

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
DOMENIUL DE DOCTORAT FARMACIE**

***APLICABILITATEA EXTRACTELOR NATURALE ÎN  
PREVENIREA ȘI TRATAREA XEROZEI  
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT***

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. GÎRD CERASELA-ELENA**

**Student-doctorand:**

**FARM. BICU (GHICA) ADELINA**

**2024**

## Cuprins

Lista cu lucrările științifice publicate.....	I
LISTA CU ABREVIERI.....	II
INTRODUCERE.....	V
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	1
1. DATE TEORETICE PRIVIND ȚESUTUL CUTANAT SĂNĂTOS ȘI XEROTIC.....	1
1.1. Dinamica structurală și funcțională a epidermului.....	1
1.2. Funcțiile epidermului.....	4
1.3. Elementele esențiale în menținerea hidratării la nivelul stratului cornos (SC).....	8
1.4. Particularitățile și factorii declanșatori ai xerozei ( <i>xerosis cutis</i> ).....	10
1.5. Modificările fiziologice și simptomatologia xerozei.....	12
1.6. Strategii în prevenirea și tratarea xerozei.....	14
2. IDENTIFICAREA SURSELOR NATURALE CU APLICABILITATE ÎN XEROZĂ ȘI A CRITERIILOR DE FORMULARE ESENȚIALE ÎN PREVENIREA ȘI TRATAREA SIMPTOMATOLOGIEI.....	16
2.1. Acțiunea terapeutică a unor produse vegetale cu valență în abordarea xerozei – Studiu de literatură.....	16
2.1.1. <i>Betula alba</i> var. <i>pendula</i> Roth.....	17
2.1.2. <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.....	18
2.1.3. <i>Avena sativa</i> L.....	20
2.2. Abordarea terapeutică și criteriile de selectare a formelor farmaceutice cu aplicare topică.....	21
2.2.1. Abordarea stadială a xerozei.....	21
2.2.2. Selectarea ingredientelor și a formelor farmaceutice cu administrare topică.....	23
CONTRIBUȚII PERSONALE.....	26
3. OBȚINEREA EXTRACTELOR VEGETALE ȘI STABILIREA NORMEI DE CALITATE.....	26
3.1. Obținerea soluțiilor extractive hidroalcoolice.....	26
3.2. Obținerea extractelor uscate prin metoda liofilizării.....	28
3.3. Determinarea conținutului în principii active.....	30
3.3.1. Determinarea conținutului total de flavone din extractele vegetale uscate.....	30

3.3.2.	Determinarea conținutului total de polifenoli din extractele vegetale uscate.....	31
3.3.3.	Determinarea conținutului de acizi fenolcarboxilici din extractele vegetale uscate.....	32
3.3.4.	Concluzii privind determinarea conținutului în principii active.....	33
4.	CARACTERIZAREA CROMATOGRAFICĂ ȘI SPECTROMETRICĂ A EXTRACTELOR VEGETALE USCATE.....	35
4.1.	Analiza extractelor uscate prin cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS).....	35
4.1.1.	Metoda de derivatizare.....	35
4.1.2.	Metoda de determinare a acizilor grași.....	38
4.1.3.	Metoda de determinare a compușilor volatili.....	39
4.1.4.	Concluzii privind identificarea compușilor prin cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS).....	40
4.2.	Analiza extractelor uscate prin cromatografia în strat subțire de înaltă performanță (HPTLC).....	41
4.2.1.	Metoda HPTLC de identificare și determinare semi-cantitativă a compușilor bioactivi din extractele vegetale uscate.....	41
4.2.1.1.	Metoda de determinare a polifenolilor și flavonelor.....	41
4.2.1.2.	Metoda de determinare a triterpenelor și saponozidelor.....	44
4.2.2.	Concluzii privind identificarea și cuantificarea semi-cantitativă a compușilor prin cromatografia în strat subțire de înaltă performanță (HPTLC).....	47
4.3.	Analiza extractelor uscate prin spectrometria de masă de înaltă rezoluție de tip Ion – Cyclotron – Resonance cu transformată Fourier (FT-ICR-MS).....	47
4.3.1.	Identificarea compușilor din extractele vegetale uscate prin metoda FT-ICR-MS.....	47
4.3.2.	Concluzii privind identificarea compușilor prin spectrometria de înaltă rezoluție de tip Ion – Cyclotron – Resonance cu transformată Fourier (FT-ICR-MS).....	52
4.4.	Analiza extractelor uscate prin spectrometria infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR).....	52
4.4.1.	Metoda de identificare FT-IR.....	52
4.4.2.	Concluzii privind identificarea compușilor prin spectrometria de infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR).....	56

5. EVALUAREA TOXICITĂȚII EXTRACTELOR VEGETALE USCATE PRIN METODE <i>IN VITRO</i> ȘI <i>IN VIVO</i> .....	57
5.1. Evaluarea <i>in vitro</i> a citotoxicității extractelor uscate asupra liniei celulare standardizate de keratinocite umane normale (HaCaT).....	57
5.1.1. Testarea citotoxicității celulare – Test LDH.....	57
5.1.1.1. Materiale și metodă.....	57
5.1.1.2. Rezultate și discuții.....	59
5.1.2. Testarea capacității proliferative – Test MTS.....	62
5.1.2.1. Materiale și metodă.....	62
5.1.2.2. Rezultate și discuții.....	64
5.1.3. Concluzii privind evaluarea <i>in vitro</i> a citotoxicității extractelor uscate.....	66
5.2. Evaluarea <i>in vivo</i> a citotoxicității extractelor uscate pe specii de <i>Daphnia</i> .....	66
5.2.1. Testarea toxicității acute pe specii de <i>Daphnia</i> .....	67
5.2.1.1. Materiale și metodă.....	67
5.2.1.2. Rezultate și discuții.....	68
5.2.2. Testarea potențialului teratogen pe embrioni de <i>Daphnia magna</i> .....	69
5.2.2.1. Materiale și metodă.....	69
5.2.2.2. Rezultate și discuții.....	70
5.2.3. Concluzii privind evaluarea <i>in vivo</i> a citotoxicității extractelor uscate.....	71
6. DETERMINAREA ACȚIUNII ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> ȘI STUDII DE DOCKING MOLECULAR.....	72
6.1. Determinarea acțiunii antioxidante <i>in vitro</i> .....	73
6.1.1. Capacitatea de scavenger a extractelor uscate asupra radicalului DPPH.....	73
6.1.2. Capacitatea de scavenger a extractelor asupra radicalului ABTS* <sup>+</sup> .....	75
6.1.3. Determinarea capacității extractelor de reducere a fierului (metoda FRAP).....	77
6.1.4. Rezultate și discuții.....	78
6.1.5. Prelucrarea statistică a rezultatelor.....	79
6.1.5.1. Metoda statistică.....	79
6.1.5.2. Efectuarea procedurilor statistice pentru compararea activității antioxidante între mai multe grupuri de extracte vegetale.....	80
6.1.5.3. Diagrame box plot pentru activitatea antioxidantă.....	81
6.1.5.4. Analiza corelației și Harta relațiilor.....	82

6.1.6. Concluzii privind determinarea <i>in vitro</i> a acțiunii antioxidante a extractelor uscate.....	84
6.2. Determinarea acțiunii antioxidante <i>in vitro</i> pe linia celulară standardizată de keratinocite umane normale (HaCaT).....	85
6.2.1. Metoda de determinare a capacității totale antioxidante pe HaCaT.....	85
6.2.2. Rezultate și discuții.....	87
6.2.3. Concluzii privind determinarea <i>in vitro</i> a capacității antioxidante totale a extractelor pe linia celulară standardizată de keratinocite umane normale.....	88
6.3. Studii de andocare moleculară.....	88
6.3.1. Introducere.....	88
6.3.2. Metodologia modelării moleculare.....	90
6.3.3. Rezultatele procesului de validare a protocoalelor de andocare.....	91
6.3.4. Rezultatele modelării moleculare prin andocare.....	92
6.3.5. Concluzii privind studiile de andocare moleculară.....	96
7. EVALUAREA <i>IN VITRO</i> A IMPACTULUI EXTRACTELOR USCATE ASUPRA RATEI DE MIGRARE CELULARĂ ÎN CADRUL PROCESULUI DE REEPITELIZARE.....	98
7.1. Testarea efectului stimulator asupra migrării celulare pe linia celulară standardizată de keratinocite umane normale (HaCaT).....	99
7.2. Rezultate și Discuții.....	100
7.3. Concluzii privind evaluarea <i>in vitro</i> a impactului extractelor uscate asupra ratei de migrare celulară.....	104
8. ANALIZA STATISTICĂ A CORELAȚIILOR DINTRE PRINCIPIILE ACTIVE DOZATE - CITOTOXICITATEA <i>IN VITRO</i> ȘI <i>IN VIVO</i> - EFICACITATEA <i>IN VITRO</i> .....	105
9. FORMULAREA UNOR PRODUSE TOPICE SEMISOLIDE FOLOSIND EXTRACTELE USCATE.....	108
9.1. Ingredientele active și funcționale selectate pentru managementul xerozei.....	108
9.2. Formularea produselor semisolide particularizat la stadiul xerozei.....	112
9.3. Caracterizarea produselor topice semisolide.....	116
9.3.1. Caracteristici organoleptice.....	116
9.3.2. Determinarea pH-ului.....	116
9.3.3. Determinarea vâscozității.....	117

9.3.4. Determinarea capacității de întindere.....	119
9.4. Concluziile privind procesele de formare și de caracterizare.....	120
Concluzii finale și contribuții personale.....	121
BIBLIOGRAFIE.....	125
ANEXE.....	146

