
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Sisteme farmaceutice nanoparticulate cu acțiune antioxidantă

Doctorand **Lucia Ruxandra Tefas**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Laurian Vlase**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Stres oxidativ și antioxidanți	19
1.1. Radicalii liberi și stresul oxidativ	19
1.2. Antioxidanții	20
2. Sisteme farmaceutice nanoparticulate	25
2.1. Considerații generale	25
2.2. Lipozomi	25
2.3. Nanoparticule polimerice	29
2.4. Nanoparticule lipidice solide	33
3. Metode de caracterizare a sistemelor farmaceutice nanoparticulate	37
3.1. Caracterizarea fizico-chimică a sistemelor nanoparticulate	37
3.2. Caracterizarea farmaceutică a sistemelor nanoparticulate	39
4. Motivația alegerii cvercetolului ca substanță model	41
4.1. Denumire chimică	41
4.2. Formulă moleculară	41
4.3. Formulă structurală	41
4.4. Masă molară	41
4.5. Proprietăți fizice	41
4.6. Proprietăți biofarmaceutice și farmacocinetice	42
4.7. Acțiuni și mecanisme de acțiune	42
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	47
2. Optimizarea formulării unor lipozomi cu cvercetol	49
2.1. Introducere	49
2.2. Ipoteza de lucru	50
2.3. Material și metodă	50
2.4. Rezultate	54
2.5. Discuții	60
2.6. Concluzii	65
3. Formularea unor nanoparticule polimerice cu cvercetol	67
3.1. Introducere	67
3.2. Ipoteza de lucru	68
3.3. Material și metodă	69
3.4. Rezultate	71
3.5. Discuții	78
3.6. Concluzii	82
4. Optimizarea formulării unor nanoparticule polimerice cu cvercetol	83
4.1. Introducere	83
4.2. Ipoteza de lucru	83

4.3. Material și metodă	85
4.4. Rezultate	87
4.5. Discuții	93
4.6. Concluzii	99
5. Optimizarea formulării unor nanoparticule lipidice solide cu cvercetol	101
5.1. Introducere	101
5.2. Ipoteza de lucru	103
5.3. Material și metodă	103
5.4. Rezultate	108
5.5. Discuții	118
5.6. Concluzii	126
6. Evaluarea <i>in vitro</i> a capacității antioxidante și a efectului citotoxic a unor sisteme farmaceutice nanoparticulate cu cvercetol	127
6.1. Introducere	127
6.2. Ipoteza de lucru	128
6.3. Material și metodă	129
6.4. Rezultate	131
6.5. Discuții	133
6.6. Concluzii	135
7. Concluzii generale (sinteză)	137
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	141
REFERINȚE	143

CUVINTE CHEIE: nanoparticule, lipozomi, cvercetol, antioxidant, plan experimental

INTRODUCERE

Domeniul nanotehnologiei a cunoscut mari progrese în ultimele decenii prin dezvoltarea a diferite tipuri de sisteme nanoparticulate utilizate în scop diagnostic sau de tratament.

Formularea sistemelor nanometrice de transport presupune încorporarea unei substanțe active în interiorul unui vector ce permite astfel modificarea unor proprietăți ale substanței precum solubilitatea, stabilitatea, biodisponibilitatea. În plus, oferă protecție substanței încorporate și permite transportul acesteia la organul sau țesutul țintă.

Teza de doctorat a avut ca obiectiv general formularea, prepararea și caracterizarea unor sisteme farmaceutice nanoparticulate încărcate cu o substanță cu proprietăți antioxidante. Pentru realizarea acestui obiectiv au fost dezvoltați lipozomi, nanoparticule polimerice, respectiv nanoparticule lipidice solide cu cvercetol.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În partea generală a tezei este cuprinsă o sinteză a informațiilor existente în literatura de specialitate privitoare la conceptul de stres oxidativ, specii reactive și substanțe cu proprietăți antioxidante.

Radicali liberi reprezintă entități chimice extrem de instabile și reactive față de alte molecule. Ei sunt produși normali ai metabolismului, funcționând ca mesageri secundari în procesele de semnalizare celulară. Totuși, datorită reactivității crescute, speciile reactive pot leza componentele celulare inducând leziuni oxidative. Apariția unui dezechilibru între sistemul oxidant și cel antioxidant, în favoarea primului, determină instalarea unei stări de stres oxidativ, ceea ce poate conduce la diferite stări patologice.

Antioxidanții sunt substanțe care pot împiedica reacțiile oxidative, deci pot proteja celulele de leziunile induse de speciile reactive. Totuși, utilizarea lor este limitată în principal de solubilitatea redusă în apă, instabilitatea și/sau biodisponibilitatea lor redusă. Aceste probleme ar putea fi depășite prin încorporarea substanțelor cu proprietăți antioxidante în sisteme nanoparticulate.

Totodată, teza prezintă sintetic aspecte legate de lipozomi, nanoparticule polimerice, nanoparticule lipidice solide, din punct de vedere al materiilor prime, metodelor utilizate la prepararea acestor sisteme, caracterizării lor, precum și al principalelor aplicații ale acestora în domeniul medical și farmaceutic.

