

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL FARMACIE

**INVESTIGAREA ACȚIUNII ANTIMICROBIENE ȘI A
PROPRIETĂȚILOR REOLOGICE ALE HIDROGELURILOR PE BAZĂ
DE CHITOSAN ȘI ALGINAT ÎMBOGĂȚITE CU ULEIURI VOLATILE
PENTRU APLICAȚII BIOMEDICALE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. DUMITRU LUPULIASA

Student-Doctorand:

FLORIN-ALEXANDRU JOIȚA

2024

Cuprins

Listă cu lucrări științifice publicate.....	
Abrevieri.....	
Introducere.....	1
Capitolul 1. Partea general-teoretică.....	4
1.1. Structura și organizarea pielii.....	4
1.1.2. Funcțiile fiziologice ale pielii.....	5
1.1.3. Impactul leziunilor: Clasificare, implicații și provocări.....	8
1.2. Utilizarea hidrogelurilor terapeutice în vindecarea leziunilor cutanate: fazele vindecării, mecanisme de acțiune și aplicații clinice.....	12
1.2.1. Fazele vindecării leziunilor cutanate.....	12
1.2.2. Hidrogeluri terapeutice: compoziție chimică și clasificare.....	14
1.2.3. Strategii avansate pentru managementul vindecării rănilor.....	17
1.2.4. Proprietățile fizico-chimice și funcționale în contextul vindecării rănilor.....	28
1.2.5. Aplicații clinice ale hidrogelurilor.....	29
CONTRIBUȚII PERSONALE.....	33
Capitolul 2. Hidrogeluri simple pe bază de chitosan cu acțiune antimicrobiană.....	33
2.1. Formularea hidrogelurilor simple cu acțiune antimicrobiană.....	33
2.1.1. Planul experimental.....	34
2.1.2. Tehnici avansate de preparare a hidrogelurilor de chitosan, îmbogățite cu uleiuri volatile.....	36
2.1.3. Metode de evaluare a calității hidrogelurilor.....	40
2.2. Evaluarea calitativă a activității antimicrobiene și caracterizarea reologică.....	44

2.2.1. Reologia hidrogelurilor simple pe bază de chitosan și alginat.....	50
2.2.2. Discuțiile studiului de cercetare.....	52
2.2.3. Evaluarea activității antimicrobiene a hidrogelurilor simple de chitosan și alginat.....	63
2.2.4. Rezultatele cercetării.....	67
2.2.5. .Discuțiile studiului.....	71
2.2.6. Concluzii parțiale.....	73
Capitolul 3. Hidrogeluri mixte pe bază de chitosan și alginat.....	75
3.1. Formularea hidrogelurilor mixte cu acțiune antimicrobiană.....	75
3.2. Materiale și metode.....	77
3.3. Controlul calității hidrogelurilor mixte de chitosan și alginat.....	84
3.4. Evaluarea calitativă a activității antimicrobiene și aspecte reologice în caracterizarea hidrogelurilor mixte.....	85
3.5. Analiza reologică a hidrogelurilor: rezultate și interpretări.....	87
3.6. Evaluarea experimentală a activității antimicrobiene a hidrogelurilor mixte de chitosan și alginat.....	94
3.7. Discuțiile studiului efectuat.....	111
3.8. Concluzii parțiale ale studiului.....	112
Concluzii generale.....	115
Bibliografie.....	119

Introducere

În contextul progreselor semnificative în domeniul materialelor biomedicale, hidrogelurile pe bază de chitosan și alginat au captat un interes considerabil datorită proprietăților lor remarcabile, precum biocompatibilitatea, biodegradabilitatea și capacitatea de a forma rețele tridimensionale hidratate.

Aceste caracteristici sunt fundamentale pentru diverse aplicații medicale și biomedicale, cum ar fi vindecarea rănilor și eliberarea controlată a medicamentelor.

Totuși, pentru a valorifica pe deplin potențialul acestor materiale, este esențial să avem o înțelegere detaliată a proprietăților lor reologice și a acțiunii antimicrobiene.

Motivația principală a acestui studiu derivă din necesitatea de a dezvolta hidrogeluri cu performanțe optimizate printr-o explorare aprofundată a comportamentului lor reologic și a capacităților antimicrobiene. În mod specific, înțelegerea proprietăților reologice ale acestor hidrogeluri este esențială pentru optimizarea proceselor de fabricație și pentru îmbunătățirea aplicabilității lor clinice. Reologia influențează nu doar modul de administrare și stabilitatea hidrogelurilor, ci și modul în care acestea pot fi adaptate pentru a mima țesuturile biologice, oferind astfel suport structural și funcțional adecvat. În ceea ce privește capacitățile antimicrobiene, chitosanul este cunoscut pentru activitatea sa împotriva unei varietăți de bacterii și ciuperci, datorită proprietăților sale cationice, care îi permit să interacționeze cu membranele celulare microbiene. Alginatul, deși mai puțin activ din punct de vedere antimicrobian, contribuie prin capacitatea sa de formare a filmelor și prin proprietățile sale mucoadezive, care pot fi îmbunătățite prin modificări chimice sau prin combinarea cu alte agenți antimicrobieni.

Aceste proprietăți sunt importante din mai multe motive:

- **Eficiența în aplicații biomedicale:** Proprietățile reologice ale hidrogelurilor influențează direct modul în care acestea pot fi aplicate și manipulate în contexte clinice, inclusiv în pansamente pentru răni și sisteme de livrare a medicamentelor. O reologie adecvată poate asigura o aplicare uniformă și o adeziune optimă la țesuturile afectate.
- **Securitatea și eficacitatea:** Proprietățile antimicrobiene sunt esențiale pentru prevenirea și combaterea infecțiilor în aplicațiile de vindecare a rănilor. Hidrogelurile care pot

inhiba eficient creșterea microorganismelor patogene pot reduce riscul de infecții și pot promova o vindecare mai rapidă și mai eficientă.

- Dezvoltarea de soluții inovatoare: Înțelegerea detaliată a acestor aspecte poate conduce la dezvoltarea de noi hidrogeluri cu performanțe îmbunătățite, contribuind la inovații în domeniul biomedical și îmbunătățirea tratamentelor disponibile pentru pacienți.

Studiul de față își propune să atingă următoarele obiective principale, concentrându-se pe proprietățile reologice și acțiunea antimicrobiană a hidrogelurilor pe bază de chitosan și alginat:

- Caracterizarea proprietăților reologice: Studiul va realiza o analiză detaliată a comportamentului reologic al hidrogelurilor pe bază de chitosan și alginat. Reologia, fiind știința care studiază deformarea și curgerea materialelor, oferă informații esențiale despre vâscozitatea, elasticitatea și fluiditatea materialelor studiate. În cadrul acestei analize, se va examina modul în care acești parametri sunt influențați de compoziția hidrogelurilor și de condițiile de formulare. Vom evalua comportamentul hidrogelurilor sub diverse tipuri de tăiere, capacitatea lor de a-și recupera forma după deformare și stabilitatea structurală în timp. Această evaluare reologică este esențială pentru înțelegerea modului în care hidrogelurile pot fi aplicate în diferite contexte, precum biomedicina sau industria alimentară.
- Evaluarea activității antimicrobiene: Al doilea obiectiv al studiului constă în testarea eficienței hidrogelurilor împotriva unui spectru larg de microorganisme patogene. Aceasta va include bacterii și fungi de interes clinic. Metodele de testare vor cuprinde tehnici standardizate, cum ar fi metoda disc-difuziune, pentru a determina capacitatea hidrogelurilor de a inhiba creșterea bacteriană și fungică. Activitatea antimicrobiană este un atribut esențial al hidrogelurilor cu aplicații în domeniul biomedical, unde prevenirea infecțiilor este o prioritate.
- Optimizarea compoziției: Un alt obiectiv central al cercetării este optimizarea compoziției hidrogelurilor prin varierea concentrației componentelor cheie: chitosanul, alginatul și agenții reticulanti. Această investigație se va concentra pe modul în care aceste variabile de formulare influențează proprietățile reologice și activitatea antimicrobiană a hidrogelurilor. Scopul final este de a identifica combinațiile optime care asigură un echilibru ideal între performanța reologică și eficiența antimicrobiană.

Această optimizare este importantă pentru dezvoltarea de hidrogeluri cu aplicabilitate largă și eficiență sporită în diverse aplicații din domeniul biomedical.

Studiul propus are ca scop să contribuie semnificativ la avansarea domeniului materialelor biomedicale prin oferirea unor perspective valoroase asupra designului și aplicării hidrogelurilor pe bază de chitosan și alginat. Această cercetare nu urmărește doar să îmbunătățească tratamentele existente, ci și să deschidă noi orizonturi pentru aplicații inovatoare în domeniul biomedical. Rezultatele obținute pot constitui baza pentru dezvoltarea unor soluții terapeutice noi, personalizate și eficiente, adaptate cerințelor clinice moderne.