## INTRODUCERE

Țesutul cutanat reprezintă bariera care protejează organismul de factorii externi, fiind implicat în menținerea homeostaziei, în termoreglare, fotoprotecție și în apărarea împotriva microorganismelor și a substanțele chimice dăunătoare, fiind, totodată, și prima linie de apărare imunologică. Conținutul apei la nivelul cutanat prezintă un rol crucial, afectând proprietățile fizice și mecanice ale stratului cornos și activitatea enzimatică implicată în procesul de proliferare și diferențiere a keratinocitelor, precum și în descuamarea normală a corneocitelor. Deteriorarea funcției de barieră a țesutului cutanat reprezintă, în esență, alterarea integrității stratului cornos, cu perturbări morfologice și funcționale importante, având drept rezultat instalarea xerozei. Xeroza reprezintă una dintre cele mai frecvente afecțiuni observate de dermatologi și de medicii generalişti în practica clinică de rutină. Reprezintă un factor psiho-social cu impact marcant și, totodată, reprezintă un factor de risc pentru dezvoltarea dermatitei atopice sau alergice, precum și a altor boli de piele. Epidemiologic, cercetările au evidențiat o prevalență la nivel mondial cuprinsă între 29% și 85%, cu precădere la persoanele de peste 60 de ani și, în particular, asociat și cu alte afecțiuni medicale preexistente sau ca urmare a unor tratamente cu anumite medicamente. Abordarea terapeutică a cazurilor severe de xeroză implică un tratament combinat, o asociere a produselor hidratante cu cele care conțin antibiotice, antihistaminice și corticosteroizi, pentru refacerea homeostaziei cutanate. Cu toate acestea însă, majoritatea tratamentelor medicamentoase prezintă o limitare la administrarea topică, cum este cazul antiinflamatoarelor, care pe termen lung scad procentul de collagen, determinând atrofia pielii. Datorită acestor riscuri, moleculele naturale din plante rămân subiecte actuale pentru noi cercetări. Extractele din produsele vegetale aduc un aport benefic pe termen lung în prevenirea și tratarea patologiilor cutanate, inclusiv a xerozei, prin dezvoltarea unor efecte antioxidante, antiinflamatorii, antimicrobiene, hidratante, cicatrizante, fotoprotectoare, etc., dar și prin capacitatea de modulare a funcțiilor pielii, în vederea corectării dezechilibrelor. Obiectivul principal al terapiilor actuale este adaptarea tratamentului la anomaliile distincte care se manifestă prin simptomele general recunoscute, clasificate în cele patru stadii de xeroză: ușoară (cu tendință de uscăciune), moderată (cu uscăciune ușoară), severă (cu uscăciune moderată) și foarte severă (cu uscăciune severă, inflamație).

În contextul prezentat, scopul acestei lucrări este formularea a trei produse semisolide topice destinate abordării personalizate a stadiilor xerozei – ușor, moderat și sever, având la bază fitocomplexe din produse vegetale cu potențial terapeutic, încorporate în matrici obținute din ingrediente atent selectate, non-iritante, compatibile cu pielea, în vederea prevenirii și

tratării simptomatologiei caracteristice, prin corectarea deficitelor hidro-lipidice existente și a perturbărilor apărute în procesele fiziologice de la nivelul pielii.

Obiectivele cercetării sunt: identificarea unor produse vegetale cu aplicabilitate în prevenirea și tratarea xerozei, ca surse de fitocompuși activi cu acțiune relevantă pentru patologia țintă (antioxidantă, antiinflamatoare, antimicrobiană, regeneratoare), precum și stabilirea metodologiei de extracție, în vederea obținerii unor soluții extractive cu o compoziție complexă și diversificată, înnobilate în principii active de interes terapeutic; obținerea extractelor vegetale uscate prin procese de concentrare și uscare optimizate și caracterizarea acestora prin realizarea unui screening fitochimic, în vederea identificării și cuantificării compușilor bioactivi constituenți, prin analize spectrofotometrice, cromatografice (GC-MS, HPTLC) și spectrometrice (FT-ICR-MS și FT-IR); definirea profilului citotoxic al extractelor prin metode *in vitro* (testarea citotoxicității celulare și a capacității proliferative pe linia celulară standardizată de keratinocite umane normale (HaCaT) – celule reprezentative ale epidermului, componenta țesutului cutanat afectată în xeroză) și *in vivo* (testarea toxicității acute pe specii de *Daphnia* și a potențialului teratogen pe embrioni de *Daphnia magna*); evaluarea *in vitro* a efectului antiradicalic al extractelor (metode DPPH, ABTS, FRAP) și a capacității antioxidante totale (TAC) pe linia celulară standardizată de keratinocite umane normale (HaCaT), precum și evaluarea capacității de modulare de către fitocompușii celor trei extracte studiate a sistemelor naturale intrinseci implicate în apărarea antioxidantă cutanată, prin studii de andocare moleculară; evidențierea *in vitro* a impactului extractelor asupra ratei de migrare celulară din cadrul procesului de reepitelizare, precum și a potențialului antiinflamator, prin efectuarea unui „scratch test” pe culturi de keratinocite cultivate în condiții normale (fără stimulare), cât și în condiții de mimare a inflamației nespecifice (stimulare cu factorul de necroză tumorală – TNF- $\alpha$ ), asociat cu stresul oxidativ (stimulare cu phorbol myristate acetate – PMA); stabilirea direcției terapeutice a extractelor privind abordarea personalizată a stadiilor xerozei, coroborat cu fitocomplexul identificat și eficacitatea *in vitro* dovedită; selectarea ingredientelor necesare obținerii preparatelor semisolide topice, în vederea susținerii sinergice a efectelor extractelor; și formularea și caracterizarea a trei tipuri de produse semisolide topice, destinate prevenirii și tratării xerozei, în stadiile ușor, moderat și sever.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

### 1. Date teoretice privind țesutul cutanat sănătos și xerotic

Capitolul 1 cuprinde informații privind dinamica structurală și funcțională a epidermului, funcțiile acestuia, cu evidențierea funcției de barieră cutanată și a elementelor esențiale în menținerea hidratării



la nivelul stratului cornos, particularitățile și factorii declanșatori ai xerozei, precum și modificările fiziologice și simptomatologia acesteia, și a strategiilor necesare în prevenirea și tratarea xerozei.

## 2. Identificarea surselor naturale cu aplicabilitate în xeroză și a criteriilor de formulare esențiale în prevenirea și tratarea simptomatologiei

Capitolul 2 cuprinde date relevante din literatura de specialitate cu privire la fitocomplexele și efectele benefice imprimare la nivel cutanat de către trei produse vegetale de interes terapeutic (*Betulae cortex*, *Liquiritiae radix* și *Avenae herba*), precum și date esențiale privind abordarea terapeutică și criteriile de selectare a formelor farmaceutice cu aplicare topică, în vederea prevenirii și tratării simptomatologiei xerozei.

### CONTRIBUȚII PERSONALE

#### 3. Obținerea extractelor vegetale și stabilirea normei de calitate

Ca primă etapă în dezvoltarea unor produse topice cu aplicabilitate în managementul xerozei, s-a urmărit valorificarea produselor vegetale selectate prin obținerea unor extracte vegetale uscate înnobilate în principii active de interes terapeutic. Ca urmare, s-a optat pentru realizarea procesului de extracție în două etape, cu etanol 50% ca solvent de extracție, și pentru uscarea prin metoda liofilizării, cu avantajul conservării integrității structurale și funcționale pe termen lung a extractelor rezultate. În ceea ce privește metodologia de determinare a profilului fitochimic, s-a urmărit identificarea și cuantificarea compușilor constituenți, prin efectuarea unui screening fizico-chimic. Aplicând metode spectrofotometrice, s-au cuantificat flavonele, polifenolii totali și acizii fenolcarboxilici (Tabelul III.1).

Tabel III.1. Rezultatele dozărilor spectrofotometrice exprimate ca medie ± RSD [1]

Extract vegetal uscat	Concentrație flavone (g rutozidă/100g extract uscat)	Concentrație polifenoli totali (g acid tanic/100g extract uscat)	Concentrație acizi fenolcarboxilici (g acid clorogenic/100g extract uscat)
<i>Betulae extractum</i>	3.747 ± 0.3140	47.96 ± 9.7083	25.34 ± 1.6728
<i>Liquiritiae extractum</i>	3.44 ± 0.3037	9.31 ± 0.9913	Nedeterminat
<i>Avenae extractum</i>	1.95 ± 0.0526	40.55 ± 6.3715	Nedeterminat

Rezultatele analizelor cantitative spectrofotometrice au evidențiat faptul că *Betulae extractum* (BE) este caracterizat prin cea mai mare concentrație de principii active, prin comparație cu celelalte extracte, și este unicul extract pentru care s-au putut cuantifica acizii fenolcarboxilici (la celelalte extracte, reacția cu reactivul Arnou a fost negativă atât la concentrații mari, cât și la concentrații mici ale probei). Important de menționat este și faptul

că *Liquiritiae extractum* (LE) prezintă o cantitate aproximativ dublă de flavone față de *Avenae extractum* (AE), dar o cantitate de polifenoli totali de patru ori mai redusă. Decelarea acizilor fenolcarboxilici, a flavonelor și a polifenolilor totali în BE în concentrații semnificativ superioare celorlalte extracte vegetale luate în lucru poate explica potențialul efect antioxidant marcant imprimat de extractul de mesteacăn [1].

