rezultatelor obținute în urma analizei complexilor de incluziune preparați prin cele trei metode instrumentale se poate trage concluzia că complexarea cea mai evidentă a avut loc în cazul experimentului *e-2.1-VitE- β CD 1:1 copp FD*, complexul obținut va fi preparat în cantitate mai mare în cadrul procesului de scalare.

Obținerea complexului VitE.acet – β CD (1:1 și 1:2) în apă prin liofilizare a generat pulberi albe, omogene (*e-4.1-VitE.acet- β CD 1:1 copp FD*) *e-4.2-VitE.acet- β CD 1:2 copp FD*).

Pulberile rezultate în urma procesului de liofilizare au fost supuse analizei prin difracție de raze X, spectroscopie de infraroșu și calorimetrie cu scanare diferențială. Au fost efectuate măsurători de Difracție de raze X pentru două probe obținute în urma experimentelor de complexare. Prin compararea difractogramele substanțelor de pornire (vitamina E acetate și β -ciclodextrina) și a celor două probe, se observa formarea unor complecsi de incluziune.

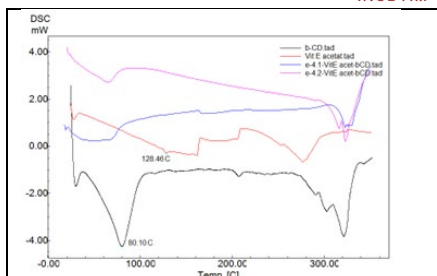


Figura 24. Difractogramele de raze X pe pulberi ale acetatului de vitamina E, β -ciclodextrinei și complexilor de incluziune ale acestora.

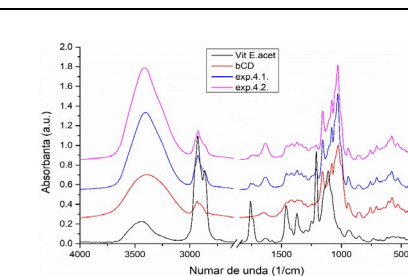


Figura 25. Spectrele FTIR ale acetatului de vitamina E, β -ciclodextrinei și complexilor de incluziune ale acestora.

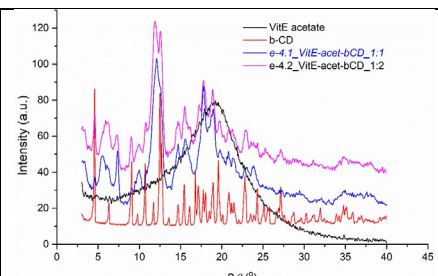


Figura 26. Termogramele DSC ale acetatului de vitamina E, β -ciclodextrinei și complexilor de incluziune ale acestora.

Compararea spectrelor FTIR ale compușilor puri, acetatul de vitamina E și β -ciclodextrina cu spectrele celor doi complexi preparați în cadrul experimentelor se observă deplasarea și modificarea intensităților unor benzi spectrale ca urmare a interacțiunilor care au luat naștere între cei doi compuși supuși complexării. Interacțiuni care dovedesc complexare au fost observate în cazul probei obținute în experimentul 4.1, modificările fiind mai evidente în cazul complexului *e-4.1-VitE.acet- β CD_1:1_copp_FD*. Curbele DSC ale complexilor de incluziune dintre *VitE.acet- β CD* obținuți prin experimentele 4.1 și 4.2 susțin rezultatele observate prin celelalte două metode de analiză. În cazul curbei DSC al complexului obținut în experimentul 4.1 semnalul apei provenite din β CD este de intensitate mai scăzută, probabil din cauză că aceasta a fost dezlocuită de acetatul de vitamina E prin înglobarea acesteia în cavitatea ciclodextrinei. Ca urmare a rezultatelor obținute în urma analizei complexilor de incluziune preparați prin cele trei metode instrumentale se poate trage concluzia că, complexarea cea mai evidentă a avut loc în cazul experimentului *e-4.1-VitE.acet- β CD_1:1_copp_FD*, complexul obținut va fi preparat în cantitate mai mare în cadrul procesului de scalare.

Prepararea complexului de incluziune dintre Acidul ferulic și β -ciclodextrină

Dat fiind că am avut la dispoziție atât acid ferulic (AF) în care sunt prezenți ambii enantiomeri, cât și acid t-ferulic (At.F), încapsularea în β CD a fost încercată în ambele cazuri. Obținerea complexului AF – β CD (2:1, 1:1 și 1:2) în etanol/apă prin liofilizare a permis obținerea unor pulberi albe, omogene (*e-7.1.a-AF- β CD_2:1_copp_FD*; *e-7.2.a-AF- β CD_1:1_copp_FD*; *e-7.3.a-AF- β CD_1:2_copp_FD*). S-au comparat difractogramele compușilor puri (acid ferulic și β -ciclodextrina) cu difractogramele probelor obținute în urma celor trei experimente. După analiza datelor obținute s-a constatat formarea complexilor de incluziune după cum se poate observa în figura de mai jos.

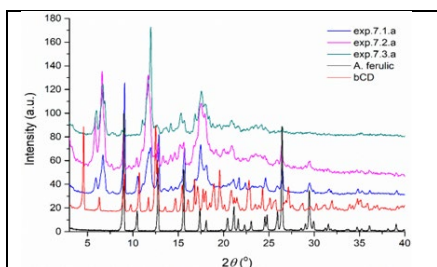


Figura 27. Difractogramele de raze X pe pulberi ale Acidului ferulic, β -ciclodextrinei și complexilor de incluziune ale acestora.

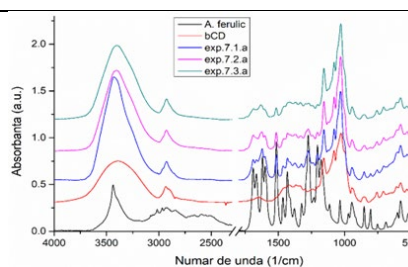


Figura 28. Spectrele FTIR ale Acidului ferulic, β -ciclodextrinei și complexilor de incluziune ale acestora.

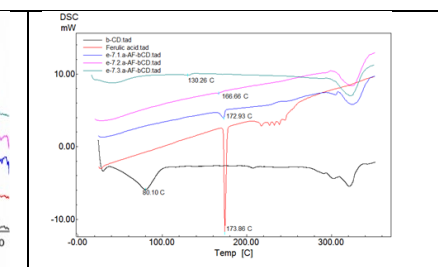


Figura 29. Termogramele DSC ale Acidului ferulic, β -ciclodextrinei și complexilor de incluziune ale acestora.

Prin compararea spectrelor FTIR ale compușilor puri, acidul ferulic și β -ciclodextrina cu spectrele celor trei complexi preparați se observă deplasarea și modificarea intensităților unor benzi spectrale ca urmare a interacțiunilor care au luat naștere între cei doi compuși supuși complexării. Interacțiuni care dovedesc complexarea au fost observate în cazul probei obținute în experimentul 7.2.a, modificările fiind mai evidente în cazul complexului *e-7.2.a-AF- β CD_1:1_copp_FD*. Curbele DSC ale complexilor de incluziune dintre Acidul ferulic și β CD obținuți prin experimentele 7.1.a-7.3.a susțin rezultatele observate prin celelalte două metode de analiză. În cazul curbei DSC al complexului obținut în experimentul 7.2.a nu se regăsește picul de topire al acidului ferulic, și nici semnalul apei provenite din β CD, ceea ce dovedește formarea unui complex de incluziune în acest experiment.

Ca urmare a rezultatelor obținute în urma analizei complexilor de incluziune preparați prin cele trei metode instrumentale se poate trage concluzia că, complexarea cea mai evidentă a avut loc în cazul experimentului *e-7.2.a-AF- β CD_1:1_copp_FD*, complexul obținut va fi preparat în cantitate mai mare în cadrul procesului de scalare.

Acidul t-ferulic și β -ciclodextrina au fost preparate în cantități corespunzătoare pentru un raport molar de At.F: β CD de 2:1, 1:1 și 1:2, obținându-se după liofilizare pulberi albe, omogene (*e-7.1.b-At.F- β CD_2:1_copp_FD*, *e-7.2.b-At.F- β CD_1:1_copp_FD* și *e-7.3.b-At.F- β CD_1:2_copp_FD*). Prin difracție de raze X pe pulberi au fost măsurate trei probe obținute în urma experimentelor. Cele trei difractograme înregistrate au fost comparate cu cele ale acidului trans-ferulic și β -ciclodextrinei. Difractogramele probelor de interes sunt diferite de cele ale substanțelor pure, rezultă formarea complexilor de incluziune.

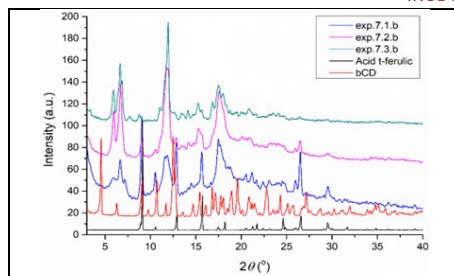


Figura 30. Difractograme de raze X pe pulberi ale Acidului trans-ferulic, β-ciclodextrinei și complexelor de incluziune ale acestora.

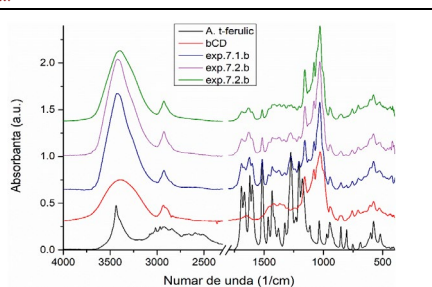


Figura 31. Spectrele FTIR ale Acidului trans-ferulic, β-ciclodextrinei și complexelor de incluziune ale acestora.