Partea general-teoretică

Primul capitol oferă o analiză detaliată a structurii și funcțiilor pielii, precum și a utilizării hidrogelurilor terapeutice în vindecarea leziunilor cutanate. Pielea, cel mai mare organ al corpului uman, joacă un rol esențial în menținerea integrității și sănătății organismului datorită multiplelor sale funcții vitale, inclusiv protecția împotriva agenților mecanici, chimici și biologici din mediul extern [1]. De asemenea, pielea este crucială pentru homeostazie, reglarea temperaturii corpului, percepția senzorială a temperaturii, atingerii și presiunii, diminuarea efectelor dăunătoare ale radiațiilor UV și întărirea sistemului imunitar pentru a preveni infecțiile. În plus, pielea are o remarcabilă capacitate de autovindecare și joacă un rol semnificativ în sinteza vitaminelor [2,3].

Din punct de vedere structural, pielea umană este compusă din trei straturi distincte: epidermul, dermul și hipodermul. Epidermul, stratul exterior, este elastic și în proces continuu de regenerare. Acesta este format din diverse tipuri de celule (keratinocite, corneocite, melanocite, celule Merkel, celule Langerhans), care îndeplinesc funcția de barieră protectoare. Aproximativ 80% din celulele epidermului sunt keratinocite, care se generează constant prin diviziune celulară și migrează progresiv către suprafața pielii. La suprafață, aceste celule devin aplatizate, moarte, și se desprind prin procesul natural de exfoliere. Stratul exterior al epidermului, keratinizat și cornos, este relativ impermeabil.

În urma unei leziuni la nivelul pielii, în jurul țesutului afectat au loc multiple reacții organizate, care duc în cele din urmă la vindecarea tisulară. Acest proces fiziologic complex și dinamic constă din patru etape (sau trei, conform unor autori care includ hemostaza în faza inflamatorie): hemostaza, faza inflamatorie, faza de proliferare (creștere tisulară) și faza de maturare și remodelare tisulară [1,4].

Imediat după traumatism, se declanșează o serie de evenimente bine coordonate, mediate de receptori și celule implicate în aceste procese, fiecare având un rol esențial în progresia vindecării rănilor

În ultimii ani, atenția cercetătorilor s-a îndreptat către investigarea speciilor reactive de oxigen (ROS), chemokinelor și fenotipurilor macrofagelor ca factori critici în inflamația excesivă observată în leziunile cutanate sau organice. Polimerii, fie naturali, fie sintetici, sunt supuși unor recombinații fizice sau chimice pentru a obține diverse funcții și proprietăți. Din perspectivă fizică, aceștia formează asocieri hidrofobe, legături de hidrogen și interacțiuni ionice. Din punct de vedere chimic, polimerii sunt conectați printr-o varietate de legături covalente, inclusiv disulfide, bază Schiff și legături esterice de borat. Metodele de încrucișare a legăturilor depind de caracteristicile individuale ale polimerilor [5].

Pansamentele anti-inflamatorii bazate pe hidrogel integrează medicamente specifice, molecule bioactive mici și materiale noi biomimetice într-o matrice de hidrogel (Figura 5). Acestea sunt capabile să neutralizeze radicalii liberi în exces, să sechestreze chemokinele și să promoveze polarizarea macrofagelor M1-M2, având astfel un efect benefic de reducere a inflamației excesive la nivelul rănilor și de facilitare a procesului de vindecare. Pansamentele acționează prin stimularea angiogenezei (formarea de noi vase de sânge pentru îmbunătățirea vascularizației locale), depunerea de colagen, migrarea celulelor epiteliale, reducerea fibrozei (dezvoltarea patologică excesivă a țesuturilor conjunctive) și remodelarea matricei extracelulare [6].

Radicalii liberi (ROS) au ca reprezentări radicalii hidroxil (-OH), ionii hidroxil (OH^-), anionul superoxid (O_2^-) și peroxidul (O_2^{2-}). Diverse studii au demonstrat că o concentrație redusă de specii reactive de oxigen (ROS) favorizează procesul de vindecare tisulară. Stările de hipoglicemie și infecțiile sunt asociate cu un răspuns proinflamator anormal, caracterizat de o infiltrare semnificativă a celulelor inflamatorii, cum ar fi neutrofilele și macrofagele, care conduc la creșterea concentrației de ROS. Această creștere a ROS poate avea efecte nocive, cum ar fi deteriorarea structurilor ADN, lipidelor și proteinelor membranare, leziuni celulare și apoptoză.

În situațiile în care concentrațiile ROS sunt scăzute, acestea pot atrage limfocitele din alte regiuni către locul leziunii, promovând și modulând procesele de angieneză și reperfuție tisulară în zona afectată. De asemenea, ROS joacă un rol important în apărarea gazdei împotriva microorganismelor invadatoare. Studiile clinice sugerează că o concentrație de 100

μM de peroxid de hidrogen (H_2O_2) poate stimula angiogeneza prin intermediul semnalizării factorului de creștere endotelial vascular (VEGF).

Este cunoscut faptul că un exces de ROS poate avea efecte negative asupra procesului de vindecare. Ca urmare, cercetătorii au căutat modalități inovatoare de a controla eliberarea excesivă de ROS. În ultima perioadă, utilizarea compușilor cu proprietăți antioxidante în hidrogeluri prin diferite procese, cum ar fi combinația, modificarea și polimerizarea, a arătat rezultate promițătoare în neutralizarea ROS în exces și în promovarea unei vindecări eficiente a rănilor. În funcție de natura lor, acești compuși au fost clasificați în cinci categorii, după cum urmează: 1) polifenoli naturali, 2) polizaharide, 3) aminoacizi, 4) polimeri sintetici, 5) nanomateriale metalice noi [7].

Grupările hidroxil fenolice din polifenolii naturali au abilitatea de a stabiliza ROS prin intermediul modificărilor chimice, cum ar fi schimbările de hidrogen și transferul de electroni.

De asemenea, polifenolii naturali au capacitatea de a chela metalele de tranziție și de a exercita un rol protector și de activare asupra enzimelor antioxidante, inhibând astfel enzimele oxidative rezultate din stresul oxidativ. Aceștia sunt implicați și în protecția antimicrobiană. Polifenolii naturali, în principal din categoria flavonoizilor (cum ar fi quercetina, catechina, cateholul și curcumina) și a esterilor acidului polifenolic (cum ar fi acidul ferulic, acidul galic, acidul tanic și derivații esterici), sunt compuși esențiali în acest sens.

Curcumina, un ingredient activ major din turmeric, demonstrează proprietăți puternice antiinfecțioase, antioxidante și antiinflamatoare, făcându-l astfel un agent promițător pentru utilizarea topică în tratarea rănilor [8]. Într-un studiu publicat de di Luca și colegii săi [9], a fost dezvoltat un compus multifuncțional prin combinarea hidrogelurilor încărcate cu curcumină și sisteme de microparticule conținând polifenoli cu proprietăți antimicrobiene și quercetină.

Rezultatele finale au arătat că acest sistem a redus stresul celular oxidativ indus de H_2O_2 , precum și proliferarea *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină.

Un alt compus bioactiv antioxidant este resveratrolul (RSV), un polifenol cu capacitate excelentă de regenerare tisulară și de modulare a producției de citokine, precum și a sensibilității la insulină [10].

Acidul galic, o substanță polifenolică crucială, prezintă calități remarcabile, inclusiv proprietăți antiinflamatorii, antimicrobiene, antibacteriene și capacitatea de a neutraliza radicalii liberi de oxigen (ROS), contribuind astfel semnificativ la accelerarea procesului de vindecare al rănilor [11].

Acidul ferulic, un compus organic fenolic derivat din acidul hidroxicinamic, este prezent în peretele celular al majorității plantelor și este asociat cu molecule precum arabinoxilanii [12]. Wei și echipa sa [13] au investigat efectele acidului ferulic prin includerea acestuia într-un hidrogel destinat accelerării vindecării rănilor.

Un alt polifenol natural provenit din speciile vegetale și utilizat pe scară largă în bioinginerie este acidul tanic. Hidrogelurile care conțin acest compus bioactiv, datorită proprietăților sale valoroase, prezintă caracteristici importante, cum ar fi aderența, activitatea antibacteriană și efectul antioxidant. Acestea stimulează o depunere accelerată de collagen la nivelul leziunii și sporesc expresia factorului de creștere endotelial vascular (VEGF), în timp ce reduc nivelurile factorului de necroză tumorală-alfa (TNF- α).

