

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL FARMACIE

**Noi oportunități terapeutice în tratamentul bolii venoase
cronice – nanoformulări cu extracte vegetale**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. GÎRD CERASELA-ELENA**

**Student-doctorand:
UNGUREANU ANDREEA ROXANA**

2024

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

Listă cu lucrările științifice publicate	iv
Listă abrevieri și simboluri	v
INTRODUCERE	2
1. ASPECTE GENERALE DESPRE BOALA VENOASĂ CRONICĂ	4
1.1. Generalități.....	4
1.2. Mecanisme fiziopatologice	5
1.2.1. Endoteliul vascular.....	5
1.2.2. Musculatura netedă vasculară	7
1.2.3. Procese la nivel dermic	8
1.3. Posibilități terapeutice.....	8
1.4. Implicațiile derivatelor vegetale în tratamentul bolii venoase cronice	11
2. NANOTEHNOLOGII CU DERIVATE VEGETALE ȘI APLICAȚII TOPIC- TRANSDERMICE	14
2.1. Implicațiile derivaților naturali în domeniul nanotehnologiei	14
2.2. Calea topic-transdermică	15
2.3. Aplicații cu nanoformulări topic-transdermice	19
3. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA PRELIMINARĂ A UNOR EXTRACTE VEGETALE CU POTENȚIALĂ ACȚIUNE VASO- ȘI VENOPROTECTOARE	25
3.1. Procedeele tehnologice de obținere a extractelor vegetale – linie pilot	25
3.2. Determinarea calității extractelor vegetale obținute	26
3.2.1. Screening calitativ prin spectrometrie de masă prin rezonanță ciclotronică cu transformată Fourier (FTICR-MS).....	26
3.2.2. Determinări cantitative spectrofotometrice	31
3.2.3. Analiza cromatografică UHPLC-HRMS/MS	35
3.2.4. Stabilitatea extractelor	44
4. CERCETĂRI <i>IN VITRO</i> , <i>IN VIVO</i> ȘI <i>IN SILICO</i>	48

4.1. Determinarea acțiunii antioxidante <i>in vitro</i>	48
4.1.1. Metoda reducerii fierului (FRAP).....	48
4.1.2. Metoda inhibării radicalului 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).....	49
4.1.3. Metoda inhibării radicalului 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) (ABTS)	50
4.1.4. Corelații între activitatea antioxidantă și conținutul de principii active.....	52
4.2. Activitatea asupra matrix metaloproteinazelor <i>in silico</i>	53
4.3. Studii de citotoxicitate	57
4.3.1. Determinări <i>in vitro</i> pe linii celulare endoteliale.....	57
4.3.2. Determinări <i>in vivo</i> – test BSLA.....	59
4.3.3. Determinări de citotoxicitate <i>in silico</i>	62
5. STUDIUL PRELIMINAR AL INTEGRĂRII EXTRACTELOR ÎN NANOFORMULĂRI ȘI DEZVOLTĂRII UNUI PROTOTIP DE PRODUS FARMACEUTIC TOPIC- TRANSDERMIC	71
5.1. Procedeele de obținere a nanoformulărilor și determinarea pH-ului	71
5.2. Determinarea capacității de întindere	72
5.3. Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier în reflexie total atenuată (ATR-FTIR)	74
5.4. Analiza prin difractometrie de raze X (XRD).....	96
5.5. Analiza prin microscopie de forță atomică (AFM).....	98
5.6. Analiza posibilității de impregnare pe materialul ciorapului compresiv	108
5.7. Analiza termogravimetrică (TGA).....	109
CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	114
BIBLIOGRAFIE	118
ANEXE.....	131

INTRODUCERE

Boala venoasă cronică este una dintre cele mai frecvente afecțiuni vasculare, stadiul adaptativ-evolutiv tradus prin poziția bipedă a corpului uman fiind unul dintre principalii determinanți. Manifestările clinice sunt adesea ignorate în fazele incipiente sau se încadrează în contextul altor afecțiuni, de aceea boala progresează la cele mai avansate stadii (ex. cordoane varicoase, ulcerații). Toate semnele și simptomele sunt consecința dezechilibrelor metabolismului celular și se rezumă prin favorizarea statusului prooxidant, procoagulant și proinflamator. Modalitățile terapeutice sunt variate, dar se ajunge adesea la metode invazive care duc la recurențe. Sursele vegetale au reprezentat dintotdeauna un punct de plecare către remedii pentru patologii vasculare. Dintre toate s-au remarcat flavonoidele care sunt principala recomandare a ghidurilor terapeutice. De asemenea, terapia compresivă ocupă un loc aparte, iar alături de administrarea flavonoidelor se recomandă și în scop profilactic sau după terapiile invazive.