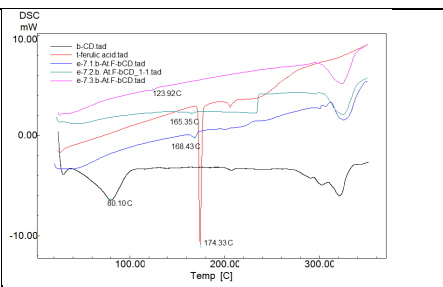


Figura 32. Termogramele DSC ale Acidului trans-ferulic, β-ciclodextrinei și complexelor de incluziune ale acestora.

Comparând spectrele FTIR ale compușilor puri, acidul trans-ferulic și β-ciclodextrina cu spectrele celor trei complexe preparați în experimentele efectuate se observă deplasarea și modificarea intensităților unor benzi spectrale ca urmare a interacțiunilor care au luat naștere între cei doi compuși. Modificările observate fiind mai evidente în spectrul probei obținute în experimentul 7.3.b, putem vorbi de o complexare avansată în cazul *e-7.3.b-At.F-βCD_1:2_copp_FD*. Curbele DSC ale complexelor de incluziune *A.t-F-βCD* obținute prin experimentele 7.1.b - 7.3.b susțin rezultatele observate prin celelalte două metode de analiză. În cazul curbei DSC al complexului obținut în experimentul 7.3.b nu se regăsește picul de topire al acidului t-ferulic, iar semnalul apei provenite din βCD este de intensitate foarte scăzută, probabil din cauză că aceasta a fost dezlucuită de A.t-F prin înglobarea acesteia în cavitatea ciclodextrinei.

Ca urmare a rezultatelor obținute în urma analizei complexelor de incluziune preparați prin cele trei metode instrumentale se poate trage concluzia că, complexarea cea mai evidentă a avut loc în cazul experimentului *e-7.3.b-At.F-βCD_1:2_copp_FD*, complexul obținut va fi preparat în cantitate mai mare în cadrul procesului de scalare.

A2.3. Precizarea teoretică a conformațiilor de energie minimă a complexelor de incluziune

Precizarea teoretică a conformațiilor de energie minimă a complexelor de incluziune

Această etapă de studiu teoretic al conformațiilor de interacțiune la echilibru dintre compușii investigați și molecula de β-ciclodextrină s-a concentrat în principal pe finalizarea calculelor de andocare moleculară începute în etapa anterioară și prezentate în detaliu în raportul precedent pentru complexul de incluziune al acidului ascorbic și β-ciclodextrină. Am investigat și vom prezenta comparativ rezultatele obținute pentru compușii: acidul ferulic, vitamina A, vitamina E și pentru ambii tautomeri ai cuminiei, enol- și keto-. Simulările au urmărit aceeași metodologie și aceeași parametrii specifici calculelor de andocare moleculară pe care i-am prezentat în detaliu și în raportul de fază anterior [6], [7],[8], [9]. Structurile au fost investigate și din punct de vedere vibrațional, și în urma calculelor nu s-au obținut frecvențe vibraționale imaginare ceea ce demonstrează că structurile optimizate corespund unor minime pe suprafața de energie potențială (PES) și nu unor stări de tranziție.

Conformația β-ciclodextrinei a fost aceeași pentru toate calculele efectuate și identică cu cea folosită anterior în investigarea complexului de incluziune cu ciclodextrina a acidului ascorbic. Aceasta a fost obținută din structura cristalografică a complexului de incluziune cu acidul meclofenamic determinată experimental în grupul profesorului Mino Caira [10] (CSD entry: WERGUV), iar pentru a fi adaptată procesului de andocare moleculară s-au îndepărtat, acidul meclofenamic, ionii de Mg^{2+} și moleculele de apă de cristalizare. Ulterior am folosit programul AutoDockTools v 1.5.6 [6], [11] pentru a genera fișierele cu parametri de simulare și fișierele pdbqt, utilizate ulterior în procedura de andocare.

În simulări am folosit procedura de andocare standard implementată în AutoDock. După adăugarea inițială a tuturor atomilor de hidrogen atât pentru proteină, cât și pentru ligand, toți atomii de hidrogen nepolari au fost ulterior îndepărtați automat de către procedura de andocare iar pentru calculul sarcinilor atomice am utilizat metoda Gasteiger-Marsili [12]. Flexibilitatea liganzilor a fost luată în calcul stabilind unghiuri de torsiune în jurul legăturilor detectate automat în AutoDock de către procedura dedicată ligandului. Toți atomii moleculei de β-ciclodextrină au fost menținuți rigizi. Prin intermediul utilitatului AutoGrid am precălculat hărțile energiilor de interacțiune ale diferitelor tipuri de atomi înainte de rularea efectivă a procedurii de andocare. Am stabilit pentru toate molecule investigate dimensiunea maximă a grilei de 70x70x70 puncte cu o distanță între puncte de 0.375 Å. Întreaga β-ciclodextrină a fost astfel inclusă în volumul de căutare de formă cubică care a fost centrat pe această moleculă. Algoritmii genetici Lamarckian au fost folosiți pentru a căuta cei mai buni conformeri folosind parametrii impliciți. Am urmat metodologia standard de andocare și am folosit aceiași parametri detaliați în articole publicate anterior de către grupul nostru de cercetare [13]–[16]. Pentru a obține o statistică și o distribuție bună în clusteri, am efectuat câte 2000 de rulări pentru fiecare moleculă investigată în parte, fiecare dintre acestea fiind generată într-un mod aleator. Vizualizarea și analiza rezultatelor de andocare au fost efectuate folosind programele Biovia Discovery Studio Visualizer v20.1 și Chimera v1.14 [17]. Tot în această etapă au fost demarate și studiile de dinamică moleculară însă acestea, implicând un efort de calcul mult superior celor de andocare moleculară, sunt încă într-o stare intermediară, nefinalizată încă, și vor fi prezentate ulterior.

Deoarece raportul de fază precedent conține deja o descriere detaliată a structurii moleculare particulare ale ciclodextrinelor și de asemenea și a proprietăților fizico-chimice și de interacțiune, ne vom limita în continuare la prezentarea comparativă a rezultatelor obținute ca urmare a studiului extins de andocare moleculară efectuat.

Astfel în Tabelul 2 prezentăm comparativ energiile de interacțiune intermoleculară dintre toate moleculele investigate și β-ciclodextrină obținute în urma procesului de andocare. Specificăm pentru fiecare, energia de legare a celei mai bune conformații andocate și, de asemenea, energia de legare medie a membrilor din clusterul căruia această structură îi aparține și numărul de membri ai acestui cluster.

Tabelul 2. Energiile de legare ale celor mai probabile conformații ai complexșilor de incluziune cu β -ciclodextrina obținute în urma calculelor de andocare moleculară.

Compus investigat	Energia de interacțiune intermoleculară	Energia medie de interacțiune în cluster	Numărul membrilor în cluster
Curcumin keto-enol	-4.64	-3.98	143
Curcumin diketo	-5.66	-5.01	1295
Ferulic Acid	-4.11	-3.70	435
Vitamin A (Retinol)	-5.28	-4.93	592
Vitamin C (Ascorbic acid)	-3.91	-3.11	972
Vitamin E	-6.22	-4.65	231

În urma analizei rezultatelor obținute observăm faptul că valoarea absolută a energiei de legare are o valoare maximă pentru complexul de incluziune cu vitamina E iar valoarea minimă pentru complexul cu acidul ascorbic, energiile de legare cu celelalte molecule prezentând valori intermediare. Acest rezultat corespunde întrucâtva intuiției și așteptărilor pe care le-am avut inițial, deoarece acidul ascorbic este o moleculă hidrofilă iar vitamina E are numărul maxim de atomi dintre moleculele investigate și o flexibilitate sporită. Vitamina E, un antioxidant lipidic solubil din familia tocoferolilor prezintă o coadă „fitil” (eng. phytyl) hidrofobă cu trei puncte sau centre chirale care se pot aranja într-o orientare stângă sau dreaptă. În acest complex având cea mai mare energie de legare, această coadă hidrofobă este acomodatată în totalitate în interiorul cavității ciclodextrinei.

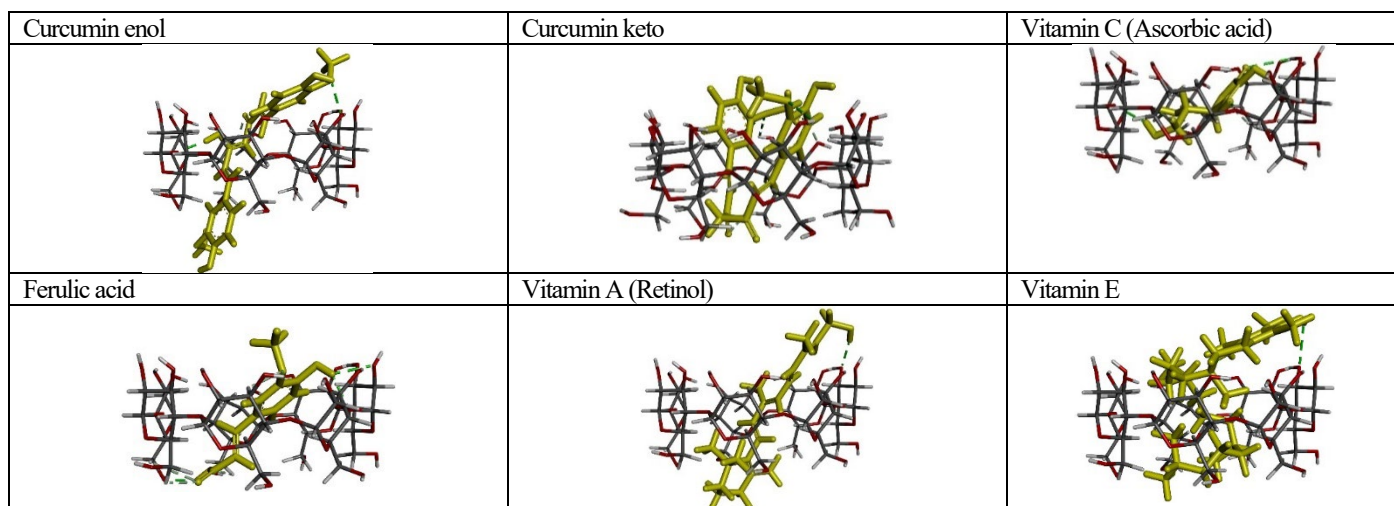


Figura 33. Conformațiile geometrice ale complexșilor de incluziune ai beta-ciclodextrinei cu moleculele investigate, rezultate în urma simulărilor de andocare moleculară. Legăturile de hidrogen intermoleculare sunt reprezentate în verde.