#### 4. Caracterizarea cromatografică și spectrometrică a extractelor vegetale uscate

În contextul caracterizării fizico-chimice a extractelor vegetale uscate, s-au selectat tehnici de determinare a compușilor bioactivi constituenți cu precizie înaltă – GC-MS, HPTLC, FT-ICR-MS și FT-IR. Asocierea metodelor cromatografice și spectrometrice a permis identificarea și/sau cuantificarea principiilor active constituențe, cât și confirmarea acestora, datorită preciziei înalte a unora dintre metodele aplicate. Caracterizarea extractelor uscate realizată prin GC-MS a evidențiat principalele clase de compuși prin metoda de derivatizare: 56 de compuși pentru BE – triterpene (51.96%), zaharide (30.25%), polioli (9.45%), compuși fenolici (4.16%), acizi grași (2.31%), acizi carboxilici (1.85%), și aminoacizi; 67 de compuși pentru LE – zaharide (83.13%), polioli (8.42%), aminoacizi și derivați (3.23%), compuși fenolici (2.39%), acizi carboxilici (1.90%) și acizi grași și, respectiv, 57 de compuși pentru AE – zaharide (69.82%), acizi carboxilici (21.99%), acizi grași (3.57%), polioli (2.20%), aminoacizi (1.78%), uree și acid glicolic. În ceea ce privește acizii grași, s-a aplicat o metodă cromatografică specifică de identificare, confirmând compușii regăsiți în urma derivatizării. Din punct de vedere cantitativ, s-a constatat faptul că AE prezintă un conținut mai mare de acizi linoleic și linolenic comparativ cu celelalte două extracte (0.19 g% acid linoleic și 0.92 g% acid linolenic), acești acizi grași având o contribuție importantă în xeroză. Metoda HPTLC a fost aplicată pentru identificarea și cuantificarea semi-cantitativă a flavonelor și polifenolilor, precum și a compușilor triterpenici și saponozidelor, clase de compuși de interes terapeutic. Astfel, în ceea ce privește polifenolii, pentru BE s-au cuantificat rutinul (6.67 μg/mL) și un amestec de polifenoli lipofili și taninuri (aprox. 3mg/mL, cuantificat pe baza standardului de acid clorogenic, frecvent utilizat pentru exprimarea conținutului de polifenoli), și s-a evidențiat prezența acidului cafeic și a acidului rozmarinic; pentru LE, s-au identificat și cuantificat rutinul și acidul cafeic (13.34 μg/mL și, respectiv, 26.67 μg/mL), dar s-a observat și prezența unui amestec de flavone cu lipofilie crescută și a izoflavonelor; în cazul AE, s-a cuantificat izoramnetin-3-rutinozida (20 μg/mL) și s-a observat prezența clorofilelor. În privința compușilor triterpenici, prin metoda HPTLC s-au identificat și cuantificat lupeolul și betulinul în BE (0.338 μg/mL și, respectiv, 0.813 μg/mL), dar s-a observat și prezența a doi compuși înrudiți cu aceștia; în timp ce pentru LE, s-au identificat 9 benzi atribuite unor triterpene și

saponozide, dar și prezența unor compuși fenolici cu polaritate scăzută. Rezultatele obținute în urma analizei FT-IR aplicată celor trei extracte studiate evidențiază, cu o probabilitate bună, o parte din componentele identificate deja anterior, în baza benzilor de amprentă vibrațională. Pornind de la datele din cercetările anterioare din literatura de specialitate, pentru BE s-a identificat prezența triterpenelor, dintre care s-au decelat acidul betulinic și betulinul; precum și prezența grupărilor specifice flavonoidelor. Pentru LE, s-a evidențiat prezența flavonoidelor, polizaharidelor și a glicozidelor, precum și a glicirizinei, glabridinului și a liquiritigeninei; în timp ce pentru AE, în spectrul FT-IR s-a identificat prezența beta-gluconului și a zaharidelor.

Considerată în prezent una dintre cele mai bune și sensibile tehnici MS, datorită puterii mari de rezoluție ( $> 10^6$ ), preciziei de masă (0.1 – 2 ppm) și a sensibilității crescute, apreciată ca fiind cea mai promițătoare tehnică analitică de identificare a componentelor moleculare individuale, metoda FT-ICR-MS a confirmat mare parte din compușii chimici de interes regăsiți prin celelalte metode: pentru extractul de mesteacăn – acid betulinic, acid oleanolic, acid ursolic, betulin, eritrodiol, betulinaldehidă, acid betulonic, lupeol, lupenonă, acid stearic, acid oleic, acid linoleic, betulozidă, acid cafeic, kaempferol, mio-inozitol; pentru extractul de lemn dulce – glicirizin, acid gliciretanic, liquiritigenină, izoliquiritigenină, glabridin, acid linoleic, acid palmitic, mio-inozitol; iar în cazul extractului de ovăz – avenacozida A, acid linolenic, acid oleic, acid palmitic, acid linoleic, tricină, vitexină, acid cafeic, acid ferulic, triptofan, mio-inozitol, acid citric, sucroză, D-manoză, D-gluconpiranoză, beta-glucon, kestoză. Acuratețea masei (ppm) înregistrată pentru compușii identificați a fost una foarte bună, cu valori cuprinse între 0.01 – 1.67, confirmând prezența lor cu o certitudine ridicată. Compușii identificați și cuantificați pentru extractele obținute indică o complexitate fitochimică, o înnobilitate în principii active de interes în patologia xerotică, în acord și cu literatura de specialitate.

##### **5. Evaluarea toxicității extractelor vegetale uscate prin metode *in vitro* și *in vivo***

Toxicitatea fitocomplexelor extractelor din plante poate fi dezvoltată prin mai multe mecanisme, precum ruperea membranei celulare (integritatea membranei fiind caracteristica cel mai frecvent utilizată), reacții enzimatică, interferența în sinteza proteinelor, legarea ireversibilă de receptorii celulari și afectarea procesului de formare a materialului genetic celular [2,3]. Deoarece nu toate substanțele/principiile active au același mecanism sau nivel de impact, evaluarea toxicității celulare prin mai multe modele experimentale, *in vitro* și *in vivo*, reprezintă o necesitate pentru a observa eventualele diferențe ale rezultatelor obținute în condiții distincte de cultură și testare. Ca urmare, screening-ul toxicologic reprezintă un indicator cheie, oferind informații valoroase în etapa de preformulare.

Evaluarea *in vitro* a citotoxicității extractelor s-a realizat pe linia celulară standardizată de keratinocite umane normale (HaCaT), relevantă patologiei țintă. În cadrul acestor analize, celulele au fost expuse la concentrații crescătoare ale produșilor de testat, pe o anumită perioadă de timp, în funcție de caracteristicile metabolice celulare. Prin corelarea celor doi parametri celulari (scăderea viabilității celulare și creșterea eliberării lactat dehidrogenazei, LDH) s-a putut cuantifica corect efectul unui compus/ produs asupra viabilității celulare. Concentrațiile luate în considerare pentru testele de citotoxicitate și de viabilitate celulară au fost situate în intervalul 12.5 – 50  $\mu\text{g/mL}$  pentru BE și LE, și 25 – 100  $\mu\text{g/mL}$  în cazul AE. Rezultatele obținute în urma analizelor au evidențiat faptul că *Betulae extractum* și *Liquiritiae extractum* prezintă un potențial citotoxic mai mare comparativ cu *Avenae extractum*. Totodată, s-a constatat un comportament doză – dependent, în special în cazul BE, pentru care gradul cel mai mare de afectare celulară a fost înregistrat la 50  $\mu\text{g/mL}$  și cel mai mic la 12.5  $\mu\text{g/mL}$ . Pentru LE, s-au obținut rezultate aproape similare la concentrațiile mai mari, de 25 și 50  $\mu\text{g/mL}$ , în timp ce cea mai scăzută toxicitate a fost semnalată la 12.5  $\mu\text{g/mL}$ . Spre deosebire de celelalte extracte uscate, în cazul AE nu a existat o relație doză – dependentă pentru cele trei concentrații testate (25, 50 și 100  $\mu\text{g/mL}$ ), valorile citotoxicităților fiind foarte apropiate. Cu toate acestea, efectul citotoxic a fost semnificativ în comparație cu controlul ( $p < 0.05$ ) pentru toate extractele, la toate concentrațiile testate. Analiza comparativă a valorilor rezultate sugerează o citotoxicitate mult mai mică în cazul AE, deoarece a indus modificări la o concentrație mai mare decât celelalte extracte analizate (BE și LE), care au fost active la doze mai mici.

Rezultatele testului de viabilitate (MTS) sunt într-o relație de inversă proporționalitate cu rezultatele testului de toxicitate celulară: cu cât citotoxicitatea este mai mică, cu atât capacitatea proliferativă este mai bună. Observațiile corelate cu prezența unui comportament doză – dependent rămân similare și pentru acest test. Determinarea viabilității celulare a evidențiat o capacitate proliferativă apreciabilă ilustrată pentru AE 50  $\mu\text{g/mL}$  și pentru BE și LE la concentrațiile de 12.5  $\mu\text{g/mL}$ . Viabilitatea celulară a keratinocitelor a fost afectată semnificativ doar de BE și LE, și doar la concentrațiile de 50  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.05$ ) [4].

Evaluarea *in vivo* a toxicității extractelor s-a realizat pe specii de *Daphnia*, frecvent utilizate pentru determinarea potențialului toxic al medicamentelor, extractelor vegetale, biocompușilor, și chiar al nanomaterialelor [5], datorită în principal sensibilității crescute a acestor specii la substanțele toxice, fiind utilizate de 40 de ani în ecotoxicologie și în studii de impact ca organisme standardizate de testare [5,6]. Astfel, pentru cele trei extracte uscate studiate au fost investigate toxicitatea acută pe două specii de *Daphnia* – *Daphnia magna* și *Daphnia pulex*, și potențialul teratogen printr-un embriotest pe *Daphnia magna*.

