

**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI DIN CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE CHIMIE ȘI INGINERIE CHIMICĂ
DEPARTAMENTUL DE INGINERIE CHIMICĂ
CENTRUL DE CERCETARE ȘTIINȚIFICĂ ÎN CHIMIE FIZICĂ**

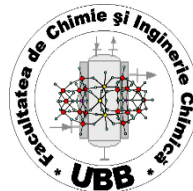
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**STUDIUL FIZICO-CHIMIC AL UNOR COMPUȘI
NATURALI CU ACTIVITATE BIOLOGICĂ**

**DOCTORAND:
Ing. Levente-Zolt RACZ**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:
PROF. UNIV. DR. MARIA TOMOAI-A-COTIȘEL**

**CLUJ-NAPOCA
2022**



**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI DIN CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE CHIMIE ȘI INGINERIE CHIMICĂ
DEPARTAMENTUL DE INGINERIE CHIMICĂ
CENTRUL DE CERCETARE ȘTIINȚIFICĂ ÎN CHIMIE FIZICĂ**

**STUDIUL FIZICO-CHIMIC AL UNOR COMPUȘINATURALI CU
ACTIVITATE BIOLOGICĂ**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Comisia:

Președinte:

Prof. Univ. Dr. Ion Grosu - Membru corespondent al Academiei Române,
Director - Școala Doctorală Chimie, Universitatea Babeș-Bolyai din Cluj-Napoca

Conducător Științific:

Prof. Univ. Dr. Maria Tomoaia-Cotișel - Membru titular al Academiei
Oamenilor de Știință din România
Director, Centrul de Cercetare Științifică în Chimie Fizică, Universitatea Babeș-
Bolyai din Cluj-Napoca

Membrii:

Prof. Univ. Dr. Ing. George Arghir - Profesor Emerit, Universitatea Tehnică din
Cluj-Napoca; Membru de onoare în Academia de Știință și Tehnică, din România

Prof. Univ. Dr. Ossi Horovitz - Universitatea Babeș-Bolyai din Cluj-Napoca

Prof. Univ. Dr. Ing. Gheorghe Nechifor - Universitatea Politehnică din București-
Facultatea de Chimie Aplicată

Data susținerii: 28 Septembrie 2022

CUPRINS TEZA:

INTRODUCERE	7
Bibliografie	11
CAPITOLUL 1. STRATEGII PENTRU ÎMBUNĂTĂȚIREA BIODISPONIBILITĂȚII, BIOACTIVITĂȚII ȘI COMPORTAMENTULUI FIZICO-CHIMIC AL CURCUMINEI	13
Rezumat	13
1.1 Introducere	13
1.2. Acțiuni biologice ale curcuminei	15
1.2.1. Bioactivități generale și limitări	15
1.2.2 Proprietăți antibacteriene	17
1.2.3 Efectul antifungic	18
1.2.4 Activitatea antivirală	19
1.2.5 Acțiunea antioxidantă și antiinflamatoare a curcuminei	20
1.2.6 Efectul antitumoral al curcuminei	21
1.3. Îmbunătățirea biodisponibilității curcuminei	22
1.3.1 Dispersii solide pe bază de curcumină	22
1.3.2 Complexarea curcuminei cu protein	24
1.3.3. Combinații cu molecule bioactive	38
1.4. Concluzii	41
1.5 Bibliografie	43
CAPITOLUL 2. INGINERIA USCĂRII PRODUSELOR ALIMENTARE ȘI A PRODUSELOR FARMACEUTICE	72
2.1 Uscarea prin congelare (Freeze drying)	72
2.2 Uscarea prin pulverizare (Spray drying)	74
2.3 Bibliografie	80
CAPITOLUL 3. METODE DE CARACTERIZARE A COMPLECȘILOR	82
3.1. Difrakția de raze X pe pulberi (XRD)	82
3.2. Microscopia electronică cu scanare (SEM)	82
3.3 Microscopia electronică de transmisie (TEM)	83
3.4 Microscopia de forță atomică (AFM)	83
3.5 Spectroscopia de infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR)	83
3.6 Analiza termică (DSC, TGA)	84
3.7 Spectrofotometria UV-Vis	84
3.8 Spectroscopia de fluorescență	84
3.9 Bibliografie	85
CAPITOLUL 4. RĂSPUNSUL IN VITRO AL OSTEOLASTELOR UMANE CULTIVATE PE HIDROXIAPATITE SUBSTITUITE CU STRONȚIU	87
Rezumat	87
4.1 Introducere	87
4.2 Partea experimentală	88
4.2.1 Materiale și metode	88

4.2.2 Metode de caracterizare	90
4.3 Rezultate și discuții	93
4.3.1 Substraturi HAP și HAP-Sr (schele)	93
4.3.2 Evaluarea procesului de mineralizare	96
4.4 Concluzii	97
4.5 Bibliografie	98
CAPITOLUL 5. DISPERSII SOLIDE DE CURCUMIN-PROTEINA DIN ZER CU SOLUBILITATE ÎMBUNĂTĂȚITĂ ȘI EFECT INHIBITOR AL CELULELOR CENCEROASE	100
Rezumat	100
5.1 Introducere	100
5.2 Rezultate	102
5.2.1 Caracterizarea complexului CCM-WPC_SD	102
5.3 Concluzii	110
5.4 Secțiunea experimentală	111
5.4.1 Materiale	111
5.5 Bibliografie	115
CAPITOLUL 6. LEGAREA DINTRE CURCUMINĂ ȘI CONCENTRATUL DE PROTEINĂ DIN ZER. ABORDARE TERMODINAMICĂ ȘI STRUCTURALĂ	118
Rezumat	118
6.1 Introducere	118
6.2 Materiale și metode	121
6.2.1 Materiale	121
6.2.2 Prepararea probelor	121
6.2.3 Complexarea curcuminei cu concentrat de proteină din zer	122
6.2.4 Caracterizarea fizico-chimică a nanocomplexelor	123
6.3 Rezultate și discuții	126
6.3.1 Spectrometrie de fluorescență	126
6.3.2 Analiza XRD	136
6.3.3 Spectroscopie de infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR)	140
6.3.4 Caracterizarea morfologiei și nanostructurii prin AFM.....	143
6.3.5 Andocare moleculară	146
6.4 Concluzii	153
6.5 Bibliografie	155
CAPITOLUL 7. COMPLEXAREA CURCUMINEI CU PROTEINĂ DIN ZER PENTRU ÎMBUNĂTĂȚIREA SOLUBILITĂȚII ÎN SOLUȚII APOASE, STABILITATEA ȘI EFECTUL ANTIOXIDANT AL CURCUMINEI	165
7.1 Introducere	165
7.2 Rezultate și discuții	166
7.2.1 Analiza termogravimetrică (TG/DTG)	166
7.2.2 Analiza prin difracție de raze X (XRD)	169
7.2.3 Microscopia electronică cu scanare (SEM)	170
7.2.4 Solubilitatea în apă	172
7.2.5 Stabilitatea curcuminei și a complexilor săi în diferite soluții apoase ...	173

7.2.6 Activitate antioxidantă a CCM-ei prin metoda de captare a radicalilor liberi DPPH•.....	178
7.3 Concluzii	184
7.4 Secțiunea experimentală	184
7.4.1 Materiale și metode	184
7.5 Bibliografie	188
CAPITOLUL 8. LEGAREA PROTEINEI DIN ZER DE CURCUMINĂ ȘI CARACTERISTICILE STRUCTURALE ALE COMPLEXULUI ACESTORA EVIDENȚIATE PRIN MICROSCOPIE DE FORȚA ATOMICĂ	191
Rezumat	191
8.1 Introducere	191
8.2 Rezultate și discuții	194
8.3 Concluzii	199
8.4 Secțiunea experimentală	199
8.4.1 Materiale	199
8.4.2 Prepararea complexului CCM-WPC.....	200
8.4.3 Pregătirea probelor pentru investigarea AFM	200
8.4.4 Microscop de Forța Atomică	200
8.5 Bibliografie	201
CAPITOLUL 9. SINTEZA ȘI EVALUAREA COMPOZITELOR FORMATE DIN PEG, CURCUMINA ȘI PROTEINA DIN ZER – STABILITATE TERMICĂ ÎMBUNĂTĂȚITĂ	205
Rezumat	205
9.1 Introducere	205
9.2.1 Stabilitatea termică a complexilor sintetizați.....	207
9.2.2. Spectroscopie de infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)	213
9.2.3 Stabilitatea curcuminei și a complexilor săi în soluții apoase	216
9.3 Concluzii	223
9.4 Secțiunea experimentală	224
9.4.1 Materiale și metode	224
9.4.2 Metode de analiză	225
9.5 Bibliografie	226
CAPITOLUL 10. CONCLUZII GENERALE	235
CAPITOLUL 11	
LISTĂ ARTICOLE ISI.....	240
Lista de Conferințe - Diseminarea Rezultatelor Științifice din Teza de Doctorat	241
Lista contractelor de cercetare științifică.....	242
Mulțumiri.....	243

CUVINTE CHEIE

curcumina, concentrate din protein din zer, PEG4000, PEG6000, Silimarina, resveratrol, activitate antioxidanta, stabilitate, solubilitate, andocare moleculară

INTRODUCERE

Curcumina (CCM) este compusul predominant (70%) din extractul turmeric, este un polifenol natural care are acțiune antioxidantă, antiinflamatoare și anticancerigenă. Este un compus care prezintă sensibilitate la lumină, aer și la căldură, și de asemenea are solubilitate redusă în apă. Acțiunea farmacologică este diminuată datorită sensibilității la lumină, structurii hidrofobe și respectiv din cauza instabilității chimice. Scopul principal al prezentei teze de doctorat este determinarea unor tehnici de preparare în scopul îmbunătățirii solubilității și stabilității curcuminei în diverse medii apoase de pH 1.5 (mediu gastric simulat), pH 7.4 (mediu fiziologic simulat) și pH 8.0 (mediu intestinal simulat) și la diferite temperaturi: 296 K, 301 K, 309 K și 313 K.

În acest context, în **Capitolul 1** au fost dezvoltate câteva strategii și anume: încapsularea CCM în proteina, de exemplu în concentratul de proteina din zer, prin complexare în diverse medii cu pH controlat și în funcție de temperatura, prin coprecipitare și uscare prin pulverizare, SD, sau prin liofilizare, FD.