O parte dintre aminoacizi și peptide pot reacționa în mod direct cu ROS prin intermediul grupărilor funcționale precum legăturile amino (-NH₂), hidroxil (-OH), carboxil (-COOH) și de sulf. În mod special, efectul antioxidant mai pronunțat este observat în cazul aminoacizilor care conțin grupări fenolice hidroxil sau sulfhidril (-SH). Dintre aminoacizii încorporați în hidrogeluri și care exercită efecte antioxidante, dar și antibacteriene se numără arginina, peptide de fibroină de mătase, peptide provenite din perle.

Toate materialele naturale menționate anterior prezintă o bună biocompatibilitate. Cu toate acestea, unul dintre principalele lor dezavantaje este degradarea enzimatică crescută, precum și stabilitatea scăzută din punct de vedere fizic și chimic. Aceste aspecte pot limita utilizarea lor în anumite aplicații medicale, deoarece durabilitatea și rezistența materialului sunt factori critici pentru succesul terapeutic pe termen lung [6]. Totuși, aceste probleme pot fi evitate sau controlate prin utilizarea materialelor sintetice, care vor fi discutate în continuare.

Contribuții personale

Contribuția personală este tratată în detaliu în **Capitolul 2** și **Capitolul 3**, care abordează atât caracteristicile reologice ale hidrogelurilor pe bază de chitosan și alginat, cât și metodologia de preparare și procedurile utilizate pentru testarea acestora în vederea evaluării acțiunii antimicrobiene.

Această cercetare reflectă contribuția personală semnificativă în mai multe aspecte:

- Dezvoltarea și optimizarea procedurii de preparare a hidrogelurilor pe bază de chitosan și alginat îmbogățite cu uleiuri volatile.
- Implementarea și adaptarea testelor reologice pentru a evalua proprietățile mecanice ale hidrogelurilor.
- Efectuarea testelor antimicrobiene și analiza datelor pentru a determina eficiența uleiurilor volatile în formulările hidrogelurilor.
- Interpretarea rezultatelor și formularea concluziilor bazate pe date empirice.

Această contribuție personală permite obținerea unor rezultate relevante și inovatoare, care aduc o valoare adăugată în domeniul aplicațiilor biomedicale ale hidrogelurilor.

Hidrogeluri simple pe bază de chitosan cu acțiune antimicrobiană

Formularea hidrogelurilor simple pe bază de chitosan și alginat implică un proces complex care necesită o selecție atentă și o pregătire riguroasă a componentelor implicate. Prin optimizarea fiecărui pas, de la dizolvare până la reticularea finală, se pot obține hidrogeluri cu proprietăți îmbunătățite pentru diverse aplicații biomedicale. Această atenție la detalii asigură nu doar calitatea și eficiența hidrogelurilor, dar și siguranța și eficacitatea acestora în utilizările medicale.

Pentru a evalua influența concentrației de chitosan asupra proprietăților hidrogelurilor formate, au fost preparate geluri cu concentrații de 2% (Formulara A), 3% (Formulara B) și 4% (Formulara C), îmbogățite cu uleiuri volatile de turmeric și dafin. De asemenea, a fost evaluată influența concentrației de alginat asupra proprietăților hidrogelurilor formate, utilizând geluri cu aceleași concentrații de 2% (Formulara D), 3% (Formulara E) și 4% (Formulara F), îmbogățite cu uleiuri volatile de copaiba și rozmarin.

În conformitate cu rezultatele experimentale obținute în urma testelor de control (Tabelul 1, Tabelul 2), s-a constatat o bună stabilitate a tuturor celor 6 formulări de hidrogeluri cu uleiuri volatile. Cu toate acestea, în ceea ce privește consistența și pH-ul, cea mai bună stabilitate în timp este prezentată de formulările C (hidrogel pe bază de chitosan) și F (hidrogel pe bază de alginat). Toate formulările au prezentat un pH fiziologic acid, similar valorii fiziologice a pielii umane de la 4.8 la 6.0.

Tabelul 1. Caracteristicile hidrogelurilor cu chitosan

Caracteristica	Formula A	Formula B	Formula C
Examen organoleptic- inițial	aspect: omogen, translucid; culoare: galben-portocaliu; miros: specific	aspect: omogen, translucid; culoare: galben-portocaliu; miros: specific	aspect: omogen, translucid; culoare: galben-portocaliu; miros: specific
Examen organoleptic după 30 zile	caracteristici inițiale constante	caracteristici inițiale constante	caracteristici inițiale constante
Examen organoleptic după 60 zile	caracteristici inițiale constante	caracteristici inițiale constante	caracteristici inițiale constante
pH -inițial	5.5-6	5.5-6	5.5-6
pH după 30 zile	5.5-6	5.5-6	5.5-6
pH după 60 zile	6-6.5	6-6.5	5.5-6
Vâscozitate inițială	640 ± 0.66 mPas	855 ± 0.25 mPas	1488 ± 0.50 mPas
Vâscozitatea după 30 zile	636 ± 0.75 mPas	853 ± 0.66 mPas	1487 ± 0.33 mPas
Vâscozitatea după 60 zile	624 ± 0.36 mPas	850 ± 0.52 mPas	1476 ± 0.73 mPas

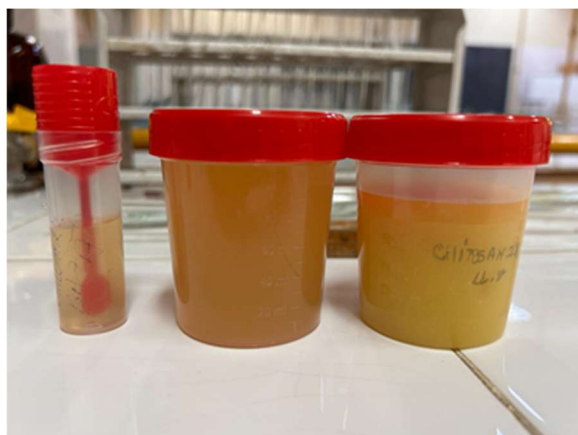


Figura 1. Hidrogeluri cu chitosan: Formula A, B, C

Tabelul 2. Caracteristicile hidrogelurilor cu alginat

Caracteristica	Formula D	Formula E	Formula F
Examen organoleptic- inițial	aspect: omogen, translucid; culoare: alb-gălbui; miros: specific	aspect: omogen, translucid; culoare: alb-gălbui; miros: specific	aspect: omogen, translucid; culoare: alb-gălbui; miros: specific
Examen organoleptic după 30 zile	caracteristici inițiale constante	caracteristici inițiale constante	caracteristici inițiale constante
Examen organoleptic după 60 zile	caracteristici inițiale constante	caracteristici inițiale constante	caracteristici inițiale constante
pH -inițial	6-6.5	6-6.5	6-6.5
pH după 30 zile	6-6.5	6-6.5	6-6.5
pH după 60 zile	6.5-6.8	6.5-6.8	6-6.5
Vâscozitate inițială	682 ± 0.50 mPas	814 ± 0.33 mPas	1038 ± 0.46 mPas
Vâscozitatea după 30 zile	676 ± 0.66 mPas	807 ± 0.75 mPas	1036 ± 0.33 mPas
Vâscozitatea după 60 zile	664 ± 0.28 mPas	800 ± 0.22 mPas	1030 ± 0.64 mPas



Figura 2. Hidrogeluri cu alginat: Formula D, E, F

Aceste rezultate indică faptul că formulările C și F sunt cele mai promițătoare în ceea ce privește menținerea stabilității în timp a caracteristicilor lor esențiale, cum ar fi consistența și pH-ul. Aceste proprietăți sunt critice pentru aplicabilitatea hidrogelurilor în domeniul medical, în special în contextul interacțiunii cu pielea umană, unde un pH adecvat poate influența semnificativ tolerabilitatea și eficacitatea produsului.

În conformitate cu rezultatele experimentale obținute în urma testelor de control, s-a constatat o bună stabilitate a tuturor celor 6 formulări de hidrogeluri cu uleiuri volatile. Cu toate acestea, în ceea ce privește consistența și pH-ul, cea mai bună stabilitate în timp este prezentată de formulările C (hidrogel pe bază de chitosan) și F (hidrogel pe bază de alginat). Toate formulările au prezentat un pH fiziologic acid, similar valorii fiziologice a pielii umane de la 4.8 la 6.0.

Din analiza reogramelor prezentate în Figura 3 se observă un comportament non-Newtonian în cazul formulelor B, C, D, E.

