

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA**

**ȘCOALA DOCTORALĂ**



**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**CONTRIBUȚII LA STUDIUL PREPARĂRII UNOR  
COMPLECȘI DE INCLUZIUNE CAPSAICINĂ-  
CICLODEXTRINĂ ȘI INCLUDEREA ÎN FORME  
FARMACEUTICE SEMISOLIDE**

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:  
PROF. UNIV. DR. JOHNY NEAMȚU**

**STUDENT-DOCTORAND:  
COSTINESCU (CIULU-COSTINESCU) FELICIA**

**CRAIOVA  
2015**

---

## **CUPRINS**

### **ABREVIERI**

### **INTRODUCERE**

### **PARTEA GENERALĂ**

### **CAPITOLUL 1. STUDIUL LITERATURII DE SPECIALITATE**

#### **1.1. PREPARATE FARMACEUTICE SEMISOLIDE**

##### **1.1.1. Clasificarea unguentelor**

##### **1.1.2. Tincturi**

##### **1.1.3. Tegumentul - cale de administrare a preparatelor farmaceutice semisolide**

#### **1.2. CAPSAICINA**

##### **1.2.1. Capsaicina-principiul activ din ardei. Descriere:**

##### **1.2.2. Capsaicina, analogi ai capsaicinei. Proprietăți fizice, chimice, solubilitate**

##### **1.2.3. Toxicitatea și proprietăți farmacologice**

##### **1.2.4. Mecanismul de acțiune al capsaicinei**

##### **1.2.5. Domeniile de aplicabilitate**

#### **1.3. CICLODEXTRINE**

##### **1.3.1. Generalități**

### **CONTRIBUȚII ORIGINALE**

### **CAPITOLUL 2. STUDII PRELIMINARII ALE SPECIEI CAPSICUM ANNUUM**

#### **2.1 GENERALITĂȚI**

##### **2.1.1. Materiale și metode**

##### **2.1.2. Rezultate și discuții**

#### **2.2. DETERMINAREA POLIFENOLILOR DIN EXTRACTELE SPECIEI CAPSICUM ANNUUM ȘI EVALUAREA INVITRO A ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE**

##### **2.2.1. GENERALITĂȚI**

##### **2.2.2. MATERIALE ȘI METODE**

##### **2.2.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII**

---

## 2.3. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE ȘI CITOTOXICE A EXTRACTELOR ALCOOLICE

### 2.3.1. Materiale și metode

### 2.3.2. Rezultate și discuții

## **CAPITOLUL 3. DETERMINAREA CAPSAICINEI DIN CAPSICUM ANNUUM PRIN METODA HPLC**

### 3.1. GENERALITĂȚI

### 3.2. MATERIALE ȘI METODE

### 3.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

## **CAPITOLUL 4. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA UNUI COMPLEX $\alpha$ -CICLODEXTRINĂ-CAPSAICINĂ**

### 4.1. SINTEZA COMPLEXULUI CAPSAICINĂ- $\alpha$ -CICLODEXTRINĂ ÎN FAZĂ LICHIDĂ

#### 4.1.1. Materiale și metode

### 4.2. CARACTERIZAREA FT-IR A COMPLEXULUI

#### 4.2.1. Materiale și metode

#### 4.2.2. Rezultate

### 4.3. CARACTERIZAREA PRIN SPECTROMETRIE UV-VIS ȘI PRIN SPECTROMETRIE DE FLUORESCENȚA A COMPLEXULUI

#### 4.3.1. Materiale și metode

#### 4.3.2. Rezultate și discuții

### 4.4. DETERMINAREA CAPSAICINEI DIN COMPLEXUL CAPSAICINĂ- $\alpha$ -CICLODEXTRINĂ PRIN HPLC

#### 4.4.1. Materiale și metode

#### 4.4.2. Rezultate și discuții

## **CAPITOLUL 5. APLICAȚII FARMACEUTICE ALE COMPLEXULUI $\alpha$ -CD/CAPSAICINĂ**

### 5.1. ÎNCORPORAREA CAPSAICINEI ÎN UNGUENT SIMPLU

### 5.2. STUDII DE CEDARE IN VITRO A PRINCIPIULUI ACTIV

#### 5.2.1. Celula de difuzie

#### 5.2.2. Determinarea disponibilității in vitro a capsaicinei din formulările farmaceutice

### 5.3. TESTE REOLOGICE

---

5.3.1. Generalități

5.3.2. Materiale și metode.

5.3.3. Rezultate și discuții

## **6. CONCLUZII GENERALE. PERSPECTIVE VIITOARE DE CERCETARE**

### **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

- **Cuvinte cheie:** *Complecși incluziune, capsaicina,  $\alpha$ -ciclodextrina, unguente;*