De asemenea, a fost motivată alegerea cvercetolului ca substanță antioxidantă model pentru a fi încorporată în sistemele nanoparticulate dezvoltate. Cvercetolul este un compus flavonoidic cu largă răspândire în regnul vegetal, ce prezintă bune proprietăți antioxidante, antiinflamatoare și antiproliferative. Principalele limitări ale utilizării cvercetolului sunt solubilitatea redusă în apă și biodisponibilitatea scăzută. Prin încorporarea cvercetolului în sisteme nanometrice este posibilă rezolvarea acestor neajunsuri pe care substanța le prezintă.

CONTRIBUȚIILE PERSONALE

Partea de contribuție personală a tezei cuprinde pe de-o parte ipotezele generale de lucru care au stat la baza părții experimentale, iar pe de altă parte cercetarea experimentală. Această parte a lucrării este sistematizată în cinci capitole, corespunzătoare sistemelor nanoparticulate dezvoltate și evaluării lor *in vitro*. Fiecare capitol al părții experimentale este prezentat detaliat, începând cu descrierea clară a ipotezei de lucru și obiectivelor specifice fiecărui studiu și încheindu-se cu formularea unor concluzii pe baza rezultatelor experimentale obținute.

Studiul 1 – Optimizarea formulării unor lipozomi cu cvercetol

În cadrul acestui studiu s-a urmărit prepararea de lipozomi convenționali cu cvercetol prin metoda hidratării filmului lipidic. Ca excipienți lipidici pentru obținerea lipozomilor au fost folosiți dipalmitoilfosfatidilcolină (DPPC) și colesterol (COL).

Obiectivul general al studiului a fost de a evalua influența unor factori de formulare asupra caracteristicilor lipozomilor cu cvercetol. În acest sens, a fost utilizat un plan experimental de tip D-optimal cu trei factori și trei niveluri. Factorii de formulare studiați au fost concentrația de DPPC, raportul molar DPPC:COL și concentrația de cvercetol. Lipozomii au fost caracterizați sub aspectul dimensiunii, indicelui de polidispersie, respectiv eficienței încorporării.

Principali factori ce au influențat dimensiunea lipozomilor au fost concentrația DPPC și raportul lipidelor, însă efectele au fost opuse. Creșterea concentrației de DPPC a dus la creșterea dimensiunii lipozomilor, însă la creșterea raportului DPPC:COL s-a observat scăderea diametrului mediu. Concentrația de cvercetol de asemenea a influențat dimensiunea lipozomilor, remarcându-se o ușoară scădere în diametru la creșterea concentrației substanței active.

Eficiența încorporării a fost influențată de toți factorii analizați. Prin creșterea concentrației DPPC și raportului DPPC:COL până la o anumită valoare a fost îmbunătățită eficiența încorporării. În contrast, concentrația de cvercetol a avut un efect negativ asupra încorporării substanței.

În ceea ce privește raportul molar DPPC:COL și concentrația de cvercetol, creșterea lor a produs o ușoară creștere a indicelui de polidispersie.

Pornid de la rezultatele obținute la planul experimental, a fost propusă și realizată o formulă optimă de preparare a lipozomilor cu cvercetol. Pe baza rezultatelor analizei multivariate, cea mai potrivită combinație a factorilor de formulare a cuprins o concentrație mare de fosfolipidă, un raport molar mediu DPPC:COL și o concentrație mai redusă de cvercetol. Formula optimă a lipozomilor cu cvercetol au prezentat o dimensiune redusă de aproximativ 200 nm și o eficiență crescută a încorporării cvercetolului de aproximativ 60%. În plus, la testul de cedare *in vitro* au prezentat o eliberare susținută a substanței încorporate.

Studiul 2 – Formularea unor nanoparticule polimerice cu cvercetol

Acest studiu a urmărit formularea unor nanoparticule polimerice cu cvercetol. Ca polimer pentru prepararea nanoparticulelor a fost utilizat un polimer biodegradabil – poli(D,L-lactidă-co-glicolidă) (PLGA). Pentru stabilizarea nanoparticulelor ca agent stabilizant a fost utilizat alcool polivinilic. Nanoparticulele polimerice cu cvercetol au fost preparate prin metoda nanoprecipitării.

Lucrarea a avut ca obiectiv studierea influenței mai multor factori de formulare asupra caracteristicilor nanoparticulelor polimerice cu cvercetol: dimensiunea, indicele de polidispersie, potențialul Zeta și eficiența încorporării. Astfel, a fost generat un plan experimental de tip Plan Factorial Redus Rezoluție IV cu șase factori și două niveluri. Acest plan a reprezentat un plan de tip screening ce a permis studierea mai multor factori de formulare, influenței lor asupra răspunsurilor, iar ulterior selectarea factorilor critici, cu impact semnificativ asupra caracteristicilor nanoparticulelor cu cvercetol. Factorii de formulare investigați au fost concentrația de PLGA, de alcool polivinilic, de cvercetol, volumul de solvent organic (acetona), de fază apoasă și viteza de agitare.

Rezultatele obținute la planul experimental au indicat că principalii factori ce au influențat dimensiunea nanoparticulelor cu cvercetol au fost concentrația de PLGA, volumul de acetonă și viteza de agitare.

