

**CREȘTEREA BIODISPONIBILITĂȚII PUERARINULUI ȘI A POTENȚIALULUI SĂU
FARMACOLOGIC PRIN NANOINGINERIE**
**NANOENGINEERING APPROACHES TO ENHANCE THE BIOAVAILABILITY OF
PUERARIN FOR IMPROVED PHARMACOLOGICAL POTENTIAL**

Teză de doctorat – Rezumat

pentru obținerea titlului științific de doctor la

Universitatea Politehnica Timișoara

în domeniul de doctorat INGINERIE CHIMICĂ

autor ing. Sergio LIGA

conducător științific Prof. univ. Dr. ing. Francisc PETER

luna Martie anul 2026

Compușii naturali continuă să reprezinte o componentă esențială a vieții cotidiene și-a domeniilor aferente sănătății, întrucât o gamă largă de materiale și produse (exemple: produse farmaceutice, alimente, parfumuri, arome, cosmetice) provin, direct sau indirect, din aceste resurse naturale [1]. Această dependență structurală de materiale și produse de origine naturală susține relevanța științifică a cercetării compușilor naturali ca și domeniu strategic modern, cu o importanță pe termen lung [2].

Astfel, teza de doctorat este structurată în 2 componente mari:

1. Studiul de literatură care oferă o perspectivă modernă asupra compușilor naturali, cu accent pe clasa de flavonoide, împreună cu strategiile moderne de dezvoltare a unor noi produse și materiale prin intermediul nanotehnologiei și biocatalizei. S-a evidențiat evoluția marcantă a datelor de literatură despre importanța crescândă a isoflavonei Puerarin în aplicații biomedicale pentru sănătate cardiovasculară, neuroprotecție, diabet sau protecție hepatică, ceea ce justifică alegerea acestui compus ca pilon central al tezei în condițiile în care problema principală o reprezintă biodisponibilitatea sa orală limitată.

Această componentă a tezei a fost valorificată prin publicarea a 4 articole științifice de tip review [3,4,5,6], dintre care două [3,4] se regăsesc printre cele mai citate lucrări științifice din domeniu (Highly Cited Papers, conform bazei de date Web of Science, 2024).

2. Contribuții originale, în care sunt prezentate rezultatele obținute pe parcursul cercetării științifice, începând cu formularea obiectivelor tezei de doctorat. Teza are ca direcție centrală creșterea solubilității și biodisponibilității flavonoidei Puerarin, prin aplicarea principiilor chimiei verzi și prin valorificarea a două direcții moderne de cercetare, intens explorate în prezent, respectiv nanotehnologia și biocataliza. Teza de doctorat urmărește, ca obiective principale, sinteza și caracterizarea fizico-chimică și biologică a unor nanoparticule sau nanobiocompozite pe bază de Puerarin, precum și obținerea unor compuși derivați ai acestora prin transformări catalizate enzimatic. Prin abordarea integrată a acestor două direcții, lucrarea propune strategii complementare pentru îmbunătățirea proprietăților biofarmaceutice ale Puerarinului și pentru creșterea potențialului său farmacologic.

Teza de doctorat este structurată pe următoarele capitole:

2.1. Studii computaționale *in silico* privind flavonoida Puerarin

În cadrul acestui subcapitol au fost investigate mai multe metode *in silico*, utilizate pentru evaluarea reactivității și optimizarea structurii izoflavonei Puerarin, precum și pentru predicția activităților biologice asociate acesteia. Studiile computaționale au avut ca obiectiv estimarea impactului modificărilor structurale asupra profilului biologic al Puerarinului, evidențiind modul în care acestea pot influența și modula diferite efecte biologice, cu accent pe activitățile anticanceroasă asupra melanomului uman și antiinflamatoare.

2.2. Sinteza, caracterizarea și activitatea biologică a nanobiocompozitelor Puerarin-oxid de zinc

În cadrul acestui subcapitol a fost optimizată sinteza unor noi nanobiocompozite de oxid de zinc pe bază de Puerarin. Caracterizarea avansată a acestora a fost realizată prin utilizarea unor metode instrumentale, precum analiza de difracție de raze X, UV-Vis și FT-IR. Analiza prin microscopie electronică de baleiaj (SEM) a evidențiat faptul că mărimea acestor nanobiocompozite se încadrează în intervalul 200-400 nm, iar microscopia de forță atomică (AFM) a evidențiat topografia specifică a suprafeței, care le recomandă pentru utilizarea ca sisteme de transport.