---

## ABREVIERI

<b>DPPH</b>	radicalul 1,1-difenil-2 picrilhidrazil
<b>SRO</b>	specii reactive de oxigen
<b>IC<sub>50</sub></b>	concentrație ce provoacă inhibiția cu 50% a unui parametru dat
<b>GC-MS</b>	cromatografie de gaz cuplată cu spectrometrie de masă
<b>FT-IR</b>	spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier
<b>HPLC</b>	cromatografie de lichide de înalta performanță
<b>DAD</b>	detector cu arie de diode
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>UFC</b>	unități formatoare de colonii
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CMI</b>	concentrație minimă inhibitorie
<b>OMS</b>	Organizația Mondială a Sănătății
<b>F.R. X</b>	Farmacopeea Română ediția a X-a
<b>α, β, γ – CD</b>	α, β, γ – Ciclodextrine
<b>C</b>	Capsaicina
<b>UV-VIS</b>	Spectrofotometrie ultraviolet-vizibil
<b>PEG</b>	Polietilenglicoli
<b>H, L</b>	Hidrofilic, Lipofilic
<b>CMC</b>	Carboximetilceluloză
<b>MC</b>	Metilceluloză
<b>APV</b>	Alcool polivinilic
<b>DHC</b>	Dihidrocapsaicină
<b>NDHC</b>	Nordihidrocapsaicină
<b>HDHC</b>	Homodihidrocapsaicină
<b>TRPV</b>	Receptorul tranzitoriu potențial vaniloid
<b>DL<sub>50</sub></b>	Doza letala medie
<b>Rpm</b>	rotații pe minut

---

<b>2-HP<math>\beta</math>CD</b>	2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrină
<b>MS</b>	Spectrometrie de masă
<b>GAE</b>	Echivalenți acid galic
<b>QE</b>	Echivalenți quercitină
<b>TEAC</b>	Echivalenți trolox

## **INTRODUCERE**

### **CONSIDERAȚII GENERALE**

Capsaicina este un principiu activ natural, componenta majoră pungentă din speciile aparținând genului *Capsicum* (Fam. Solanaceae).

Capsaicina s-a dovedit a avea o multitudine de efecte farmacologice, fiind utilizată în studii recente publicate în literatură ca agent antineoplazic<sup>1</sup> pe mai multe tipuri de linii celulare inițiate din diferite tipuri de tumori precum cancerul de sân<sup>2</sup>, carcinomul de colon<sup>3</sup>, nazofaringeal<sup>4</sup>, cancerul gastric și pancreatic<sup>5</sup>.

Un inconvenient al utilizării acestei substanțe este reprezentat de slaba solubilitate care reduce biodisponibilitatea acestuia în organismul uman.

Pe de altă parte, se cunoaște faptul că ciclodextrinele sunt substanțe chimice cu masă moleculară mare care formează complecși de incluziune cu diverse medicamente, ajutând astfel la cedarea mai ușoară a medicamentului respectiv. Aceste CD reprezintă agenți transportori hidrofilii la exteriori cu o cavitate nepolară care furnizează o matrice hidrofobă la interior.

În literatura de specialitate există numeroase studii de sinteza de complecși de tipul medicament/ $\beta$ -ciclodextrină. Studiile cu  $\alpha$ -CD sunt însă destul de limitate, ca și cele cu  $\gamma$ -CD care sunt mai puțin accesibile ca și costuri.

## **OBIECTIVE PROPUSE**

### **Motivația alegerii temei**

Pentru această teză a fost aleasă capsaicina ca principiu activ și  $\alpha$ -CD din considerentele mai sus menționate în vederea sintetizării unui complex în fază lichidă capsaicină/ $\alpha$ -CD care să fie ulterior inclus în formulări farmaceutice semisolide.

---

Un alt argument care a stat la baza alegerii acestui produs a fost răspândirea speciei *Capsicum annuum*, specie care stă la baza obținerii capsaicinei naturale pe teritoriul țării noastre precum și accesibilitatea acesteia.