Indicele de polidispersie, la fel ca diametrul mediu, a fost influențat de concentrația polimerului și volumul fazei organice, însă cei doi factori au manifestat un efect contrar. Concentrația de PLGA a avut un efect pozitiv, în timp ce volumul de acetonă a prezentat un efect negativ. Concentrația de cvercitol de asemenea a avut un efect important și pozitiv asupra indicelui de polidispersie.

Potențialul Zeta al nanoparticulelor a fost afectat doar de concentrația de PLGA, în sens negativ.

În ceea ce privește eficiența încorporării, factorii de formulare ce au exercitat un efect semnificativ au fost concentrația de alcool polivinilic și cvercitol, precum și volumul fazei apoase. Eficiența încorporării a scăzut la creșterea concentrației de alcool polivinilic și a volumului de apă, însă valori mai mari ale procentului de cvercitol încorporat au fost obținute prin creșterea concentrației substanței active.

Studiul 3 - Optimizarea formulării unor nanoparticule polimerice cu cvercitol

Studierea aprofundată a influenței și interacțiunii factorilor de formulare critici ale unui proces este utilă, întrucât permite precizarea condițiilor optime de preparare în vederea obținerii nanoparticulelor cu caracteristicile dorite.

Din acest motiv, pe baza rezultatelor studiului anterior, trei factori de formulare cu influență semnificativă asupra răspunsurilor au fost selectați și investigați pentru aprofundarea înțelegerii procesului. Factorii de formulare aleși au fost concentrația de PLGA, concentrația de alcool polivinilic și viteza de agitare. Factorii au fost evaluați la valori mai mari față de studiul precedent în vederea evidențierii sau confirmării unor efecte asupra răspunsurilor studiate.

Pentru ceilalți trei factori de formulare evaluați în studiul anterior, mai precis concentrația de cvercitol, volumul de acetonă și volumul de apă, au fost fixate anumite valori pentru care, conform analizei multivariate realizate în studiul precedent, s-au obținut rezultate mai bune ale răspunsurilor.

Nanoparticulele polimerice cu cvercitol au fost preparate prin metoda nanoprecipitării. Ca materii prime pentru obținerea nanoparticulelor au fost utilizați aceiași excipienți: PLGA și alcool polivinilic. Răspunsurile evaluate au fost identice studiului precedent: diametrul mediu, indicele de polidispersie, potențialul Zeta și eficiența încorporării.

Pentru realizarea studiului a fost utilizat un plan experimental de tip Box-Behnken, cu trei factori și trei niveluri. Obiectivul a fost de a obține, prin realizarea unui număr minim de experimente, informații suplimentare despre influența factorilor de formulare cheie asupra caracteristicilor nanoparticulelor cu cvercitol și de a stabili condițiile optime de preparare a acestor nanoparticule.

Concentrația de PLGA a avut un efect important asupra tuturor răspunsurilor studiate, în special asupra dimensiunii nanoparticulelor, creșterea ei ducând la creșterea răspunsului. Concentrația de alcool polivinilic și viteza de agitare au prezentat un efect pozitiv, respectiv negativ asupra diametrului mediu.

Privitor la indicele de polidispersie, probe de nanoparticule omogene au fost obținute prin reducerea concentrației PLGA.

Dintre factorii studiați, concentrația de PLGA și de alcool polivinilic au fost cei ce au influențat potențialul Zeta al nanoparticulelor. În timp ce concentrația de PLGA a determinat scăderea potențialului Zeta, concentrația de alcool polivinilic a avut un efect contrar.

Eficiența încorporării a fost influențată puternic de concentrația de alcool polivinilic. Creșterea concentrației stabilizantului a produs o scădere marcată a procentului de cvercitol încorporat în nanoparticule. Pe de altă parte, concentrația de PLGA și viteza de agitare au manifestat efecte pozitive asupra eficienței încorporării, îmbunătățind-o prin creșterea lor.

Pornind de la aceste rezultate, a fost propusă și preparată o formulă optimă de nanoparticule polimerice cu cvercitol. S-a constatat că pentru obținerea nanoparticulelor polimerice cu cvercitol cu caracteristici dorite, condițiile optime de preparare ar fi reprezentate de o concentrație mai crescută de PLGA, o concentrație mai redusă de alcool polivinilic și o viteză de agitare mai mare. Nanoparticulele polimerice cu cvercitol preparate conform formulei optime au prezentat o dimensiune de aproximativ 200 nm, însă un procent mai redus de 35% de cvercitol încorporat. La testul de cedare *in vitro*, nanoparticulele polimerice au prezentat o eliberare imediată și rapidă a cvercitolului.

Studiul 4 – Optimizarea formulării unor nanoparticule lipidice solide cu cvercitol

Această parte experimentală a fost dedicată formulării și optimizării formulării unor nanoparticule lipidice solide cu cvercitol. Nanoparticulele au fost preparate prin metoda sonicării pornind de la monostearat de gliceril (Imwitor® 900K) și alcool cetilic ca excipienți lipidici. În cadrul studiului a fost aplicat un plan experimental de tip D-optimal cu cinci factori și două niveluri. La fel ca în cercetările precedente, s-a urmărit influența unor factori de formulare asupra caracteristicilor nanoparticulelor lipidice solide cu cvercitol. Doi factori de formulare evaluați au fost calitativi: tipul agentului stabilizant și metoda de preparare. S-au evaluat patru stabilizanți diferiți: Tween 80, Kolliphor® P188, Kolliphor P407® și Soluplus®. Nanoparticulele au fost preparate prin două metode (numite A și B) ce au diferit prin faza (lipidică sau apoasă) în care s-a adăugat agentul stabilizant. Ceilalți trei factori de formulare au fost cantitativi: raportul dintre lipide (Imwitor® și alcoolul cetilic), concentrația agentului stabilizant și timpul de sonicare.