Scopul principal al prezentei teze de doctorat este determinarea unor tehnici de preparare și caracterizare în scopul îmbunătățirii solubilității și stabilității curcuminei, descrise în **Capitolul 2 și 3**. În scopul determinării relației dintre metoda de preparare și proprietățile/aplicațiile produsului obținut, în funcție de caracteristicile materialului investigat, a fost utilizat un număr mare de metode de caracterizare fizico-chimice.

Capitolul 4 deschide o tematică de top și anume folosirea nanomaterialelor nanostructurate pentru transportul ionilor fiziologic esențiali sau a moleculelor biologice active in vitro sau in vivo. Scopul acestui studiu a fost de a analiza răspunsul osteoblastelor cultivate pe hidroxiapatite substituie cu stronțiu (HAP-Sr) de cristalinitate ridicată bine definită depuse sub formă de pelicule subțiri pe plăci de sticlă. Până în prezent, acest aspect nu a fost investigat cu atenție în contextul bioceramicii. În acest studiu, prezentăm activitatea osteoblastelor pe HAP-Sr sintetizat pentru diferite cantități de stronțiu care înlocuiesc calciu în cadrul rețelei de hidroxiapatită ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAP), și anume HAP-5%Sr, HAP-10%Sr, HAP-15%Sr și HAP-59,2%Sr (Sr-HAP, cu formula $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), în comparație cu HAP pur stoichiometrică, ales ca martor. Fiecare bioceramică a fost depusă ca substrat subțire multistrat auto-asamblat (scaffold) și legată chimic de suprafața plăcilor de sticlă. Utilizarea acestor nanomateriale drept vehicul de transport al curcuminei este în progres în Centrul de cercetare în Chimie Fizică în vederea folosirii în implante ortopedice împotriva infecțiilor.

În **Capitolul 5**, sistemul dispers solid cu conținut ridicat de curcumina a fost preparat cu concentrat de proteina din zer în raport molar de 5:1 prin metoda uscării prin pulverizare. Analiza prin difracție de raze X pe pulberi și DSC arată formarea

sistemului dispers solid în stare amorfă, iar analiza FTIR identifică prezența unor interacțiuni slabe de tip legături de hidrogen între componentele sistemului. Imaginile SEM arată o morfologie omogenă a microparticulelor sferice.

Capitolul 6 descrie interacțiunea moleculară dintre curcumină, CCM și concentratul de proteina din zer, WPC, care a fost studiată utilizând măsurători de fluorescență. Numărul de legare (n), constanta de legare (K_s) și parametrii termodinamici (ΔG , ΔH și ΔS) au fost determinați la diferite temperaturi și la diferite valori ale pH-ului soluțiilor apoase. Abordarea termodinamică și structurală a mecanismului de legare dintre CCM și WPC constituie o premieră în literatură de specialitate. S-a evidențiat cea mai mare stabilitate a acestui complex CCM-WPC în mediu cu pH acid (de exemplu, fluid gastric cu pH 1,5), scăzând la valoarea pH-ului alcalin (de exemplu, lichid din intestinul subțire cu pH 7,5 până la 8) și, astfel, indicând o bună stabilitate a acestui complex în mediul gastric simulat. Complexul CCM-WPC ca pulbere uscată prin pulverizare a fost investigat în continuare prin imagistica XRD, FTIR și AFM. Interacțiunea și mecanismul de legare a fost aprofundat și prin andocare moleculară.

Capitolul 7 tratează stabilitatea și solubilitatea curcuminei, CCM, care pot fi îmbunătățite prin complexarea cu concentrat de proteina din zer (WPC). CCM-WPC de complecși cu raport molar 1:1 și 1:0,5 au fost încapsulate prin două metode, și anume uscare prin pulverizare (SD) și uscare prin congelare/lioofilizare (FD). Obiectivul major al acestei lucrări este de a determina stabilitatea și solubilitatea complexelor CCM-WPC încapsulate prin metoda SD și FD. Difrakția de raze X și analiza termogravimetrică au fost efectuate pe CCM brute și WPC, precum și pe complecșii acestora. Stabilitatea acestor complecși CCM-WPC este studiată prin spectrele UV-Vis și timpul de injumatărire, $t_{1/2}$, determinat prin cinetica de ordin 2. S-a studiat de asemenea și activitatea antioxidantă IC_{50} a curcuminei atât în stare pură cât și în complecșii CCM-WPC de diverse rapoarte molare.

Capitolul 8, folosește microscopia de forță atomică (AFM) pentru a evidenția topografia suprafeței filmelor de adsorbție pentru curcumina pură, proteina din zer pură și complexul lor (CCM-WPC). Rezultatele obținute arată că nanoparticulele individuale au fost stabilizate în dispersie apoasă și adsorbite cu succes pe lamele de sticlă sub forma de filme subțiri bine organizate și netede cu o rugozitate superficială de cca 5 nm.

O altă strategie este dezvoltată în **Capitolul 9** și constă în utilizarea polimerului de sinteză, polietilen glicolul, PEG, biocompatibil de masă moleculară variată: PEG400, PEG4000 sau PEG6000, în topitura. Prin înglobarea curcuminei în topitura PEG rezultă un sistem stabil bicomponent. Am constatat că introducerea proteinei din zer în compozitul PEG-CCM bicomponent a condus la un alt compozit tri-component PEG-CCM-WPC cu îmbunătățirea stabilității curcuminei în medii apoase; prin adăugare de silimarina, SIL, compozitul rezultat a fost: PEG-CCM-WPC-SIL; prin aceeași metodă s-a preparat și PEG-CCM-WPC-RESV. Așadar s-au preparat 8 noi materiale, numite compozite sau complecși, sisteme multi-componente care conțin curcumina. Formarea complecșilor a fost investigată prin Spectroscopia de Infraroșu cu Transformată Fourier (FTIR). Stabilitatea termică a tuturor complecșilor sintetizați a fost investigată comparativ cu precursorii prin analiza termogravimetrică (TG) și analiza de calorimetrie cu scanare diferențială (DSC). S-

au efectuat studii de stabilitate a CCM in diverse medii apoase si s-a constatat ca materialele compozite au condus la marirea substantiala a timpului de injumatatire - al curcuminei – contribuind totodata la realizarea unor sisteme policomponente de foarte buna calitate care se pot folosi in industria alimentara sau in cea farmaceutica.

Capitolul 10 descrie Concluziile Generale ale cercetarii din Teza de Doctorat.

Capitolul 11 prezinta realizarile Drd. Ing. Chim. Levente Z. Racz, in munca de cercetare stiintifica inclusa in aceasta Teza de doctorat.

Lucrări proprii

1. S. Rapuntean, P. T. Frangopol, I. Hodisan, Gh. Tomoaia, D. Oltean-Dan, A. Mocanu, C. Prejmorean, O. Soritau, **L. Z. Racz**, M. Tomoaia-Cotisel, In vitro response of human osteoblasts cultured on strontium substituted hydroxyapatites, Rev. Chim. (Bucharest), 69(12), 3537-3544, (2018). **I.F. 1.605**

2. **L. Z. Rác**z, M. Tomoaia-Cotișel, Cs.-P. Rácz, P. Bulieris, I. Grosu, S. Porav, A. Ciorîță, X. Filip, F. Martin, G. Serban, I. Kacso, Curcumin-Whey Protein Solid Dispersion System With Improved Solubility And Cancer Cell Inhibitory Effect, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Chem., 66(3), 209-224, (2021). **I.F. 0.447**

3. **L. Z. Rác**z, G.-A. Paltinean, I. Petean, Gh. Tomoaia, L. C. Pop, G. Arghir, E. Levei, A. Mocanu, Cs.-P. Rácz, M. Tomoaia-Cotisel, Curcumin and Whey Protein Binding And Structural Characteristics of Their Complex Evidenced by Atomic Force Microscopy, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Chem., 2022, 67(3), sub tipar. **I.F. 0.447**

4. **L. Z. Rác**z, Cs. P. Rácz, L. C. Pop, Gh. Tomoaia, A. Mocanu, I. Barbu, M. Sárközi, I. Roman, A. Avram, M. Tomoaia-Cotisel, V.-A. Toma, Strategies for improving bioavailability, bioactivity, and physical-chemical behavior of the curcumin, Molecules, 2022, Manuscript ID-1919555. Under review. **I.F. 4.927**

5. **L. Z. Rác**z, Cs.-P. Rácz, O. Horovitz, Gh. Tomoaia, A. Mocanu, I. Kacso, M. Sárközi, M. Dan, S. Porav, G. Borodi, M. Tomoaia-Cotisel, Complexation of Curcumin using Whey Proteins to Enhance Aqueous Solubility, Stability and Antioxidant Property, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Chem., 2022, 67(3), sub tipar. **I.F. 0.447**

CAPITOLUL 1. STRATEGII PENTRU ÎMBUNĂTĂȚIREA BIODISPONIBILITĂȚII, BIOACTIVITĂȚII ȘI COMPORTAMENTULUI FIZICO-CHIMIC AL CURCUMINEI

Curcumina este unul dintre compușii vegetali cel mai frecvent explorați, cu diverse acțiuni biologice, cum ar fi proprietăți antibacteriene, antivirale, antifungice, antineoplazice și anti-oxidante/antiinflamatorii. Datele de laborator și studiile clinice au demonstrat că biodisponibilitatea și bioactivitatea curcuminei sunt influențate de

caracteristicile tipurilor de complex molecular de curcumină. Curcumina are o capacitate mare de a forma complecși moleculari cu proteine (cum ar fi proteinele din zer, albumina serică bovină, β -lactoglobulina), carbohidrații, lipidele și compuși naturali (de exemplu, resveratrolul, piperina, quercetina). Acești complecși cresc bioactivitatea și biodisponibilitatea curcuminei. Revizuirea actuală a constatat aceste strategii de derivatizare pentru curcumină în ceea ce privește aspectele biologice și fizico-chimice, cu un accent puternic pe proteinele din zer, metodele de caracterizare și caracteristicile termodinamice ale complecșilor proteine - curcumină. Revizuirea literaturii oferă o abordare completă a interacțiunilor curcumină-biomolecule cu privire la strategii de îmbunătățire a bioactivității, precum și a biodisponibilității curcuminei.