În vederea obținerii unor rezultate cât mai bune s-a realizat un studiu multidisciplinar (analiza instrumentală, tehnologie farmaceutică, biochimie, farmacognozie, microbiologie, biologie celulară), fiind aplicată în mai multe metodologii care au condus la elaborarea unei forme farmaceutice având ca principiu activ capsaicina.

Metodologia de cercetare a cuprins:

1. Analiza calitativă și cantitativă a compoziției în capsaicina a *Capsicum Annuum*.
2. Stabilirea părților anatomice ale ardeiului cu conținut maxim de capsaicina.
3. Punerea la punct a unor metode de concentrare și extragere a capsaicinei din materialul biologic cu maximum de randament.
4. Analiza spectrală a principalelor componente implicate în procesul de cercetare: capsaicina, alfa-ciclodextrina, complexul acestora.
5. Stabilirea prin metode fizico-chimice de analiză a raportului de combinare și a condițiilor cele mai facile pentru obținerea unei cantități cât mai mari de complex.
6. Stabilirea principalelor componente auxiliare folosite pentru aplicarea acestora sub formă de unguent.
7. Urmărirea posibilităților de interacționare a combinației complexe cu baza de unguent și crearea condițiilor optime pentru folosirea acestui unguent pentru scopul propus.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

### CAPITOLUL 1. STUDIUL LITERATURII DE SPECIALITATE

**Capitolul 1** cuprinde un studiu bibliografic al literaturii de specialitate în care sunt descrise preparatele farmaceutice semisolide. Conform FR. X unguentele sunt preparate farmaceutice semisolide destinate aplicării pe piele sau pe mucoase, în scop terapeutic sau de protecție; sunt constituite din excipienți (baze de unguent) în care se pot încorpora substanțele active<sup>6</sup>. Tot aici, în subcapitolul 1.2 este descrisă capsaicina ca principiu activ cu numeroase proprietăți farmacologice. Ultimul subcapitol (1.3) este dedicat studiului literaturii de specialitate în ceea ce privește utilizarea  $\alpha$ -ciclodextrinelor în formulări de medicamente.

---

## CAPITOLUL 2. STUDII PRELIMINARII ALE SPECIEI CAPSICUM ANNUUM

În acest capitol s-a realizat efectuarea unor studii preliminare asupra speciei *Capsicum annum*. Astfel, s-a determinat procentul de apă, materie uscată și cenușă din pulberea plantei. Analiza FT-IR efectuată a confirmat prezența unor clase importante de metaboliți secundari care au fost ulterior identificați prin GC-MS. Dintre compușii identificați, un număr important s-a dovedit a avea proprietăți farmaceutice, incluzând capsaicina.

Subcapitolul 2.2. este dedicat exclusiv determinării profilului polifenolic al extractelor ultrasonicate de *Capsicum annum* prin HPLC. Utilizând o metodă simplă de cuantificare, s-a reușit dozarea a unsprezece acizi derivați de la acidul hidroxicinamic și cinci flavonoide. S-a constatat prezența în concentrație relativ crescută comparativ cu alte specii a acidului elagic în toate probele analizate. Încadrul aceluiași subcapitol s-a efectuat și un studiu paralel prin care s-a determinat totalul polifenolic (Metoda Folin-Ciocalteu), totalul flavonoidic și activitatea antioxidantă. Rezultatele acestui studiu au relevat faptul că extractele alcoolice de *Capsicum annum* prezintă proprietăți antioxidante semnificative, cea mai mare activitate antioxidantă fiind obținută pentru extractul de ardei verde (723.795 mg/L GAE, 3.315 mg/L echivalenți trolox și 327.394 mg/L QE). În plus, activitatea antibacteriană a extractelor testate a fost semnificativ mai mare în comparație cu standardul capsaicină utilizat ca martor pozitiv față de *Enterococcus faecalis*, *E. coli* și *Bacillus subtilis*, acestea având activitate similară cu capsaicina pentru tulpina *Staphylococcus aureus*. Rezultatele testelor *in vitro* de citotoxicitate au arătat că extractele testate au o bună biocompatibilitate și nu au modificat morfologia celulelor HACAT. Luată împreună, aceste proprietăți biologice indică faptul că aceste extracte pot fi utilizate în diferite aplicații biomedicale, ca agenți anti-reumatici, antiinflamatori și antimicrobieni.