Asemenea lipozomilor și nanoparticulelor polimerice, și aceste sisteme nanoparticulate au fost caracterizate prin dimensiune, indice de polidispersie, potențial Zeta și eficiența încorporării.

Conform rezultatelor, principalii factori care au influențat dimensiunea și eficiența încorporării au fost concentrația agentului stabilizant și timpul de sonicare. Creșterea acestora a condus la obținerea de nanoparticule mai mici ca dimensiune și la procente de încorporare a cvercitolului mai mari. Natura agentului stabilizant de asemenea a influențat caracteristicile nanoparticulelor. Cu toate că cele mai mici dimensiuni ale particulelor s-au obținut utilizând Soluplus® ca agent stabilizant, în ansamblu, nanoparticule cu caracteristici corespunzătoare sub toate aspectele s-au obținut cu ajutorul Tween 80.

Nu a putut fi stabilit efectul metodei de preparare asupra proprietăților nanoparticulelor lipidice solide cu cvercitol. Adăugarea agentului stabilizant cu rol de solubilizant al cvercitolului în faza lipidică (metoda B) nu a adus îmbunătățiri semnificative ale dimensiunii și eficienței încorporării.

Pe baza rezultatelor planului experimental, a fost prezisă o formulă optimă de preparare a nanoparticulelor lipidice solide cu cvercitol. Dintre toți agenții stabilizanți testați, Tween 80, în concentrația maximă studiată, alături de un raport mare al lipidelor și în condițiile aplicării metodei A de preparare, prin sonicarea probelor pentru timpul maxim testat, au permis obținerea de nanoparticule lipidice solide cu cvercitol cu caracteristicile dorite: dimensiune

redușă a particulelor de aproximativ 140 nm, omogenitate corespunzătoare și grad de încorporare a cvercetolului crescut, de peste 90%.

De asemenea, formula optimă a fost testată *in vitro* relevând o cedare susținută a cvercetolului din nanoparticulele lipidice solide.

Studiul 5 – Evaluarea *in vitro* a capacității antioxidante și a efectului citotoxic a unor sisteme farmaceutice nanoparticulate cu cvercetol

În cadrul acestui studiu s-a evaluat capacitatea antioxidantă a celor trei sisteme farmaceutice nanoparticulate cu cvercetol dezvoltate în cadrul tezei: lipozomi, nanoparticule polimerice, respectiv nanoparticule lipidice solide. În acest sens, a fost utilizat un test standard de determinare a potențialului antioxidant, mai precis testul cu radicalul DPPH. Capacitatea antioxidantă a celor trei sisteme nanoparticulate cu cvercetol a fost comparată cu a unei soluții metanolice a cvercetolului liber. Rezultatele obținute au indicat faptul că prin încorporarea în sistemele nanoparticulate, activitatea antioxidantă a cvercetolului s-a păstrat, însă a fost ușor mai redusă comparativ cu cea a cvercetolului liber. Dintre cele trei sisteme testate, lipozomii au prezentat cel mai bun potențial antioxidant, fiind urmați de nanoparticulele lipidice solide, iar la urmă de nanoparticulele polimerice cu cvercetol. Valorile mai reduse ale capacității antioxidante obținute pentru cele trei sisteme nanoparticulate pot fi justificate însă prin eliberarea treptată a cvercetolului din sistem, față de soluția cvercetolului ce este disponibil imediat pentru reacția cu radicalul DPPH.

Tot în cadrul acestui studiu s-a investigat *in vitro* efectul antiproliferativ asupra unei linii celulare de carcinom murin. Întrucât procentul de cvercetol încorporat a fost mai mare în cazul lipozomilor și nanoparticulelor lipidice solide, și totodată aceste două sisteme au prezentat o activitate antioxidantă comparabilă cu a cvercetolului liber, doar aceste două sisteme nanometrice au fost studiate în cadrul testului de citotoxicitate *in vitro*.

Activitatea sistemelor cu cvercetol a fost evaluată în paralel cu sistemele goale (fără cvercetol) și cu o soluție de cvercetol liber. Atât lipozomii, cât și nanoparticulele lipidice solide au prezentat efect citotoxic, însă doar pentru lipozomii cu cvercetol rezultatele au fost mai concludente.

Aceste rezultate au permis testarea lipozomilor cu cvercetol împreună cu 5-fluorouracilul, pentru a evalua și a pune în evidență un eventual efect de potențare a acțiunii anticanceroase a 5-fluorouracilului. Procentele de inhibare obținute la asociere au fost mai mari față de cele ale substanțelor individuale. Totodată, procentele de inhibare obținute pentru asocierea lipozomi cu cvercetol-5-fluorouracil au fost aproape identice celor ale asocierii cvercetol liber-5-fluorouracil. Aceasta a confirmat ipoteza inițială și sugerează posibilitatea reducerii dozei de 5-fluorouracil, deci reducerea consecutivă a efectelor secundare asociate chimioterapiei. Prin urmare, asocierea între 5-fluorouracil și lipozomii încărcăți cu cvercetol ar putea reprezenta o posibilă strategie terapeutică în cancerul de colon.