Asocierea mai multor forme de terapie și a mai multor substanțe/principii active, cu scopul anihilării cât mai cuprinzătoare a mecanismelor fiziopatologice, reprezintă o premisă pentru cercetare. Aderența pacienților la tratament este un aspect primordial în succesul terapeutic. Aceasta poate fi îmbunătățită prin conceperea unor formulări cu administrare facilă, pe căi ușor accesibile și neinvazive cum ar fi calea transdermică, care s-ar putea utiliza concomitent cu materialele compresive (bandaje/ciorapi compresivi).

Demersul de cercetare prezent are la bază următoarele obiective principale: analiza stadiului actual al cunoașterii cu selecția unor surse vegetale cu implicații terapeutice; obținerea de extracte și caracterizarea fitochimică (calitativă, cantitativă); studiul stabilității extractelor; evidențierea potențialului terapeutic (activitatea antioxidantă, potențialul de interacțiune cu ținte la nivel celular); analiza citotoxicității (*in vivo*, *in vitro* și *in silico*); integrarea extractelor în nanoformulări cu biopolimeri; caracterizarea fizico-chimică a formulărilor; investigarea posibilității de funcționalizare a unui material compresiv; diseminarea rezultatelor obținute în literatura de specialitate.

În acest context, lucrarea de față reprezintă o etapă preliminară de investigare a posibilității dezvoltării unui produs farmaceutic complex ca prim pas către noi oportunități terapeutice pentru tratamentul bolii venoase cronice.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. ASPECTE GENERALE DESPRE BOALA VENOASĂ CRONICĂ

În cadrul acestui capitol s-a stabilit contextul general al bolii venoase cronice, completat de mecanismele prin care se dezvoltă afecțiunea la nivelul endoteliului vascular, musculaturii netede vasculare precum și la nivel dermic. S-au descris principalele posibilități terapeutice cuprinse în ghidurile de management precum și implicațiile derivatelor vegetale.

Definiția bolii venoase cronice este următoarea: orice anormalitate morfologică și funcțională a sistemului venos, de lungă durată, manifestată prin semne și simptome care indică necesitatea investigațiilor și/sau îngrijirii [1]. Stadializarea se realizează prin grila CEAP (Clinic Etiologic Anatomic Patofiziologic), conform ghidurilor terapeutice [2–4]. În România, conform unui studiu (desfășurat în perioada iunie-iulie 2015, publicat în 2018), prevalența este de 68.4%, cu incidența de 36.9% [5].

Fiziopatologia bolii venoase cronice este complexă, se rezumă prin declanșarea și autoalimentarea proceselor oxidative, inflamatoare și procoagulante. Mecanismele din cadrul acestei cascade patologice acționează, uneori concomitent, alții succesiv în sens degradativ (figura 1.1.). Dezechilibrul de la nivel endotelial progresează până la distrucție dermică (necroză tisulară).