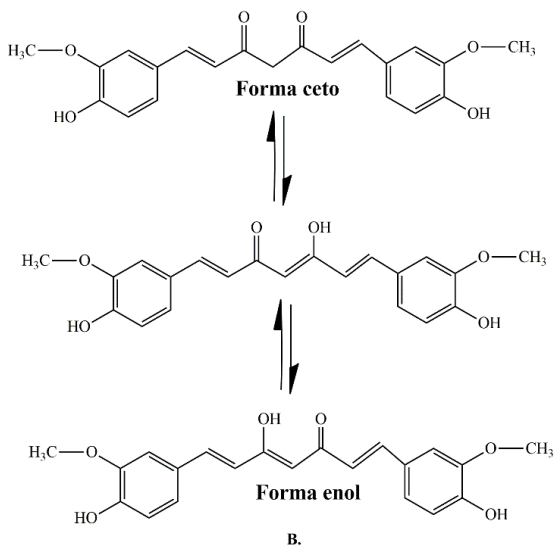


Figura 1. B: formele enol și ceto ale CCM

Majoritatea medicamentelor chimioterapice au toxicitate ridicată, prin administrarea lor sistematică acestea se distribuie în organism nețintit, ele ajungând aleator la diferite organe/țesuturi, provocând multiple efecte secundare. Prin urmare utilizarea unor compuși cu profil bun de siguranță, netoxice și cu biodisponibilitate ridicată ar fi imperios necesară. Curcumina este un compus polifenolic hidrofob [21], cu o gamă largă de proprietăți farmacologice (Figura 2): antiproliferativ, anticancerigen [22-33], antidiabetic, antioxidant [34], antiinflamator [35-37], antifungic și antimicrobian [38], motiv pentru care atenția cercetătorilor s-a îndreptat către studiul acesteia în domeniul biomedical. În plus, CCM ca agent antiviral [38-40] și antiinflamator [41] poate fi utilă pentru prevenirea și în tratamentul COVID-19. Acest aspect este foarte bine documentat în literatură: CCM previne bolile inflamatorii, inhibă carcinogeneza, controlează bolile neurologice, respiratorii, cardiovasculare, metabolice, autoimune și unele cancere [38-40].

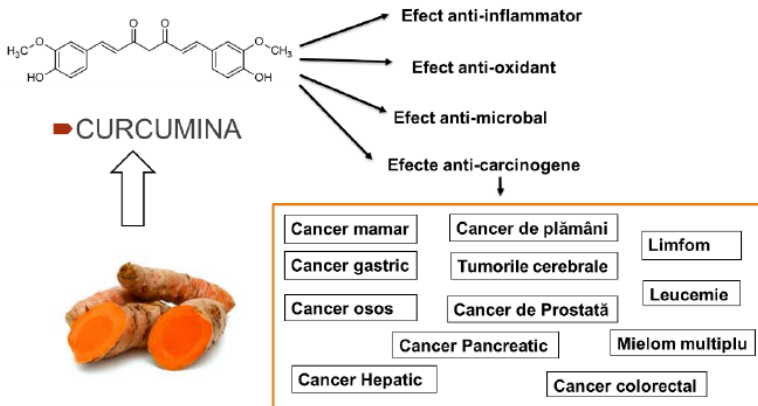


Figura 2: Efectele terapeutice ale CCM s-au reflectat printr-un spectru larg de acțiune, cum au fost observate de literatură. Acțiunea antitumorală a CCM a fost pe larg explorată în condiții clinice și experimentale.

Cel mai mare dezavantaj al CCM este solubilitatea sa scăzută în apă, prin urmare biodisponibilitatea sa scăzută; există multe publicații pe această temă. Au fost expuse metodele de eliminare a acestor dezavantaje ale CCM prin: obținerea de dispersii solide de a doua și a treia generație, complexarea CCM cu proteine, adăugarea diferitelor flavonoide sau adjuvanți, ca piperina, la CCM. PEG-ilarea poate îmbunătăți deficiențele CCM, dar combinarea prin alte tehnici sau alți polimeri i-a îmbunătățit și mai mult proprietățile. O altă alternativă este complexarea CCM cu proteine, care îmbunătățește foarte mult dispersibilitatea în apă, stabilitatea și biodisponibilitatea CCM. Cele mai bune rezultate pentru îmbunătățirea proprietăților CCM se pot obține prin combinarea tuturor tehnicilor enumerate. Identificarea metodei corecte de formulare și utilizarea excipienților adecvați în relație cu CCM poate avea ca rezultat un tratament farmacologic eficient prin administrarea unei doze mai mici, ceea ce poate avea o implicație semnificativă a costurilor.

CAPITOLUL 2. INGINERIA USCĂRII PRODUSELOR ALIMENTARE ȘI A PRODUSELOR FARMACEUTICE

Dezvoltarea produselor farmaceutice s-a dovedit a fi o provocare, ca urmare a complexității producerii și purificării, dar și stabilizării fizice și chimice a acestora. Pentru a avea un termen de valabilitate admisibil ca produs farmaceutic, pentru un produs în forma solidă este necesară combaterea instabilității sub acțiunea factorilor de mediu. Cel mai important factor la deteriorarea calității produsului este apa inclusă în produsele medicamentoase și alimente, astfel trebuie utilizată o metoda de uscare

pentru eliminarea acesteia. Tehnologiile bine cunoscute sunt liofilizarea, uscarea prin pulverizare și uscarea la presiune redusă [1].

Liofilizarea este cea mai comună metodă de a produce proteine în stare solidă, dar această procedură poate aduce multe neajunsuri în timpul congelării și uscării, precum modificări ale pH-ului, formarea cristalelor de gheață, modificarea concentrației de dizolvare și altele. Aceste probleme pot cauza denaturări semnificative în proteine, astfel încât apare nevoia utilizării de stabilizatori în timpul procedurilor de răcire și uscare [1, 4, 5].

Uscarea prin pulverizare este o metodă cunoscută pentru producerea particulelor de dimensiuni mici prin transformarea unui material fluid în particule uscate, într-un mediu de uscare fierbinte gazos [11, 12]. De când a fost descoperită, tehnica de uscare prin pulverizare a fost îmbunătățită în ceea ce privește designul și aplicațiile sale operaționale. Transformarea fluidului în particule uscate are un efect foarte slab asupra calității acesteia, metoda fiind comună și răspândită ca tehnologie de încapsulare în industria alimentară, . [12, 14]. Procedul este potrivit pentru substanțe sensibile la căldură, cum ar fi compușii fenolici, deoarece temperatura de uscare prin pulverizare este relativ scăzută (în general, temperatura de intrare este mai mică de 200 °C) și timpul de rezidență al picăturii/particulelor este foarte scurt (în câteva secunde). Această metodă constă în interacțiuni complexe ale componentelor echipamentului, parametrilor de procesare și proprietățile fizice ale materialelor , care toate împreună influențează caracteristicile produsului final [14]. Trebuie menționat faptul că diferența dintre parametrii procesului de uscare și caracteristicile materialelor care alcătuiesc complexul, reglementează procesul de microîncapsulare, care în cele din urmă influențează proprietățile pulberii obținute, cum ar fi fluiditatea, stabilitatea, solubilitatea, forma, dimensiunea, conținutul de umiditate, eficiența procesului și densitatea în vrac [14, 15].

CAPITOLUL 3. METODE DE CARACTERIZARE A COMPLEXILOR

În scopul determinării relației dintre metoda de preparare și proprietățile/aplicațiile produsului obținut, în funcție de caracteristicile materialului investigat, a fost utilizat un număr mare de metode de caracterizare fizico-chimice. În cele ce urmează sunt prezentate metodele și aparatele utilizate -pentru caracterizarea cât mai complexă a produșilor obținuți:

- analiza morfologică realizată prin microscopia electronică de transmisie (TEM), microscopia electronică de scanare (SEM) și microscopie de forță atomică (AFM)
- analiza structurală: difracție de raze X pe pulberi (PXRD) și spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)
- analiza termică: termogravimetrie (TGA), derivata curbei termogravimetrice (DTG) și calorimetrie de baleiaj cu scanare diferențială (DSC)
- analiza interacțiunii dintre WPC și CCM – din studii de spectroscopie de fluorescență
- testarea stabilității și solubilității curcuminei – din cercetare folosind spectrofotometrie de UV-Vis

- Analiza termodinamică – ΔG , ΔH și ΔS
- cercetarea citotoxicității pe culturi celulare A375 și A549
- testul MTT pentru viabilitate celulară
- biocompatibilitatea nanomaterialelor folosind cultură de osteoblaste

CAPITOLUL 4. RĂSPUNSUL IN VITRO AL OSTEUBLASTELOR UMANE CULTIVATE PE HIDROXIAPATITE SUBSTITUITE CU STRONȚIU

Scopul acestui studiu a fost de a analiza răspunsul osteoblastelor cultivate pe hidroxiapatite substituie cu stronțiu (HAP-Sr) de cristalinitate ridicată bine definită depuse sub formă de pelicule subțiri pe plăci de sticlă. Până în prezent, acest aspect nu a fost investigat cu atenție în contextul bioceramicilor. În acest studiu, prezentăm activitatea osteoblastelor pe HAP-Sr sintetizat pentru diferite cantități de stronțiu care înlocuiesc calciul în cadrul rețelei de hidroxiapatită ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAP), și anume HAP-5%Sr, HAP-10%Sr, HAP-15%Sr și HAP-59,2%Sr (Sr-HAP, cu formula $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), în comparație cu HAP pur stoechiometrică, ales ca martor. Fiecare bioceramică a fost depusă ca substrat subțire multistrat auto-asamblat (scaffold) și legată chimic de suprafața plăcilor de sticlă. Aceste acoperiri au revelat prin imagistica AFM și SEM o textură granulară formată din nanoparticule bioceramice. Ele posedă un grad ridicat de cristalinitate, adică 68% până la 86%, în funcție de cantitatea de Sr din rețeaua HAP, după cum s-a putut vedea în urma analizei XRD. Osteoblastele au fost cultivate până la 21 de zile și au prezentat aderență și proliferare îmbunătățite, evidențiate în special la conținuturi relativ ridicate de stronțiu (în special 5 și 10 % în greutate, determinate de SEM-EDX), unde activitatea fosfatazei alcaline și colagenul de tip I au fost puternic evidențiate. Aceste bioceramici au prezentat o biocompatibilitate ridicată in vitro stimulând activitatea osteoblastelor în procesul de formare a osului. Aceste nanobiomateriale pot avea aplicații în chirurgia ortopedică și dentară, îmbunătățind osteointegrarea ca acoperiri ale implanturilor osoase, precum și pentru repararea și regenerarea osoasă.