Ciclul cromanol din structura chimică a vitaminei E, produs natural în calea metabolică de biosinteză a șichimatului din acidul homogenistic cunoscut și sub numele de acid melanolic, mai hidrofil și de dimensiuni mai mari rămâne la exterior, în apropierea deschiderii secundare, mai largi, a cavității ciclodextrinei. Conformația moleculară tridimensională acestui complex precum și cele rezultate, în urma calculelor, pentru toate moleculele investigate sunt prezentate în Figura 33. Aceste structuri corespund valorilor energiilor de legare specificate anterior în Tabelul 2.

În Figura 34 reprezentăm histogramele distribuțiilor de energie de legare ale tuturor clusterelor identificate în timpul analizei de andocare pentru toți complexșii de incluziune investigați. Aceste distribuții au fost obținute în urma clasificării în clusteri ținând cont de similaritatea structurilor, a tuturor celor 2000 de configurații obținute în urma calculelor de andocare moleculară, pentru fiecare dintre moleculele investigate în parte. Pentru a înțelege corect aceste reprezentări, precizăm faptul că poziția fiecărui cluster pe axa energiei de legare este determinată doar de membrul având cea mai mare energie de legare al clusterului. Semnul minus apare deoarece căutăm efectiv complexșii care au energii mai mici decât suma energiilor moleculelor implicate în interacțiune, moleculelor gazdă și oaspete calculate individual. Pe lângă energia de legare, o altă informație semnificativă este frecvența cu care este identificată fiecare conformație de legare, reprezentată ca intensitate în histograme și reprezentând numărul de membri din fiecare cluster, a cărei valoare pentru clusterul corespunzând structurii cu valoarea absolută a energiei de legare maximă este menționată și în Tabelul 2. Pe măsură ce numărul de membri dintr-un grup este mai mare, acea conformație de legare particulară este mai favorizată sau a fost identificată mai des. O altă informație care poate oferi o perspectivă suplimentară este gama energiilor de legare ale membrilor fiecărui cluster sau cel puțin energia de legare medie a clusterului care este de asemenea precizată în Tabelul 2, pentru clusterul având valoarea absolută a energiei de legare maximă. Aceste valori teoretice pot și vor fi comparate și cu valorile experimentale ale constantelor de stabilitate determinate prin rezonanță magnetică nucleară și calorimetrie de titrare izotermă. În opinia noastră conformațiile obținute sunt apropiate de cele efective în soluție unde interacțiunea cu moleculele de solvent va contribui cu siguranță la relaxarea configurațiilor. Simulările de dinamică moleculară au fost în momentul actual deja demarate însă datorită efortului de calcul substanțial, necesar calculului unor traiectorii suficient de lungi,

nu sunt încă finalizate. Aceste noi rezultate care vor oferi informații și mai detaliate privind interacțiunile dintre moleculele investigate și moleculele de β -ciclodextrină și vor fi prezentate într-un raport ulterior.

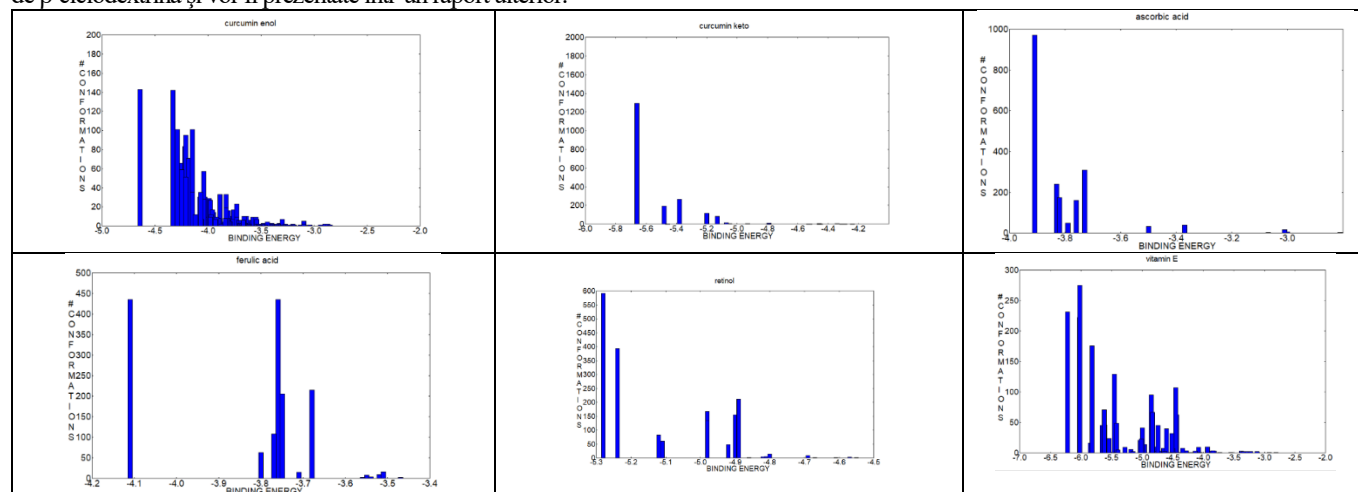


Figura 34. Histogramele distribuțiilor de energie de legare ale tuturor clusterelor identificate în timpul analizei de andocare, corespunzătoare tuturor complexelor de incluziune investigați.

În paralel cu acest studiu, și utilizând structuri deja optimizate în cadrul actualului proiect, am efectuat și o cercetare privind interacțiunea dintre concentratul proteic din zer conținând majoritar proteina β -lactoglobulina și cei doi tautomeri ai curcuminei care a fost publicat recent în revista Food Hydrocolloids [18].

A2.4. Sinteza hidrogelurilor Col-HA funcționale obținute prin includerea complexelor supramoleculare

Complexitatea procesului de formulare rezidă din multitudinea de factori implicați în procesul de livrare a principiului activ în piele, asigurând penetrabilitatea și distribuția optimă a substanței active. În formulările tip U/A faza apoasă continuă are rolul de a hidrata stratul cornos, care poate absorbi apă de trei până la cinci ori greutatea sa. Vehiculul afectează penetrabilitatea la nivelul țesutului subcutanat, reducând pierderea transepidermală de apă. Când stratul cornos este puternic hidratat absorbția principiului activ crește până la de 10 ori, acest mecanism fiind corelat cu creșterea constantei de difuzie (crește volumul celulelor țesutului epidermal și scade rezistența la difuzie a membranei celulare). Compoziția bazei va afecta absorbția substanței active în piele, aspect predictibil, care depinde de cunoașterea interacțiunii dintre substanța activă și vehicul și de solubilitatea relativă a acestuia în vehicul, respectiv stratul cornos. Absorbția principiilor active din produse topice depinde de natura chimică a vehiculului, situsul de aplicare utilizat, regiunea corporală, statusul hidratării, integritatea pielii, durata contactului cu aceasta, eventuala ocluzie a situsului vizat. Factorii de natură chimică implicați în procesul de permeabilizare/ absorbție sunt: masa moleculară a substanței active, gradul de disociere, pH, volatilitate, solubilitate. Substanțele cu bună solubilitate în apă și substanțele de natură lipidică sunt absorbite în piele, ceea ce implică o atenă evaluare a coeficientului de partiție pentru favorizarea penetrabilității. Substanțele intens liposolubile, cu solubilitate mai bună în stratul cornos față de vehicul, vor avea o mai bună penetrabilitate. Vâscozitatea formulării afectează penetrarea substanței active în stratul cornos, ca și aria de aplicare, frecvența aplicării, aplicarea prin masaj local. Masajul local accelerează evaporarea vehiculului și permite pătrunderea formulării în relieful cutanat și suprafețele glandulare de la nivelul pielii. Grosimea stratului de produs aplicat influențează penetrabilitatea substanței active datorită diferențelor ratei evaporării. Rata fluxului substanței active care penetrează pielea va fi dependentă de coeficientul de difuzie și de concentrația substanței active.

Metodele *in vitro* de testare a eliberării principiului activ permit cuantificarea cedării substanței active în mediul cu care sunt în contact. În plus, metodele *in vitro* comparativ cu cele *in vivo* permit un studiu cinetic, având ca scop principal studiarea parametrilor formulării: natura excipienților; concentrația substanțelor active; pH-ul; vâscozitatea unguentului. Acești parametri modifică cedarea (intensitatea și viteza de cedare), dar pot constitui un mijloc de a controla reproductibilitatea fabricării.

În această etapă s-au obținut două formule – o emulsie care înglobează β -cilclodesxtrine care complexează vitaminele A și E, și un hidrogel care înglobează β -cilclodesxtrine care complexează vitamina C și acidul ferulic. Formulele finale și tehnologia de formulare sunt prezentate în Tabelele 3 și 4.