Concluzii generale

Obiectivul general al tezei de doctorat a constat în formularea, prepararea și caracterizarea a trei sisteme farmaceutice nanometrice: lipozomi, nanoparticule polimerice și nanoparticule lipidice solide. În aceste sisteme s-a încorporat cvercetol ca model de substanță cu proprietăți antioxidante. Totodată, s-a evaluat capacitatea antioxidantă și efectul antiproliferativ a acestor sisteme nanoparticulate, cu scopul de a evidenția posibila lor aplicație în tratamentul cancerului de colon.

Pentru dezvoltarea fiecăruia dintre cele trei sisteme nanoparticulate a fost folosită metoda planurilor experimentale ce a permis studierea influenței factorilor de formulare asupra caracteristicilor sistemelor nanoparticulate, iar în final optimizarea procesului prin determinarea celei mai potrivite combinații a factorilor de formulare pentru un anumit răspuns.

Pornind de la rezultatele analizei multivariate, s-au obținut lipozomi, nanoparticule polimerice, respectiv nanoparticule lipidice solide cu cvercitol cu caracteristicile optime dorite.

Prin realizarea testului cu DPPH a fost evidențiată capacitatea antioxidantă a acestor sisteme, ceea ce sugerează că prin încorporarea cvercitolului în sistemele nanoparticulate se menține nealterat potențialul antioxidant.

În plus, la testul de citotoxicitate *in vitro* pe linie celulară de carcinom murin, lipozomii și nanoparticulele lipidice solide cu cvercitol au prezentat efect citotoxic, însă rezultatele nu au fost concludente. Totuși, testarea lipozomilor cu cvercitol în asociere cu 5-fluorouracilul a prezentat rezultate promițătoare la testul de proliferare celulară, sugerând posibila utilizare în terapie combinată pentru potențarea efectului anticanceros a 5-fluorouracilului.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Originalitatea lucrării se reflectă în rezultatele obținute în cadrul cercetării experimentale. Rezultatele obținute oferă informații suplimentare și concluzii noi, venind să îmbogățească datele existente actualmente în literatura de specialitate.

Contribuțiile inovative ale tezei constau și în dezvoltarea celor trei sisteme nanoparticulate cu cvercitol utilizând combinații de excipienți sau concentrații ale excipienților și/sau cvercitolului diferite de cele raportate de alți cercetători din domeniu.

De asemenea, elementul de noutate stă și la baza studiului comparativ al sistemelor nanoparticulate cu cvercitol sub aspectul potențialului antioxidant și efectului citotoxic asupra celulelor tumorale, ce a permis astfel evidențierea eficienței unor sisteme față de altele.

PhD THESIS SUMMARY

Nanoparticulate pharmaceutical systems with antioxidant activity

PhD Student **Lucia Ruxandra Tefas**

PhD Supervisor Prof.dr. **Laurian Vlase**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Oxidative stress and antioxidants	19
1.1. Free radicals and oxidative stress	19
1.2. Antioxidants	20
2. Nanoparticulate pharmaceutical systems	25
2.1. General considerations	25
2.2. Liposomes	25
2.3. Polymeric nanoparticles	29
2.4. Solid lipid nanoparticles	33
3. Methods for characterizing the nanoparticulate pharmaceutical systems	37
3.1. Physicochemical characterization of the nanoparticulate systems	37
3.2. Pharmaceutical characterization of the nanoparticulate systems	39
4. Motivation for choosing quercetin as a model drug	41
4.1. Chemical name	41
4.2. Molecular formula	41
4.3. Structural formula	41
4.4. Molar mass	41
4.5. Physical properties	41
4.6. Biopharmaceutical and pharmacokinetic properties	42
4.7. Actions and mechanisms of action	42
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Work hypothesis/objectives	47
2. The optimization of a formulation of quercetin-loaded liposomes	49
2.1. Introduction	49
2.2. Work hypothesis	50
2.3. Material and method	50
2.4. Results	54
2.5. Discussions	60
2.6. Conclusions	65
3. The formulation of quercetin-loaded polymeric nanoparticles	67
3.1. Introduction	67
3.2. Work hypothesis	68
3.3. Material and method	69
3.4. Results	71
3.5. Discussions	78
3.6. Conclusions	82
4. The optimization of a formulation of quercetin-loaded polymeric nanoparticles	83
4.1. Introduction	83
4.2. Work hypothesis	83

4.3. Material and method	85
4.4. Results	87
4.5. Discussions	93
4.6. Conclusions	99
5. The optimization of a formulation of quercetin-loaded solid lipid nanoparticles	101
5.1. Introduction	101
5.2. Work hypothesis	103
5.3. Material and method	103
5.4. Results	108
5.5. Discussions	118
5.6. Conclusions	126
6. <i>In vitro</i> evaluation of the antioxidant capacity and the cytotoxic effect of quercetin-loaded nanoparticulate pharmaceutical systems	127
6.1. Introduction	127
6.2. Work hypothesis	128
6.3. Material and method	129
6.4. Results	131
6.5. Discussions	133
6.6. Conclusions	135
7. General conclusions (synthesis)	137
8. The originality and the innovative contributions of the thesis	141
REFERENCES	143

KEY WORDS: nanoparticles, liposomes, quercetin, antioxidant, experimental design

INTRODUCTION

Nanotechnology has known great progress in the last decades by developing different types of nanoparticulate systems used for diagnosis or treatment.