Nanohidroxiapatită stoechiometrică de înaltă puritate, HAP: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ și nanohidroxiapatite substituie cu stronțiu, HAP-Sr, pentru diferite cantități de Sr: HAP-5% Sr; HAP-10% Sr; HAP-15% Sr; HAP-59,2%Sr (adică Sr-HAP: $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), au fost sintetizate prin metodologia chimică umedă, asistată de compuși șablon. După liofilizare, matrițele organice au fost îndepărtate prin calcinare în două etape, la 550 °C timp de 6 ore și apoi la 850 °C timp de 4 ore.

Hidroxiapatita este utilizată drept vehicul pentru transportul ionilor fiziologic esențiali.

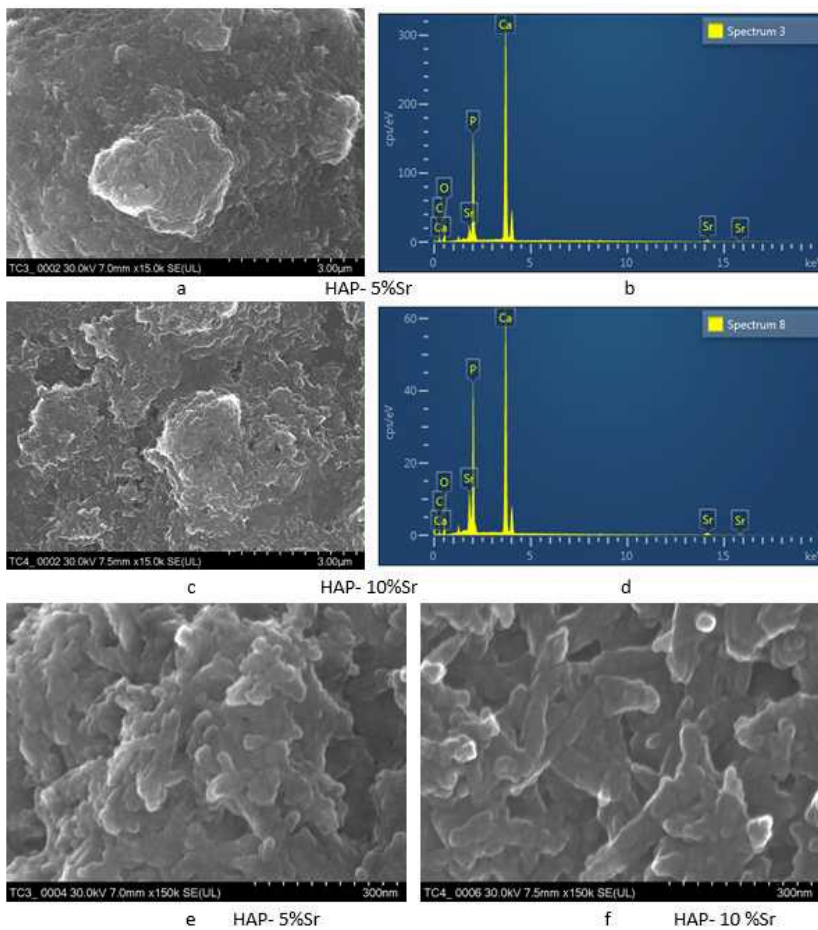


Figura 1. Micrografiile SEM și spectre EDX pentru substraturi de HAP-5%Sr (a, b, e) și HAP-10%Sr (c, d, f) liofilizat calcat
Revista de Chimie (Bucharest) 69(12), 3537-3544 (2018)

CAPITOLUL 5. DISPERSII SOLIDE DE CURCUMINĂ-PROTEINA DIN ZER CU SOLUBILITATE ÎMBUNĂTĂȚITĂ ȘI EFECT INHIBITOR AL CELULELOR CENCEROASE

Sistemul dispers solid cu conținut ridicat de curcumina a fost preparat cu concentrat de proteine din zer în raport molar de 5:1 cu metoda uscării prin pulverizare. Analiza prin difracție de raze X pe pulberi și DSC arată formarea sistemului dispers solid în stare amorfă, iar analiza FTIR identifică prezența unor interacțiuni slabe de tip legături de hidrogen între componentele sistemului. Imaginile SEM pentru sistem arată o morfologie omogenă a microparticulelor sferice asemănătoare unor gogoși. Solubilitatea curcuminei din sistemul dispers a fost îmbunătățită în comparație cu curcumina pură, care practic este insolubilă în apă, atingând o valoare de 70 $\mu\text{g/mL}$ în soluție apoasă tampon la $\text{pH}=8$, asemănătoare cu mediul intestinal. Materialul sintetizat prezintă efect citotoxic mai pronunțat în cazul celulelor melanomului pielii, comparativ cu celulele de adenocarcinom pulmonar, dar în ambele cazuri efectul este promițător, iar prin analize mai complexe potențialul antitumoral al CCM-WPC_SD ar putea fi exploatat în continuare.

Pentru a demonstra formarea sistemului dispers solid CCM-WPC_SD obținut prin încorporarea CCM în WPC, în raport molar optimizat 5:1, acesta mai întâi a fost analizat prin XRPD.

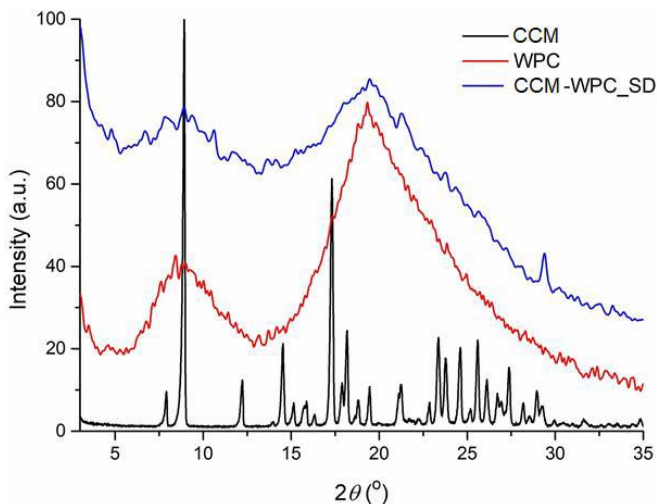


Figura 2. Difractogramele XRPD comparate ale CCM, WPC și CUC-WPC_SD
Studia UBB Chemia, 66(3), 209-224 (2021)

Analizând curba DSC a CCM-WPC_SD se poate observa un semnal endoterm larg de intensitate scăzută între 40 și 90°C atribuit eliminării apei nelegate reziduale, lipsește semnalul de topire al CCM, ceea ce indică încărcarea curcuminei în WPC în raport stoechiometric de 5:1.

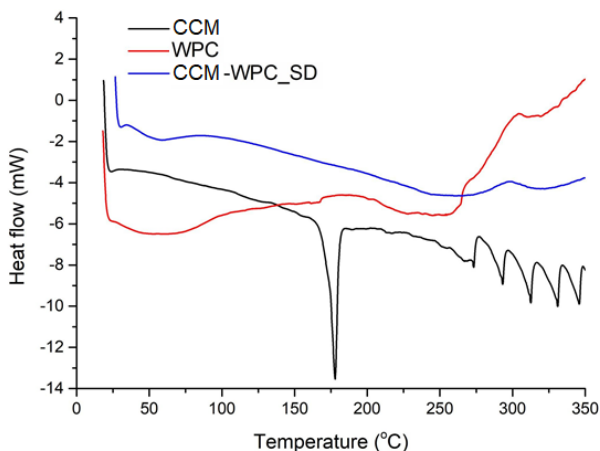


Figura 3. Curbele DSC comparate ale CCM, WPC și CCM-WPC_SD
Studia UBB Chemia, 66(3), 209-224 (2021)

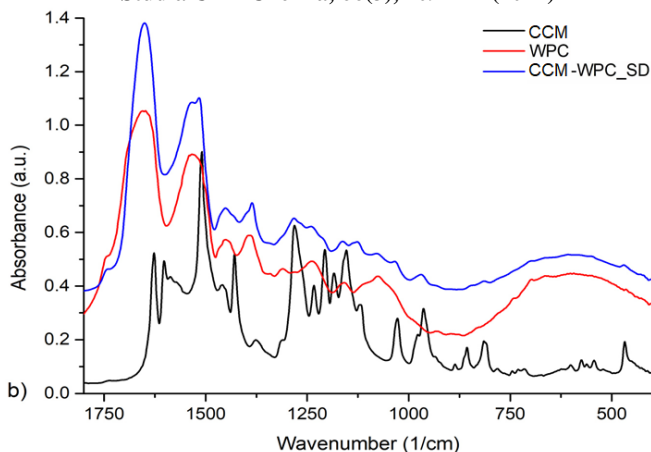


Figura 4. Spectrele FTIR comparate ale CCM, WPC și CCM-WPC_SD, domeniu spectral a) 3750-2750 cm^{-1} și b) 1800-400 cm^{-1}
Studia UBB Chemia, 66(3), 209-224 (2021)

Modificările suferite de unele benzi de vibrație, în special de acelea caracteristice grupărilor OH și COOH, sugerează existența unor legături de hidrogen slabe și de interacțiuni de tip electrostatic între cele două componente ale sistemului dispers CCM-WPC_SD.

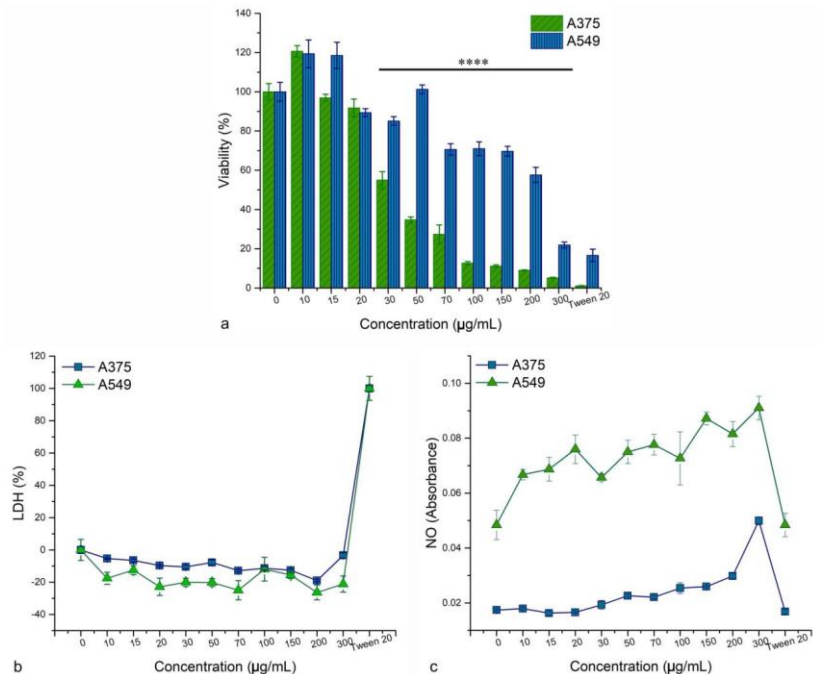


Figura 8. Teste de citotoxicitate efectuate pe celulele A375 și A549, tratate cu CUC-WPC_SD. a) Testul MTT arată gradul de deteriorare a viabilității celulelor în 24 de ore. b) Testul LDH arată cantitatea de LDH eliberată în mediul de cultură al celulelor tratate cu medicamentul timp de 24 de ore. c) Testul oxidului de azot (NO) arată cantitatea de oxid de azot eliberată în mediul de cultură al celulelor tratate.