Curbele de letalitate obținute pentru extracte, trasate ca L% (letalitatea indusă ca exprimare procentuală) în funcție de concentrația logaritmică (Log [C]), sunt prezentate în Fig. 5.1. Rezultatele obținute în urma testelor de toxicitate pe speciile de *Daphnia* pentru cele trei extracte vegetale (BE, LE și AE) au arătat răspunsuri diferite pentru cele două specii folosite, din punctul de vedere al susceptibilității acestora la extracte, *Daphnia pulex* prezentând o sensibilitate mai crescută în comparație cu *Daphnia magna* (Tabel V.1.). Datele de letalitate au indicat că, în timp ce extractul de ovăz a prezentat o toxicitate relativ scăzută, extractele de lemn dulce și de mesteacăn au prezentat niveluri mai ridicate, în special la concentrațiile mai mari, sugerând prezența unor compuși bioactivi mai puternici în aceste două extracte.

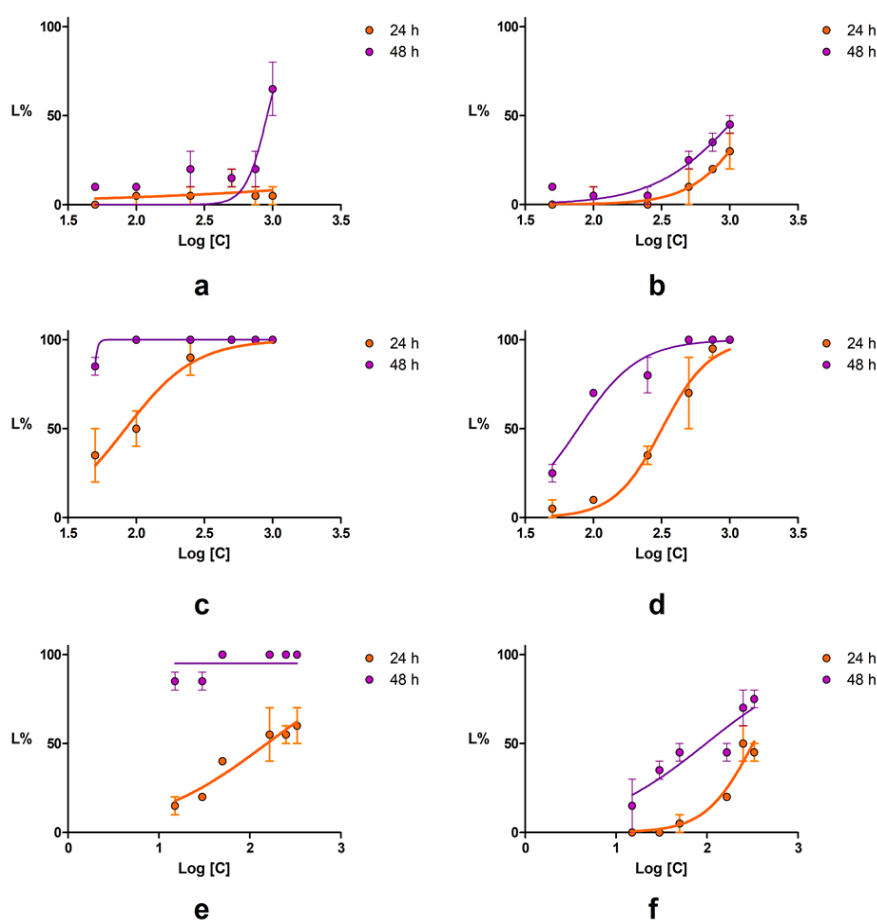


Fig. 5.1. Curbele de letalitate obținute după 24 și 48 de ore de expunere pentru *Daphnia magna* (a,c,e) și pentru *Daphnia pulex* (b,d,f) la cele trei extracte – AE (a,b); LE (c,d) și BE (e,f); barele de eroare reprezintă erorile standard ale celor două replicare (n=2)

Tabel V.1. Rezultatele letalității obținute în cadrul testului de toxicitate pe speciile de *Daphnia*

Specie de <i>Daphnia</i>	Tip de extract	LC50 (μg/mL)		IC95%	
		24 ore	48 ore	24 ore	48 ore
<i>Daphnia magna</i>	AE	1507	1152	906.3 – 2506	853.6 – 1555
	LE	318.5	77.47	254.5 – 398.6	63.31 – 94.80

	BE	321.2	97.58	252.0 – 409.5	57.83 – 164.60
<i>Daphnia pulex</i>	AE	NC*	NC*	NC*	NC*
	LE	83.74	47.15	63.06 – 111.2	NC**
	BE	154.1	NC**	96.28 – 246.7	NC**

NC\* - letalitate < 50%; NC\*\* - letalitate > 90%

În cazul testului pentru potențialul teratogen, rezultatele obținute prin tratarea embrionilor de *Daphnia magna* cu cele trei extracte au evidențiat lipsa teratogenității acestora la concentrațiile mai mici (15 μg/mL BE, 50 μg/mL LE și 50 μg/mL AE), precum și inhibarea completă a dezvoltării embrionare în cazul celor expuși la concentrația de 500 μg/mL AE, indicând un prag critic de toxicitate pentru acest extract (Fig. 5.2.). Rezultatele celor două tipuri de teste de toxicitate realizate pe speciile de *Daphnia* demonstrează că cele trei extracte vegetale studiate prezintă efecte toxice la concentrații mari, dar pot fi considerate sigure la concentrațiile mai mici.

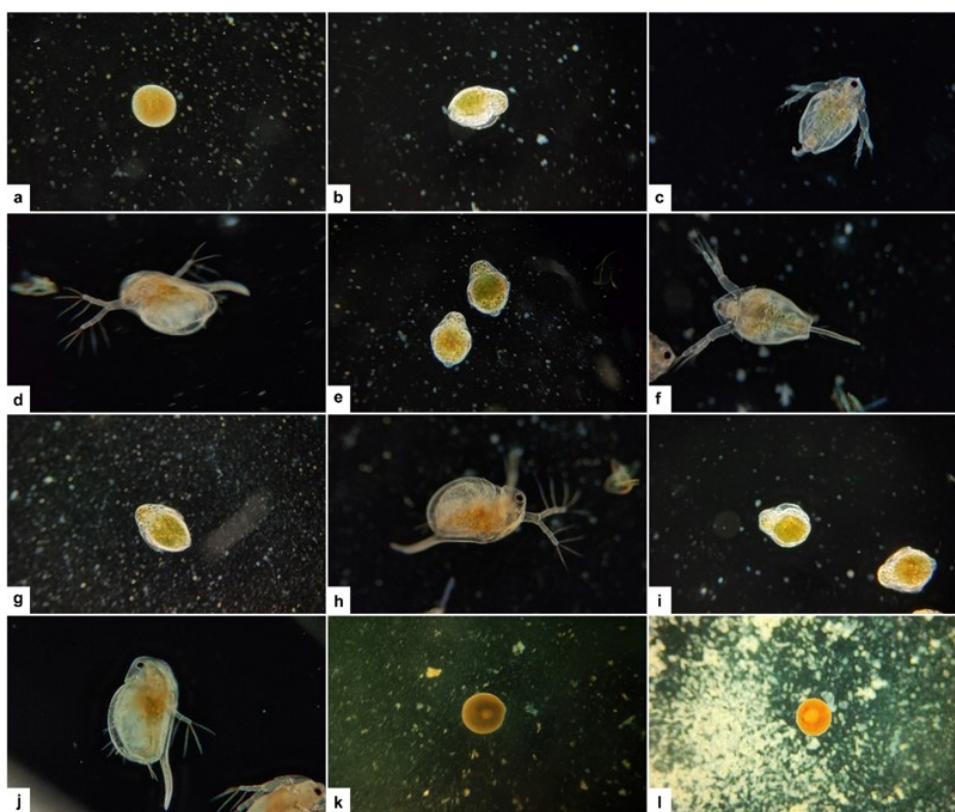


Fig. 5.2. Testul pe embrionii de *Daphnia magna*: a. – embrionii la 0 ore; b. – stadiu larvar intermediar netratat, la 24 ore; c,d. – dafnidă tânără netratată, la 48 de ore; e. – stadiu larvar intermediar tratat cu 50 μg/mL LE, la 24 ore; f. – dafnidă tânără tratată cu 50 μg/mL LE, la 48 ore; g. – stadiu larvar intermediar tratat cu 15 μg/mL BE, la 24 ore; h. – dafnidă tânără tratată cu 15 μg/mL BE, la 48 ore; i. – stadiu larvar intermediar tratat cu 50 μg/mL AE, la 24 ore; j. –

dafnidă tânără tratată cu 50 µg/mL AE, la 48 ore; k,l. – embrioni nedezvoltați tratați cu 500 µg/mL AE, la 24 și, respectiv, 48 ore

## 6. Determinarea acțiunii antioxidante *in vitro* și studii de docking molecular

Potențialul antioxidant al extractelelor studiate se află în strânsă corelație cu fitocomplexul identificat și cuantificat. Pentru evidențierea efectului antiradicalic, a capacității totale antioxidante și a potențialului de a modula activitatea sistemelor intrinseci implicate în protecția naturală antioxidantă cutanată, s-a realizat un screening prin aplicarea a trei metode: determinarea *in vitro* prin metode chimice standardizate (DPPH, ABTS, FRAP) și pe linia celulară standardizată de keratinocite umane normale (HaCaT), precum și studii de andocare moleculară (modelări *in silico*).