The formulation of nanoscaled delivery systems consists in encapsulating a drug inside a delivery vector which allows to modify properties of the drug such as solubility, stability, bioavailability. Furthermore, it protects the encapsulated drug and provides a method to transport the active drug to a specific target.

The main objective of the PhD thesis was the formulation, preparation and characterization of nanoparticulate pharmaceutical systems loaded with an antioxidant drug. In order to achieve this, liposomes, polymeric nanoparticles and solid lipid nanoparticles, respectively, all loaded with quercetin were prepared.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The general part of the thesis comprises a summary of information available in literature, regarding the concept of oxidative stress, reactive species and antioxidant drugs.

Free radicals are chemical entities which are highly unstable and reactive towards other molecules. They are normal products of metabolism, and function as secondary messengers in cellular signaling pathways. Yet, due to their increased reactivity, reactive species can attack cellular components and induce oxidative damage. Generating an imbalance between the oxidant and antioxidant systems, in favor of the former, induces an oxidative stress state which can lead to different pathological conditions.

Antioxidants are substances that can prevent oxidative reactions, and thus can protect cells from oxidative damage induced by reactive species. However, their use is limited mainly by their low water solubility, instability and/or their low bioavailability. These problems can be overcome by incorporating the antioxidant drugs in nanoparticulate systems.

Also, the thesis briefly presents aspects related to liposomes, polymeric nanoparticles, solid lipid nanoparticles regarding the materials and methods used to prepare these systems, their characterization, as well as their main applications in the medical and pharmaceutical field.

Additionally, the thesis provides a motivation for choosing quercetin as the model antioxidant drug to be encapsulated in the nanoparticulate systems. Quercetin is a flavonoid ubiquitously present in the plant kingdom, and exhibits good antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties. The main limitations for using quercetin include its low water solubility and low bioavailability. These drawbacks could be overcome by incorporating quercetin in nanoscaled delivery systems.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

The personal contribution part of the PhD thesis includes on the one hand the general work hypothesis of the experimental studies, and on the other hand the experimental research itself. This part of the thesis is organized into five chapters corresponding to the developed nanoparticulate system, and their *in vitro* evaluation. Each chapter of the experimental part is presented in detail, starting with the clear description of the work hypothesis and the specific objectives of each study, and ending with conclusions drawn from the experimental results.

Study 1 – The optimization of a formulation of quercetin-loaded liposomes

This study aimed at preparing quercetin-loaded conventional liposomes by employing the film hydration method. In order to obtain the liposomes, dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and cholesterol (COL) were used as lipophilic excipients.

The prime objective of the study was to evaluate the influence of formulation factors on the quercetin-loaded liposomes' characteristics. In this sense, a D-optimal experimental design with three factors and three levels was used. The studied formulation factors were the DPPC concentration, the DPPC:COL molar ratio and the quercetin concentration. The liposomes were characterized in terms of size, polydispersity index and encapsulation efficiency, respectively.

The main factors which influenced liposome size were the DPPC concentration and the lipid molar ratio, but the observed effects were opposite. Increase in DPPC concentration led to an increase in liposome size, but by increasing the DPPC:COL molar ratio a decrease of the mean diameter was observed. The quercetin concentration also influenced liposome size, causing a slight decrease of the diameter when increasing the drug's concentration.

The encapsulation efficiency was influenced by all the analyzed factors. By increasing the DPPC concentration and the DPPC:COL ratio up to a certain value, the encapsulation efficiency increased as well. In contrast, quercetin concentration had a negative effect on the encapsulation efficiency.

Regarding the DPPC:COL molar ratio and the quercetin concentration, their increase led to a slight increase of the polydispersity index.

Based on the experimental design results, an optimized formulation for preparing quercetin-loaded liposomes was proposed and done. According to the multivariate analysis, the best combination of formulation factors comprised a high phospholipid concentration, a medium DPPC:COL molar ratio and a low quercetin concentration. The optimized quercetin-loaded liposome formulation showed a small size of approximately 200 nm and a high encapsulation efficiency of about 60%. Also, in the *in vitro* release study the liposomes showed a sustained release of the entrapped drug.

Study 2 – The formulation of quercetin-loaded polymeric nanoparticles

The aim of this study was to formulate quercetin-loaded polymeric nanoparticles. A biodegradable polymer – poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) was used to prepare the nanoparticles. In order to stabilize the nanoparticles, polyvinyl alcohol was chosen as the stabilizing agent. The polymeric nanoparticles were prepared according to the nanoprecipitation method.

The prime objective was to study the influence of several formulation factors on the characteristics of the quercetin-loaded polymeric nanoparticles: size, polydispersity index, Zeta potential, encapsulation efficiency. Therefore, a Fractioned Factorial Design Resolution IV experimental design with six factors and two levels was generated. This was a screening design which allowed the study of different formulation factors, their influence on the responses, and subsequently the selection of those critical factors which had significant impact on the characteristics of quercetin-loaded nanoparticles. The investigated formulation factors were the PLGA concentration, the polyvinyl alcohol concentration, the volume of organic solvent (acetone), the volume of aqueous phase and the stirring speed.