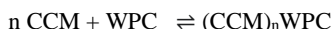
Studia UBB Chemia, 66(3), 209-224 (2021)

Valorile LDH calculate nu prezintă nici o diferență semnificativă între cele două linii celulare (Figura 8b). În comparație cu celulele tratate cu Tween 20, nu a fost observată necroză, totuși, valorile negative înregistrate ar putea indica un blocaj al membranei [6]. O reacție direct dependentă de doză a fost observată în cazul celulelor A375 prin înregistrarea de valori ridicate ale monoxidului de azot (NO) la concentrații de peste 30 µg/mL. Rezultatele sunt în concordanță cu efectele observate în cazul testului MTT. O reacție dependentă de doză a fost observată și pentru celulele A549, totuși tendința a fost mai haotică (Figura 8c), în comparație cu celulele melanomului pielii. Cu toate acestea, cea mai mare valoare înregistrată pentru concentrația de monoxid de azot a fost asociată cu cea mai mică valoare înregistrată pentru testul MTT, în ambele tipuri de celule.

CAPITOLUL 6. LEGAREA DINTRE CURCUMINĂ ȘI CONCENTRATUL DE PROTEINĂ DIN ZER. ABORDARE TERMODINAMICĂ ȘI STRUCTURALĂ

Interacțiunea moleculară dintre curcumină, CCM și concentratul de proteina din zer, WPC, a fost studiată utilizând măsurători de fluorescență. Numărul de legare (n), constanta de legare (K_s) și parametrii termodinamici (ΔG, ΔH și ΔS) au fost determinați la diferite temperaturi și la diferite valori ale pH-ului soluțiilor apoase. Abordarea termodinamică a evidențiat cea mai mare stabilitate a acestui complex CCM-WPC în mediu cu pH acid (de exemplu, fluid gastric cu pH 1,5), scăzând la valoarea pH-ului alcalin (de exemplu, lichid din intestinul subțire cu pH 7,5 până la 8) și, astfel, indicând o bună stabilitate a acestui complex în mediul gastric simulat. Apoi, în pH alcalin, care este caracteristic mediului intestinului subțire, acest complex poate elibera CCM pentru a pătrunde în circulația sanguină și a fi direcționat către locul său de acțiune. Complexul CCM-WPC sub formă de pulbere uscată prin pulverizare a fost investigat în continuare prin imagistica XRD, FTIR și AFM. Difrakția de raze X pe pulberi arată că datorită interacțiunii chimice dintre CCM și WPC se formează un nou compus amorf. Spectrele FTIR oferă dovezi puternice pentru interacțiunea CCM cu WPC și formarea complexului CCM-WPC. Imaginile AFM au dezvăluit nanostructura CCM, WPC și complexului CCM-WPC cu o dimensiune medie a particulelor de la 30 nm la 60 nm. Studiile de andocare au arătat interacțiunile hidrofobe dintre CCM și WPC, în acord cu formarea, condusă de componenta entropică, a complecșilor CCM-WPC, ceea ce duce la o mai bună înțelegere a mecanismului de legare dintre aceste componente. Prin urmare, acest capitol a confirmat că WPC este un purtător promițător pentru CCM, ceea ce poate conduce la obținerea unui supliment alimentar funcțional prin încorporarea, distribuția și stabilitatea ridicată a acestor compuși bioactivi, sporind împreună efectele lor biologice.

Parametrii de legare, numărul de legare (n, numărul locurilor de legare) și constanta de asociere (K_s, constanta de legare) [57, 58, 61, 62], caracterizează echilibrul:



$$K_s = \frac{[(\text{CCM})_n \text{WPC}]}{[\text{CCM}]^n [\text{WPC}]}$$

unde parantezele drepte indică concentrația la echilibru a speciilor respective. Acestea pot fi calculate conform următoarei ecuații (Ec.1) [57, 64], pentru stingerea statică:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_s + n \log [\text{CCM}] \quad (1)$$

unde: F - intensitatea fluorescenței, F₀ - intensitatea maximă (fluorescența intrinsecă a WPC pur) și [CCM] -concentrația molară a CCM.

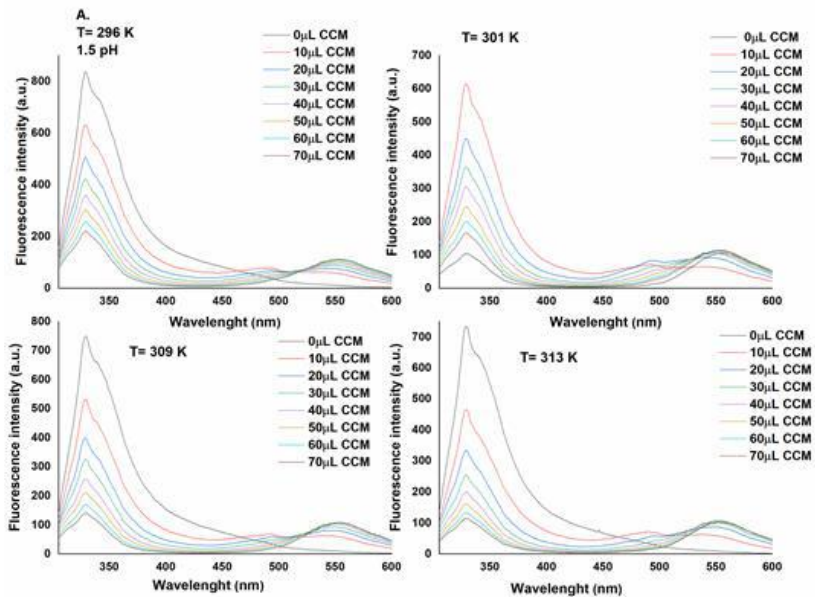


Figura 1. Spectre de fluorescență de emisie a soluțiilor de WPC (2 mL soluție, concentrația $2 \times 10^{-6} \text{ M}$) obținute prin titrare treptată cu câte $10 \mu\text{L}$ de soluție CCM ($2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$), rezultând concentrații de CCM cuprinse între 10^{-5} - $6,8 \times 10^{-5} \text{ M}$ (vezi Tabelul 1), pH 1.5 la patru temperaturi constante (296, 301, 309 și 313K), indicate pe grafice. Maximul spectrelor de fluorescență este la lungimea de undă de 328 nm; spectrele au fost înregistrate în intervalul de 300-600 nm, cu lungimea de undă de excitație de 295 nm.

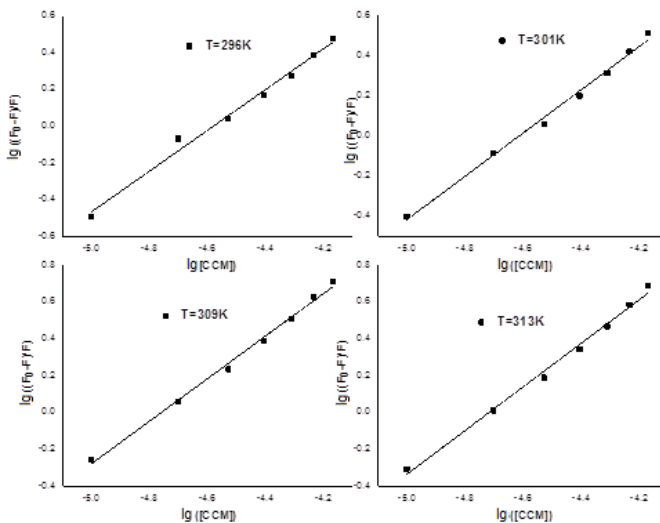


Figura 2. Liniile de regresie $y = a + bx$ ale $\lg((F_0-F)/F)$ vs $\lg([CCM])$ la valoarea pH 1,5 și la temperaturile studiate: 296, 301, 309 și 313K. Cu lg se notează logaritmul zecimal.

Modificarea entalpiei (ΔH) și entropiei (ΔS) au fost calculate din ecuația Van't Hoff (Ec.(2), prin reprezentarea grafică a $\log K_S$ față de $1/T$ (T-temperatura absolută) [57, 58, 62, 63].

$$\ln K_S = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (2)$$

unde, K_S - constanta de asociere de echilibru (L/mol) la temperatura corespunzătoare (T în K) și R - constanta universală a gazelor [J/(mol·K)]. Temperaturile utilizate au fost cuprinse între 296 și 313 K. ΔH și ΔS au fost determinate din panta și respectiv interceptarea y a dreptei de regresie a relației Van't Hoff. Modificarea energiei libere (ΔG) a fost calculată cu ajutorul Ec. (3) [62] și Ec. (4) [63,64]:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_S \quad (4)$$

Valoarea negativă a lui ΔG relevă faptul că procesul de interacțiune este spontan (Tabelul 4) [61]. Valorile pozitive ΔH și ΔS ale interacțiunii dintre CCM și concentratul de proteine din zer (Tabelul 4) subliniază că forțele hidrofobe joacă un rol major în procesul de legare [65, 66], legarea este determinată în principal de

entropie, iar entalpia este nefavorabilă. pentru aceasta complexare a lui CCM cu WPC [67].