Tabelul 4. Formula emulsiei GC

Faza	Denumire INCI	Denumire comerciala	%	50 g
B	Aqua	Apa demineralizata		
A	Vitis Vinifera Seed Oil	Ulei struguri	5.00	2.50
A	Acrylates Crosspolimer	Acrylates Crosspolimer	1.00	0.50
D1		Colagen+Hyaluronic	10.00	5.00
B	Glycerin	Glicerina	0.50	0.25
B	Xanthan gum	Guma xantan	0.40	0.20
E	Benzyl Alcohol, Salicylic Acid, Glycerin, Sorbic Acid	Cosgard	1.00	0.50
D2		β -cilclodesxtrina vit A	0.50	0.25

D3		β-cilclodesxtrina vit E	0.20	0.10
C1	Aqua (and) Glycerin (and) Sorbitol (and) Lecithin (and) Sodium Ascorbyl Phosphate (and) Xanthan Gum	Lpds vitamin C	0.50	0.25

Tehnologia de formulare

1. Faza A - ulei de struguri – 2.50g; - acrylates crosspolimer – 0.55g; Hidratare 800 rpm, fara incalzire → fluid alb, opac, omogen	2. Faza B - apa demineralizata – 40.90g; - glicerina – 0.27g; - xantan gum – 0.20g Hidratare 500 rpm, 40°C → gel omogen, usor bej, transparent. Emulsionare → adaugare faza A peste B, viteza maxima, aproximativ 5 min. → aspect crema-gel, alba, omogenă, lucioasă. - Ad. Lpds vitamina C (0.26g) peste emulsie → emulsie omogena, de culoare ocru.	3. Faza D - Collagen+ Acid hialuronic – 5.36g; - β-cilclodesxtrina vit A - 0.250g; - β-cilclodesxtrina vit E – 0.187g; Dispersare cclotextrine in collagen sub agitare, 800 rpm → lichid alb-opc, omogen. Adaugare faza D peste emulsie si omogenizare → emulsie omogena, usor fluida, de culoare alb-laptos. Adaugare Cosgard (0.58g) peste emulsie → emulsie lucioasa, omogena, de culoare alb-laptos.
--	---	--

Tabelul 4. Formula hidrogelului GG

Faza	Denumire INCI	Denumire comerciala	%	50 g
B	Aqua	Apa demineralizata	86.20	43.10
B		Curcumina	0.50	0.25
B	Acrylates Crosspolimer	Acrylates Crosspolimer	1.00	0.50
A		Colagen+Hyaluronic	10.00	5.00
C	Benzyl Alcohol, Salicylic Acid, Glycerin, Sorbic Acid	Cosgard	1.00	0.50
A		β-cilclodesxtrina vit C	0.50	0.25
A		β-cilclodesxtrina acid ferulic	0.20	0.10

Tehnologia de formulare

Faza B - Apa demineralizata – 44g.70; - acrylates crosspolimer – 0.50g; Hidratare 800 rpm, fara incalzire → gel omogen, transp., incolor. - Curcumina – 0.20g → omogenizare la viteza maxima → gel usor fluid, omogen, de culoare portocaliu- morcov, cu particule de dimensiuni mici, de culoare inchisa in masa.	Faza A - Collagen+Acid hialuronic – 5.10g; - β-cilclodesxtrina vit C - 0.40g; - β-cilclodesxtrina acid ferulic – 0.250g; Dispersare ciclotextrine in collagen sub agitare, 800 rpm → lichid alb- opc, omogen. Adaugare faza A peste B si omogenizare → gel usor fluid, de culoare portocaliu-morcov, cu particule de dimensiuni mici, de culoare inchisa in masa. Adaugare Cosgard (0.52g) peste emulsie si omogenizare.
---	--

Figura 35. Aspectul emulsiei
codificată GC și a hidrogelului
codificat GG



A2.5. Evaluarea analitică a gradului de eliberare a activelor din complexii de incluziune

Principalele tehnici de studiu constau în determinarea cantității de substanță activă eliberată de mediul donor în mediul acceptor. Metodele de studiu ale cedării substanțelor active in vitro sunt numeroase dar ele se diferențiază esențial prin faptul că cele doua medii – donor și receptor sunt sau nu separate printr-o membrană semipermeabilă. Introducerea unei membrane semipermeabile în modelele experimentale permite evitarea modificărilor de la suprafața de contact între produsul de testat și faza acceptoare. Aceste studii se pot realiza pe membrane biologice și artificiale.

Rata de eliberare a Vitaminei A din crema-gel s-a realizat prin dializarea unei probe de crema (10g) printr-o membrana de dializa (MWCO < 10000) în 35mL soluție Ringer. Spectrul UV/Vis pentru Vitamina A palmitat în metanol (Figura 36) evidențiază picul caracteristic cu un maxim de absorbție la 326nm, încapsularea acesteia în β -ciclodextrina este confirmată prin deplasarea picului către lungimi de undă mai mici (279nm), iar spectrul obținut pentru soluția Ringer acceptoare în procesul de dializa se observa deplasarea acestuia către lungimi de undă mai mari 296nm

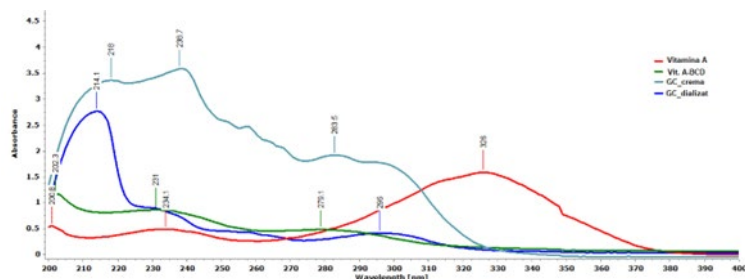


Figura 36. Spectrul de absorbanta UV/Vis pentru Vitamina A palmitat în metanol.

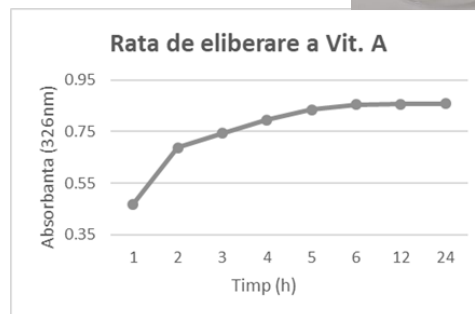


Figura 37. Rata de eliberare a vitaminei A.

Valoarea absorbantei la 326 nm pentru soluția Ringer a fost determinată la diferite intervale de timp pentru a stabili rata de eliberare a vitaminei A. Se observa astfel că după un interval de șase ore cantitatea de Vitamina A eliberată din crema rămâne constantă.

A2.6. Evaluarea acțiunii hidrogelurilor funcționalizate asupra viabilității unor microorganisme procariote și influența asupra unor factori de virulență fenotipici și genotipici

Scopul activității a fost evaluarea activității antimicrobiene intrinseci a complexelor nou formați incluși în hidrogeluri prin metode calitative și cantitative. Protocolul de lucru utilizat este cel raportat în activitatea 2.1.

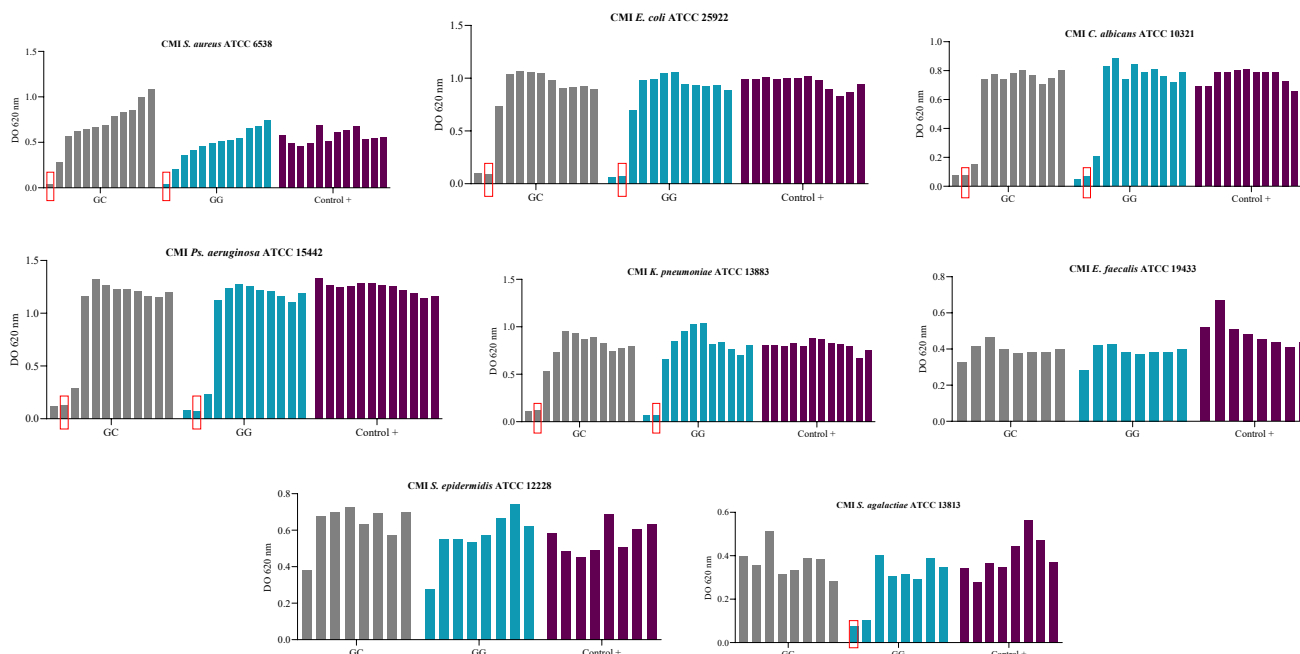


Figura 38. Concentrațiile minime inhibitorii obținute pentru proba de emulsie codificată GC și proba de hidrogel codificată GG, în prezența tulpinilor *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 25992, *Candida albicans* ATCC 10321, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813

Probele reprezentate de emulsia GC și hidrogelul GG prezintă o activitate antimicrobiană bună, fiind obținute valori CMI la concentrațiile inițiale testate (0.18mg/mL) pentru tulpinile *S. aureus* și *S. agalactiae*. În cazul tulpinilor *E. coli*, *C. albicans*, *Ps. aeruginosa*, *K. pneumoniae* CMI s-a observat la 0.09 mg/MI pentru ambele formule. Pentru tulpinile *E. faecalis* și *S. epidermidis* nu s-au obținut valori CMI la

concentrațiile inițiale testate. În etapa următoare, vom crește concentrația produselor pentru a putea determina o valoare CMI corespunzătoare acestor tulpini. Chenerale rosii din figura 38 indică valorile CMI obținute.