Ulterior caracterizării fizico-chimice avansate, nanobiocompozitele au fost investigate din punct de vedere al activității biologice. Rezultatele obținute au evidențiat un profil biologic promițător, exprimat prin activitate antimicrobiană semnificativă asupra unor specii patogene (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Candida parapsilosis*), precum și prin activitate anticanceroasă *in vitro* împotriva celulelor de melanom uman (A375). În plus, evaluarea *in ovo* a evidențiat faptul că nanobiocompozitele Puerarin-oxid de zinc nu induc efecte iritante și nu determină modificări semnificative ale proceselor de angiogeneză. Rezultatele acestor studii susțin biocompatibilitatea preliminară și indică potențialul acestora pentru utilizarea în formularea unor produse farmaceutice topice moderne.

Aceste rezultate au fost publicate în revista *Pharmaceutics* [7].

2.3. Sinteza, caracterizarea și evaluarea biologică complexă a nanoparticulelor de Puerarin-Ag₂O/Ag și Puerarin-Ag

În cadrul acestui subcapitol a fost optimizată sinteza unor noi nanoparticule de Puerarin-Ag₂O/Ag și Puerarin-Ag, obținute folosind Puerarin ca agent reducător. Caracterizarea acestora a fost realizată prin RX, UV-Vis, și FT-IR. Analizele morfologice (TEM, SEM, AFM) au evidențiat formarea unor sisteme nanostructurate și au furnizat informații privind dimensiunea și topografia suprafeței acestora. Analiza DLS a arătat tendința acestor nanoparticule de a forma agregate în suspensie, rezultând dimensiuni hidrodinamice mari.

Evaluarea biologică a nanoparticulelor de Puerarin-Ag₂O/Ag și Puerarin-Ag a fost realizată printr-o abordare multifactorială, incluzând activitatea antibacteriană pe specii nosocomiale Gram-pozitive și Gram-negative (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), activitatea antioxidantă prin testul DPPH, precum și studii pe linia celulară de melanom uman A375, respectiv linia celulară umană de keratinocite imortalizate HaCaT, prin testul MTT și metoda eliberării LDH, pentru investigarea efectelor asupra activității

mitocondriale și a citotoxicității. În plus, potențialul iritant și impactul asupra angiogenezei au fost analizate prin teste *in ovo*. Ansamblul acestor investigații a permis conturarea unui profil biologic complex al nanosistemelor obținute și a demonstrat posibilitățile ca acestea să poată fi utilizate în aplicații biomedicale și farmacologice.

Aceste rezultate au fost publicate în revista *Journal of Functional Biomaterials* [8].

2.4. Studii preliminare privind sinteza nanoparticulelor utilizând cationi metalici alternativi (cupru, nichel și fier)

Studiile preliminare prezentate în acest subcapitol au arătat că, dintre cationii metalici alternativi investigați (Cu, Ni, Fe), cuprul este cel mai potrivit pentru obținerea nanoparticulelor oxidice în prezența isoflavonei Puerarină, cu formarea nanoparticulelor de CuO, în timp ce sistemele pe bază de Ni și Fe au condus predominant la faze intermediare de tip hidroxid și necesită optimizare suplimentară. Nanoparticulele de CuO cu Puerarin au fost caracterizate din punct de vedere al proprietăților optice, structurale și morfologice prin analize RX, UV-Vis, FT-IR, SEM și AFM, iar evaluarea lor biologică a fost realizată prin teste *in ovo*, pentru aprecierea profilului preliminar de biocompatibilitate.