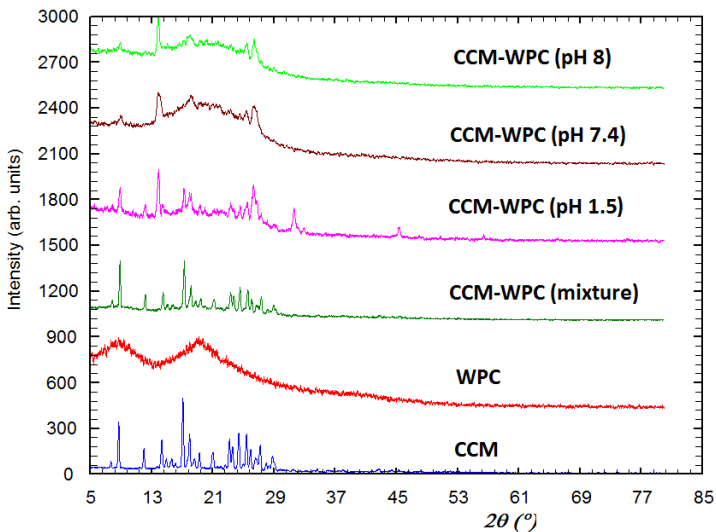


Figura 5C. Difrakția cu raze X pentru CCM, WPC, amestecul lor fizic CCM-WPC și complexii CCM-WPC (raport molar 35:1) la diferite valori de pH: 1,5, 7,4 și 8,0.

Figura 5C prezintă difractogramele de raze X pe pulberi ale CCM, WPC, CCM-WPC (amestec mecanic), și alte trei probe obținute prin complexare la pH 1,5, 7,4 și 8,0. Difractogramele pe pulberi evidențiază faptul că prin complexare s-au obținut compuși diferiți față de cei inițiali. Cele mai intense 3 vârfuri de difracție pentru curcumină sunt la unghiurile de difracție 2θ : $8,850^\circ$, $17,300^\circ$ și $25,160^\circ$, în timp ce cele mai intense vârfuri de difracție pentru complexi se găsesc la 2θ : $9,130^\circ$, $18,140^\circ$ și $26,260^\circ$. Fiecare dintre cele trei probe complexate are un halou de difracție intens, ceea ce demonstrează că complexii au și o cantitate de fază amorfă. Halo-ul din proba care a fost preparată la pH 1,5 este mai puțin intens, în comparație cu halourile corespunzătoare probelor care au fost preparate la pH 7,4 și pH 8,0, care sunt foarte proeminente.

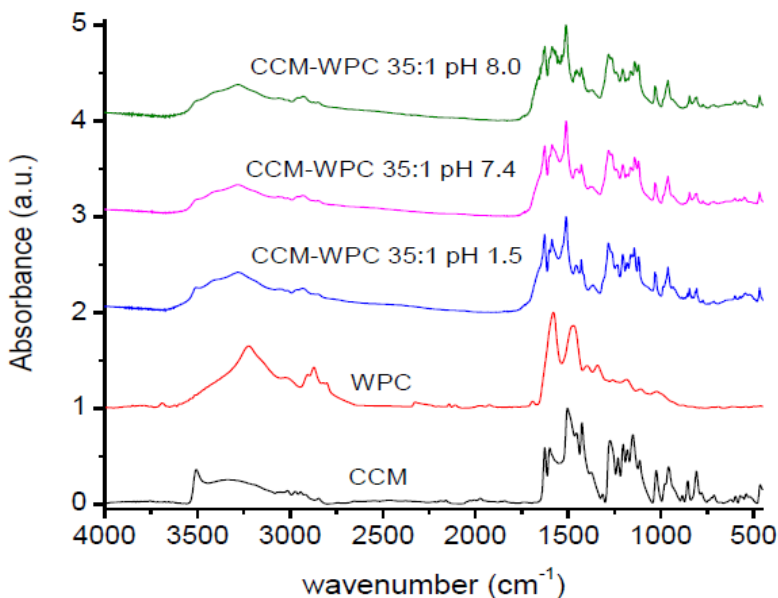


Figura 6B. Spectrele FTIR ale CCM, WPC și complexilor CCM-WPC în raport molar 35:1 la pH 1,5, 7,4 și 8,0. Spectrele sunt normalizate la 1

În concluzie, există dovezi puternice pentru interacțiunea dintre CCM și WPC și formarea de noi complecși supramoleculari. În special, modificarea benzii de absorbție în domeniul spectral 3600-3000 cm^{-1} se poate datora formării legăturilor de hidrogen între CCM și WPC.

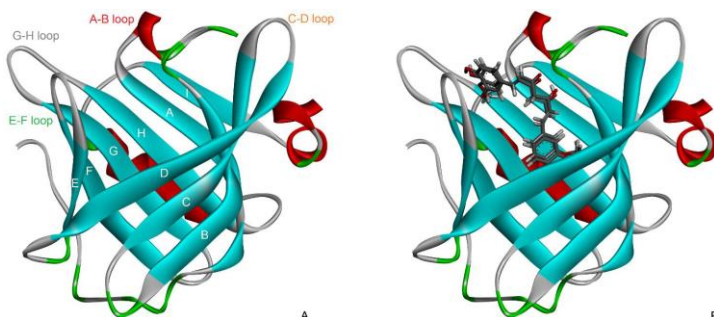


Figura 8. (A) β -lactoglobulina bovină. Cupa centrală este constituită din cele opt catene β antiparalele (A-H) și este străjuită de bucle flexibile: A-B, C-D, E-F, G-H; (B) Conformațiile de andocare suprapuse ale tautomerilor de curcumină ceto-enol și diceto, având cea mai mare energie de legare.

În analiza noastră de andocare am considerat ca moleculă gazdă β -lactoglobulina monomerică 3NPO, depusă în baza de date RCSB. În Figura 8A este reprezentată această structură în care au fost etichetate și cele opt catene β antiparalele (A-H) precum și buclele flexibile: A-B, C-D, E-F, G-H care înconjoară caliciul central. Amintindu-ne de tranziția Tanford, menționată anterior, se poate remarca în această conformație cristalografică că bucla EF este în stare deschisă. În Figura 8B, sunt reprezentate, de asemenea, suprapuse conformațiile având energiile de legare maxime calculate pentru tautomerii ceto-enol și diceto ai curcuminei. Se poate observa astfel, că cele două conformații diferă doar puțin. Energiile lor de legare sunt: -9,11 kcal/mol pentru ceto-enol și -8,82 kcal/mol pentru forma diceto. În cele ce urmează se vor prezenta în detaliu aceste rezultate.

CAPITOLUL 7. COMPLEXAREA CURCUMINEI CU PROTEINĂ DIN ZER PENTRU ÎMBUNĂTĂȚIREA SOLUBILITĂȚII ÎN SOLUȚII APOASE, STABILITATEA ȘI EFECTUL ANTIOXIDANT AL CURCUMINEI

Stabilitatea și solubilitatea curcuminei, CCM, pot fi îmbunătățite prin complexarea cu concentrat de proteine din zer (WPC). Complecși CCM-WPC în raport molar 1:1 și 1:0,5 au fost preparați prin două metode, și anume uscare prin pulverizare (SD) și uscare prin congelare (FD). Obiectivul major al acestei lucrări este de a determina stabilitatea și solubilitatea complecșilor CCM-WPC încapsulați prin metoda SD și FD. Difracția de raze X și analiza termogravimetrică au fost efectuate pe CCM brută și WPC, precum și pe complecșii acestora. Modificările comportamentului termic și ale cristalinității sugerează formarea acestor complecși CCM-WPC. Imaginile de microscopie electronică cu scanare au arătat că metodele utilizate au influențat morfologia și proprietățile complecșilor formați. Stabilitatea și solubilitatea curcuminei sunt îmbunătățite prin complexare în ambele metode de încapsulare. S-a observat prin compararea raportului molar utilizat și metodelor de uscare folosite, că rezultatele obținute sunt diferite. Solubilitatea probelor obținute prin metoda FD a fost mai mare decât a celor obținute prin metoda SD, ceea ce poate explica diferența de morfologie a acestora (probele FD sunt mai amorf decât probele SD). Proprietatea antioxidantă a curcuminei și a complecșilor proteici în comparație cu vitamina C au arătat că CCM are o valoare IC₅₀ mai mică decât vitamina C, adică efectul antioxidant al CCM este mai mare (Tabel 5). Adăugarea de WPC a îmbunătățit activitatea antioxidantă a CCM, probabil datorită încapsulării sale în proteină.

Tabelul 5: Concentrație inhibitorie (IC₅₀) determinată pentru acidul ascorbic, CCM și complecșii CCM -WPC

Materiale	Ecuația, dreptei din graficele din Excell	Masa molară (g/mol)	IC ₅₀ (μg/mL)	IC ₅₀ (M)
Acid ascorbic	$y=8,429x - 7,0714$	176,24	6,771	$3,842 \cdot 10^{-5}$
Curcumina	$y = 4,3234x + 2,1078$	368,38	11,077	$3,007 \cdot 10^{-5}$
1CCM:1WPC_SD	$y = 2,9895x + 2,2429$	18768,38	15,975	$8,511 \cdot 10^{-7}$
1CCM:1WPC_FD	$y = 2,7424x - 2,3095$		19,074	$1,016 \cdot 10^{-6}$
1CCM:0.5WPC_SD	$y = 2,3338x + 2,2733$	9568,38	20,298	$2,121 \cdot 10^{-6}$
1CCM:0.5WPC_FD	$y = 2,6255x - 2,7293$		18,004	$1,881 \cdot 10^{-6}$

CCM posedă structură cristalină, care prin complexare cu concentratul de proteină din zer devine amorfă. Această natură amorfă a complecșilor contribuie la creșterea semnificativă a solubilității. Morfologia complecșilor este diferită în funcție de tehnicile de uscare utilizate. Proprietățile antioxidante, solubilitatea și stabilitatea CCM au crescut semnificativ prin complexare.