## CAPITOLUL 3. DETERMINAREA CAPSAICINEI DIN CAPSICUM ANNUUM PRIN METODA HPLC

**Capitolul 3** În capitolul 3 a fost realizat un studiu prin care două varietăți de *Capsicum annum* L. au fost analizate în ceea ce privește conținutul lor în capsaicină utilizând o metodă simplă RP-HPLC. Extracția capsaicinei a fost accelerată prin ultrasonicare. Cel mai mare conținut a fost găsit în ardeiul verde uscat (85,262 mg/L), urmat de ardeiul roșu uscat de la care au fost îndepărtate semințele și nervurile (75,457 mg /L).

## CAPITOLUL 4. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA UNUI COMPLEX $\alpha$ -CICLODEXTRINĂ-CAPSAICINA

**Capitolul 4** cuprinde sinteza unui complex de incluziune alfa ciclodextrină-capsaicină, pentru care atât ecuația de fitare obținută prin spectrofotometrie UV-Vis cât și prin fluorescență a arătat un raport de complexare de 1:1. Determinarea HPLC a confirmat atât calitativ cât și cantitativ prezența capsaicinei în complex, obținându-se un randament bun de încorporare a acesteia.



---

## CAPITOLUL 5. APLICAȚII FARMACEUTICE ALE COMPLEXULUI $\alpha$ -CD/CAPSAICINĂ

În **capitolul 5** s-a constatat că pe o durată de 6 h, are loc o cedare a principiului activ inclus în transportor cu 59%, formularea complexului de incluziune ajutînd la mărirea cantității de capsaicină care difuzează prin membrană<sup>7</sup>. Procentul poate fi ajustat prin modificarea tipului de membrană utilizată, propunându-ne o astfel de abordare în următoarele studii.

În subcapitolul 5.3 s-au realizat teste reologice asupra bazei de unguent în care a fost inclusă capsaicina simplă și asupra bazei de unguent în care a fost inclus complexul capsaicina- $\alpha$ -CD. La valori ale vitezei de forfecare de peste 240 s<sup>-1</sup> capsaicina din unguentul A/U a produs o îndepărtare de proprietăți de tixotrop ale bazei de unguent. Același lucru se poate constata și la viteze de forfecare sub 240 s<sup>-1</sup> dar de data aceasta în sens invers. Pe baza acestor concluzii putem afirma că unguentul A/U are o mai mare stabilitate.

### BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

---

<sup>1</sup>Govindarajan VS, Sathyanarayana MN: Capsicum— production, technology, chemistry, and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition, and metabolism; structure, pungency, pain, and desensitization sequences. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1991, 29:435–474.

<sup>2</sup>Chou CC, Wu YC, Wang YF, Chou MJ, Kuo SJ, Chen DR: Capsaicin-induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through caspase-independent pathway. *Oncol Rep* 2009, 21:665–671.

<sup>3</sup>Kim CS, Park WH, Park JY, Kang JH, Kim MO, Kawada T, Yoo H, Han IS, Yu R: Capsaicin, a spicy component of hot pepper, induces apoptosis by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in HT-29 human colon cancer cells. *J Med Food* 2004, 7:267–273.

<sup>4</sup>Lu HF, Chen YL, Yang JS, Yang YY, Liu JY, Hsu SC, Lai KC, Chung JG: Antitumor activity of capsaicin on human colon cancer cells in vitro and Colo 205 tumor xenografts in vivo. *J Agric Food Chem* 2010, 58:12999–13005.

<sup>5</sup>Zhang R, Humphreys I, Sahu RP, Shi Y, Srivastava SK: In vitro and in vivo induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. *Apoptosis* 2008, 13:1465–1

<sup>6</sup>Iuliana Popovici, Dumitru Lupuleasa, Lacramioara Ochiuz – Dicționar Farmaceutic- Ediția a III-a, editura Polirom 2014, p.745-746.

<sup>7</sup>Claude B., Morin Ph., Lafosse M., Andre P. Evaluation of apparent formation constants of pentacyclic triterpene acids complexes with derivatized beta- and gamma-cyclodextrins by reversed phase liquid chromatography. *J. Chrom. A.* 1049:37-42, 2004.