A2.7. Analiza *in vitro* a citotoxicității și a răspunsului inflamator al hidrogelurilor functionalizate

Evaluarea gradului de citotoxicitate celulară *in vitro* a emulsiei, hidrogelului și a activelor, s-a realizat cu ajutorul testelor MTT (bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu) și LDH (lactat dehidrogenază). Biocompatibilitatea probelor a fost evaluată pe fibroblaste umane, linia celulară HDF *Human Dermal Fibroblast* standardizată ATCC (*American Type Culture Collection*). Densitatea celulară pentru testele MTT și LDH a fost optimizată la 4×10^5 . Celulele cultivate într-o placă de culturi celulare cu 96 de godeuri au fost tratate cu probele obținute la diferite concentrații și împreună cu martori au incubate timp de 24 de ore la 37°C, 95 % umiditate cu 5% CO₂. După 24 de ore de expunere la compuşii testați, celulele au fost incubate timp de 4 ore cu reactivul MTT (Sigma, SUA) la 37°C, 95% umiditate cu 5% CO₂. După incubare, celulele au fost tratate cu solvent MTT (Sigma, SUA) timp de 15 minute la temperatura camerei. Absorbanta a fost măsurată folosind un cititor de microplăci spectrofotometric (Thermo Scientific) la DO = 570 nm. Cu kit-ul de detectare a citotoxicității LDH (Roche), activitatea LDH a fost măsurată folosind, de asemenea, un cititor de microplăci spectrofotometric la 492 nm cu o lungime de undă de referință de 600 nm.

Martorii experimentului au fost reprezentați de: celule fără tratament, celule cultivate în prezența DMSO-ului și PBS ca martor negativ.

Proba	Concentrații
GC – Emulsie Grace	0.187 mg/mL
GG – Hidrogel Grace	0.187 mg/mL
BvA – β -ciclodextrină complexată cu Vitamina A	5 mg/mL
BvE – β -ciclodextrină complexată cu Vitamina E	2 mg/mL
BvC – β -ciclodextrină complexată cu Vitamina C	8 mg/mL
BaF – β -ciclodextrină complexată cu Acid Ferulic	5 mg/mL

În urma evaluării biocompatibilității celulare utilizând testul MTT (Figura 39) s-au obținut valori ridicate de viabilitate (peste 70%) a fibroblastelor HDF pentru toate probele testate. În cazul probelor BvA și BvE, la 24 de ore, s-au observat procente de viabilitate mai mici (75.66 ± 12.72 , respectiv 78.44 ± 20.33) comparativ cu restul probelor și martorul de celule viabile. Însă, la 48 de ore după tratament, ratele de viabilitate s-au îmbunătățit semnificativ, crescând la 93.50 ± 7.48 pentru BvA și la 89.12 ± 3.42 pentru BvE. Efectul poate fi datorat ratelor de eliberare rapidă a activelor din ciclodextrine, acestea inducând un stresor în mediul celular.

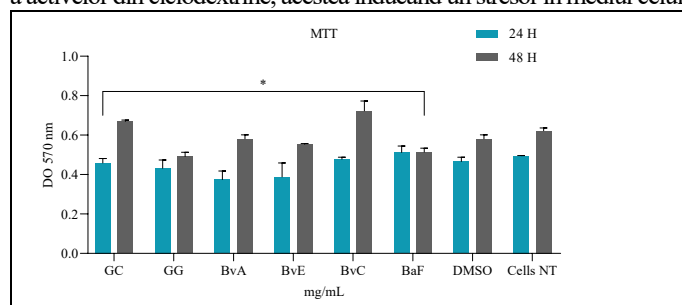


Figura 39.

Evaluarea biocompatibilității celulare a emulsiei GC, hidrogelului GG și activele acestora în prezența fibroblastelor HDF utilizând testul MTT; cells NT = martor celule viabile, fără tratament; * = valoare cu semnificație statistică, $p < 0.05$

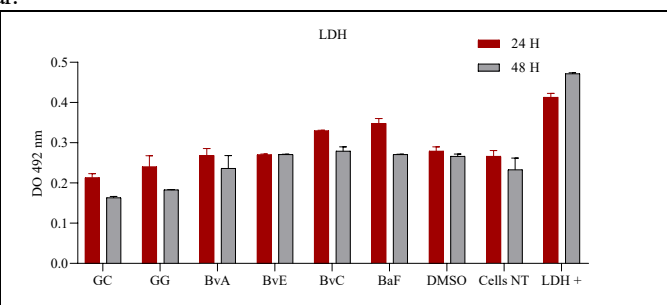


Figura 40.

Evaluarea biocompatibilității celulare a emulsiei GC, hidrogelului GG și activele acestora în prezența fibroblastelor HDF utilizând testul LDH; cells NT = martor celule viabile, fără tratament; Positive LDH – celule moarte, martor eliberare maximă de LDH.

Evaluarea eliberării de lactat dehidrogenază în mediul celular s-a realizat la 24 și 48 de ore de contact cu probele de interes. Rezultatele obținute se corelează cu cele aferente testului MTT. Probele care au prezentat cantități mai mari de LDH în mediul celular - 21.14 ± 0.08 BvC și 22.74 ± 1.08 BaF au un puternic efect antioxidant care poate contribui la aceste valori crescute ale LDH, însă acestea s-au ameliorat la 48 de ore de contact. Acest comportament se aplică și pentru celelalte probe, fiind observată scăderea cantității de LDH eliberată la 48 de ore (Figura 40). Cuantificarea activității LDH-ul s-a realizat trasând curba standard a NADH.

Utilizând kitul de analiză LIVE/DEAD® a fost evaluată prin microscopie de fluorescență viabilitatea/ citotoxicitatea celulelor expuse probelor reprezentate de hidro-emulsie și CBD. Celulele vii se disting prin prezența activității esterazei intracelulare omniprezente, determinată de conversia enzimatică a calceinei AM cu permeație celulară practic nefluorescentă în calceină intens fluorescentă. Calceina colorantă polianionică este bine reținută în celulele vii, producând o fluorescență verde uniformă intensă în celulele vii (ex/em ~495 nm/~515 nm). EthD-1 intră în celulele cu membranele deteriorate și suferă o îmbunătățire de 40 de ori a fluorescenței la legarea la acizii nucleici, producând astfel o fluorescență de culoare roșu strălucitor în celulele moarte (ex/em ~495 nm/~635 nm). EthD-1 este exclus de membrana plasmatică intactă a celulelor vii. Determinarea viabilității celulare depinde de aceste proprietăți fizice și biochimice ale celulelor.

Rezultatele obținute prin microscopie de fluorescență în urma analizei *Live/Dead* indică un procent ridicat de celule care apar verzi sub lumină fluorescentă, acestea fiind considerate celule viabile (Figura 41). Confluența celulară a fost de 80-90%. Celulele care apar roșii la lumină fluorescentă sunt considerate celule non-viabile (moarte), însă după cum se poate observa, la sub 1% din celule le este modificată viabilitatea și implicit morfologia. Nu se observă celule picnotice, rotunjite sau în suspensie. Aspectul este caracteristic fibroblastelor.

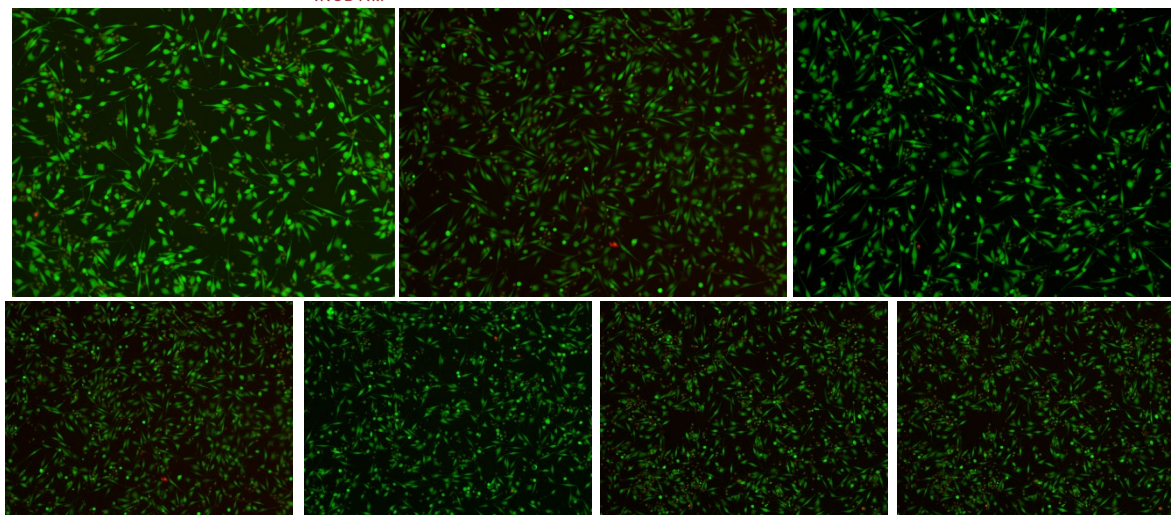


Figura 41. Martor celule HDF viabile fără tratament – sângea sus; Fibroblaste HDF tratate cu emulsia GC, concentrația 0.18mg/mL – sus mijloc; Fibroblaste HDF tratate cu hidrogelul GG, 0.18mg/mL – dreapta sus; HDF cu BvA, 5mg/mL – stânga jos; HDF cu BvE, 2mg/mL – stânga mijloc jos; HDF cu BvC, 8 mg/mL –dreapta mijloc jos; HDF cu BvF, 5mg/mL – dreapta jos.