CAPITOLUL 8. LEGAREA PROTEINEI DIN ZER DE CURCUMINĂ ȘI CARACTERISTICILE STRUCTURALE ALE COMPLEXULUI ACESTORA EVIDENȚIATE PRIN MICROSCOPIE DE FORȚA ATOMICĂ

Curcumina (CCM) are efecte benefice asupra sănătății umane datorită activității sale farmacologice, având rol protector împotriva multor boli. Concentratul de proteina din zer (WPC) este un produs rezultat din industria laptelui care este adesea folosit pentru a îmbunătăți și stabiliza diferite alimente. Proteina din zer favorizează curcumina să-și îmbunătățească solubilitatea în apă, biodisponibilitatea slabă, stabilitatea și eficacitatea. Microscopia de Forță Atomică (AFM) a fost folosită pentru a evidenția topografia suprafeței filmelor de adsorbție pentru curcumina pură, proteina din zer pură și complexul lor (CCM-WPC). Rezultatele obținute arată că nanoparticulele individuale au fost mobilizate în dispersie apoasă și adsorbite cu succes pe lamele de sticlă sub forma de filme subțiri. Forma lor este rotunjită, iar diametrul diferă de la o probă la alta: 30 nm pentru CCM, 55 nm pentru WPC și 40 nm pentru complexul CCM-WPC. Se demonstrează că atât CCM cât și WPC formează un complex care le înglobează într-o structură compactă. Rugozitatea suprafeței a fost de asemenea monitorizată, iar curcumina pură produce un film neted și uniform, în timp ce prezența WPC determină apariția mai multor pori pe suprafața filmului, ceea ce crește valoarea rugozității. Rezultatele obținute oferă dovezi utile pentru aplicarea WPC ca purtător eficient al CCM, un compus polifenolic bioactiv. În plus, această lucrare sprijină utilizarea complexului CCM-WPC ca supliment alimentar, cu rol în menținerea sănătății.

Nanostructurile sistemului CCM – WPC au fost investigate cu succes prin microscopie de forță atomică, care este o metodă fundamentală pentru nanocaracterizarea materialelor. Pulberile inițiale de CCM și WPC au fost capabile să formeze nanoparticule în mediul apos. Aceste nanoparticule au fost adsorbite pe substrat de sticlă formând filme subțiri. Forma lor este rotundă iar diametrul mediu diferă de la o probă la alta: 30 nm pentru CCM, 55 nm pentru WPC.

Complexarea dintre CCM și WPC duce la un diametru intermediar de aproximativ 40 de nm. Nanoparticulele de CCM sunt adsorbite uniform pe suprafața de sticlă generând un film subțire neted cu rugozitate mică. WPC tinde să genereze pori în filmul adsorbit, ceea ce duce la valori relativ mai mari ale rugozității. Complexul CCM-WPC formează un film subțire neted în care influența concentratului de proteină din zer produce în compoziție niște pori care afectează valorile rugozității.

Aceste rezultate ar putea sprijini dezvoltarea alimentelor funcționale, inclusiv curcumina și proteinele din zer, cu noi utilizări în iaurt și suplimente nutritive

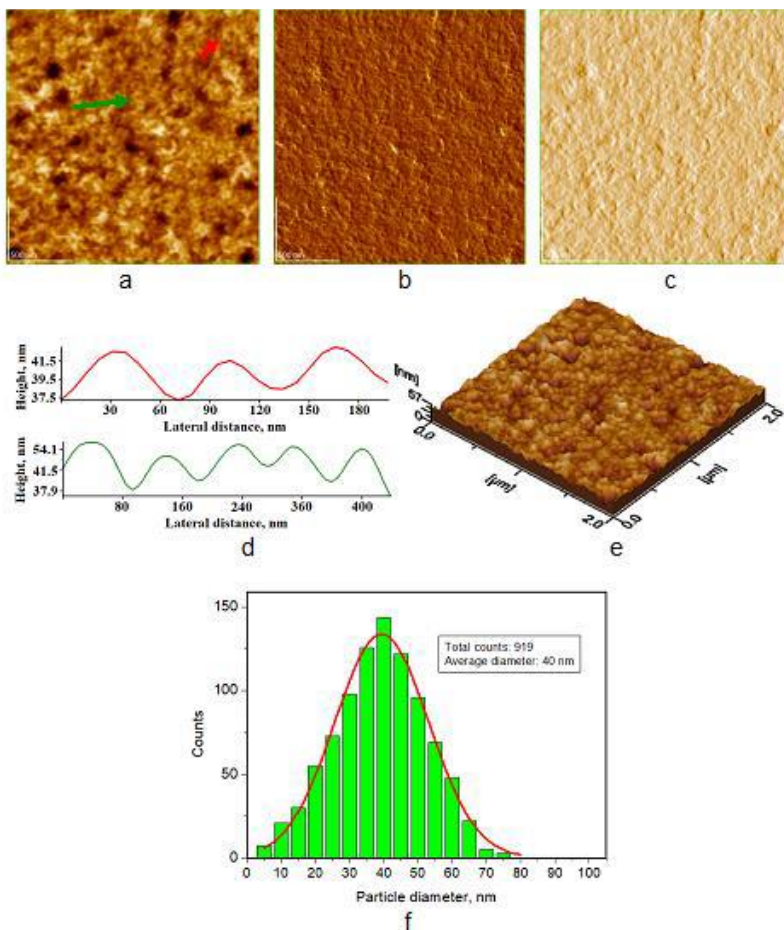


Figura 3. Imagini AFM ale complexului CCM-WPC, pH 7,4 adsorbție pe sticlă și uscare în mod natural: a) imagine topografică, b) imagine de fază, c) imagine de amplitudine, d) profile de-alungul săgeților din panoul (a), e) imagine tridimensională și f) histograma de distribuție a particulelor. Aria de scanare 2 μm x 2 μm . **Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Chem 2022, 67(3); sub tipar**

CAPITOLUL 9. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA COMPOZITELOR FORMATE DIN PEG, CURCUMINA ȘI PROTEINA DIN ZER – STABILITATE TERMICĂ ÎMBUNĂTĂȚITĂ

Curcumina (CCM) este un polifenol natural cu un potențial farmaceutic promițător. Totuși, acest potențial este restricționat datorită biodisponibilității sale limitate. Pentru a rezolva acest aspect au fost sintetizate noi compozite (noi complecși) din curcumină-PEG (PEG4000 sau PEG6000), cu sau fără un adaos de proteina din zer (WPC), resveratrol (RES) sau silimarina (SIL). Stabilitatea termică a tuturor compozitelor sintetizate a fost investigată comparativ cu precursorii prin analiza termogravimetrică (TG) și analiza de calorimetrie cu scanare diferențială (DSC), evidențiind o stabilitate termică până la 200 °C. Formarea compozitelor și interacțiunea dintre componenți a fost investigată prin spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR). Studiul cinetic demonstrează o stabilitate mărită a curcuminei în compozitele studiate, în special pentru compozitele: PEG4000-CCM-WPC-SIL și PEG6000-CCM-WPC-SIL care prezintă cea mai înaltă stabilitate a curcuminei în faza apoasă. Această strategie de proiectare a compozitelor pe baza de PEG-CCM și WPC este utilă deoarece conduce la noi materiale cu stabilitate mărită a curcuminei și la proiectarea diverselor suplimente alimentare.

Prezentul studiu descrie o serie de complecși pe bază de două tipuri de polietilen glicol (PEG4000 și PEG6000) și curcumină, cu sau fără un adaos de proteină sub formă de proteină concentrată din zer (WPC) sau un polifenol secundar, trans-resveratrol (RES) sau silimarina (SIL). RES și SIL au fost aleși datorită efectului sinergic raportat în prezența curcuminei – trans-resveratrol [Du et al. 2013, Chen et al. 2017]; silimarina [Montgomery et al. 2016].

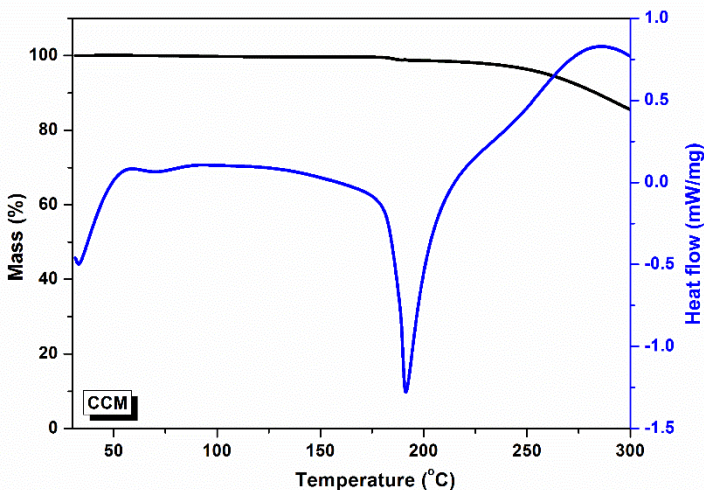


Figura 1. Curbele TG și DSC pentru curcumină

Stabilitatea termică a tuturor compozitelor sintetizați a fost investigată comparativ cu precursorii prin analiza termogravimetrică (TG) și analiza de calorimetrie cu scanare diferențială (DSC), evidențiind o stabilitate termică până la 200 °C.

Tabelul 4. Timpul de înjumătățire ($t_{1/2}$) al curcuminei și pentru compozitele (complecșii) cu PEG4000 sau PEG6000 prin utilizarea modelului cinetic de ordinul doi.

Material	$t_{1/2}$ (min)		
	pH 1.5	pH 7.4	pH 8.0
CCM	78	74	4
PEG4000-CCM	292	146	16
PEG4000-CCM-WPC	3266	4072	1113
PEG4000-CCM-WPC-RES	3395	4872	2524
PEG4000-CCM-WPC-SIL	4248	5176	2569
PEG6000-CCM	327	170	13
PEG6000-CCM-WPC	1983	2017	1228
PEG6000-CCM-WPC-RES	3867	5378	2532
PEG6000-CCM-WPC-SIL	5050	5534	2099

Stabilitatea curcuminei in solutii apoase pentru compozitele dezvoltate in acest studiu a fost investigată comparativ, prin determinarea timpului de injumatatire dupa o cinetica de ordinul 2. S-a constata o stabilitate marita a curcuminei in toate compozitele noi obtinute în special pentru compozitele: PEG4000-CCM-WPC-SIL și PEG6000-CCM-WPC-SIL care prezintă cea mai înaltă stabilitate a curcuminei in medii apoase (Tabel 4).

CAPITOLUL 10. CONCLUZII GENERALE

Cel mai mare dezavantaj al CCM este solubilitatea sa scăzută în apă, prin urmare biodisponibilitatea sa scăzută.

Pentru combaterea acestui neajuns, au fost dezvoltate cateva strategii si anume: incapsularea CCM in proteina, de exemplu in concentratul de proteina din zer, prin complexare si in diverse medii cu pH controlat si in functie de temperatura., prin co-precipitare si uscare prin pulverizare, SD, sau prin liofilizare, FD. Identificarea metodei corecte de formulare și utilizarea excipienților adecvați în relație cu CCM poate avea ca rezultat un tratament farmacologic eficient prin administrarea unei doze mai mici, ceea ce poate avea o implicație semnificativă a costurilor.