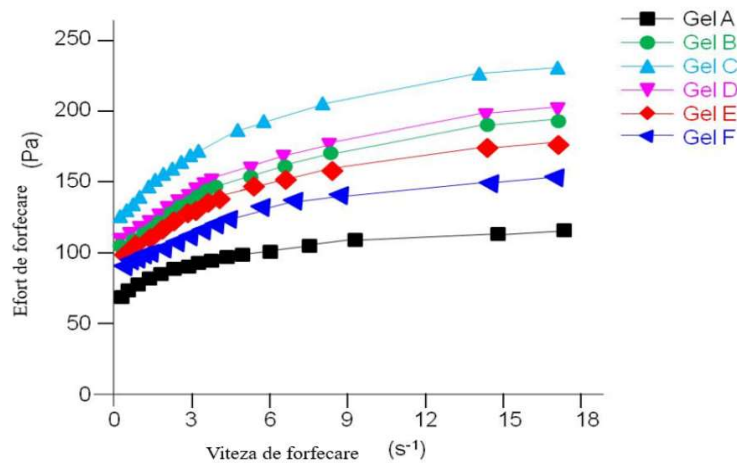


Figura 3. Reogramele hidrogelurilor analizate

Identificarea comportamentului ne-Newtonian în formulările studiate îmbogățește înțelegerea noastră asupra reologiei hidrogelurilor, aliniindu-se cu descoperirile stabilite în literatura de specialitate. Hidrogelurile, datorită structurilor lor complexe de rețea polimerică, prezintă adesea răspunsuri reologice complexe care deviază de la comportamentul fluidelor newtoniene. Acest fenomen a fost documentat în literatură, unde diverse formulări de hidrogel au demonstrat comportamente de subțiere la forfecare, îngroșare la forfecare sau comportament viscoelastic, în funcție de factori precum compoziția polimerului, concentrația și densitatea legăturilor transversal [14].

A fost testată activitatea antimicrobiană pentru formulele de hidrogeluri B, C și D, formulele cu caracteristicile reologice cele mai bune.

De asemenea, s-a testat și acțiunea antimicrobiană a amestecului de uleiuri volatile din formulele hidrogelurilor cu bază de chitosan, amestecul U1 (ulei volatil de turmeric și ulei volatil de dafin în părți egale 1/1 g/g) precum și acțiunea antimicrobiană a amestecului de uleiuri volatile din formulele hidrogelurilor cu bază de alginat, amestecul U2 (ulei volatil de rozmarin și ulei volatil de copaiba în părți egale 1/1 g/g).

Scopul acestor teste a fost să se determine eficacitatea potențială a formulărilor în combaterea microorganismelor patogene.

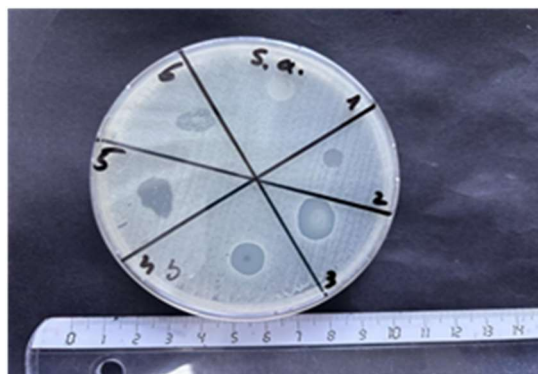


Figura 4.a. Zonele de inhibiție pe tulpinile de *Staphylococcus aureus* după 24h

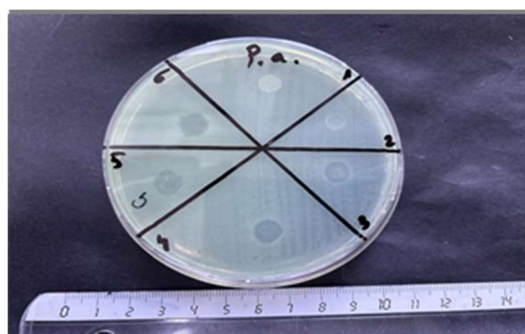


Figura 4.b. Zonele de inhibiție pe tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* după 24h



Figura 4.c. Zonele de inhibiție pe tulpinile de *Candida albicans* după 24h

Formarea zonei de inhibiție a creșterii indică activitate antimicrobiană, iar zonele mai mari de inhibiție sugerează în mod obișnuit o activitate antimicrobiană mai puternică, demonstrând capacitatea formulărilor de a împiedica proliferarea tulpinilor microbiene.

Prin utilizarea metodei adaptate de difuzie pe petice, gelurile de chitosan și alginat au prezentat o activitate antimicrobiană moderată împotriva tulpinilor bacteriene testate.

Diametrele zonelor de inhibiție a creșterii pentru *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa* au variat între 7 și 11 mm.

Testele au fost efectuate conform standardelor microbiologice relevante, iar rezultatele au fost analizate pentru a evalua capacitatea hidrogelurilor și a amestecurilor lor de uleiuri volatile de a inhiba creșterea și dezvoltarea bacteriilor și fungilor, inclusiv a tulpinilor standardizate utilizate în studii antimicrobiene.

Solventul folosit pentru solubilizarea uleiurilor esențiale și a amestecurilor lor a fost dimetil sulfoxid (DMSO), care în general nu are activitate antimicrobiană. DMSO și bazele de gel (chitosan și alginat) au fost utilizate ca martori pentru toate tulpinile testate.

Această abordare asigură că efectele observate în testele antimicrobiene sunt atribuite în mod specific compușilor activi (uleiurile esențiale și amestecurile lor), eliminând posibilitatea ca solventul sau bazele de gel să influențeze rezultatele.

Utilizarea DMSO și a bazelor de gel ca controale este esențială pentru interpretarea corectă a activității antimicrobiene a compușilor testați în comparație cu condițiile standardizate de laborator.

Toate determinările au fost efectuate în triplicat, iar rezultatele au fost exprimate ca medie \pm deviație standard (SD). Evaluarea statistică a rezultatelor clinice s-a realizat prin testul t Student (testul t) și prin analiza varianței (ANOVA).

Această metodă asigură o validare robustă a datelor obținute prin repetarea măsurătorilor de trei ori pentru fiecare set de experimente. Calcularea mediei și a deviației standard permite o descriere precisă a rezultatelor, evidențiind variabilitatea între măsurători și gradul de precizie al fiecărei determinări.

Combinatia U1 (uleiuri esențiale de turmeric și dafin) a prezentat în general un potențial inhibitor ușor mai ridicat decât celelalte amestecuri de uleiuri volatile analizate împotriva celor trei tipuri de tulpini testate (Figura 5).

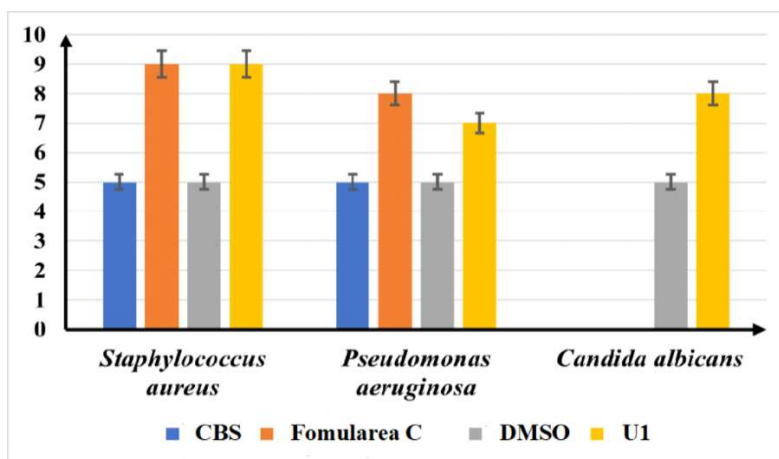


Figura 5. Diametrele zonei de inhibiție a creșterii (GZID) pentru formulările testate de hidrogeluri pe bază de chitosan (CBS), Formularea C, DMSO și amestecul de uleiuri volatile (U1).

În ansamblu, aceste constatări subliniază potențialul hidrogelurilor pe bază de chitosan și alginat (în special formularea C), precum și al amestecurilor de uleiuri volatile (în special U1) ca agenți antimicrobieni. Aceste rezultate erau de așteptat, deoarece uleiurile esențiale de turmeric și dafin au o activitate antimicrobiană remarcabilă, conform datelor din literatură.

Activitatea antimicrobiană, proprietățile reologice ale formulărilor de hidrogel joacă un rol important în aplicațiile practice, în special în vindecarea rănilor și ingineria țesuturilor. Capacitatea de întindere a hidrogelurilor, așa cum s-a observat în studiul nostru, reflectă integritatea lor mecanică și abilitatea de a se conforma diferitelor geometrii ale rănilor [15][16]. Rezultatele noastre arată că toate formulările de hidrogel mențin o capacitate robustă de întindere în timp, cu variații minime, chiar și după stocare prelungită. Acest lucru sugerează stabilitatea matricei de hidrogel și potențialul lor pentru aplicații biomedicale pe termen lung.

Compararea cu datele din literatură evidențiază interacțiunea complexă dintre eficacitatea antimicrobiană, proprietățile reologice și compoziția hidrogelului. În timp ce studiile anterioare au raportat activitatea antimicrobiană a hidrogelurilor pe bază de chitosan și alginat, puține au investigat efectele combinate ale uleiurilor volatile asupra activității antimicrobiene și comportamentului reologic [17][18]. Studiul nostru completează acest gol prin demonstrarea impactului sinergic al formulărilor de hidrogel îmbogățite cu uleiuri volatile, alături de proprietățile lor reologice favorabile.