Determinarea concentrațiilor derivaților oxidului nitric

Determinarea cantitativă a nitriților și nitraților eliberați în mediu celular a fost efectuată pe fibroblaste umane, linia HDF. Celulele cultivate așa cum s-a descris la testul MTT s-au testat cu probele GC, BvA, BvE, BvC și BvF, la concentrațiile 0.187 mg/mL, 0.187 mg/mL, 5 mg/mL, 2 mg/mL, 8 mg/mL și 5 mg/mL. Supernatantul celular a fost colectat și utilizat pentru determinarea nitriților și nitraților folosind kitul de testare a oxizilor nitrici pe bază de reactivi Griess (Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA) urmând instrucțiunile producătorului. Nitrații (NO₃⁻) și nitriții (NO₂⁻) sunt o parte integrantă a ciclul biologic al azotului. NO este o moleculă cheie de semnalizare care reglează o gamă largă de funcții fiziologice, cum ar fi homeostazia vasculară, reglarea respirației mitocondriale, modularea inflamației, a răspunsului imun specific [19], [20], [21]. Raportul NO₂/NO₃⁻ al celulelor netratate – martor, respectă valorile așteptate pentru modelele celulare umane (Figura 42), rația 10/90. Deoarece NO este implicat în diferite funcții fiziologice celulare rapoarte scăzute NO₂/NO₃⁻ au fost raportate ca fiind corelate pozitiv cu citotoxicitatea intracelulară și promovarea inflamației. Rezultatele obținute pentru probele BvE și BvC indică rapoarte reduse NO₂/NO₃⁻ (1/2, respectiv 1/3) (fig. ..), fiind corelate cu un grad moderat de citotoxicitate. Pentru restul probelor, rapoartele NO₂/NO₃⁻ sunt conforme, însă experimentele se vor repeta și pe alte linii celulare (de ex. PBMC) și efectele vor fi urmărite la timp diferiți de contact.

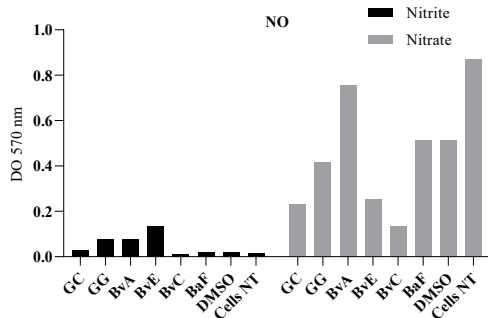


Figura 43. Determinarea cantitativă a nitraților și nitriților rezultați în urma tratamentului celulelor HDF cu probele reprezentate de emulsia GC, hidrogelul GG și activele acestora.

Determinarea profilului de citokine pro – antiinflamatorii

Determinarea unui panel de șase citokine pro- și anti-inflamatorii (IL-1β, IL-8, IL-10, IL-6, IL-12p70, TNF) s-a realizat utilizând kitul BD - CBA (Cytokine Beads Assay). Evaluarea s-a realizat pe linia celulară de fibroblaste HDF la 24 și 48 de ore după tratamentul cu probele obținute. În placa cu 96 de godeuri celulele au fost însămânțate celulele HDF la densitatea celulară de 1x 10⁵ și peste volumul de 90 μL suspensie celulară s-au adăugat 10 μL din probele testate. Au fost pregătite beads-urile de numărare și standardele conform instrucțiunilor producătorului. Probele, martorii și standardele au fost incubate 3 ore la întuneric, Tcam, împreună cu Capture Beads și reactivul de detecție Human Inflammatory Cytokine PE Detection Reagent. După incubare probele au fost spălate cu Wash Buffer, centrifugate, resuspendate în Wash Buffer și analizate prin citometrie în flux utilizând citometrul BD Accuri C6 plus echipat cu laserele 488 nm și 633 nm. Au fost numărate 5000 de evenimente/ probă.

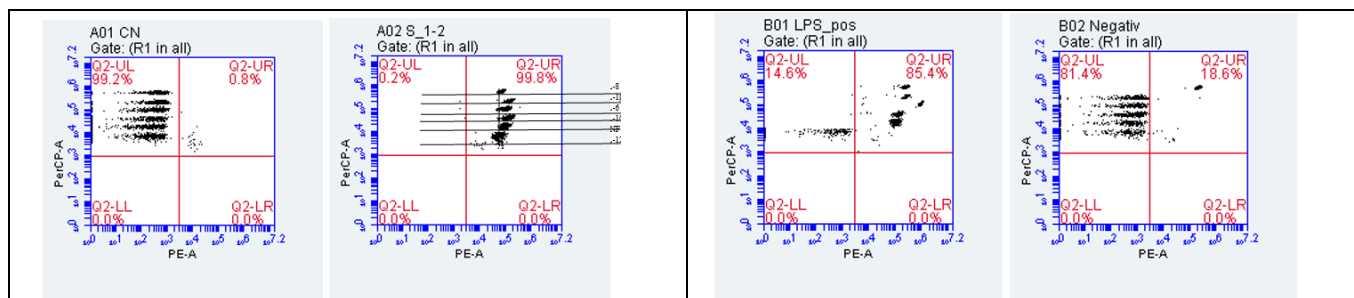


Figura 43. a) Control negativ **b)** Control pozitiv – expresie citokine activate

Figura 44. a) Martor celule HDF tratate cu LPS – activare citokine; **b)** Martor celule fără tratament

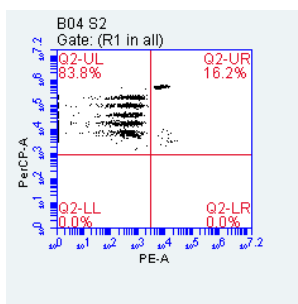


Figura 45. Profilul panelului de citokine pentru proba GC

GC	Count	Events/ μ L	% of This Plot	% of All	Mean PE-A	Mean PerCP-A	CV PE-A	CV PerCP-A
This Plot	1,954	27	100.00 %	59.90 %	1,449.28	135,900.33	185.25 %	131.74 %
Q2-UL	1,638	23	83.83 %	50.21 %	381.64	65,723.68	115.41 %	106.05 %
Q2-UR	316	4	16.17 %	9.69 %	6,983.47	499,664.15	37.97 %	24.65 %

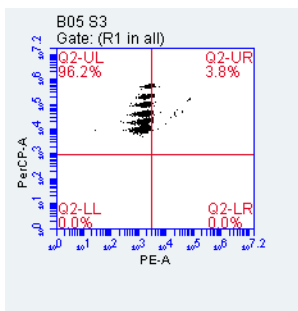


Figura 46. Profilul panelului de citokine pentru proba GG

GG	Count	Events/ μ L	% of This Plot	% of All	Mean PE-A	Mean PerCP-A	CV PE-A	CV PerCP-A
This Plot	1,970	29	100.00 %	78.61 %	1,996.39	113,781.91	212.47 %	132.72 %
Q2-UL	1,895	27	96.19 %	75.62 %	1,621.82	107,106.18	32.76 %	133.48 %
Q2-UR	75	1	3.81 %	2.99 %	11,460.56	282,455.43	168.38 %	81.46 %

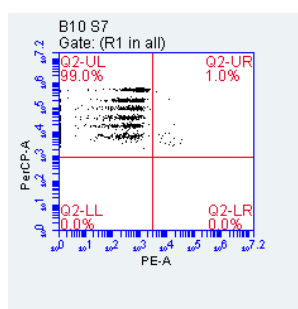


Figura 47. Profilul panelului de citokine pentru proba BvA

BvA	Count	Events/ μ L	% of This Plot	% of All	Mean PE-A	Mean PerCP-A	CV PE-A	CV PerCP-A
This Plot	1,957	36	100.00 %	71.63 %	526.38	158,708.96	301.17 %	123.75 %
Q2-UL	1,938	35	99.03 %	70.94 %	400.77	159,864.41	122.26 %	123.05 %
Q2-UR	19	0	0.97 %	0.70 %	13,338.58	40,852.84	62.10 %	269.26 %

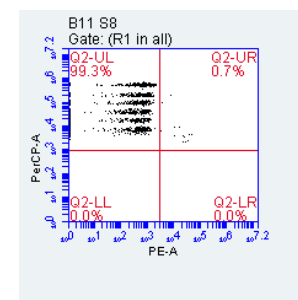


Figura 48. Profilul panelului de citokine pentru proba BvE

BvE	Count	Events/ μ L	% of This Plot	% of All	Mean PE-A	Mean PerCP-A	CV PE-A	CV PerCP-A
This Plot	1,942	65	100.00 %	74.75 %	486.64	148,105.07	431.07 %	127.62 %
Q2-UL	1,928	64	99.28 %	74.21 %	341.05	148,997.37	140.23 %	127.08 %
Q2-UR	14	0	0.72 %	0.54 %	20,535.79	25,222.79	64.24 %	210.73 %

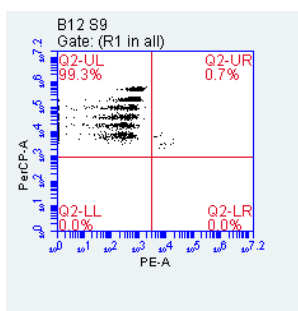
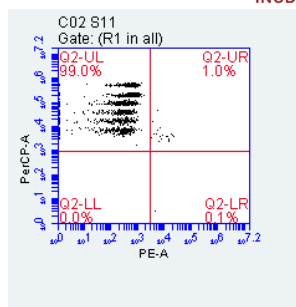


Figura 49. Profilul panelului de citokine pentru proba BvC

BvC	Count	Events/ μ L	% of This Plot	% of All	Mean PE-A	Mean PerCP-A	CV PE-A	CV PerCP-A
This Plot	1,957	36	100.00 %	71.63 %	526.38	158,708.96	301.17 %	123.75 %
Q2-UL	1,938	35	99.03 %	70.94 %	400.77	159,864.41	122.26 %	123.05 %
Q2-UR	19	0	0.97 %	0.70 %	13,338.58	40,852.84	62.10 %	269.26 %



BaF	Count	Events/ μ L	% of This Plot	% of All	Mean PE-A	Mean PerCP-A	CV PE-A	CV PerCP-A
This Plot	1,971	51	100.00 %	75.75 %	400.28	138,188.32	297.35 %	130.63 %
Q2-UL	1,951	50	98.99 %	74.98 %	300.08	139,536.20	101.15 %	129.67 %
Q2-UR	19	0	0.96 %	0.73 %	10,469.42	7,055.42	55.82 %	134.22 %

Figura 50. Profilul panelului de citokine pentru proba BaF

S-au obținut o serie de controale: negativ – citokine absente, pozitiv – conform indicațiile producătorului kitului *CBA*, celule HDF tratate cu LPS și netratate (figurile 43-44). După cum se poate observa în fig 43 a) inactivarea citokinelor corespunde cu shift-ul la stânga în cvadrantul Q2-UL, în timp ce activarea acestora (fig. 43b) duce la deplasarea celulelor spre dreapta, în cvadrantul Q2-UR. În cazul controlului de celule fără tratament se poate observa activarea IL-8 (fig. 44b). Rezultatele obținute după tratarea celulelor cu probele GC (conc. 0.18mg/mL), GG (conc. 0.18mg/mL), BvA (conc. 5mg/mL), BvE (conc. 2mg/mL), BvC (conc. 8mg/mL), BaF (conc. 5mg/mL), indică inactivarea panelului de citokine, având un efect de tamponare a expresiei IL-8 întâlnită la martorul celular fără tratament (figurile 45-50).