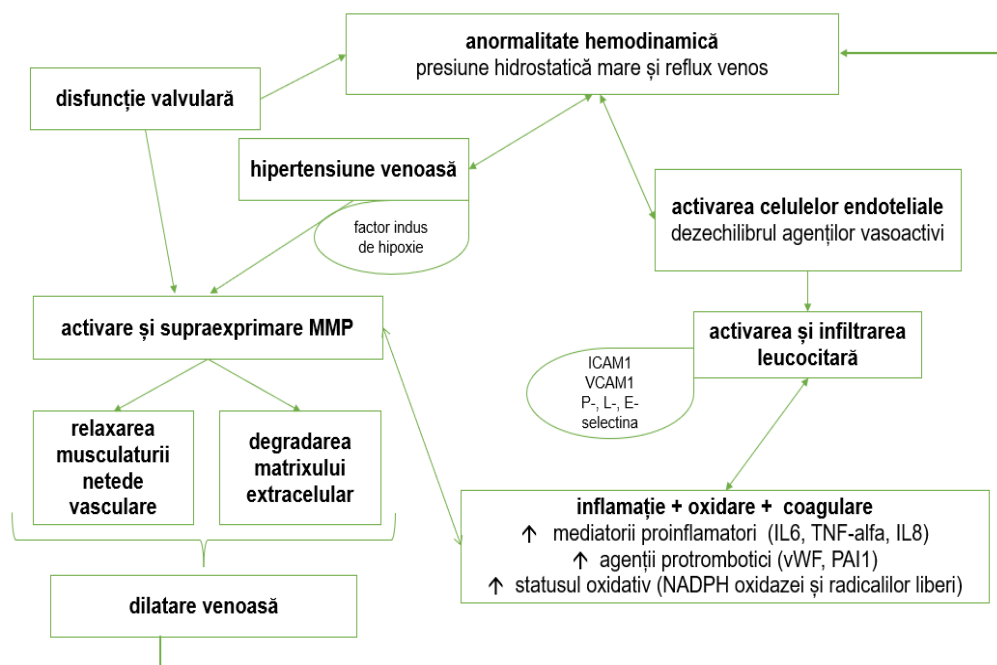


Figura 1.1. Afecțarea vasculară în boala venoasă cronică, adaptare după Mansilha et al. [6].

În ceea ce privește măsurile terapeutice, acestea sunt variate și se stabilesc în funcție de stadiul afecțiunii. Terapia compresivă este de primă intenție (clasa de recomandare I, nivel de evidență A/B) [2]. Din punct de vedere farmacologic, ca medicație de bază se utilizează

fracțiunile flavonoidice purificate și micronizate (MPFF) (clasa de recomandare IIa, nivel de evidență A) [2]. Dintre terapiile invazive, aplicate în fazele mai avansate, se remarcă următoarele: scleroterapia (cu lichid sau cu spumă) [7], terapia cu laser (EVLA) [6], ablație endovenoasă [8], terapia chirurgicală: stripping sau tehnica de ligaturare CHIVA [9,10]. Pentru stadiile însoțite de ulcerări cronice se practică debridare și administrare de antibiotice.

MPFF rămân un standard în tratamentul bolii venoase cronice [11], dar se iau în considerare și alte terapii pe baza de surse naturale (ex. extract de *Ruscus* [12], extract de castan [13–15], extract de frunze de viță de vie roșie [16], complexe de hidroxietilrutozide [17,18]).

Implicațiile surselor vegetale în tratament se pot rezuma astfel:

- activitate antioxidantă: captarea radicalilor liberi (ex. oxigen singlet, superoxid, hidroxil, peroxizi), chelatarea ionilor metalici (ex. Fe^{2+} , Fe^{3+}), inhibarea enzimelor catalizatoare (ex. xantin-oxidaza), regenerarea sistemelor antioxidante proprii celulelor [19];
- activitate antiinflamatoare: blocarea sistemelor de semnalizare pentru procesele inflamatorii, inhibarea enzimelor cu rol în stimularea monocitelor și neutrofilelor pentru a produce citokine (ex. protein-kinaza tirozinei este inhibată de genisteină, iar beta-glucuronidazele sunt inhibate puternic de luteolină, kaempferol, apigenină, quercetină) [20], inhibarea ciclooxigenazelor (COX1, COX2), lipooxigenazei (LOX) și iNOS cu scăderea producției de citokine proinflamatorii (IL6, IL1-beta, IL8) și TNF-alfa, inhibarea factorului nuclear NF-kB [21];
- activitatea antitrombotică: inhibarea expresiei moleculelor de adeziune ICAM1 și VCAM1, inhibarea factorului de activare plachetară (PAF) (ex. ginkgolida B [22]), interferențe cu receptorii GPIIb/IIIa (ex. naringenină, naringină, cumarină, esuletină, fraxetină [23])
- alte acțiuni: restabilirea tonusului venos prin echilibrul vasoconstricție-vasodilatație (ex. inhibarea metabolizării COMT), inhibarea producției excesive de ET1, efecte stabilizatoare asupra colagenului pentru a preveni deformarea vasculară [22,24,25], favorizarea drenajului veno-limfatic [24], vindecarea leziunilor (ex. quercetina [26], extractele de *Calendulae flos* [27,28] sau *Centella asiatica* [22,26]), reducerea activității matrix metaloproteinazelor (ex. rutozidă, diosmină [29]).