The results obtained within the experimental design indicated that the main factors which influenced quercetin-loaded nanoparticle size were the PLGA concentration, the volume of acetone and the stirring speed.

The polydispersity index, as with the mean diameter, was influenced by the polymer's concentration and the volume of organic phase, but the two factors had opposite effects. The PLGA concentration had a positive effect, while the acetone volume showed a negative effect. The quercetin concentration also exhibited an important and positive effect on the polydispersity index.

The nanoparticles' Zeta potential was influenced only by the PLGA concentration, in a negative sense.

Concerning the encapsulation efficiency, the formulation factors which had a significant effect on the response were the concentration of polyvinyl alcohol and quercetin, respectively, as well as the volume of aqueous phase. The encapsulation efficiency decreased as the polyvinyl alcohol concentration and the aqueous phase volume increased. However, higher values for the encapsulation efficiency were obtained when the quercetin concentration increased.

Study 3 – The optimization of a formulation of quercetin-loaded polymeric nanoparticles

The thorough study of the influence of and interaction between critical formulation factors of a process is very useful as it can predict the optimum preparation conditions in order to obtain nanoparticles with desired characteristics.

Therefore, based on the results obtained in the previous study, three formulation factors with major influence on the responses were selected and evaluated in order to thoroughly understand the process. The selected and investigated formulation factors the PLGA concentration, the polyvinyl alcohol concentration and the stirring speed. The effects of the chosen factors were evaluated at higher levels than those considered in the previous study, in order to highlight or confirm the influence on the responses.

For all the other formulation factors which were investigated in the previous study, namely the quercetin concentration, the volume of acetone and the volume of water, certain values were established. Based on the multivariate analysis, the chosen values led to good results for the responses in the previous study.

The quercetin-loaded polymeric nanoparticles were prepared by the nanoprecipitation method. The same excipients, namely PLGA and polyvinyl alcohol were used to obtain the nanoparticles. The responses were identical to those investigated in the previous study: size, polydispersity index, Zeta potential and encapsulation efficiency.

To perform the study, a Box-Behnken experimental design with three factors and three levels was used. The goal was to obtain, by running a minimum number of experiments, additional information about the influence of the key formulation factors on the quercetin-loaded nanoparticles' characteristics, and to establish the optimum preparation conditions for these nanoparticles.

The PLGA concentration had an important effect on all the studied responses, especially on the size of the nanoparticles. Increasing the PLGA concentration led to an increase in the response. The polyvinyl alcohol concentration and the stirring speed had a positive effect and negative one, respectively on the mean size.

Regarding the polydispersity index, much more homogeneous samples of nanoparticles were obtained by decreasing the concentration of PLGA.

Of the studied factors, only the PLGA concentration and the polyvinyl alcohol concentration influenced the Zeta potential of the nanoparticles. While the PLGA concentration

produced a decrease in the Zeta potential, the polyvinyl alcohol concentration had an opposite effect.

The encapsulation efficiency was strongly influenced by the concentration of polyvinyl alcohol. Increasing the stabilizer's concentration led to a marked decrease in the percentage of entrapped quercetin. On the other hand, the PLGA concentration and the stirring speed had positive effects on the encapsulation efficiency, enhancing it as they increased.

From these results, the optimization process for the quercetin-loaded nanoparticles was carried out. It was observed that in order to obtain quercetin-loaded nanoparticles with desirable characteristics, the optimum preparation conditions would include a higher concentration of PLGA, a lower concentration of polyvinyl alcohol, along with a higher stirring speed. The quercetin-loaded polymeric nanoparticles prepared according to the optimized formulation had a size of approximately 200 nm, but a slightly reduced percentage, of 35%, of encapsulated quercetin. In the *in vitro* test, the quercetin-loaded polymeric nanoparticles showed an immediate release.

Study 4 - The optimization of a formulation of quercetin-loaded solid lipid nanoparticles

This experimental study included the formulation and optimization of quercetin-loaded solid lipid nanoparticles. The nanoparticles were prepared by sonication using glycerol monostearate (Imwitor® 900K) and cetyl alcohol as lipophilic excipients. A D-optimal experimental design with five factors and two levels was constructed in the study. Like in the other studies, the influence of several formulation factors on the characteristics of quercetin-loaded solid lipid nanoparticles was evaluated. Two of the formulation factors were qualitative factors, namely the type of stabilizer and the method of preparation, respectively. Four different stabilizing agents were tested: Tween 80, Kolliphor® P188, Kolliphor P407® and Soluplus®. The solid lipid nanoparticles were prepared by employing two different methods (named A and B). The difference between the two methods consisted in the phase (lipophilic or aqueous) in which the stabilizer was added. The other three formulation factors were quantitative factors: the lipid ratio (Imwitor® and cetyl alcohol), the concentration of stabilizer and the sonication time.

As with the liposomes and polymeric nanoparticles, these systems as well were characterized in terms of size, polydispersity index, Zeta potential and encapsulation efficiency.

According to the results, the main factors which influenced the size and the encapsulation efficiency were the concentration of stabilizer and the sonication time. An increase in these factors led to smaller size particles, as well as higher encapsulation efficiency values. Although the smallest particles were obtained using Soluplus® as stabilizer, the nanoparticles which corresponded in all respects were the one prepared with Tween 80.