A2.8. Studiul stabilității complexelor supramoleculare incluși în hidrogeluri și evaluarea gradului de eliberare a activelor

Curba de calibrare pentru β -ciclodextrină a fost construită prin determinarea intensității de absorbție pentru un set de soluții de β -CD de concentrații cunoscute. Soluția stoc de concentrație 32 mg/mL a fost preparată prin dizolvarea unei cantități de 1280 mg β -CD în 40 mL de soluție Ringer. Pornind de la această soluție stoc s-au preparat diverse diluții: 24 mg/mL, 16 mg/mL, 12 mg/mL, 8 mg/mL, 4 mg/mL. Au fost înregistrate spectrele UV în domeniul de lungimi de undă 400-190 nm. Curba de calibrare s-a construit pentru intensitățile de absorbție înregistrate la 203 nm. Probele GC și GH obținute în urma procesului de eliberare din bază realizată prin dializarea unei probe de crema (10g) printr-o membrana de dializa (MWCO < 10000) în 35mL soluție Ringer, au fost diluate de mai multe ori (256 ori) până când s-a obținut o concentrație adecvată pentru înregistrarea spectrelor UV. Prin suprapunerea spectrelor UV ale soluțiilor colectate la diferite intervale de timp, în ambele cazuri se observă creșterea concentrației speciilor urmărite.

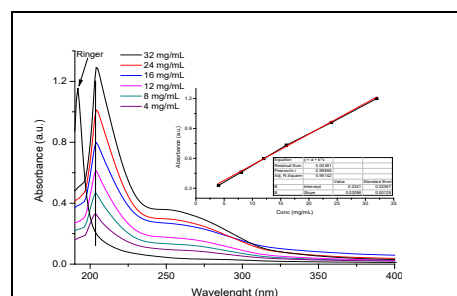


Figura 51. Curbă de calibrare β -ciclodextrină

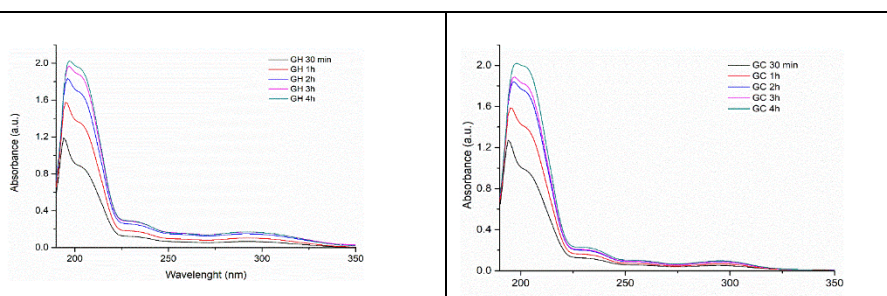


Figura 52. Ssuprapunerea spectrelor UV ale soluțiilor colectate la diferite intervale de timp

A2.9. Obținerea hidrogelurilor funcționale în condiții de producție la nivel micro-pilot

Realizarea scalării la nivel micro-pilot a presupus într-o primă etapă obținerea β ciclodextrinelor în cantitățile necesare obținerii a minim 1 kg de produs finit din fiecare formulă.

În urma stabilirii parametrilor optimi ai proceselor de formare a complexelor de incluziune cu β -ciclodextrina a compuşilor studiați, vitaminele A, C, E și acidul ferulic, s-a trecut la reproducerea complexelor obținuți în procesul de scalare, în vederea obținerii unor cantități de materiale suficiente pentru efectuarea testelor ulterioare. Procesul de scalare s-a efectuat în triplicat în cazul complexului de incluziune a fiecărei substanțe active studiate.

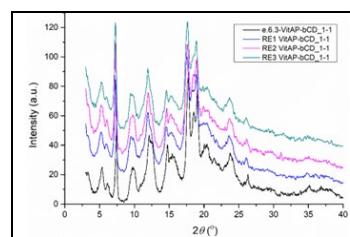


Figura 54. Difractogramele de raze X pe pulberi ale palmitatului de vitamina A, β -ciclodextrinei și complexelor de incluziune ale

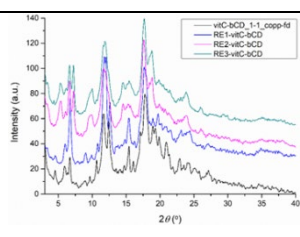


Figura 55. Difractogramele de raze X pe pulberi ale vitaminei C, β -ciclodextrinei și complexelor de incluziune ale

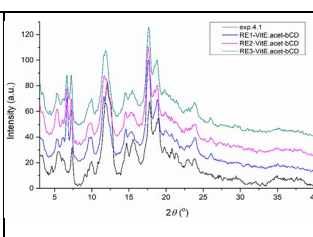


Figura 56. Difractogramele de raze X pe pulberi ale acetatului de vitamina E, β -ciclodextrinei și complexelor de incluziune ale

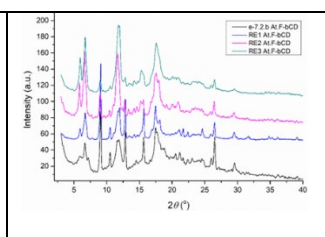


Figura 57. Difractogramele de raze X pe pulberi ale Acidului t-ferulic, β -ciclodextrinei și complexelor de incluziune ale

acestora obținuti în urma procesului de scalare.	acestora obținuti în urma procesului de scalare.	acestora obținuti în urma procesului de scalare.	acestora obținuti în urma procesului de scalare.
--	--	--	--

Complexul dintre palmitatul de vitamina A și β -ciclodextrina, *VitA-P- β CD 1:1 FD*, cu un conținut de 125 mg VitA-P și 315 mg β CD a fost preparat în triplicat, în parametrii de proces stabiliți în experimentul e-6.3.

Complexul *VitC- β CD 1:1 FD*, cu un conținut de 125 mg VitC și 915 mg β CD a fost preparat în triplicat, în parametrii de proces stabiliți în experimentul *VitC β CD 1:1_copp2_FD* (vezi decontare 2022).

Complexul dintre acetatul de vitamina E și β -ciclodextrina, *VitE.acet- β CD 1:1 FD*, cu un conținut de 125 mg VitA-P și 342 mg β CD a fost preparat în triplicat, în parametrii de proces stabiliți în experimentul e-4.1.

Complexul dintre Acidul t-ferulic și β -ciclodextrina, *A.t-F- β CD 1:1 FD*, cu un conținut de 125 mg A.t-F și 840 mg β CD a fost preparat în triplicat, în parametrii de proces stabiliți în experimentul e-7.2.a.

Toate probele obținute în urma procesului de scalare au fost măsurate prin difracție de raze X pe pulberi. Difractogramele au fost comparate cu cele obținute în urma experimentelor inițiale. În cazul tuturor probelor, intensitățile de difracție se suprapun cu cele ale complexelor obținute în urma experimentelor de complexare, rezultă că acești complecși au fost obținuti și la scală mare.

Formulele dezvoltate au fost scalate la nivel micro-pilot (1 kg/produs). În urma caracterizării aspectului produselor obținute, a stabilității acestora, nu au fost observate fenomene de separare ale fazelor. A fost testată stabilitatea produselor în condiții normale de lumină, umiditate și temperatură, precum și în condiții accelerate, cu expunerea la temperatură și umiditate ridicată (40°C, 75% umiditate relativă). Caracteristicile complexelor supramoleculare și a hidrogelurilor înainte de încorporarea în formula de produs finit s-au menținut după perioada de stabilitate. S-au repetat testele de eliberare din bază pentru confirmare. Rata de curgere a cremelor formulate a fost determinată prin măsurarea timpului necesar de curgere a unei picături. Astfel pentru crema-gel ce prezintă o vâscozitate mai mare sunt necesare 6 min pentru 20 μ L iar pentru hidrogel sunt necesare 2 min.

Rezultatele legate de aspect, pH final și încărcătura microbiană sunt prezentate în tabelele 5 și 6.