În urma evaluării *in vitro* a acțiunii antioxidante prin cele trei metode de determinare (DPPH, ABTS, FRAP), valorile IC<sub>50</sub> rezultate au permis compararea efectului antiradicalar al extractelor luate în lucru. Astfel, s-a constatat faptul că valoarea cea mai mică a IC<sub>50</sub> a fost obținută, prin toate metodele aplicate, în cazul extractului de mesteacăn (IC<sub>50</sub>DPPH = 0.0736 mg/mL; IC<sub>50</sub>ABTS = 0.0112 mg/mL; EC<sub>50</sub>FRAP = 0.0587 mg/mL). Această activitate se corelează pozitiv cu rezultatele determinării polifenolilor totali, BE având un conținut mai mare decât LE și AE. Pentru metoda ABTS, rezultatele obținute au indicat cinetici diferite de reacție pentru cele trei extracte uscate, precum și interdependența dintre profilul fitochimic și timpul de reacție a radicalilor liberi. BE a prezentat un timp de reacție foarte mare, mult mai mare decât a altor extracte de plante, anihilând speciile reactive de oxigen (SRO) într-un timp foarte scurt, chiar și la concentrații foarte mici. De asemenea, valoare IC<sub>50</sub> a extractului de mesteacăn a fost foarte apropiată de cea a standardul folosit ca referință (acid ascorbic – 0.0165 mg/mL) (Tabel VI.1.), subliniind o acțiune antioxidantă puternică. La polul opus, AE a prezentat activitatea antioxidantă cea mai slabă, în urma aplicării metodelor ABTS și DPPH, însă, după compararea rezultatelor obținute în cadrul metodei FRAP, LE a înregistrat cea mai mare valoare EC<sub>50</sub>, deci activitatea antiradicalică cea mai scăzută. Aceste diferențe care au apărut între extractele de lemn dulce și ovăz, în funcție de tipul metodei antioxidante aplicate, se pot datora absenței acizilor fenolcarboxilici care nu au fost decelați în niciunul dintre aceste două extracte uscate, ceea ce influențează capacitatea de anihilare a speciilor reactive libere. De asemenea, pentru AE a fost conturat un comportament antioxidant atipic, deoarece, deși compușii fenolici ar putea fi cele mai importante substanțe care contribuie marcant la exercitarea acțiunii antioxidante, cu toate acestea efectul antiradicalic poate fi conferit și de compușii bioactivi cu structură non-fenolică, substanțe care pot contribui considerabil la capacitatea totală donoare de electroni a extractului de ovăz. Astfel, efectul antioxidant protector al AE poate fi legat de

prezența substanțelor non-fenolice fibroase și în special de conținutul de  $\beta$ -glucani solubili. Prezența acestor compuși a justificat profilul antiradicalic aparte al AE, în care s-au reliefat diferențe mai mari între valorile  $IC_{50}$  determinate prin cele trei metode ( $IC_{50DPPH} = 1.1266$  mg/mL;  $IC_{50ABTS} = 0.0997$  mg/mL;  $EC_{50FRAP} = 0.1351$  mg/mL) [4].

Tabel VI.1. Valorile  $IC_{50}$  și  $EC_{50}$  obținute pentru cele 3 extracte uscate prin metodele DPPH, ABTS și FRAP

Extract vegetal	Metoda DPPH, $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Metoda ABTS, $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Metoda FRAP, $EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Betulae extractum</i> (BE)	73.6	11.2	58.7
<i>Liquiritiae extractum</i> (LE)	805.6	92.1	722.0
<i>Avenae extractum</i> (AE)	1122.6	99.7	135.1
Vitamin C (substanța de referință)	16.5	-	-

Prin construirea unei hărți a relațiilor (Fig. 6.1.), s-au putut stabili legăturile dintre cele trei metode antioxidante (ABTS, DPPH și FRAP) aplicate celor trei grupe de extracte vegetale (*Betulae extractum*, *Liquiritiae extractum* și *Avenae extractum*) și concentrația de compuși bioactivi (polifenoli totali, TP și flavone totale, FL). Rezultatul a evidențiat o simetrie a mărimii nodurilor pentru toate variabilele testate și o uniformitate a conexiunilor, ceea ce a sugerat existența unei relații puternice, confirmată prin utilizarea acestui instrument grafic.

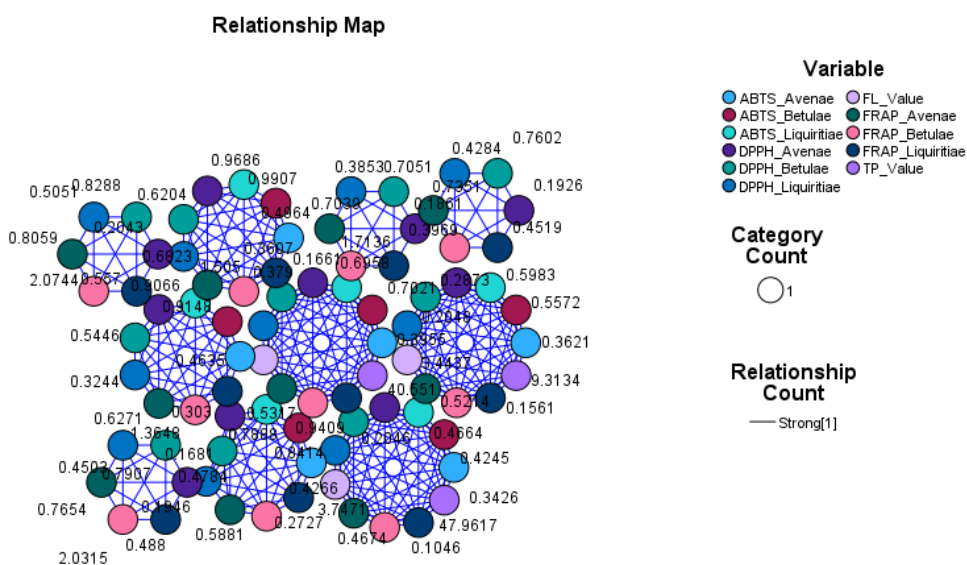


Fig. 6.1. Aspectul tip cerc al hărții relațiilor



Valorile coeficientului Pearson ( $r$ ) au fost negative în cazul corelării efectului antioxidant cu concentrația de principii active, ceea ce explică corelația inversă dintre date (cu cât cantitatea de principii active este mai mare, cu atât este mai mică valoarea  $IC_{50}$  a extractelor, astfel acțiunea antioxidantă fiind mai puternică). Conținutul total de polifenoli (TPC) se află în corelație directă cu activitatea antioxidantă a extractelor de plante, datele comparate (concentrația TPC vs. valoarea  $IC_{50}$ ) indicând o corelație foarte puternică în cazul tuturor metodelor de determinare a antioxidanților (ABTS, DPPH și FRAP) ( $|r|$  este între 0.900 și 1.000). Corelația Pearson între metodologiile utilizate în acest studiu (DPPH, ABTS și FRAP), pentru evaluarea acțiunii antioxidante în extractele analizate pentru fiecare set de perechi de date obținute prin diferite metode, a prezentat valori de peste 0.900, sugerând o corelație foarte puternică și semnificativă statistic ( $p = 0.0001$ ) între metodologiile aplicate experimental. Rezultatele corelației Pearson între metode ( $r > 0.900$ ), precum și coeficienții de determinare ( $R^2 > 0.900$ ), au subliniat o activitate antioxidantă foarte bine corelată a extractelor care prezintă valori independente și nu este influențată semnificativ de erorile metodologice [4].

Potențialul antioxidant al extractelor a fost demonstrat *in vitro* și pe linia celulară standardizată de keratinocite umane normale (HaCaT), metodă cu o relevanță mai mare din punct de vedere biologic comparativ cu testele chimice. În urma testării concentrațiilor stabilite ale extractelor, selectate în baza evaluărilor citotoxicității *in vitro* și *in vivo*, BE a reieșit având potențialul cel mai marcant, la concentrația de 25  $\mu\text{g/mL}$ , fiind urmat îndeaproape de LE (25  $\mu\text{g/mL}$ ) și, respectiv, de AE (50  $\mu\text{g/mL}$ ). Și pentru celelalte concentrații, activitatea antioxidantă este foarte bună, mai mari decât ale controlului (etanol). Rezultatele obținute sunt semnificative statistic ( $p < 0.05$ ) pentru concentrația 12.5  $\mu\text{g/mL}$  în cazul BE și LE, și pentru ambele concentrații testate (25  $\mu\text{g/mL}$  și 50  $\mu\text{g/mL}$ ) în cazul AE.

Experimentele de andocare moleculară au evidențiat faptul că mulți dintre fitocompușii identificați prin metodele de screening au potențialul de a acționa ca liganzi necovalenți la interfața de legare Keap1 – Nrf2, astfel cele trei extracte vegetale uscate analizate posedând un potențial mare de a exercita efecte antioxidante și antiinflamatorii *in vivo*, prin calea de semnalizare Nrf2 [4]. Au fost analizate mai multe triterpenoide pentaciclice, cum ar fi betululinul, betulinaldehida, acidul betulinic, acidul betulonic, lupeolul, lupenona, acidul oleanolic și acidul ursolic. Dintre acești compuși, acidul ursolic a arătat cel mai bun potențial de legare față de domeniul Kelch al proteinei Keap1. Glicirizina și agliconul său, acidul gliciretinic, au evidențiat cea mai mare afinitate de legare pentru domeniul Kelch al Keap1, formând cel mai mare număr de interacțiuni polare cu reziduurile de la situsul de legare. De asemenea, și acidul cinamic a prezentat o afinitate de legare foarte bună și a format cinci interacțiuni electrostatice. În cazul

liquiritigeninei, rezultatele au prezentat o conformație potențială de legare în domeniul Kelch al Keap1, cu posibilitatea de a perturba interacțiunea Keap1 – Nrf2 și de a promova translocația nucleară a Nrf2. Prin simulările de andocare moleculară, s-a observat că izoliquiritigenina formează, de asemenea, multe interacțiuni favorabile necovalente cu buzunarul de legare, precum și că acidului clorogenic se leagă la Cys151 într-o manieră similară, cu o energie de legare satisfăcătoare. Studiile de andocare au dat rezultate interesante și pentru kaempferol (flavonol), vitexină (flavonă tip apigenin-glucozidă) și tricină (flavonă O-metilată).