The influence of the preparation method on the quercetin-loaded solid lipid nanoparticles' characteristics could not be determined. The addition of the stabilizer in the lipophilic phase (method B) in which it acted as a solubilizing agent, did not bring significant improvements of the size, nor of the encapsulation efficiency.

An optimized formula for preparing quercetin-loaded solid lipid nanoparticles was predicted. Solid lipid nanoparticles having desirable characteristics were obtained by using the highest concentration of Tween 80 as stabilizer, a bigger lipid ratio, and by employing method A of preparation, by subjecting the samples to sonication for 30 minutes. Working in these conditions led to nanoparticles with a size of approximately 140 nm, relatively homogeneous, and with a high encapsulation efficiency of more than 90%.

Also, the optimum formulation was evaluated in the *in vitro* release study, indicating a sustained release of the entrapped quercetin.

Study 5 – *In vitro* evaluation of the antioxidant capacity and the cytotoxic effect of quercetin-loaded nanoparticulate pharmaceutical systems

This study evaluated the antioxidant capacity of the three quercetin-loaded nanoparticulate systems which were developed in the PhD thesis: liposomes, polymeric nanoparticles and solid lipid nanoparticles, respectively. A standard test for determining the antioxidant potential was used, namely the DPPH assay. The antioxidant capacity of the three quercetin-loaded nanoparticulate systems was compared to that of a methanol solution of free quercetin. Data suggested that by incorporating quercetin in the nanoparticulate systems, the antioxidant capacity of quercetin was preserved, but it was slightly lower when compared to that of free quercetin. Of the three systems evaluated, the liposomes showed the highest antioxidant potential, followed by the solid lipid nanoparticles, and lastly by the polymeric nanoparticles. The lower antioxidant capacity seen with the three nanoparticulate systems can be due to the sustained release of quercetin from the delivery systems as opposed to a solution of free quercetin which is readily available to react with the DPPH radical.

The study also included the *in vitro* evaluation of the antiproliferative effect of the quercetin-loaded nanoparticulate systems on a murine carcinoma cell line. Due to the fact that the entrapped quercetin percentage was higher for the liposomes and the solid lipid nanoparticles, and also because these two systems showed an antioxidant capacity comparable to that of free quercetin, only these nanoscaled systems were investigated in the *in vitro* cytotoxicity study.

Alongside the quercetin-loaded systems, the effects of unloaded systems and a free quercetin solution were tested as well. Both the liposomes and the solid lipid nanoparticles showed a cytotoxic effect, but for the quercetin-loaded liposomes the obtained results were more conclusive.

Thus, the quercetin-loaded liposomes were investigated together with 5-fluorouracil, in order to evaluate and emphasize a potential anticancer enhancing effect. Growth inhibition percentages were higher for the combination than for the individual compounds. Also, the combination of quercetin-loaded liposomes and 5-fluorouracil showed growth inhibition percentages almost identical to those obtained for the free quercetin and 5-fluorouracil combination. These results confirmed the initial hypothesis, and suggest the possibility of reducing the necessary doses of 5-fluorouracil, thus the subsequent reduction of the side effects associated with chemotherapy. Hence, the association of 5-fluorouracil and quercetin-loaded liposomes could represent a potential therapeutic strategy in treating colon cancer.

General conclusions

The prime goal of the PhD thesis was the formulation, preparation and characterization of three nanoscaled systems: liposomes, polymeric nanoparticles and solid lipid nanoparticles. Quercetin as a model antioxidant substance was entrapped in these systems. Also, the antioxidant capacity and antiproliferative effect of these systems were evaluated *in vitro*, in order to highlight their potential use in the treatment of colon cancer.

An experimental design was constructed in order to develop each nanoparticulate system. This methodology allowed the study of several formulation factors, their influence on the

nanoparticles' characteristics and finally to optimize the process by determining the most suitable combination of the formulation factors for a given response.

Based on the multivariate analysis, quercetin-loaded liposomes, polymeric nanoparticles and solid lipid nanoparticles, respectively having optimum and desirable characteristics were prepared.

The DPPH assay emphasized the antioxidant capacity of these systems, and suggested that incorporating quercetin in the nanoparticles does not alter the antioxidant potential.

In addition, the *in vitro* cytotoxicity test performed on a murine carcinoma cell line, suggested a cytotoxic effect for the liposomes and solid lipid nanoparticles, but the results were inconclusive. However, the combination of quercetin-loaded liposomes and 5-fluorouracil showed promising results in the antiproliferative assay, thus suggesting a possible use in combined cancer therapy to increase the anticancer effect of 5-fluorouracil.

The originality and the innovative contributions of the thesis

The originality of the thesis is reflected in the results of the experimental research. The results bring new information and conclusion, enriching data already available in literature.

The innovative contributions of the thesis consist in the development of the three quercetin-loaded nanoparticulate systems by using combinations of excipients or concentrations of excipients and/or quercetin different from those reported by other research groups.

Also, the novelty underlies the comparative study of the quercetin-loaded nanoparticulate systems in terms of antioxidant potential and cytotoxic effect on cancerous cells. This allowed to emphasize the efficiency of one system compared to the others.