Formularea hidrogelurilor mixte cu acțiune antimicrobiană

Hidrogelurile compuse din alginat și chitosan reprezintă o inovație semnificativă în domeniul materialelor biomedicale datorită combinației unice de proprietăți ale acestor două polizaharide naturale. Aceste materiale oferă avantaje remarcabile în diverse aplicații, în special în biomedicină și ingineria tisulară, datorită caracteristicilor lor fizice, chimice și biologice.

Combinarea alginatului cu chitosanul duce la îmbunătățirea semnificativă a proprietăților mecanice ale hidrogelurilor. Alginatul, cunoscut pentru capacitatea sa de a forma geluri stabile, conferă hidrogelului o structură robustă, menținându-și integritatea chiar și în condiții variate de mediu. În același timp, chitosanul adaugă flexibilitate și rezistență mecanică, ceea ce face ca hidrogelurile să fie mai elastice și mai adaptabile la solicitările mecanice. Această combinație de proprietăți permite utilizarea acestor hidrogeluri în aplicații care necesită materiale durabile și versatile.

Combinarea chitosanului și alginatului în formularea hidrogelurilor exploatează avantajele fiecărui polimer, rezultând materiale cu proprietăți îmbunătățite. Hidrogelurile obținute din acești doi biopolimeri prezintă o biocompatibilitate excelentă, proprietăți mecanice ajustabile și capacități antimicrobiene crescute. Aceste hidrogeluri sunt capabile să elibereze agenți antimicrobieni într-un mod controlat și să formeze bariere protectoare împotriva microorganismelor patogene.

Scopul principal al acestei cercetări a fost de a obține hidrogeluri complexe cu baze mixte alginat-chitosan în concentrații de alginat de 2% și chitosan de 1,5% (Formula A), precum și de alginat de 1,5% (formula B) îmbogățite cu uleiuri volatile (turmeric, dafin și rozmarin) care au fost analizate comparativ cu un hidrogel de chitosan de 3% (Formula C) bază simplă urmărindu-se identificarea avantajelor oferite de bazele mixte atât în ceea ce privește stabilitatea și proprietățile reologice, cât și activitatea antimicrobiană.

Elaborarea complexului de hidrogel pe bază de alginat și chitosan pentru aplicare topică a implicat o selecție atentă a ingredientelor și pregătirea acestora conform cerințelor specifice.

Acest proces a inclus selecția riguroasă a alginatului și chitosanului, ajustarea proporțiilor acestora pentru a asigura o interacțiune eficientă și o distribuție uniformă în

hidrogel, precum și utilizarea unei tehnologii adecvate de încrucișare pentru a conferi hidrogelului proprietăți optime pentru aplicarea pe piele.

Prin această abordare atentă, s-a obținut un complex de hidrogel potrivit pentru utilizarea topică, cu capacitatea de a elibera controlat substanțele active și cu compatibilitate biologică adecvată pentru interacțiunea cu pielea.

Prin stabilirea concentrațiilor de 1,5% și 2%, s-a urmărit obținerea unor dispersii coloidale cu proprietăți reologice și de gelificare optime, care să asigure formarea hidrogelului cu caracteristici adecvate pentru aplicarea topică.

Procesul de formulare a hidrogelurilor complexe implică mai multe etape.

În primul rând, alginatul și chitosanul sunt dispersați în soluții apoase, formând dispersii coloidale de bază separate.

Apoi, uleiurile volatile sunt încorporate prin diverse metode, cum ar fi emulsificarea sau difuzia directă, pentru a asigura dispersia uniformă în matricea polimerică.

Următorul pas este reprezentat de combinarea soluțiilor de alginat și chitosan, care reacționează pentru a forma un hidrogel stabil.

Parametrii precum pH-ul, temperatura și concentrațiile componentelor sunt optimizați pentru a obține caracteristicile dorite ale hidrogelului, inclusiv textura, porozitatea și capacitatea de eliberare a uleiurilor volatile.

S-au formulat două hidrogeluri complexe pe bază de alginat și chitosan cu uleiuri volatile și o formula de hidrogel pe bază de chitosan îmbogățită în uleiuri volatile.

Controlul calității hidrogelurilor [19-21]:

-Examinarea aspectului s-a făcut conform F.R. X. examinând probele de hidrogeluri întinse în strat subțire pe o lamă de microscop cu lupa (4,5 X).

-Examinarea culorii s-a făcut prin examinarea pe un fond alb a probelor de hidrogeluri întinse în strat pe o sticlă de ceas. Culoarea trebuie să fie stabilă în timp.

-Examinarea mirosului s-a făcut prin perceperea mirosului de la o distanță de 4-6 cm a probelor de hidrogeluri întinse în strat pe o sticlă de ceas.

-Examinarea pH-ului s-a făcut prin dispersarea unei probe de 1g din fiecare hidrogel analizat în 5g apă distilată urmată de filtrare, iar apoi pe faza apoasă s-a determinat pH –ul potențiomtric.

-Examinarea capacității de întindere s-a făcut prin metoda Ojeda-Arbussa. Pe placa de sticlă inferioară se aduce 1g probă peste care se așează cea de-a doua placă. După intervale egale de timp (1 minut) se aduc pe placa superioară greutateți în ordine crescătoare (50g, 100g, 150g, 250g) și se citesc diametrele cercurilor formate atât după aducerea plăcii de sticle peste probă, cât și după fiecare greutate adăugată. Se calculează apoi suprafețele cercurilor.

-Examinarea vâscozității s-a realizat cu ajutorul vâscozimetrului rotațional Brookfield, model RTV (cilindru T.F., 5 rpm, Helipath Stand). Rezultatele sunt exprimate în valori medii ± deviația standard (SD).

-Examinarea reogramelor: comportamentul reologic al gelurilor s-a studiat cu ajutorul vâscozimetrului rotațional Brookfield, model RTV viteza de forfecare variind de la 0.08 la 18.8 s⁻¹, la temperatura camerei.

Rezultatele controlului calității probelor de hidrogel sunt prezentate în Tabelul 3.

Tabelul 3. Caracteristicile hidrogelurilor mixte de chitosan și alginat

Caracteristici	Formulara A	Formulara B	Formulara C
Evaluare organoleptică – momentul inițial	aspect: omogen, translucid; culoare: alb-gălbui; miros: specific	aspect: omogen, translucid; culoare alb-gălbui; miros: specific	aspect: omogen, translucid; culoare: alb-gălbui; miros: specific
Evaluare organoleptică – după 30 zile	caracteristici inițiale constante	caracteristici inițiale constante	caracteristici inițiale constante
Evaluare organoleptică – după 60 zile	caracteristici inițiale constante	caracteristici inițiale constante	caracteristici inițiale constante
pH – momentul inițial	5.5	5.5	5.5

Caracteristici	Formulara A	Formulara B	Formulara C
pH – după 30 zile	5.5 - 5.8	5.5	5.5 – 5.7
pH – după 60 zile	5.5 - 6.0	5.5 – 5.7	5.5 – 5.8
Vâscozitate – momentul inițial	1158 ± 0.33 mPa·s	1575 ± 0.25 mPa·s	895 ± 0.35 mPa·s
Vâscozitate – după 30 zile	1150 ± 0.45 mPa·s	1571 ± 0.66 mPa·s	887 ± 0.65 mPa·s
Vâscozitate – după 60 zile	1142 ± 0.25 mPa·s	1568 ± 0.50 mPa·s	872 ± 0.53 mPa·s

Formulările A, B și C au prezentat caracteristici organoleptice similare la momentul inițial, toate având un aspect omogen și translucid, dar cu diferențe minore de culoare: formularea A a fost alb-gălbui, în timp ce formulările B și C au avut o nuanță portocaliu-gălbui. Mirosul a fost specific și constant pentru toate formulările.

Pe parcursul perioadei de 60 de zile, caracteristicile organoleptice inițiale au rămas constante pentru toate formulările. Aceasta sugerează o stabilitate bună a formulărilor în condițiile testate, fără modificări vizibile sau olfactive care ar putea indica degradare sau reacții chimice nedorite.

Măsurătorile pH-ului au arătat o stabilitate relativă în timp pentru toate formulările. La momentul inițial, toate formulările au avut un pH de 5.5. După 30 de zile, pH-ul formulării A a variat ușor între 5.5 și 5.8, în timp ce formularea B a rămas constantă la 5.5, iar formularea C a variat între 5.5 și 5.7. După 60 de zile, pH-ul formulării A a variat între 5.5 și 6.0, formularea B între 5.5 și 5.7, iar formularea C între 5.5 și 5.8. Aceste variații minore sunt acceptabile și nu indică o instabilitate majoră a formulărilor.