## **7. Evaluarea *in vitro* a impactului extractelor uscate asupra ratei de migrare celulară în cadrul procesului de reepitelizare**

Testul *in vitro* de migrare celulară tip scratch (“scratch test”) reprezintă o metodă valoroasă în evaluarea procesului de restructurare a pielii în studiile preclinice, contribuind la o înțelegere mai bună a mecanismelor prin care are loc reglarea procesului de migrare celulară, cât și la obținerea unor rezultate preliminare cu privire la efectele produse asupra migrării în diferite condiții experimentale, cum ar fi expunerea la diferite substanțe active, extracte din plante, etc. [13,14]. Modelul experimental aplicat liniei celulare standardizate de keratinocite umane normale (HaCaT) a cuprins două serii de celule: 1). o serie de celule *nestimulate*, menținute în cultură, în prezența extractelor testate, timp de 24 ore; 2). o serie de celule *stimulate inflamator și oxidativ* prin adăugarea a 15 ng/mL de factor de necroză tumorală (Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ )) și a 0.1  $\mu$ M Phorbol myristate acetate (PMA), cu mimarea inflamației nespecifice și a stresului oxidativ, menținute în cultură în prezența extractelor testate timp de 24 ore. Au fost urmăriți parametri importanți în vindecarea rănilor – a fost calculată lățimea rănii (lățimea medie a zonei fără celule în unitatea de timp -  $\mu$ m), utilizată ulterior în estimarea confluenței rănii (procentul din zona inițială a rănii acoperită de celulele migratoare în timp - %) și a ratei maxime de vindecare a rănilor -  $\mu$ m<sup>2</sup>/h.

Rezultatele obținute în cadrul studiilor de migrare celulară *in vitro* realizate susțin și confirmă eficacitatea acestor extracte vegetale, în special a extractului de mesteacăn (Fig. 7.1.) în procesul de reepitelizare, evidențiind totodată și un potențial efect antiinflamator, prin creșterea ratei de migrare celulară în condiții de inflamație nespecifică indusă, asociată cu stres oxidativ. Dintre concentrațiile testate pentru cele trei extracte selectate, cu o contribuție potențială în stimularea migrării celulare, și implicit, în dezvoltarea efectului reepitelizant, prin (1) menținerea homeostaziei matricei extracelulare epidermice, (2) restaurarea matricei extracelulare, (3) creșterea semnificativă a ratei de vindecare a rănilor, s-au evidențiat: *Betulae extractum* 3  $\mu$ g/mL, *Liquiritiae extractum* 7.5  $\mu$ g/mL și *Avenae extractum* 7.5  $\mu$ g/mL [4].

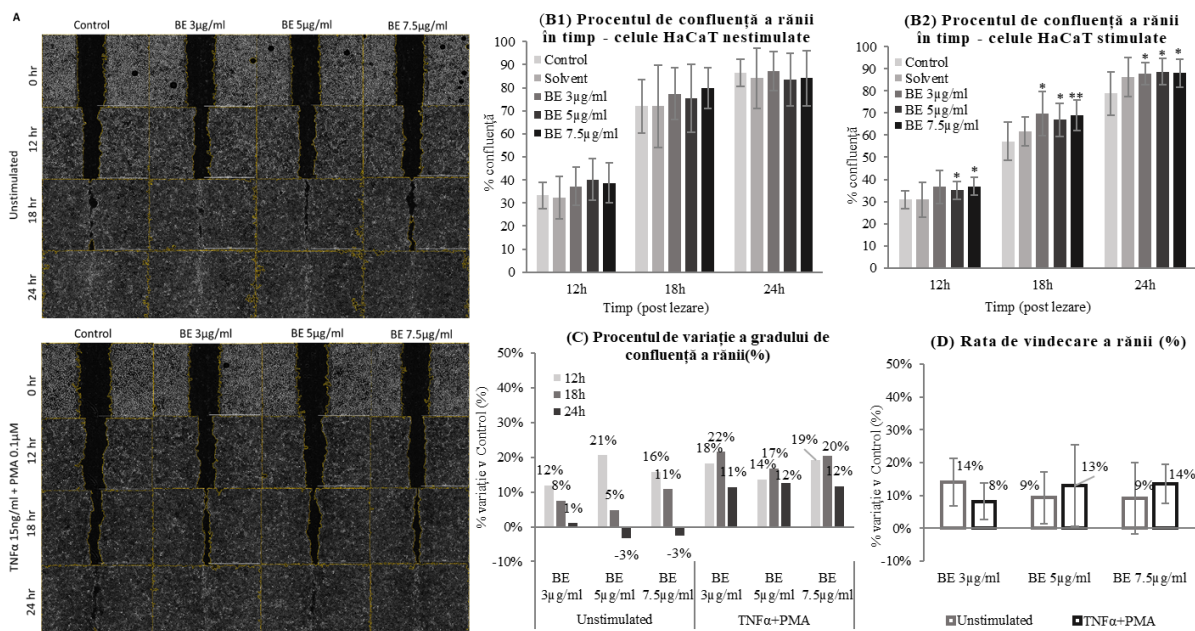


Fig. 7.1. Imagini reprezentative din testul *in vitro* de vindecare a rănilor, ilustrând migrarea celulelor în situsul răni (zona marcată); achiziția imaginilor s-a realizat timp de 24 de ore utilizând obiectivul de magnificare 4x în modul Bright-field high-contrast (scală = 1000 µm). Evaluarea procesului de vindecare a rănilor în prezența extractului uscat de mesteacăn, utilizând analiza celulară bazată pe imagini: evoluția gradului de confluență a răniilor după 12h, 18h, respectiv, 24h, pentru celulele tratate nestimulate (B1) și stimulate proinflamator cu 15 ng/mL TNF- $\alpha$  și 0.1 µM PMA (B2); Calcularea procentului de variație pentru gradul de confluență a răniilor (C) și rata de vindecare a răniilor (D). Toate valorile numerice sunt reprezentate ca medie (n=3)  $\pm$  deviația standard (SD); (\* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01)

## 8. Analiza statistică a corelațiilor dintre principiile active dozate – citotoxicitatea *in vitro* și *in vivo* – eficacitatea *in vitro*

În vederea înțelegerii aprofundate a conexiunilor dintre rezultatele obținute la dozările principiilor active prin metode spectrofotometrice cu cele rezultate în urma evaluării citotoxicității *in vitro* și *in vivo* și cu efectele cuantificate prin testele *in vitro* de migrare celulară și de determinare a activității antioxidante, s-au aplicat analize statistice de corelare. Analiza Componentelor Principale (PCA) a evidențiat corelațiile dintre variabile, în timp ce hărțile de corelații au permis sublinierea diferențelor dintre toate cele trei extracte studiate, în ceea ce privește compușii bioactivi și proprietățile farmacologice. Toate rezultatele statistice semnificative obținute pentru corelațiile dintre constituenții bioactivi și potențialul farmacologic al tuturor celor trei extracte (clusterelor ierarhice și analiza hărții corelațiilor) validează posibila relevanță clinică a determinărilor realizate. Comparabilitatea bună a testelor ar putea fi explicată prin mecanismul de acțiune al extractelor de plante analizate, care poate

duce la o reepitelizare eficientă și o capacitate proliferativă a celulelor pielii deteriorate ca urmare a efectului antioxidant puternic la nivel celular, cu rol protector.

## **9. Formularea unor produse topice semisolide folosind extractele uscate**

În vederea susținerii sinergice a eficacității extractelor uscate studiate, au fost selectate o serie de ingrediente active (glicerină, niacinamidă, uree, ceramide NP, vitamina E, dimeticonă, ceară de albine, squalen din ulei de măsline) și funcționale (copolimer acriloidimetil-laurat de amoniu/VP, gumă xantan, emulgatori, trigliceride, etilhexilglicerină), bazat și pe compatibilitatea lor cu pielea. Pornind de la simptomatologia descrisă pentru fiecare stadiu al xerozei și de la mecanismele necesare tratării acestora, s-au selectat trei tipuri de formulări: gel pentru tendință de uscăciune cutanată (fază incipientă), cremă-gel pentru un grad redus de uscăciune cutanată (fază moderată) și cremă pentru un grad moderat de uscăciune cutanată (fază severă). Ținând cont de fitocomplexul identificat și cuantificat, de potența lor demonstrată *in vitro*, de citotoxicitățile *in vitro* și *in vivo* obținute, precum și de modalitatea recomandată de administrare, s-au stabilit concentrațiile, precum și direcția terapeutică: extractul uscat obținut din herba de ovăz – gel hidratant, pentru tendința de uscăciune cutanată, în concentrație de 5% soluție 0.3 mg/mL; extractul uscat obținut din rădăcină de lemn dulce – cremă-gel hidratantă și emolientă, pentru grad redus de uscăciune cutanată, în concentrație de 3% soluție 0.5 mg/mL; extractul uscat obținut din scoarță de mesteacăn – cremă hidratantă, emolientă și reparatoare, pentru grad moderat de uscăciune cutanată, în concentrație de 2% soluție 0.3 mg/mL. Extractul de mesteacăn poate fi benefic și în cazurile foarte severe de xeroză, ca adjuvant al terapiei cu antiinflamatoare topice.