Tabelul 5. Caracterizarea aspectului produselor formulate și a valorilor de pH optime

Denumire produs	Aspect produs	Valoare pH inițial	Valoare pH final
GC	Omogen, cu consistență cremoasă, aspect aerat, de culoare aproape alb, miros discret.	4,67	5,55
GG	Omogen, cu consistență specifică hidrogelului, fluidă aspect foarte aerat, de culoare portocalie, cu miros discret.	4,63	5,60

Tabelul 6. Determinarea încărcăturii microbiene

Proba test	Caracteristici (Numar total microorganisme viabile)	Rezultate
GC	Număr total bacterii aerobe viabile, UFC/g	< 10 UFC/g
	Număr total drojdii și mucegaiuri, UFC/g	< 10 UFC/g
GG	Număr total bacterii aerobe viabile, UFC/g	< 10 UFC/g
	Număr total drojdii și mucegaiuri, UFC/g	< 10 UFC/g

A2.10. Diseminarea rezultatelor

Articole în jurnale ISI

- *Curcumin and whey protein concentrate binding: Thermodynamic and structural approach*, Csaba-Pal Rac, Levente Zsolt Rac, Calin Gabriel Floare, Gheorghe Tomoaia, Ossi Horovitz, Sorin Riga, Irina Kacso, Gheorghe Borodi, Melinda Sarkozi, Aurora Mocanu, Cecilia Roman, Maria Tomoaia-Cotisel, *Food Hydrocolloids*, 139, 1 – 17, 108547 (2023);
- *Inclusion of a Catechol-Derived Hydrazinyl-Thiazole (CHT) in -Cyclodextrin Nanocavity and Its Effect on Antioxidant Activity: A Calorimetric, Spectroscopic and Molecular Docking Approach*, Mihaela Mic, Adrian Pîmău*, Calin G. Floare, Mariana Doina Palage, Ovidiu Oniga, Gabriel Marc, *Antioxidants*, 12, 1367, 1 – 16 (2023);
- *Antioxidant and Cytotoxic Activity of New Polyphenolic Derivatives of Quinazolin-4(3H)-one: Synthesis and In Vitro Activities Evaluation*, Raluca Pele, Gabriel Marc, Ioana Ionut, Cristina Nastasa, Ionel Fizes, Adrian Pîmău, Laurian Vlase, Mariana Palage, Smaranda Oniga, Ovidiu Oniga, *Pharmaceutics*, 15, 136, 1– 23 (2023)

Participări la “14th International Conference Processes in Isotopes and Molecules (PIM), Cluj – Napoca:

- Antioxidant Activity Evaluation and Assessment of the Binding Affinity to HSA of a New Catechol Hydrazinyl-Thiazole Derivative, A Pîmău, M Mic, C G Floare, M Bogdan, B M Tihăuan, O Oniga, G Marc

- Inclusion of CHT in β -cyclodextrin nanocavity and its effect on antioxidant potential of CHT: A calorimetric, spectroscopic and molecular docking approach, M Mic, A Pîmău, C G Floare, M Miclăuș, I Kacso, B M Tihăuan, O Oniga, G Marc
- Investigation of Vitamin C and β -cyclodextrin interactions in liquid and solid state, I Kacso, M Mic, M Miclaus, C Floare, X Filip and A Pîmău.

În vederea asigurării transparenței proiectului GRACE a fost actualizat site-ul www.sanimed.ro/proiecte/grace unde au fost încărcate concluziile acestei etape împreună cu rezultatele și diseminarea acestora.

Rezumatul etapei 2023

Etapa aferentă anului 2023 a avut un obiectiv bi-partit, și anume a) Definirea funcționalității fizico-chimice și a compoziției produselor inovatoare și b) Modelarea funcționalității biologice și determinarea parametrilor tehnologici pentru obținerea produselor inovatoare.

Obiectivul propus a fost atins cu ajutorul celor zece activități, conducând la (i) evaluarea afinității și stoichiometriei de legare în stare lichidă a principiilor active cu ciclodextrine; (ii) precizarea teoretică a conformațiilor de energie minimă a complexelor de incluziune; (iii) sinteza și caracterizarea hidrogelurilor Col-HA funcționale obținute prin includerea complexelor supramoleculare; (iv) evaluarea analitică a gradului de eliberare a activelor din complexii de incluziune; (v) evaluarea activității antimicrobiene, a citotoxicității și a răspunsului inflamator a complexelor nou formați, a formulelor dezvoltate; (vi) obținerea complexelor și a formulelor în condiții de producție la nivel micro-pilot.

Diseminarea rezultatelor s-a realizat prin participarea cu trei lucrări la o conferință națională din domeniu și publicarea a trei articole științifice în jurnale indexate ISI. În vederea asigurării transparenței proiectului GRACE s-a realizat site-ul www.sanimed.ro/proiecte/grace unde a fost încărcat rezumatul acestei etape împreună cu rezultatele și diseminarea acestora.

Bibliografie

- [1] P. Saha and M. R. Rafe, "Cyclodextrin: A prospective nanocarrier for the delivery of antibacterial agents against bacteria that are resistant to antibiotics," *Heliyon*, vol. 9, no. 9, p. e19287, Sep. 2023, doi: 10.1016/J.HELIYON.2023.E19287.
- [2] A. Machelart *et al.*, "Intrinsic antibacterial activity of nanoparticles made of β -cyclodextrins potentiates their effect as drug nanocarriers against tuberculosis," *ACS Nano*, vol. 13, no. 4, pp. 3992–4007, Apr. 2019, doi: 10.1021/ACS.NANO.8B07902/SUPPL_FILE/NN8B07902_SI_002.PDF.
- [3] S. Christaki *et al.*, "Cyclodextrins for the Delivery of Bioactive Compounds from Natural Sources: Medicinal, Food and Cosmetics Applications," *Pharmaceuticals*, vol. 16, no. 9, Sep. 2023, doi: 10.3390/PH16091274.
- [4] M. H. Alma, M. Ertaş, S. Nitz, and H. Kollmannsberger, "Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.)," *BioResources*, vol. 2, no. 2, pp. 265–269, 2007.
- [5] Y.-H. Jiang *et al.*, "Cross-linking methods of type I collagen-based scaffolds for cartilage tissue engineering," *Am. J. Transl. Res.*, vol. 14, no. 2, p. 1146, 2022, Accessed: Dec. 06, 2023. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC8902548/.
- [6] G. M. Morris *et al.*, "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility," *J. Comput. Chem.*, vol. 30, no. 16, pp. 2785–2791, Dec. 2009, doi: 10.1002/JCC.21256.
- [7] M. A. Matin *et al.*, "The Effects of Oxidation States, Spin States and Solvents on Molecular Structure, Stability and Spectroscopic Properties of Fe-Catechol Complexes: A Theoretical Study," *Adv. Chem. Eng. Sci.*, vol. 7, no. 2, pp. 137–153, Feb. 2017, doi: 10.4236/ACES.2017.72011.
- [8] Y. Zhao and D. G. Truhlar, "The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: Two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals," *Theor. Chem. Acc.*, vol. 120, no. 1–3, pp. 215–241, May 2008, doi: 10.1007/S00214-007-0310-X/METRICS.
- [9] Y. Zhao and D. G. Truhlar, "Density functionals with broad applicability in chemistry," *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, no. 2, pp. 157–167, Feb. 2008, doi: 10.1021/AR700111A/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AR-2007-00111A_0011.GIF.
- [10] M. R. Caira, J. L. Miller, and L. R. Nassimbeni, " β -Cyclodextrin Inclusion Complexes of Mg^{2+} and Ca^{2+} Salts of Meclofenamic Acid: Preparation and Structural Characterisation," *Supramol. Chem.*, vol. 18, no. 7, pp. 553–559, Oct. 2006, doi: 10.1080/10610270600844005.
- [11] O. Trott and A. J. Olson, "AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading," *J. Comput. Chem.*, vol. 31, no. 2, pp. 455–461, Jan. 2010, doi: 10.1002/JCC.21334.
- [12] J. Gasteiger and M. Marsili, "Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges," *Tetrahedron*, vol. 36, no. 22, pp. 3219–3228, Jan. 1980, doi: 10.1016/0040-4020(80)80168-2.
- [13] C. G. Floare, M. Bogdan, M. Tomoaia-Cotișel, and A. Mocanu, "¹H NMR spectroscopic characterization of inclusion complex of desferrioxamine B chelator and β -cyclodextrin," *J. Mol. Struct.*, vol. 1248, p. 131477, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.MOLSTRUC.2021.131477.
- [14] M. Mic *et al.*, "Synthesis and molecular interaction study of a diphenolic hidrazinyl-thiazole compound with strong antioxidant and antiradical activity with HSA," *J. Mol. Struct.*, vol. 1244, p. 131278, Nov. 2021, doi: 10.1016/J.MOLSTRUC.2021.131278.
- [15] M. Mic, A. Pîmău, C. G. Floare, and M. Bogdan, "Study of the binding affinity between imatinib and α -1 glycoprotein using nuclear spin relaxation and isothermal titration calorimetry," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 147, pp. 326–332, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.01.077.
- [16] M. Bogdan, C. G. Floare, L. Buimaga-Iarinca, C. Morari, and A. Pîmău, "NMR study and computational assays of meclofenamic Na salt and β -cyclodextrin inclusion complex," *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, vol. 85, no. 1–2, pp. 111–120, Jun. 2016, doi: 10.1007/S10847-016-0610-7/FIGURES/11.
- [17] E. F. Pettersen *et al.*, "UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis," *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612, Oct. 2004, doi: 10.1002/JCC.20084.

- [18] C. P. Racz *et al.*, “Curcumin and whey protein concentrate binding: Thermodynamic and structural approach,” *Food Hydrocoll.*, vol. 139, p. 108547, May 2023, doi: 10.1016/J.FOODHYD.2023.108547.
- [19] M. Hidaka, A. Gotoh, T. Shimizu, K. Minamisawa, H. Imamura, and T. Uchida, “Visualization of NO₃–/NO₂– Dynamics in Living Cells by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Imaging Employing a Rhizobial Two-component Regulatory System,” *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 5, p. 2260, Jan. 2016, doi: 10.1074/JBC.M115.687632.
- [20] E. Caballano-Infantes, G. M. Cahuana, F. J. Bedoya, C. Salguero-Aranda, and J. R. Tejedo, “The Role of Nitric Oxide in Stem Cell Biology,” *Antioxidants 2022, Vol. 11, Page 497*, vol. 11, no. 3, p. 497, Mar. 2022, doi: 10.3390/ANTIOX11030497.
- [21] M. Q. Man, J. S. Wakefield, T. M. Mauro, and P. M. Elias, “Regulatory Role of Nitric Oxide in Cutaneous Inflammation,” *Inflamm. 2021 453*, vol. 45, no. 3, pp. 949–964, Jan. 2022, doi: 10.1007/S10753-021-01615-8.

06.12.2023

Director de proiect,
Dr. Biochim. Bianca-Maria Tihăuan