Astfel, sursele vegetale s-au dovedit intens studiate pentru tratamentul afecțiunilor vasculare și constituie o pistă de continuă cercetare.

2. NANOTEHNOLOGII CU DERIVATE VEGETALE ȘI APLICAȚII TOPIC-TRANSDERMICE

Capitolul conturează implicațiile surselor vegetale în nanotehnologie, aspecte generale privitoare la calea topic-transdermică și exemplificări prin aplicații raportate în literatura de specialitate.

S-au dezvoltat mai multe nanosisteme cu derivați naturali [30]: nanoparticule (nanosfere, nanocapsule, nanoparticule lipidice solide - SLN, cărăuși lipidici nanostructurați - NLC), lipozomi convenționali sau acoperiți cu chitosan și/sau pectină (ex. liposomi secundari și terțiari [31]), etozomi, transferzomi, invazomi, niozomi. S-au integrat diferite tipuri de extracte: apoase (ex. provenind de la *Centella asiatica*, (nanoparticule), *Hibiscus sabdariffa* (lipozomi), *Camelia sinensis* (nanoemulsie)), alcoolice (ex. provenind de la *Curcuma longa* (lipozomi, etozomi, transferzomi), *Fraxinus angustifolia* (etozomi), *Vitis vinifera* (nanoemulsii)), hidroalcoolice (ex. provenind de la *Polygonum aviculare* (lipozomi), *Glycine max* (nanoemulsii), *Salvia officinalis* (nanoparticule)) și uleioase (ex. provenind de la *Eucalyptus camadulensis* (lipozomi), *Artemisia arborescens* (lipozomi), *Melaleuca alternifolia* (nanoemulsie)) [32]; nanoformulări particulare denumite fitozomi (silibina (hepatoprotector), curcumină (anticanceros), naringerină (antioxidant), quercetină (antioxidant) [33,34]).

Dezvoltarea nanosistemelor destinate administrării topic-transdermice a luat amploare având la bază două argumente importante: cale neinvazivă cu grad mare de aderență a pacienților la tratament, mai ales în cazul afecțiunilor cronice și asigurarea eliberării substanței active la locul de acțiune mai ales pentru afecțiuni dermatologice [35]. Există trei posibilități de penetrare: intercelular, transcelular, transfolicular. Calea transfoliculară a fost mult timp considerată o cale mai puțin importantă deoarece foliculii piloși reprezintă doar 0.1% din suprafața pielii [36–38], dar s-a constatat că pot fi rute de permeație sau de depozit [36]. Cele mai avansate nanoformulări aflate în cercetare sunt de tipul celor ultradeformabile precum: transferzomii, invazomii, niozomii, etozomii, vizându-se integrarea acestora în formulări farmaceutice complexe (ex. geluri, microace cu transferzomi [39]).

Majoritatea studiilor s-au concentrat pe realizarea și analiza nanoformulărilor cu principii active izolate (ex. quercetină [40], rutozidă [41]), mai puțin pe extracte ca fitocomplex. Rezultatele acestora evidențiază perspective semnificative de cercetare în acest sens.

CONTRIBUȚII PERSONALE

3. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA PRELIMINARĂ A UNOR EXTRACTE VEGETALE CU POTENȚIALĂ ACȚIUNE VASO- ȘI VENOPROTECTOARE

Partea experimentală debutează cu obținerea de extracte pornind de la sursele vegetale selectate *Sophorae flos*, *Ginkgo bilobae folium*, *Meliloti herba*, *Calendulae flos*, urmată de analiza calitativă și cantitativă a extractelor rezultate cu scopul evidențierii principiilor active de interes terapeutic.