Caracterizarea produselor topice semisolide dezvoltate a evidențiat obținerea unor preparate stabile, omogene, cu proprietăți organoleptice corespunzătoare, în concordanță cu cerințele de calitate indicate în literatura de specialitate. Din punct de vedere al comportamentului reologic, preparatele prezintă o vâscozitate redusă, asigurând o capacitate de întindere foarte bună, permițând astfel facilitarea aplicării, fără agresarea suplimentară a țesutului cutanat – caracteristică importantă pentru produsele destinate prevenirii și tratării xerozei. Îmbinarea extractelor uscate studiate cu ingrediente active atent selectate, personalizat în funcție de modificările fiziologice caracteristice stadiului xerozei țintă, a permis dezvoltarea unor formule complexe, capabile să suplinească deficitele existente la nivelul epidermului, precum și să stimuleze mecanismele intrinseci de refacere a homeostaziei cutanate.

## CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

### Concluzii Generale

Cercetările efectuate în cadrul tezei de doctorat au avut drept scop identificarea unor produse vegetale cu potențial în prevenirea și tratarea xerozei, caracterizarea fizico-chimică și farmaco-toxicologică a extractelor obținute din acestea, precum și dezvoltarea a trei produse topice destinate tratării personalizate a xerozei, în funcție de severitatea simptomatologiei.

- ❖ Pe baza datelor din literatura de specialitate, au fost introduse în studiu trei produse vegetale – *Betulae cortex*, *Liquiritiae radix* și *Avenae herba* (recoltată înainte de înflorire), pentru care au fost descrise efecte benefice în tratarea afecțiunilor dermatologice, inclusiv a xerozei.
- ❖ În vederea obținerii unor extracte vegetale îmbogățite în principii active, în particular polifenoli, compuși triterpenici, acizi grași, zaharide (compuși de interes în xeroză), s-a optat pentru etanol 50% ca solvent de extracție, acesta permițând extracția atât a compusilor hidrofilii, cât și lipofili.
- ❖ Pentru extractele vegetale uscate, obținute în urma aplicării proceselor optimizate de concentrare și de uscare prin liofilizare, s-a efectuat un screening fitochimic prin aplicarea unor analize spectrofotometrice, cromatografice și spectrometrice, pentru determinarea calitativă și cantitativă a fitocomplexelor. Întrucât fiecare metodă de analiză prezintă limitări de detecție, este mult mai utilă aplicarea unui ansamblu de tehnici, în vederea confirmării și validării prezenței compușilor constituenți.
- ❖ Determinările cantitative spectrofotometrice pentru flavone, polifenoli totali și acizi fenolcarboxilici, au evidențiat o concentrație mai mare în cazul mesteacănului, justificând astfel potența sa terapeutică mai mare, comparativ cu celelalte două extracte vegetale uscate. În ceea ce privește conținutul de acizi fenolcarboxilici, acesta a fost determinat doar în cazul extractului de mesteacăn (pentru celelalte extracte, reacția cu reactivul Arnou a fost negativă, atât la concentrații mari, cât și la concentrații mici ale probei).
- ❖ Analiza cromatografică de gaze cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS) a evidențiat diversitatea fitocomplexelor obținute, prin intermediul metodei de derivatizare identificându-se un total de 56 de compuși în cazul extractului de mesteacăn (în principal triterpene, zaharide, compuși fenolici, acizi grași), 67 de compuși în cazul extractului de lemn dulce (în principal zaharide, aminoacizi, acizi fenolici, acizi grași) și, respectiv, 57 de compuși în cazul extractului de ovăz (în principal zaharide, acizi carboxilici, acizi grași, aminoacizi, uree). Acizii grași, identificați în cele trei extracte vegetale prin metoda de derivatizare, au fost confirmați și în urma aplicării metodei de determinare a acizilor grași (GC-MS). Din punct de vedere cantitativ,

extractul de ovăz se evidențiază printr-un conținut mai bogat, atât în acid linoleic, cât și în acid linolenic, compuși de interes terapeutic.

- ❖ Cromatografia în strat subțire (HPTLC) a permis identificarea și cuantificarea semi-cantitativă a polifenolilor și a triterpenelor din cele trei extracte uscate studiate: pentru extractul de mesteacăn - cuantificare rutin și amestec de polifenoli lipofili și taninuri (bandă albastru intens, cu  $R_f = 0.991$ ), și identificare acizi cafeic și rozmarinic; pentru extractul de lemn dulce - cuantificare rutin și acid cafeic, și identificare amestec de flavone cu lipofilie crescută și izoflavone (banda portocaliu intens, cu  $R_f > 0.99$ ); în cazul extractului de ovăz - cuantificare izoramnetin-3-rutinozidă și identificare clorofile (banda puternic roșie). În ceea ce privește compușii triterpenici, prin metoda HPTLC s-au identificat și cuantificat lupeolul și betulinul în extractul de mesteacăn, dar s-a observat și prezența a doi compuși înrudiți cu betulinul sau lupeolul; pentru extractul de lemn dulce, s-au identificat saponozide și triterpene, dar și compuși fenolici cu polaritate scăzută.
- ❖ Rezultatele obținute cu ajutorul analizei FT-ICR-MS (spectrometrie de masă de înaltă rezoluție de tip Ion – Cyclotron – Resonance cu Transformata Fourier) au confirmat prezența unui număr mare de principii active în compoziția celor trei extracte uscate studiate, validând rezultatele obținute prin analiza GC-MS: pentru *Betulae extractum* – triterpene (betulin, acid betulinic, lupeol, lupenonă, acid oleanolic, acid ursolic, eritrodiol), acizi grași (acid stearic, acid oleic, acid linoleic), polifenoli (acid cafeic, kaempferol) și mio-inozitol; pentru *Liquiritiae extractum* – triterpene (glicirizină, acid gliciretanic), polifenoli (liquiritigenină, izoliquiritigenină, glabridin), acizi grași (acid palmitic, acid linoleic); pentru *Avenae extractum* – avenacozida A, acizi grași (acid linoleic, acid linolenic, acid oleic, acid palmitic), flavone (tricină, vitexină), polifenoli (acid cafeic, acid ferulic), aminoacizi (triptofan), zaharide.
- ❖ Analiza FT-IR a evidențiat o parte din componentele identificate prin analizele GC-MS și FT-ICR-MS, datorită benzilor de amprentă vibrațională prezente în spectrul caracteristic: pentru extractul de mesteacăn s-a putut identifica prezența triterpenelor, dintre care s-au decelat acidul betulinic și betulinul, și prezența grupărilor specifice flavonoidelor; pentru extractul de lemn dulce, s-a evidențiat prezența flavonoidelor, polizaharidelor și a glicozidelor, și s-au putut decela glicirizina, glabridinul și liquiritigenina; iar pentru extractul de ovăz, spectrul FT-IR a identificat prezența beta-gluconului și a zaharidelor.
- ❖ Evaluarea citotoxicității extractelor vegetale uscate s-a realizat *in vitro*, pe linia celulară standardizată de keratinocite umane normale (HaCaT), relevantă pentru patologia xerotică, și *in vivo*, pe modelele *Daphnia magna* și *Daphnia pulex*. Testele LDH și MTS, realizate pe HaCaT, au demonstrat faptul că la concentrații mai mari (intervalul 25 – 100 μg/mL) extractele

de mesteacăn și de lemn dulce au prezentat efecte toxice celulare mai pronunțate, în timp ce extractul de ovăz a prezentat un efect ușor citotoxic. Însă, în cazul concentrațiilor mai mici ( $< 12.5 \mu\text{g/mL}$  pentru mesteacăn și lemn dulce, și  $< 50 \mu\text{g/mL}$  pentru ovăz), rezultatele au evidențiat un impact negativ minim asupra keratinocitelor, extractele vegetale putând fi considerate sigure. În ceea ce privește evaluarea toxicității *in vivo*, cele două tipuri de teste de toxicitate pe specii de *Daphnia* (toxicitate acută și potențial teratogen) au demonstrat, similar testelor efectuate pe HaCaT, că cele trei extracte vegetale studiate prezintă efecte toxice la concentrații mari, dar pot fi considerate sigure la concentrațiile mai mici ( $12.5 \mu\text{g/mL}$  pentru extractele uscate de mesteacăn și de lemn dulce,  $50 \mu\text{g/mL}$  pentru extractul uscat de ovăz).

- ❖ Acțiunea antioxidantă a celor trei extracte vegetale uscate a fost evaluată prin metode *in vitro* chimice (DPPH, ABTS și FRAP) și pe linie celulară standardizată de keratinocite umane normale (HaCaT), precum și prin studii *in silico*. Asocierea acestor trei tipuri de determinări a permis evidențierea eficienței antiradicalice, a capacității antioxidante totale, precum și a capacității de modulare a activității sistemelor intrinseci implicate în protecția naturală antioxidantă cutanată a celor trei extracte studiate – calea de semnalizare Nrf2. Rezultatele obținute au demonstrat efecte antioxidante bune, în directă corelație cu fitocomplexele identificate, capacitatea antioxidantă cea mai mare fiind atribuită extractului de mesteacăn și cea mai slabă, extractului de ovăz.
- ❖ Rezultatele obținute în cadrul studiilor de migrare celulară *in vitro* realizate pe linia celulară standardizată de keratinocite umane normale (HaCaT) susțin și confirmă eficacitatea acestor extracte vegetale în procesul de reepitelizare, evidențiind totodată și un potențial efect antiinflamator, prin creșterea ratei de migrare celulară în condiții induse de inflamație nespecifică (factor de necroză tumorală, TNF- $\alpha$ ), asociate și cu stres oxidativ (Phorbol myristate acetate, PMA).
- ❖ Ținând cont de fitocomplexul identificat și cuantificat, de potența demonstrată *in vitro*, de citotoxicitățile *in vitro* și *in vivo* obținute, s-a stabilit direcția terapeutică a extractelor uscate studiate: extractul uscat obținut din herba de ovăz – tendința de uscăciune cutanată (xeroză ușoară); extractul uscat obținut din rădăcină de lemn dulce – grad redus de uscăciune cutanată (xeroză moderată); extractul uscat obținut din scoarță de mesteacăn – grad moderat de uscăciune cutanată (xeroză severă). *Betulae extractum* poate fi benefic și în cazurile foarte severe de xeroză, ca adjuvant al terapiei cu antiinflamatoare topice.
- ❖ Pornind de la simptomatologia descrisă pentru fiecare stadiu al xerozei și de la mecanismele necesare tratării acestora, s-au selectat trei tipuri de formulări - gel pentru tendință de uscăciune,

cremă-gel pentru un grad redus de uscăciune și cremă pentru un grad moderat de uscăciune cutanată.