2.5. Geluri proniozomale bazate pe niozomi ca sisteme integrate de livrare ale Puerarinului

În cadrul acestui subcapitol s-a realizat, pentru prima dată, formularea și caracterizarea fizico-chimică și biologică a unui gel proniozomal încărcat cu Puerarin. Proprietățile fizico-chimice și caracteristicile structurale ale gelului proniozomal încărcat cu Puerarin au fost investigate sistematic, în scopul confirmării formării sistemului vezicular și al evaluării potențialului acestuia pentru administrare topică. Formularea optimizată a fost supusă unei caracterizări fizico-chimice complexe, prin analize FT-IR, calorimetrie diferențială de baleiaj (DSC), DLS, determinarea potențialului zeta și evaluare reologică. Complementar investigațiilor fizico-chimice experimentale, au fost efectuate studii biologice constând în teste de citotoxicitate *in vitro* (pe liniile celulare de melanom uman A375, respectiv de keratinocite imortalizate HaCaT) și evaluări *in ovo* pe membrana corioalantoidiană (CAM), pentru investigarea performanței biologice inițiale și a profilului de siguranță al formulării selectate.

Aceste rezultate au fost publicate în revista *Gels* [9].

2.6. Utilizarea catalizei enzimatică ca strategie de creștere a solubilității și biodisponibilității Puerarin-ului

În acest subcapitol s-a urmărit sinteza unor esteri ai Puerarinului cu diferiți donori naturali de acil, în vederea creșterii liposfilicității și implicit a biodisponibilității sale. În acest sens, a fost investigată sinteza esterilor de Puerarin utilizând mai multe lipaze native și imobilizate, trei donori de acil (acid hexanoic, acid octanoic, laurat de vinil), în sisteme de reacție de esterificare și transesterificare. Reacțiile au fost optimizate utilizând lipaza B din *Candida antarctica* în formă imobilizată, iar ca element original suplimentar s-a realizat imobilizarea lipazei din *Pseudomonas stutzeri* prin entrapare în matrici de sol-gel, care a fost ulterior utilizată în aceleași reacții de transesterificare și evaluată comparativ cu biocatalizatorii comerciali.

3. Partea experimentală a tezei include descrierea detaliată a materialelor și procedurilor experimentale utilizate pentru sinteza și caracterizarea nanoparticulelor, precum și metodele de analiză instrumentală folosite.

4. Concluzii finale și contribuții originale, rezumă principalele rezultate ale studiilor experimentale și teoretice, în concordanță cu obiectivele propuse și cu accent pe caracterul inovativ al acestora.

Atingerea obiectivelor tezei de doctorat, prin activitatea de cercetare experimentală desfășurată, a condus la formularea următoarelor concluzii și contribuții originale:

4.1. Studiul de literatură a evidențiat aspecte relevante privind importanța compușilor naturali, cu accent asupra flavonoidelor, precum și asupra strategiilor moderne de creștere a solubilității și biodisponibilității acestora, precum nanotehnologia și biocataliza.

4.2. Studiile *in silico* au permis optimizarea structurală și analiza reactivității Puerarin-ului, precum și predicția unor activități biologice relevante, în special activitatea anticancerasă asupra melanomului uman și activitatea antiinflamatoare.

4.3. A fost realizată și optimizată, pentru prima dată, sinteza și caracterizarea fizico-chimică și biologică a nanobiocompozitelor Puerarin-oxid de zinc (PUE-ZnO).

- A fost demonstrată posibilitatea utilizării Puerarin-ului ca agent reducător și stabilizator pentru sinteza nanoparticulelor de oxid de zinc.

- Analizele morfologice au evidențiat particule în intervalul 200-400 nm, susținând potențialul utilizării acestora ca sisteme de transport.

- Rezultatele au demonstrat, pentru prima dată, potențialul anticanceros al Puerarin-ului asupra liniei celulare A375 (melanom uman).

- Nanobiocompozitele PUE-ZnO au prezentat un profil biologic promițător, exprimat prin activitate antimicrobiană asupra speciilor patogene (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Candida parapsilosis*), precum și activitate *in vitro* anticancerasă sinergică împotriva melanomului uman.

- Testele *in ovo* au indicat absența efectului iritant și lipsa unui impact semnificativ asupra angiogenezei în condițiile experimentale investigate, susținând potențialul lor pentru aplicații farmaceutice.