3.1. Procedeele tehnologice de obținere a extractelor vegetale – linie pilot

Materiale și metodă

S-a practicat o extracție la reflux, cu etanol 80 % (*Sophorae flos*, rutozida are solubilitate mai bună în alcool mai concentrat [42]), respectiv etanol 70% (*Ginkgo bilobae folium*, *Meliloti herba* și *Calendulae flos*) urmată de rotavaporizare și liofilizare.

Rezultate și discuții

S-au obținut extracte uscate tip pulberi amorfe cu proprietăți organoleptice particulare, în funcție de sursa vegetală de la care provin.

3.2. Determinarea calității extractelor vegetale obținute

Activitatea experimentală desfășurată urmărește identificarea și cuantificarea principalilor fitoconstituenți.

3.2.1. Screening calitativ prin spectrometrie de masă prin rezonanță ciclotronică cu transformată Fourier (FTICR-MS)

Materiale și metodă

S-a utilizat sistemul FTICR-MS solarix-XR QQQ FTICR HR (Bruker Daltonics) cu magnet superconductor 15T [43,44], ionizare prin electrospray (ESI negativ, ESI pozitiv), probe lichide obținute prin dizolvarea extractelor în apă și în metanol. S-au generat șabloane de ionizare folosind software-ul Bruker Compass Data Analysis. Compușii au fost identificați în spectrogramele rezultate din analiză prin comparație cu șabloanele de ionizare [43].

Rezultate și discuții

Cei mai mulți compuși s-au identificat în extractul de *Meliloti herba* (16 compuși: rutozida, robinina, kaempferol-O-glucozida, kaempferol-O-rutinozida, isoquercitrina/hyperozida, acid cumaric, acid melilotic, medicarpina, apigetrina/afzelina, acid ferulic, isorhamnetina/rhamnetina, fisetina/kaempferol/luteolina, quercetina, quercitrin-O-rutinozida, acid rosmarinic, daidzeina/chrisina), urmat de extractul de *Ginkgo bilobae folium*

(12 compuși: rutozida, bilobalid, quercetina, ginkgolide (A, B, C), kaempferol, isoquercitrina, isorhamnetina/rhamnetina, catechina, bilobetina, acid cafeic), apoi extractul de *Calendulae flos* (10 compuși: rutozida, narcissina/calendoflavozida, thyphaneozida, acid clorogenic, isoquercitrina, isorhamnetina/rhamnetina, quercetina, calendoflavozide (H, F/G, E)) și extractul de *Sophorae flos* (8 compuși: rutozida, quercetina, isorhamnetina/rhamnetina, kaempferol/fisetina, isoquercitrina, sophoricozida, kaikasaponina I, kaikasaponina III). Corelat cu datele din literatura de specialitate, acești compuși au multiple implicații în tratamentul bolii venoase cronice și oferă potențial terapeutic extractelor obținute. Ținând cont de apartenența compușilor identificați a mai multe clase fitochimice (acizi fenolcarboxilici, flavonoide, polifenoli) cercetările consecutiv derulate se bazează pe determinări cantitative pe clase fitochimice.

3.2.2. Determinări cantitative spectrofotometrice

Materiale și metodă

S-a utilizat spectrofotometrul Jasco V-530. Principiile metodelor sunt următoarele [45,46]:

- acizi fenolcarboxilici (AFC): formare de nitrozoderivați cu Reactiv Arnow și tautomerizarea la oxime de culoare roșie ($\lambda = 510 \text{ nm}$);
- flavone (FLV): formarea de chelați galbeni cu fluorescență galben-verzuie ($\lambda=427 \text{ nm}$) în prezența ionilor metalici trivalenți;
- polifenoli (PF): oxidarea polifenolilor sub acțiunea reactivului Folin-Ciocalteu (molibdowolfram, $\text{Na}_2\text{WO}_4/\text{Na}_2\text{MoO}_4$), colorație albastră ($\lambda=725 \text{ nm}$);

S-au realizat diluții succesive din probele de analizat, iar rezultatele s-au calculat pe baza curbelor etalon obținute în aceleași condiții experimentale.