Spre exemplu, sistemul dispers solid cu conținut ridicat de curcumina a fost preparat cu concentrat de proteina din zer în raport molar de 5:1 prin metoda uscării prin pulverizare. Analiza prin difracție de raze X pe pulberi și DSC arată formarea sistemului dispers solid în stare amorfă, iar analiza FTIR identifică prezența unor interacțiuni slabe de tip legături de hidrogen între componentele sistemului. Imaginile SEM arată o morfologie omogenă a microparticulelor sferice.

Interacțiunea moleculară dintre curcumină, CCM și concentratul de proteina din zer, WPC, care a fost studiată utilizând măsurători de fluorescență. Numărul de legare (n), constanta de legare (KS) și parametri termodinamici (ΔG , ΔH și ΔS) au fost determinați la diferite temperaturi și la diferite valori ale pH-ului soluțiilor apoase. Abordarea termodinamică și structurala a mecanismului de legare dintre CCM și WPC constituie o premiera in literatură de specialitate. S-a evidențiat cea mai mare stabilitate a acestui complex CCM-WPC în mediu cu pH acid (de exemplu, fluid gastric cu pH 1,5).

De asemenea, au fost sintetizați mai multe complexe pe bază de PEG (fie cu PEG4000, fie cu PEG6000) cu sau fără încorporarea proteinei din zer sau a unui polifenol secundar, fie trans-resveratrol, fie silimarină. Adăugarea proteinei duce la un complex mai stabil prin legături de hidrogen. Acest lucru se corelează cu creșterea dramatică a solubilității în apă în complexele cu PEG, curcumină și proteina din zer. Adăugarea unui polifenol secundar scade solubilitatea în apă. Cu toate acestea, potențialul antioxidant și antiinflamator cumulat ar putea fi mai plină de satisfacții în cadrul unui supliment. În ceea ce privește stabilitatea termică, toate complexele sunt destul de stabile până la aproximativ 200 °C. Acest lucru este mai mult decât adecvat în ceea ce privește orice procesare ulterioară privind o potențială aplicație farmaceutică. În schimb, în ceea ce privește stabilitatea pH-ului, rezultatele evidențiază în mod clar efectul benefic al WPC și al flavonoidelor asupra creșterii timpului de înjumătățire al CCM. În timp ce complexele PEG-CCM tind să se descompună rapid la toate valorile pH-ului, cele mai complexe, inclusiv cel puțin proteina din zer, stabilizează foarte mult curcumina.

S-au efectuat testari in vitro al osteoblastelor umane cultivate pe hidroxiapatite substituie cu stronțiu demonstrand un potențial osteogen ridicat al acestor ceramice și implicarea lor puternică în formarea și mineralizarea osului. Aceste substraturi ceramice au stimulat celulele osoase să crească pe suprafața lor și să participe activ la formarea de oase noi și au favorizat creșterea osoasă pe suprafața lor, conducând osteoblastele să intre în stadii terminale de diferențiere declanșând procesul de mineralizare a osului nou format.

S-a demonstrat ca toate substraturile ceramice testate au fost biocompatibile cu diferențe semnificative în ceea ce privește adeziunea, proliferarea și diferențierea

celulelor. Cea mai buna biocompatibilitate si osteoconductivitate excelentă a fost evidentiata de HAP-Sr, în special cei cu o cantitate de Sr de 5%, 10% și 15%.

Aceste rezultate promițătoare recomandă complexele menționate pentru potențiale aplicații farmaceutice. Sunt în curs de desfășurare studii viitoare pentru a examina efectele lor prospective atât in vitro, cât și in vivo.

CAPITOLUL 11

Activitatea de cercetare știintifică se concretizează în 5 lucrări știintifice cotate ISI: 2 lucrări publicate și 2 lucrări acceptate pentru publicare și 1 lucrare în curs de publicare, la revista *Molecules*. Menționăm că avem încă două lucrări știintifice în manuscris care sunt finalizate în vederea publicării.

LISTĂ ARTICOLE PUBLICATE ISI

1. S. Rapuntean, P. T. Frangopol, I. Hodisan, Gh. Tomoaia, D. Oltean-Dan, A. Mocanu, C. Prejmorean, O. Soritau, **L. Z. Răcz**, M. Tomoaia-Cotisel, In vitro response of human osteoblasts cultured on strontium substituted hydroxyapatites, *Rev. Chim. (Bucharest)*, 69(12), 3537-3544, (2018). **I.F. 1.605**

2. **L. Z. Răcz**, M. Tomoaia-Cotișel, Cs.-P. Răcz, P. Bulieris, I. Grosu, S. Porav, A. Ciorîță, X. Filip, F. Martin, G. Serban, I. Kacso, Curcumin-Whey Protein Solid Dispersion System With Improved Solubility And Cancer Cell Inhibitory Effect, *Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Chem.*, 66(3), 209-224, (2021). **I.F. 0.447**

3. **L. Z. Răcz**, G.-A. Paltinean, I. Petean, Gh. Tomoaia, L. C. Pop, G. Arghir, E. Levei, A. Mocanu, Cs.-P. Răcz, M. Tomoaia-Cotisel, Curcumin and Whey Protein Binding And Structural Characteristics of Their Complex Evidenced by Atomic Force Microscopy, *Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Chem.*, 2022, 67(3), sub tipar. **I.F. 0.447**

4. **L. Z. Răcz**, Cs. P. Răcz, L. C. Pop, Gh. Tomoaia, A. Mocanu, I. Barbu, M. Sárközi, I. Roman, A. Avram, M. Tomoaia-Cotisel, V.-A. Toma, Strategies for improving bioavailability, bioactivity, and physical-chemical behavior of the curcumin, *Molecules*, 2022, Manuscript ID-1919555. Under review. **I.F. 4.927**

5. **L. Z. Răcz**, Cs.-P. Răcz, O. Horovitz, Gh. Tomoaia, A. Mocanu, I. Kacso, M. Sárközi, M. Dan, S. Porav, G. Borodi, M. Tomoaia-Cotisel, Complexation of Curcumin using Whey Proteins to Enhance Aqueous Solubility, Stability and Antioxidant Property, *Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Chem.*, 2022, 67(3), sub tipar. **I.F. 0.447**

Listă de comunicări la conferințe și simpozioane

Diseminarea rezultatelor științifice din Teza de Doctorat s-a realizat în 4 *prezentari orale* la conferințele naționale de la Academia Oamenilor de Știință din România [1-4], dintre care una a fost în Engleza [4] la NanoBioMat 2022 cu participare internațională.

1. **L. Racz**, A. Mocanu, Cs.-P. Racz, I. Kacso, O. Horovitz, M. Tomoaia-Cotisel, RO: „Sistem de dispersie solidă de curcumină-proteine din zăr cu solubilitate îmbunătățită și efect inhibitor al celulelor canceroase”/ ENG : „Curcumin-whey protein solid dispersion system with improved solubility and cancer cell inhibitory effect”, Prezentare orală, Academia Oamenilor de Știință din România, Conferința Științifică Națională de Toamnă „Tradiții și Progrese în Știința Românească”, Secțiunea Științe Biologice, 18 – 20 noiembrie, on line platforma Zoom, Volum rezumate pag. 21 (2021).

2. **L. Racz**, Cs.-P. Racz, A. Mocanu, I. Kacso, M. Tomoaia-Cotisel, RO : „Potențialul terapeutic al curcuminei și tehnici de a-i îmbunătăți solubilitatea și bioactivitatea in vivo”/ ENG : „Therapeutic potential of curcumin and techniques for improving its solubility and bioavailability in vivo”, Prezentare orală, Academia Oamenilor de Știință din România, Conferința Științifică Națională de Toamnă „Tradiții și Progrese în Știința Românească”, Secțiunea Științe Biologice, 18 – 20 noiembrie, on line platforma Zoom, Volum rezumate pag. 30-31 (2021).

3. **L. Racz**, Cs. P. Racz, O. Horovitz, A. Mocanu, M. Tomoaia-Cotisel, RO: “Perspective asupra interacțiunilor curcuminei cu proteinele din zăr: abordare termodinamică a legării curcuminei de proteine și potențiale efecte biologice” / ENG: “Insights into curcumin and whey protein interactions: Thermodynamic approach of curcumin - protein binding and potential biological effects”, Prezentare orală, Academia Oamenilor de Știință din România, Conferința Științifică Națională de Primăvară „Era digitală – Provocări și Oportunități pentru Societatea Contemporană”, 6 – 7 Mai 2022, secțiunea Biologie, on-line platforma Zoom, Volum de rezumate, pag. 103-104 (2022).

4. **L. Racz**, Cs.-P. Racz, O. Horovitz, A. Mocanu, M. Tomoaia-Cotisel, ENG: „Thermodynamic approach of curcumin and whey protein binding”, Virtual International Scientific Conference on “Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering” NanoBioMat 2022 – Summer Edition, 22-24 June 2022, Oral presentation on Session I, Advanced Techniques for Material Design and Processing, on line platforma TEAMS (2022).

Lista Proiecte de cercetare științifică

Contract PN2 Perteneriat 241/2014-2016 Dezvoltare de nanomaterials inovative bazate pe nanotehnologie avansată cu aplicații în profilaxia dentară și a bolilor paradontale, **InovaMat** Coordonator: Universitatea Babeș-Bolyai, Director: Conf. Dr. Aurora Mocanu

Obținerea unui produs alimentar de tip supliment, pe substrat natural de *Apium Graveolens* L. optimizat nutrițional prin îmbogățire cu seleniu și vitamine, în scopul îmbunătățirii calității vieții.

COD SMIS 119675

Optimizarea nutrițională a produselor alimentare pe bază de struguri și fructe de pădure, prin îmbogățire cu resveratrol, în scopul intensificării aportului de antioxidanți în alimentație.

COD SMIS 119601

Membru în Centrul de Cercetare Științifică în Chimie Fizică

Doctorandul Ing. Chim. **RÁCZ Levente Zsolt** este membru în Centrul de Cercetare Științifică în Chimie Fizică din 2015. CECHIF: Fondator (2006) și Director (2006-prezent): Prof. Univ. Dr. M. Tomoaia-Cotișel, Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică din cadrul Universității Babeș-Bolyai din Cluj-Napoca.