4.4. A fost optimizată pentru prima dată sinteza nanoparticulelor de Puerarin-Ag₂O/Ag și Puerarin-Ag, urmată de caracterizarea fizico-chimică și biologică.

- Caracterizarea fizico-chimică prin RX, UV-Vis și FT-IR a confirmat formarea nanoparticulelor și a permis evidențierea particularităților structurale și optice.

- Analizele morfologice prin SEM și AFM au furnizat informații complementare privind morfologia, topografia suprafeței și organizarea particulelor, confirmând obținerea unor sisteme nanostructurate adecvate pentru evaluare biologică.

- Evaluarea biologică a fost realizată printr-o abordare multifactorială, incluzând activitate antibacteriană, activitate antioxidantă (DPPH), teste *in vitro* de citotoxicitate/celularitate (MTT și LDH) și evaluări *in ovo* (potențial iritant și impact asupra angiogenezei).

- La toate concentrațiile testate, nanoparticulele au prezentat citotoxicitate pronunțată asupra liniilor celulare HaCaT și A375, determinând scăderea semnificativă a activității mitocondriale și creșterea mortalității celulare. Rezultatele obținute pe linia HaCaT (keratinocite umane) indică necesitatea unei evaluări atente a intervalului terapeutic și a profilului de siguranță, în special în contextul unor potențiale aplicații topice sau biomedicale.

- Evaluările *in ovo* au completat profilul biologic al nanoparticulelor, oferind informații preliminare privind potențialul iritant și impactul asupra angiogenezei, utile pentru aprecierea biocompatibilității inițiale.

4.5. Studiile preliminare privind utilizarea unor cationi metalici alternativi (Cu, Ni, Fe) în prezența Puerarin-ului au arătat că cuprul este cel mai promițător cation pentru obținerea nanoparticulelor oxidice, cu formarea fazei CuO. În condițiile experimentale investigate, sistemele pe bază de Ni și Fe au condus predominant la specii de tip hidroxid, ceea ce indică necesitatea unor optimizări suplimentare pentru favorizarea conversiei către fazele oxidice corespunzătoare.

4.6. A fost realizată, pentru prima dată, formularea și caracterizarea fizico-chimică și biologică a unui gel proniozomal încărcat cu Puerarin, ca sistem integrat de livrare bazat pe niozomi, cu potențial pentru aplicații farmaceutice topice.

- Caracterizarea fizico-chimică a formulării optimizate prin FT-IR, DSC, DLS, determinarea potențialului zeta și evaluare reologică a confirmat formarea sistemului vezicular și a furnizat informații relevante privind proprietățile sale structurale și coloidale.

- Analizele efectuate au evidențiat caracteristici fizico-chimice compatibile cu utilizarea formulării ca sistem de transport topic, susținând stabilitatea și comportamentul adecvat al sistemului proniozomal în condițiile investigate.

- Studiile biologice preliminare *in vitro* pe linia celulară de melanom malign uman A375, respectiv linia celulară de keratinocite imortalizate HaCaT au permis evaluarea inițială a profilului de citotoxicitate al formulării proniozomale încărcate cu Puerarin.

- Testele *in ovo* (CAM) au fost utilizate pentru evaluarea preliminară a potențialului iritant și pentru aprecierea profilului de siguranță al formulării, în perspectiva unor aplicații topice viitoare.

- Rezultatele obținute susțin potențialul gelului proniozomal încărcat cu Puerarin ca platformă promițătoare pentru dezvoltarea unor sisteme moderne de livrare topică.

4.7. În domeniul biocatalizei, a fost demonstrată fezabilitatea sintezei unor esteri ai Puerarin-ului utilizând donori naturali de acil (acid hexanoic, acid octanoic și vinil laurat) în sisteme de reacție de tip esterificare și transesterificare, cu scopul îmbunătățirii solubilității și biodisponibilității sale.

- Rezultatele au evidențiat faptul că natura donorului de acil și tipul reacției influențează semnificativ conversia și randamentul de ester, confirmând importanța optimizării condițiilor de reacție.

- A fost realizată optimizarea reacțiilor utilizând lipaza B din *Candida antarctica* (CalB GF-IM) în formă imobilizată, confirmând eficiența acesteia în sinteza derivaților esterici ai Puerarin-ului.