Rezultate și discuții

Extractele analizate conțin cantități importante de principii active de interes (AFC, FLV, PF). Rezultatele urmează succesiunile: 1. AFC (echivalenți acid clorogenic): ES (17.1399%) > EC (3.8073%) > EG (2.1722%) > EM (1.6453%); 2. FLV (echivalenți rutozidă): ES (37.4473%) >> EM (3.0600%) > EG (2.3765%) > EC (2.0129%); 3. PF (echivalenți acid tanic): ES (28.4903%) > EG (7.2344%) > EC (4.9029%) [43]. Pentru extractul de *Meliloti herba* nu s-a putut determina conținutul de polifenoli prin metoda aplicată din cauza formării de precipitate abundente. Se observă în mod particular extractul de *Sophorae flos* la care valorile înregistrate sunt semnificativ mai mari față de restul extractelor, valabil pentru toate clasele de principii active analizate (mai ales flavone, valori de 10 ori mai mari).

3.2.3. Analiza cromatografică UHPLC-HRMS/MS

Materiale și metodă

S-a utilizat sistemul cromatografic Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 UHPLC cu software Chromeleon 7.2 (Thermo Fisher Scientific). Faza staționară: coloană C18 (l=150 mm, diametru 2.1 mm, dimensiunea particulelor 2.6 μm). Faza mobilă: A (apă ultrapură + 500 μL/L acid formic) și B (metanol + 500 μL/L acid formic). S-a aplicat eluție în gradient: 100% A 0-1 min; creștere liniară la 30% B 1-10 min; creștere liniară la 100% B 10-26 min cu menținere 4 min apoi scădere liniară la 0% B 30-32.5 min și menținere 2.5 min. Parametrii de lucru: volum probă 10 μL, debitul fazei mobile 0.3 mL/min, timp 35 min, temperatura 40°C.

Sistemul spectrometric de masă: spectrometru Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) cu sursă de ionizare prin electrospray (HESI-Heated ElectroSpray Ionization). Parametrii de ionizare: debitul gazului purtător (azot) 8 unități, debitul gazului auxiliar 6 unități, temperatura capilară și temperatura de încălzire a gazului auxiliar 300 °C, voltaj 2800 V, camera S și nivelul RF 50 [43,47]. S-a utilizat un software generator de șabloane de fragmentare (ACDLabs MS Fragmenter 2019.2.1) [43,47].

Rezultate și discuții

Analiza calitativă s-a derulat prin screening general raportat la o serie de aproximativ 150 compuși care ar putea fi prezenți în matricile vegetale, aparținând a diferite clase fitochimice.

În extractul de *Sophorae flos* s-au identificat 43 de compuși care aparțin claselor fitochimice astfel: 35 flavonoide (6-metoxiluteolina, afrormosina, apigenin-7-O-glucozilglucozida, apigenin-7-rutinozida, apigenina, chrisoeriol-7-glucozida, cinarozida (7-glucozida luteolului), diosmetina, florizina, formononetina, galocatechina/epigalocatechina, genistina, ginkgetina, glyciteina, hesperitina, hispidulin-7-rutinozida/izomeri, hispidulin-O-glucozida/izomeri, hyperozida (quercetin-3-galactozida), isoquercitrin/quercitrin (quercetin-3-rhamnozida), isorhamnetin-3-O-hexozida, isorhamnetin-3-O-rutinozida, kaempferol, kaempferol (sau luteolin)-O-glucozida/izomeri, miricetina, naringenina, naringina, pseudobaptigenina, quercetagetina (6-hidroxi-quercetina), quercetin-3-O-rutinozida, quercetina, rhamnozil-vitexina, robinina, rutozida (quercetin-3-rutinozida), sissotrin (biochanin-7-O-β-D-glucozida), sophoraflavanonă G/izomeri), 6 acizi carboxilici (acid azelaic, acid cafeoilshikimic, acid hidroxiferulic, acid p-cumaric, acid quinic, acid siringic) și două terpenoide (acid abscisic, calendulozida G/izomeri) [43].