Măsurătorile vâscozității au arătat o ușoară scădere în timp pentru toate formulările, dar aceste scăderi au fost mici și constante, indicând o bună stabilitate a structurii hidrogeliului. La momentul inițial, vâscozitatea formulării A a fost de 1158 ± 0.33 mPa·s, formularea B de 1575 ± 0.25 mPa·s, și formularea C de 895 ± 0.35 mPa·s. După 30 de zile, vâscozitatea a scăzut ușor la 1150 ± 0.45 mPa·s pentru formularea A, 1571 ± 0.66 mPa·s pentru formularea B, și 887 ± 0.65 mPa·s pentru formularea C. După 60 de zile, vâscozitatea a fost de 1142 ± 0.25 mPa·s

pentru formularea A, 1568 ± 0.50 mPa·s pentru formularea B, și 872 ± 0.53 mPa·s pentru formularea C.

În concluzie, datele din Tabelul 3 sugerează o stabilitate bună a celor trei formule de hidrogeluri dezvoltate cu o menținere mai bună a caracteristicilor constante în timp pentru formularea B, urmată de formularea C, putând aprecia că gelurile complexe mixte au un plus de stabilitate.

Evaluarea eficacității antimicrobiene a fost realizată împotriva tulpinilor standard, incluzând *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Candida albicans* ATCC 10231, alături de izolatele clinice, precum *Staphylococcus aureus* 1(50), *Staphylococcus aureus* 2(45), *Candida albicans* 5529 și *Candida albicans* 7262 (din colecția Laboratorului de Microbiologie, Facultatea de Biologie, Universitatea din București).

Activitatea antimicrobiană a fost determinată utilizând metoda de difuzie pe spot [22][23]. Suspensiile celulare bacteriene cu o densitate de 1.5×10^8 CFU/mL (echivalent cu standardul 0.5 McFarland) și suspensiile fungice cu o densitate de 3×10^8 CFU/mL (echivalent cu standardul 1 McFarland) au fost pregătite din culturi crescute pe Agar Nutritiv (pentru speciile bacteriene) și Agar Sabouraud (pentru speciile fungice).



Figura 6.a. Zona de inhibiție *S. aureus* ATCC 25923

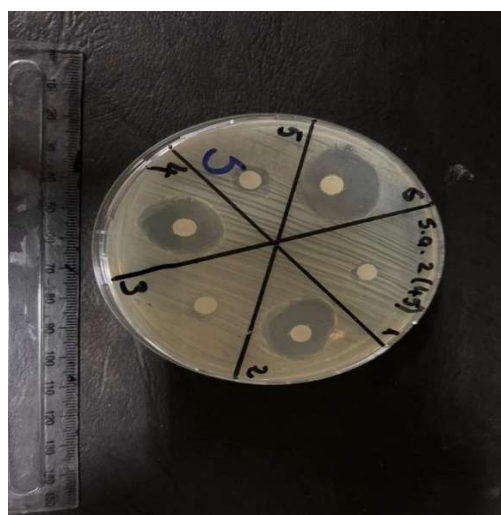


Figura 6.b. Zona de inhibiție *S. aureus*

2(45)



Figura 6.c. Zona de inhibiție *S. aureus* 1(50)

Figura 6.d. Zona de inhibiție *C. albicans* ATCC

10231

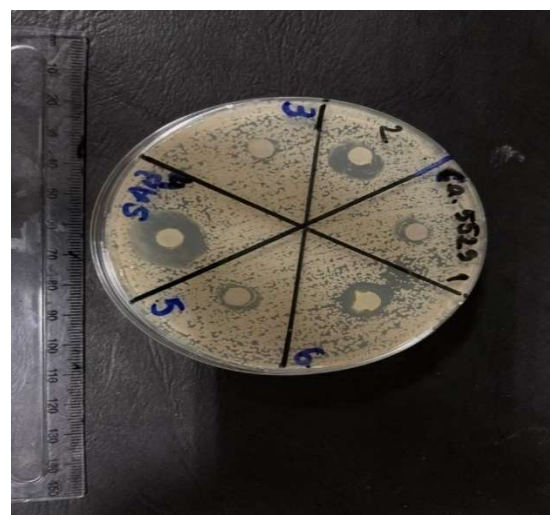
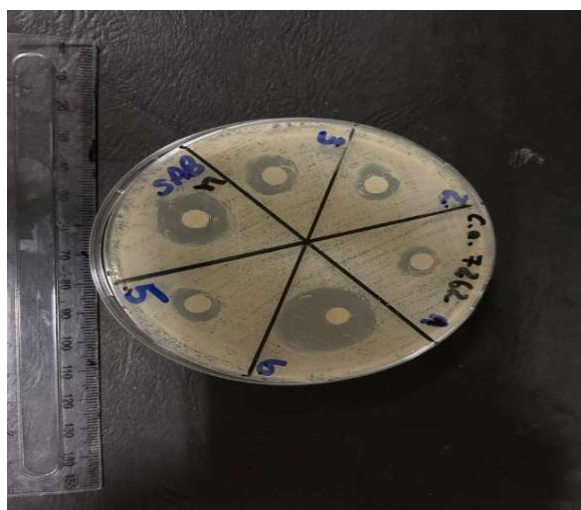


Figura 6.e. Zona de inhibiție *C. albicans* 7262

Figura 6.f. Zona de inhibiție *C. albicans* 5529

Legendă: 1- chitosan bază gel 3 %, 2 - Formularea C, 3 - baza gel complex alginat 2% și chitosan 1.5 %, 4 - Formularea B, 5 - baza gel complex alginat 1.5% și chitosan 2%, 6 – Formularea A

Toate determinările au fost efectuate în triplicat, iar prin utilizarea metodei difuzimetrice, s-a constatat o activitate antimicrobiană și antifungică semnificativă a complexului de hidrogel pe bază de alginat și chitosan, precum și a gelului de chitosan pe placa de cultură.

Aceste rezultate indică faptul că ambele formulări au capacitatea de a inhiba creșterea și dezvoltarea bacteriilor și fungilor, sugerând un potențial promițător în combaterea infecțiilor microbiene. Este important de remarcat că această activitate antimicrobiană poate fi deosebit de utilă în diverse aplicații medicale și farmaceutice, inclusiv în dezvoltarea de materiale pentru răni și îngrijirea pielii.

Wathoni N. și colaboratorii au subliniat că hidrogelurile pe bază de chitosan și alginat prezintă un mare potențial în tratarea infecțiilor bacteriene la nivelul pielii [16].

Cruz Sánchez E. și colaboratorii au demonstrat experimental efectul inhibitor al uleiului esențial de lavandă asupra creșterii speciilor bacteriene de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* și a fungului *Candida albicans*, prin incorporarea uleiului în membrane de chitosan, alginat și chitosan-alginat [24].

Diametrele zonelor de inhibiție pentru *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 au prezentat o variație între 6 și 18 mm. În special, proba de formă farmaceutică F2 s-a distins prin obținerea celor mai înalte valori între probele de gel analizate, în timp ce formele farmaceutice B1, B3 și F3 au înregistrat valori mai scăzute.

În ceea ce privește tulpinile de *Staphylococcus aureus* 1(50), toate formulele de gel analizate au avut aproximativ aceleași diametre ale zonelor de inhibiție, cu mențiunea că forma farmaceutică F2 a avut un diametru al zonei de inhibiție dublu față de forma farmaceutică F3.

În cazul tulpinilor de *Staphylococcus aureus* 2(45), s-a observat că forma farmaceutică F2 a prezentat cele mai mari valori. Aceste constatări sugerează că aceste formulări ar putea reprezenta opțiuni promițătoare pentru dezvoltarea de tratamente antimicrobiene.

Pe tulpinile de *Candida albicans* ATCC 10231, s-a observat că forma farmaceutică F2 a prezentat valori ușor mai ridicate în comparație cu formele farmaceutice F1 și F3.

Această tendință a fost evidentă și în cazul altor tulpini de *Candida albicans*, precum *Candida albicans* 7262 și *Candida albicans* 5529. Aceste rezultate indică faptul că forma farmaceutică F2 ar putea avea un potențial mai mare în inhibarea creșterii și dezvoltării tulpinilor de *Candida albicans* în comparație cu celelalte forme farmaceutice testate.

În timp ce multe studii se concentrează pe adăugarea de agenți antimicrobieni externi pentru a îmbunătăți eficacitatea formulărilor de hidrogel, această cercetare sugerează că baza de hidrogel în sine poate juca un rol semnificativ în controlul infecțiilor.