- A fost realizată imobilizarea prin entrapare în matrici sol-gel a lipazei din *Pseudomonas stutzeri*, urmată de evaluarea performanței preparatelor obținute în reacția de transesterificare a Puerarin-ului cu vinil laurat.

- Au fost obținute și testate șase preparate enzimatiche prin entrapare în sol-gel, utilizând diferiți precursori silanici și lichide ionice în rapoarte molare variate, ceea ce a permis evaluarea influenței compoziției matricii asupra activității biocatalitice.

- Dintre preparatele investigate, 1PST și 2PST au prezentat cele mai bune performanțe, cu conversii > 50%, fiind identificate ca cele mai eficiente preparate enzimatiche obținute.

- Studiul de biocataliză confirmă faptul că modificarea enzimatică a Puerarin-ului reprezintă o direcție promițătoare pentru obținerea unor derivați cu potențial biofarmaceutic îmbunătățit, în acord cu principiile chimiei verzi.

5. Bibliografie selectivă

[1] G. A. Cordell, “Sixty Challenges – A 2030 Perspective on Natural Products and Medicines Security”, *Nat. Prod. Comm.*, vol. 12, no. 8, pp. 1371-1379, **2017**, doi:10.1177/1934578X1701200849.

[2] S. Daley, G. A. Cordell, “Natural Products, the Fourth Industrial Revolution, and the Quintuple Helix”, *Nat. Prod. Comm.*, vol. 16, no. 3, pp. 1-31, **2021**, doi:10.1177/1934578X211003029.

[3] S. Liga, C. Paul, F. Péter, “Flavonoids: Overview of Biosynthesis, Biological Activity, and Current Extraction Techniques”, *Plants*, vol. 12, no. 14, 2732, **2023**, <https://doi.org/10.3390/plants12142732>.

[4] S. Liga, C. Paul, E. A. Moacă, F. Péter, “Niosomes: Composition, Formulation Techniques, and Recent Progress as Delivery Systems in Cancer Therapy”, *Pharmaceutics*, vol. 16, no. 2, 223, **2024**, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16020223>.

[5] S. Liga, C. Paul, “Puerarin-A Promising Flavonoid: Biosynthesis, Extraction Methods, Analytical Techniques, and Biological Effects”, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 25, no. 10, 5222, **2024**, <https://doi.org/10.3390/ijms25105222>.

[6] S. Liga, C. Paul, “Flavonoid-Based Nanogels: A Comprehensive Overview”, *Gels*, vol. 11, no. 4, 267, **2025**, <https://doi.org/10.3390/gels11040267>.

[7] S. Liga, R. Vodă, L. Lupa, C. Paul, N. S. Nemeș, D. Muntean, Ș. Avram, M. Gherban, F. Péter, “Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Puerarin: Characterization, Antimicrobial Potential, Angiogenesis, and *In Ovo* Safety Profile Assessment”, *Pharmaceutics*, vol. 16, no. 11, 1464, **2024**, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16111464>.

[8] S. Liga, R. Vodă, L. Lupa, E.-A. Moacă, D. Muntean, L. Barbu-Tudoran, M. Suciuc, V. Socoliuc, F. Péter, “Synthesis of Ag₂O/Ag Nanoparticles Using Puerarin: Characterization, Cytotoxicity, *In Ovo* Safety Profile, Antioxidant, and Antimicrobial Potential Against Nosocomial Pathogens”, *J. Funct. Biomater.*, vol. 16, no. 7, 258, **2025**, <https://doi.org/10.3390/jfb16070258>.

[9] S. Liga, A. Tămaș, R. Vodă, G. Rusu, I. Bîțcan, V. Socoliuc, R. Pop, D. H. Ali, I.-A. Predescu, C. A. Dehelean, F. Péter, “Puerarin-Loaded Proniosomal Gel: Formulation, Characterization, *In Vitro* Antimelanoma Cytotoxic Potential, and *In Ovo* Irritation Assessment”, *Gels*, vol. 12, no. 1, 72, **2026**, <https://doi.org/10.3390/gels12010072>.