Pentru extractul de *Ginkgo bilobae folium* (EG) s-au regăsit 42 de compuși, clasificați astfel: 32 flavonoide (2',6-dihidroxi-flavona, 6-metoxiluteolina, amentoflavona, apigenin-7-O-glucozilglucozida, apigenina, baptigenina, cinarozida (7-glucozida luteolului), chrisoeriol-7-

glucozida, daphnina, diosmetina, epicatechina, galocatechina/epigalocatechina, ginkgetina, gliciteina, hispidulin-O-glucozida/izomeri, hyperozida (quercetin-3-galactozida), isoquercitrina/quercitrina (quercetin-3-rhamnozida), isorhamnetin-3-O-glucozida, isorhamnetin-3-O-hexozida, isorhamnetin-3-O-rutinozida, kaempferol, kaempferol (sau luteolin)-O-glucozida/izomeri, naringenina, naringina, narirutina (naringenin-7-O-rutinozida), quercetin-3-O-rutinozida, quercetina, robinina, rutozida (quercetin-3-rutinozida), sophoraflavanona G/izomeri, tricina, vitexina (apigenin-8-C-glucozida)/isovitexina), nouă acizi carboxilici (acid azelaic, acid cafeoilshikimic, acid clorogenic, acid galic, acid hidroxiferulic, acid p-cumaric, acid quinic, acid siringic, cinarina (acid 1,5-di-O-cafeoilquinic)) și un compus terpenic (cinaropicrina) [43].

Extractul de *Meliloti herba* (EM) cuprinde 32 de compuși repartizați pe clase fitochimice astfel: 25 flavonoide (apigetrina (apigenin-7-glucozida), cirsimarina, crisina, cumestrol, daidzeina, diosmetin-7-O-rutinozida (diosmina), diosmetina, epicatechina, florizina, formononetina, hispidulina, hyperozida (quercetin-3-galactozida), irilona, kaempferol (sau luteolin)-O-glucozida/izomeri, kaempferol-3-O-rutinozida, liquiritigenina/isoliquiritigenina, medicarpina, naringenina, ononina, pratenseina, procianidina B1/B2, pseudobaptigenina, quercetin-3-O-rutinozida, robinina, rutozida (quercetin-3-rutinozida)), șase acizi carboxilici (acid azelaic, acid cafeoilshikimic, acid clorogenic, acid ferulic, acid p-cumaric, cinarina (acid 1,5-di-O-cafeoilquinic)) și un reprezentant sesquiterpenic (acid abscisic).

Pentru extractul de *Calendulae flos* (EC) s-au identificat 35 de compuși aparținând mai multor clase astfel: 17 flavonoide (apigenin-7-O-glucozilglucozida, apigenina, cinarozida (luteolin-7-glucozida), criosoeriol-7-glucozida, hispidulin-O-glucozida/izomeri, hyperozida (quercetin-3-galactozida), isoquercitrina/quercitrina (quercetin-3-rhamnozida), isorhamnetin-3-O-hexozida, isorhamnetin-3-O-rutinozida, kaempferol-3-O-rutinozida, kaempferol-O-glucozida/izomeri, naringenina, procianidina, quercetin-3-(6-malonil)-glucozida, quercetina, robinina, rutozida (quercetin-3-rutinozida)), 11 acizi carboxilici (acid azelaic, acid cafeic, acid cafeoilshikimic, acid clorogenic, acid cumaroylquinic/izomeri, acid ferulic, acid p-cumaric, acid quinic, acid sinapic, acid siringic, cinarina (acid 1,5-di-O-cafeoilquinic), cinci terpene (acid abscisic, calendulozida E/izomeri, calendulozida G/izomeri, carnosol, lactucopicrina) și două cumarine (cichorina, daphnina) [43].