Pentru a înțelege mai bine aceste mecanisme și pentru a exploata pe deplin potențialul formulărilor de hidrogel în combaterea infecțiilor fungice și microbiene, sunt necesare cercetări ulterioare. Acestea ar putea să se concentreze pe elucidarea modului în care proprietățile chimice și fizice ale hidrogelului afectează capacitatea sa antimicrobiană și pe dezvoltarea de strategii pentru îmbunătățirea acestei activități antimicrobiene intrinseci.

În ansamblu, aceste constatări subliniază potențialul complexului de hidrogel pe bază de alginat și chitosan, precum și al hidrogelului de chitosan, ca agenți antimicrobieni promițători.

Identificarea formulării F2 drept cea mai promițătoare subliniază importanța procesului de optimizare a compoziției pentru obținerea rezultatelor antimicrobiene dorite. Capacitatea sa superioară de a inhiba creșterea microorganismelor, însoțită de flexibilitatea sa mecanică, consolidează poziția formulării F2 ca un candidat deosebit de promițător pentru dezvoltarea ulterioară. Totuși, este esențial să se continue cercetările pentru a înțelege mai bine mecanismele subiacente care stau la baza efectelor antimicrobiene observate și pentru a adapta formulările în funcție de aplicațiile biomedicale specifice.

În final, rezultatele studiului nostru oferă perspective semnificative asupra proiectării și dezvoltării de hidrogeluri antimicrobiene cu eficacitate crescută și proprietăți reologice favorabile. Prin exploatarea potențialului sinergic al chitosanului și alginatului, împreună cu uleiurile volatile, se deschid noi orizonturi pentru abordarea infecțiilor microbiene și pentru îmbunătățirea intervențiilor biomedicale.

Concluzii generale

Hidrogelurile cu bază mixtă alginat-chitosan oferă o serie de avantaje datorită combinației proprietăților celor două polizaharide naturale.

Aceste materiale sunt biocompatibile, biodegradabile, au proprietăți mecanice și antimicrobiene îmbunătățite și permit controlul eliberării medicamentelor.

Combinația alginatului cu chitosanul îmbunătățește proprietățile mecanice ale hidrogelurilor, oferindu-le o structură robustă și flexibilă. Alginatul asigură stabilitatea structurală, în timp ce chitosanul conferă elasticitate și rezistență mecanică. În plus, prezența chitosanului adaugă proprietăți antimicrobiene, ajutând la prevenirea infecțiilor, aspect esențial în aplicațiile biomedicale, cum ar fi pansamentele pentru răni și materialele de implant.

În plus, hidrogelurile pe bază mixtă alginat-chitosan au proprietăți reologice îmbunătățite datorită interacțiunilor dintre cele două polizaharide și a optimizării parametrilor de sinteză și formulare.

Studiul nostru a evidențiat importanța optimizării compoziției și procesului de fabricație pentru a maximiza eficacitatea hidrogelurilor pe bază de alginat și chitosan.

Variabilele critice, cum ar fi raportul alginat-chitosan, concentrația de agent antimicrobian și condițiile de reacție, au un impact semnificativ asupra performanței finale a hidrogelului.

Optimizarea acestor parametri poate îmbunătăți consistența activității antimicrobiene și poate asigura o eliberare controlată și eficientă a medicamentelor sau substanțelor active încorporate.

Plecând de la observațiile și rezultatele obținute, este evident că formulările de hidrogel pe bază de alginat și chitosan, îmbogățite cu uleiuri volatile, reprezintă o direcție promițătoare în dezvoltarea de produse antimicrobiene eficiente și cu potențial terapeutic.

Identificarea formulării F2, complexul de hidrogel alginat 2% și chitosan 1,5 % cu uleiuri volatile (turmeric, dafin, rozmarin) drept cea mai eficientă din acest studiu subliniază importanța optimizării compoziției și procesului de fabricație pentru obținerea rezultatelor dorite.

Eficacitatea sporită a formulării F2 în inhibarea creșterii microorganismelor, evidențiată de rezultatele experimentale, împreună cu proprietățile sale reologice favorabile, sugerează că această formulă poate fi un candidat deosebit de promițător pentru aplicații biomedicale viitoare.

În cazul gelurilor simple, au fost dezvoltate și evaluate șase formulări de hidrogeluri și amestecuri de uleiuri volatile pe bază de chitosan și alginat, pentru caracteristicile lor reologice și activitatea antimicrobiană.

Printre formulările testate, formulările C (hidrogelul cu chitosan 4% îmbogățit cu uleiuri volatile de turmeric și dafin) și D (hidrogelul cu alginat 2% îmbogățit cu uleiuri volatile de copaiba și rozmarin) au prezentat cele mai favorabile proprietăți reologice, justificând investigații suplimentare.

Toate cele trei formulări de hidrogel au demonstrat o activitate antimicrobiană semnificativă împotriva tulpinilor bacteriene selectate.

În mod deosebit, formularea D a prezentat cea mai puternică activitate antimicrobiană împotriva *S. aureus* și *P. aeruginosa* în comparație cu celelalte formulări.

În plus, formularea D include o combinație de uleiuri volatile cu puternice proprietăți antimicrobiene, printre care uleiurile esențiale de turmeric și dafin.

Acest lucru evidențiază efectul sinergic al combinării hidrogelurilor pe bază de alginat cu uleiuri volatile antimicrobiene și potențialul acestor formulări pentru aplicații biomedicale.

Această formulare este un candidat promițător pentru optimizare suplimentară și posibilă traducere clinică, oferind un beneficiu dual de proprietăți reologice favorabile și activitate antimicrobiană potentă.

Descoperirile acestui studiu subliniază importanța luării în considerare atât a caracteristicilor reologice, cât și a activității antimicrobiene în dezvoltarea preparatelor farmaceutice pe bază de hidrogeluri.

Cercetări suplimentare sunt necesare pentru a elucidă mecanismele subiacente și pentru a optimiza formularea în vederea îmbunătățirii eficacității și extinderii aplicabilității în vindecarea rănilor și tratamentele antimicrobiene.

Procesul de dezvoltare a formulărilor de hidrogeluri a implicat optimizarea compoziției, proporțiilor de alginat și chitosan, precum și integrarea de uleiuri volatile cu proprietăți antimicrobiene.

Chitosanul, datorită capacității sale antimicrobiene recunoscute, a fost o alegere naturală pentru a fi integrat în matricea de alginat, sporind astfel activitatea formulărilor împotriva microorganismelor patogene.

Formulara D a ieșit în evidență pentru că a demonstrat cea mai puternică activitate antimicrobiană în comparație cu celelalte formulări testate.

Acest rezultat sugerează că integrarea uleiurilor volatile, cum ar fi cele de turmeric și dafin, în matricea de hidrogel pe bază de alginat și chitosan, poate crea un efect sinergic puternic, amplificând proprietățile antimicrobiene ale hidrogelului.

Aplicabilitatea clinică a acestor formulări este esențială pentru avansarea în tratamentele biomedicale.

Proprietățile reologice favorabile ale formulării D sugerează că aceasta ar putea fi utilizată eficient în pansamentele pentru răni, unde o consistență adecvată și capacitatea de a controla eliberarea medicamentului sunt critice pentru vindecare. Îmbunătățirea activității antimicrobiene ar putea, de asemenea, să ofere soluții inovatoare în tratamentul infecțiilor bacteriene rezistente la antibiotice.

Totuși, este necesară continuarea cercetării pentru a înțelege mai bine mecanismele subiacente care stau la baza activității antimicrobiene a acestor formulări și pentru a le adapta corespunzător la nevoile specifice ale aplicațiilor biomedicale.

Aceste eforturi ar putea include investigarea mai detaliată a interacțiunilor între componentele hidrogelului și microorganismele, precum și optimizarea parametrilor de fabricație pentru obținerea unei eficacități maxime.

Studiul nostru a evidențiat importanța optimizării compoziției și a procesului de fabricație pentru a maximiza eficacitatea hidrogelurilor pe bază de alginat și chitosan. Prin ajustarea concentrației și proporțiilor celor două polizaharide, precum și a condițiilor de preparare, cum ar fi temperatura și pH-ul, putem obține hidrogeluri cu proprietăți personalizate, adaptate nevoilor specifice ale fiecărei aplicații. Această optimizare este esențială pentru a

exploata la maximum potențialul acestor materiale inovatoare și pentru a asigura performanța lor optimă în aplicațiile dorite.

În concluzie, studiul nostru aduce contribuții semnificative în domeniul dezvoltării de produse antimicrobiene, evidențiind potențialul formulărilor de hidrogel pe bază de alginat și chitosan în combaterea infecțiilor microbiene și în avansarea intervențiilor biomedicale.

Aceste rezultate deschid noi direcții de cercetare și oferă fundația necesară pentru dezvoltarea de terapii inovatoare și eficiente în viitor.