- ❖ Caracterizarea produselor topice semisolide dezvoltate a evidențiat obținerea unor preparate stabile, omogene, cu proprietăți organoleptice corespunzătoare, cu o capacitate de etalare foarte bună, permițând astfel facilitarea aplicării, fără agresarea suplimentară a țesutului cutanat – caracteristică importantă pentru produsele destinate prevenirii și tratării xerozei.
- ❖ Îmbinarea extractelor uscate studiate cu ingrediente active atent selectate, personalizat în funcție de modificările fiziologice caracteristice stadiului xerozei țintă, a permis dezvoltarea unor formule complexe, capabile să suplinească deficiențele existente la nivelul epidermului, precum și să stimuleze mecanismele intrinseci de refacere a homeostaziei cutanate.

### **Gradul de Originalitate**

Elementele de originalitate ale prezentei teze constau în: evidențierea potențialului extractului obținut din părțile aeriene de ovăz, recoltate înainte de înflorire, în patologia xerotică, în baza compoziției bogată în zaharide, aminoacizi și acizi grași, cu utilitate în corectarea dezechilibrelor la nivel cutanat, dar și în baza acțiunii bune antioxidante, importantă în refacerea barierei cutanate; evidențierea *in vitro* a capacității de stimulare a migrării celulare (pe keratinocite) a celor trei extracte uscate, cu impact important în procesul de reepitelizare; evidențierea potențialului antiinflamator a extractelor uscate, prin creșterea ratei de migrare celulară în condiții de inflamație nespecifică indusă (prin stimulare cu TNF- $\alpha$ ), asociată cu stres oxidativ (prin stimulare cu PMA); abordarea terapeutică particularizată a gradelor de xeroză, prin dezvoltarea a trei produse topice personalizate din punct de vedere al compoziției, în strânsă legătură cu mecanismele necesare tratării gradului de afectare și, în consecință, a simptomatologiei.

### **Perspective de Cercetare**

În continuarea cercetării, ne propunem realizarea unor studii de stabilitate, în condiții accelerate și pe termen lung, pentru cele trei extracte uscate și pentru cele trei produse topice dezvoltate, studii *in vitro* de eliberare din bază a principiilor active, studii de determinare a compatibilității cutanate, precum și studii de evidențiere a eficacității clinice, pe voluntari sănătoși, cu aplicarea unor tehnici de testare a impactului produselor topice asupra hidratării SC (corneometrie), integrității SC (TEWL), proprietăților elastice ale pielii (cutometrie), eritemului (mexametrie), determinarea valorilor pH-ului cutanat (pH-metrie) și a influenței asupra microreliefului cutanat – rugozitate, descumare (visioscan).



## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1] Ghica A., Drumea V., Moroșan A., Mihaiescu D.E., Costea L., Luță E.A., Mihai D.P., Balaci D.T., Fița A.C., Olaru O.T., et al. Phytochemical Screening and Antioxidant Potential of Selected Extracts from *Betula alba* var. *pendula* Roth., *Glycyrrhiza glabra* L., and *Avena sativa* L. *Plants*, 12(13): 2510, 2023, <https://doi.org/10.3390/plants12132510>;
- [2] Aslantürk Ö.S. *In Vitro* Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, *Intechopen, E-book Genotoxicity*, 2018, doi: 10.5772/intechopen.71923;
- [3] Gavanji S., Bakhtari A., Famurewa A.C., Othman E.M. Cytotoxic Activity of Herbal Medicines as Assessed *in Vitro*: A Review, *Chem. Biodiversity*, 20: e202201098, 2023, doi:10.1002/cbdv.202201098;
- [4] Ghica A., Tănase M.L., Niculițe C.M., Tocilă A., Popescu L., Luță E.A., Olaru O.T., Popovici V., Balaci T.D., Duțu L.E., et al. *In Vitro* Toxicity Evaluation of Some Plant Extracts and Their Potential Application in *Xerosis cutis*. *Cosmetics*, 11(4):124, 2024, <https://doi.org/10.3390/cosmetics11040124>
- [5] Reilly K., Ellis L.-J., Davoudi H.H., Supian S., Maia M.T., Silva G.H., Guo Z., Martinez D.S., Lynch I. *Daphnia* as a model organism to probe biological responses to nanomaterials – from individual to population effects via adverse outcome pathways, *Front Toxicol*, 5: 1178482, 2023, doi: 10.3389/ftox.2023.1178482;
- [6] Teplova V.V., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Sineva E.V., Solonin A.S. Quick assessment of cytotoxins effect on *Daphnia magna* using *in vivo* fluorescence microscopy, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(6): 1345-1348, 2010, <https://doi.org/10.1002/etc.169>;
- [7] Jaffri J. Reactive Oxygen Species and Antioxidant System in Selected Skin Disorders. *Malays J Med Sci.*, 30(1): 7-20, 2023, doi: 10.21315/mjms2023.30.1.2;
- [8] Pedro A.C., Paniz O.G., Fernandes I.D.A.A., Bortolini D.G., Rubio F.T.V., Haminiuk C.W.I., Maciel G.M., Magalhães W.L.E. The Importance of Antioxidant Biomaterials in Human Health and Technological Innovation: A Review. *Antioxidants*, 11(9): 1644, 2022, <https://doi.org/10.3390/antiox11091644>;
- [9] Heckmann M., Stadlbauer V., Drotarova I., Gramatte T., Feichtinger M., Arnaut V., Atzmüller S., Schwarzinger B., Röhrl C., Blank-Landeshammer B., et al. Identification of Oxidative-Stress-Reducing Plant Extracts from a Novel Extract Library—Comparative Analysis of Cell-Free and Cell-Based *In Vitro* Assays to Quantitate Antioxidant Activity. *Antioxidants*, 13(3): 297, 2024, <https://doi.org/10.3390/antiox13030297>;
- [10] Huang L., Zhu L., Ou Z., Ma C., Kong L., Huang Y., Chen Y., Zhao H., Wen L., Wu J., et al. Betulinic acid protects against renal damage by attenuation of oxidative stress and inflammation via Nrf2 signaling pathway in T-2 toxin-induced mice. *Int. Immunopharmacol.*, 101(Pt B): 108210, 2021, doi: 10.1016/j.intimp.2021.108210;
- [11] Huang S., Mo C., Zeng T., Lai Y., Zhou C., Xie S., Chen L., Wang Y., Chen Y., Huang S., et al. Lupeol ameliorates LPS/D-GalN induced acute hepatic damage by suppressing inflammation and oxidative stress through TGFβ1-Nrf2 signal pathway. *Aging*, 13(5): 6592–6605, 2021, doi: 10.18632/aging.202409;
- [12] Reisman S.A., Aleksunes L.M., Klaassen C.D. Oleanolic acid activates Nrf2 and protects from acetaminophen hepatotoxicity via Nrf2-dependent and Nrf2-independent processes. *Biochem. Pharmacol.*, 77(7): 1273–1282, 2009, doi: 10.1016/j.bcp.2008.12.028;
- [13] Fronza M., Heinzmann B., Hamburger M., Laufer S., Merfort I. Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 126: 463-467, 2009, doi:10.1016/j.jep.2009.09.014
- [14] Roy I., Magesh K.T., Sathyakumar M., Sivachandran A., Purushothaman D., Aravindhan R. Evaluation of Wound Healing Property of the Ethanolic Extract of *Glycyrrhiza Glabra* on Vero Cell Lines Using *In Vitro* Scratch Assay Test. *J. Pharm. Bioallied. Sci.*, 15(1): S630-S635, 2023, doi: [10.4103/jpbs.jpbs\\_61\\_23](https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_61_23)

## Lista cu lucrările științifice publicate

Articole publicate în reviste cotate ISI

1. **Ghica A.**, Drumea V., Moroșan A., Mihaiescu D.E., Costea L., Luță E.A., Mihai D.P., Balaci D.T., Fița A.C., Olaru O.T., Boscencu R., Gîrd C.E.. Phytochemical Screening and Antioxidant Potential of Selected Extracts from *Betula alba* var. *pendula* Roth., *Glycyrrhiza glabra* L., and *Avena sativa* L. *Plants*, 12(13): 2510, 2023, revistă indexată ISI, cu factor de impact **4.5**, ISSN: 2223-7747 (*for the Online Edition*), link: <https://doi.org/10.3390/plants12132510>  
(capitolele din care a fost realizată lucrarea sunt Capitolul 3, Capitolul 4 și Capitolul 6)
2. **Ghica A.**, Tănase M.L., Niculițe C.M., Tocilă A., Popescu L., Luță E.A., Olaru O.T., Popovici V., Balaci T.D., Duțu L.E., Boscencu R., Gîrd C.E. *In Vitro* Toxicity Evaluation of Some Plant Extracts and Their Potential Application in *Xerosis cutis*. *Cosmetics*, 11(4):124, 2024, revistă indexată ISI, cu factor de impact **3.4**, EISSN: 2079-9284, link: <https://doi.org/10.3390/cosmetics11040124>  
(capitolele din care a fost realizată lucrarea sunt Capitolul 5, Capitolul 6, Capitolul 7 și Capitolul 8)