Bibliografie selectivă

- [1]. Vig K., Chaudhari A., Tripathi S., Dixit S., Sahu R., Pillai S., Dennis V.A., Singh S.R., Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering, *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, *18*, doi:10.3390/IJMS18040789.
- [2]. HSE - Skin at Work: Work-Related Skin Disease – Skin Structure and Function Available online: <https://www.hse.gov.uk/skin/professional/causes/structure.htm> (accesat în data de 10 martie **2024**).
- [3]. Zhang Z., Michniak B.B., Tissue Engineered Human Skin Equivalents, *Pharmaceutics*, **2012**, *4*, 26–41, doi:10.3390/PHARMACEUTICS4010026.
- [4]. Kolimi P., Narala S., Nyavanandi D., Youssef A.A.A., Dudhipala N., Innovative Treatment Strategies to Accelerate Wound Healing: Trajectory and Recent Advancements, *Cells*, **2022**, *11*, doi:10.3390/CELLS111152439.
- [5]. Shu W., Wang Y., Zhang X., Li C., Le H., Chang F., Functional Hydrogel Dressings for Treatment of Burn Wounds, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **2021**, *9*, doi:10.3389/FBIOE.2021.788461.
- [6]. Huang C., Dong L., Zhao B., Lu Y., Huang S., Yuan Z., Luo G., Xu Y., Qian W., Anti-inflammatory Hydrogel Dressings and Skin Wound Healing, *Clin. Trans. Med.*, **2022**, *12*, doi:10.1002/CTM2.1094.
- [7]. Xu Z., Han S., Gu Z., Wu J., Advances and Impact of Antioxidant Hydrogel in Chronic Wound Healing., *Adv. Healthc. Mater.*, **2020**, *9*, doi:10.1002/ADHM.201901502.
- [8]. Li X., Ye X., Qi J., Fan R., Gao X., Wu Y., Zhou L., Tong A., Guo G., EGF and Curcumin Co-Encapsulated Nanoparticle/Hydrogel System as Potent Skin Regeneration Agent, *Int. J. Nanomedicine*, **2016**, *11*, 3993–4009, doi:10.2147/IJN.S104350.
- [9]. Di Luca M., Curcio M., Valli E., Cirillo G., Voli F., Butini M.E., Farfalla A., Pantuso E., Leggio A., Nicoletta F.P., Combining Antioxidant Hydrogels with Self-Assembled Microparticles for Multifunctional Wound Dressings, *J. Mater. Chem. B.*, **2019**, *7*, 4361–4370, doi:10.1039/C9TB00871C.

- [10]. Gokce E.H., Tuncay Tanriverdi S., Eroglu I., Tsapis N., Gokce G., Tekmen I., Fattal E., Ozer O., Wound Healing Effects of Collagen-Laminin Dermal Matrix Impregnated with Resveratrol Loaded Hyaluronic Acid-DPPC Microparticles in Diabetic Rats, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2017**, 119, 17–27, doi: 10.1016/J.EJPB.2017.04.027.
- [11]. Thi P.Le., Lee Y., Tran D.L., Thi T.T.H., Kang J.II., Park K.M., Park K.D., In Situ Forming and Reactive Oxygen Species-Scavenging Gelatin Hydrogels for Enhancing Wound Healing Efficacy, *Acta Biomater*, **2020**, 103, 142–152, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2019.12.009.
- [12]. Mathew S., Abraham T.E., Ferulic Acid: An Antioxidant Found Naturally in Plant Cell Walls and Feruloyl Esterases Involved in Its Release and Their Applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, **2008**, 24, 59–83, doi:10.1080/07388550490491467.
- [13]. Wei Q., Duan J., Ma G., Zhang W., Wang Q., Hu Z., Enzymatic Crosslinking to Fabricate Antioxidant Peptide-Based Supramolecular Hydrogel for Improving Cutaneous Wound Healing, *J. Mater. Chem. B.*, **2019**, 7, 2220–2225, doi:10.1039/C8TB03147A.
- [14]. Onyekwelu I., Yakkanti R., Protzer L., Pinkston C.M., Tucker C., Seligson D., Surgical Wound Classification and Surgical Site Infections in the Orthopaedic Patient, *J. Am. Acad. Orthop. Surg. Glob. Res. Rev.*, **2017**, 1, doi:10.5435/JAAOSGLOBAL-D-17-00022.
- [15]. Li X., Ye X., Qi J., Fan R., Gao X., Wu Y., Zhou L., Tong A., Guo G., EGF and Curcumin Co-Encapsulated Nanoparticle/Hydrogel System as Potent Skin Regeneration Agent, *Int. J. Nanomedicine*, **2016**, 11, 3993–4009, doi:10.2147/IJN.S104350.
- [16]. Norahan M.H, Pedroza S.C, Sánchez M.G, Álvarez M.M, Trujillo de Santiago G., Structural and biological engineering of 3D hydrogels for wound healing, *Bioact. Mater.*, **2022**, 24: 197-235, doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.11.019.
- [17]. Di Luca M., Curcio M., Valli E., Cirillo G., Voli F., Butini M.E., Farfalla A., Pantuso E., Leggio A., Nicoletta F.P., Combining Antioxidant Hydrogels with Self-Assembled Microparticles for Multifunctional Wound Dressings, *J. Mater. Chem. B.*, **2019**, 7, 4361–4370, doi:10.1039/C9TB00871C.
- [18]. Niaraki N.J., Jamshidi S., Fasaei B.N., Joghataei S.M., Antibacterial effects of chitosan-based hydrogels containing *Trachyspermum ammi* essential oil on pathogens isolated from dogs with otitis externa. *BMC Vet. Res.*, **2024**, 20(1): 130, doi: 10.1186/s12917-024-03971-7.

- [19]. Mititelu M., Licu M., Lupu C.E., Neacșu S.M., Olteanu G., Stanciu G., Drăgănescu D., Oancea C.N., Busnatu Ș.S., Hîncu L., Ciocîlteu M.V., Lupuleasa D., Characterization of some dermatocosmetic preparations with marine lipids from Black Sea wild stingray, *Mar. Drugs*, **2023**, 21: 408, doi: 10.3390/md21070408.
- [20]. Neculai A.M., Stanciu G., Lepădatu A.C., Cima L.M., Mititelu M., Neacșu S.M., Development of New Dermato-Cosmetic Therapeutic Formulas with Extracts of *Vinca minor* L. Plants from the Dobrogea Region, *Int. J. Mol. Sci.*, **2023**, 24: 16234, doi: 10.3390/ijms242216234.
- [21]. Ioniță-Mîndrican C.B., Mititelu M., Musuc A.M., Oprea E., Ziani K., Neacșu S.M., Grigore N.D., Negrei C., Dumitrescu D.E., Mireșan H., Roncea F.N., Ozon E.A., Măru N., Drăgănescu D., Ghica M., Honey and other beekeeping products intake among the Romanian population and their therapeutic use, *Appl. Sci.*, **2022**, 12: 9649, doi: 10.3390/app12199649.
- [22]. Kolimi P., Narala S., Nyavanandi D., Youssef A.A.A., Dudhipala N., Innovative Treatment Strategies to Accelerate Wound Healing: Trajectory and Recent Advancements, *Cells*, **2022**, 11, doi: 10.3390/CELLS11152439.
- [23]. Ilie C.I., Oprea E., Geana E.I., Spoiala A., Buleandra M., Gradisteanu P.G., Badea I.A., Fikai D., Andronescu E., Fikai A., Ditu L.M., Bee Pollen Extracts: Chemical Composition, Antioxidant Properties, and Effect on the Growth of Selected Probiotic and Pathogenic Bacteria, *Antioxidants (Basel)*, **2022**, 11(5):959, doi: 10.3390/antiox13030353.
- [24]. Niaraki N.J., Jamshidi S., Fasaee B.N., Joghataei S.M., Antibacterial effects of chitosan-based hydrogels containing *Trachyspermum ammi* essential oil on pathogens isolated from dogs with otitis externa, *BMC Vet. Res.*, **2024**, 20(1): 130, doi: 10.1186/s12917-024-03971-7.

Lista de lucrări științifice publicate

1. Joița F.A., Mititelu M., Musuc A.M., Oprea E., Marinescu F., Lupuliasa D., Hîncu L., Nicolescu T.O., Pop A.L., Popescu I.O., Investigation of antimicrobial activity and rheological properties of chitosan- and alginate- based hydrogels enriched with volatile oils for biomedical applications, *Farmacia*, **2024**, Vol. 72, 3, doi: 10.31925/farmacia.2024.3.7.
2. Joița F.A., Eliza O., Musuc A.M, Mititelu M., Marinescu F., Lupuliasa D., Hîncu L., Roșca A.C., Boroghină S.C., Popescu I.O., Development of antimicrobial hydrogels using alginate-chitosan matrix enhanced with essential oils, *Farmacia*, **2024**, Vol. 72, 4, doi: 10.31925/farmacia.2024.4.19.