Din punct de vedere cantitativ, s-au determinat preponderent compuși flavonoidici și acizi fenolcarboxilici. La extractul de *Calendulae flos* cele mai mari cantități sunt reprezentate de acidul clorogenic (20676.63 μg/g extract), isorhamnetină (11286.93 μg/g extract), rutozidă (2165.42 μg/g extract). În extractul de *Ginkgo bilobae folium* se observă cantități mari de

isorhamnetină (5032.60 µg/g extract), quercetină (4504.66 µg/g extract) și rutozidă (3907.47 µg/g extract). Extractul de *Meliloti herba* este bogat în rutozidă (5233.24 µg/g extract), hyperozidă (1318.87 µg/g extract) și acid p-cumaric (641.99 µg/g extract). Extractul de *Sophorae flos* are un conținut mare de rutozidă (104186.77 µg/g extract), isorhamnetină (97049.32 µg/g extract) și quercetină (46678.34 µg/g extract). Dintre toți compușii determinați cantitativ, cinci au fost cuantificați în toate extractele: acid p-cumaric (ES>EG>EM>EC), acid galic (ES>EG>EC>EM), hyperozida (ES>EM>EG>EC), rutozida (ES \cong 2×EM \cong 3×EG \cong 5×EC) și acidul abscisic (EM>ES>EG>EC).

Rezultatele înregistrate în cadrul analizei cromatografice confirmă compoziția chimică a extractelor care este adecvată implicațiilor acestora în tratamentul afectării vasculare.

3.2.4. Stabilitatea extractelor

Materiale și metodă

Stabilitatea s-a determinat prin analiza variației conținutului de principii active pe parcursul a 12 luni, cu o determinare intermediară la 8 luni. Determinările s-au realizat conform tehnicilor de lucru descrise pentru determinările spectrofotometrice. Analiza statistică: ANOVA și test t-Student, considerând semnificație statistică pentru $p < 0.05$.

Rezultate și discuții

Toate extractele analizate au dovedit o stabilitate relativ bună pe parcursul unei perioade de 12 luni de condiționare chiar dacă valorile cantităților de principii active au urmat scăderi semnificative statistic fie în primele 8 luni fie în ultimele 4 luni, dependent de extract și de cantitatea inițială de principii active. Pentru trei dintre extractele analizate (ES, EG, EC) polifenolii au avut cele mai importante variații. Deși acizii fenolcarboxilici pot fi considerați mai instabili, nu s-au înregistrat variații semnificative, posibil și prin concentrația mai mică a acestor principii active; doar la extractul ES s-a observat o variație mai mare, dar și cantitatea acestora este de câteva ori mai mare (5-8 ori) față de celelalte extracte. În cazul tuturor extractelor, flavonele au stabilitate bună, în ciuda variațiilor, acestea s-au menținut în intervale acceptabile.

4. CERCETĂRI *IN VITRO*, *IN VIVO* ȘI *IN SILICO*

Capitolul este structurat având la bază două direcții: 1. evaluarea implicațiilor terapeutice cu accent pe activitatea antioxidantă și inhibarea matrix metaloproteinazelor și 2. evaluarea citotoxicității având în vedere faptul că un aport citotoxic ar accentua mecanismele fiziopatologice ale bolii venoase cronice.

4.1. Determinarea acțiunii antioxidante *in vitro*

Acțiunea antioxidantă este primordială pentru impactul terapeutic al extractelor analizate. Se poate dezvolta pe mai multe căi, de aceea aplicarea mai multor metode de determinare conduce la o perspectivă de ansamblu asupra activității antioxidante [43].

Materiale și metodă

Analiza extractelor s-a derulat *in vitro* prin trei metode spectrofotometrice (Jasco V-530):

1. reducerea fierului (FRAP): reacția antioxidantului din probă cu Fe^{3+} pe care îl reduce la Fe^{2+} care imprimă colorație albastră ($\lambda=700$ nm) [43];
2. inhibarea radicalului 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH): reducerea radicalului liber DPPH (violet), la hidrazina corespunzătoare, de culoare galbenă ($\lambda=515$ nm) [43];
3. inhibarea radicalului 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) (ABTS): reducerea intensității culorii turcoaz a radicalului ABTS ($\lambda=734$ nm) [43];

Rezultate și discuții

Se remarcă extractul de *Sophorae flos*, cu cea mai mică concentrație necesară reducerii fierului, $\text{EC}_{50}=129.38$ $\mu\text{g/ml}$, urmat de extractul de *Calendulae flos*, cu valoarea $\text{EC}_{50}=437.00$ $\mu\text{g/ml}$, apoi de extractul de *Ginkgo bilobae folium*, $\text{EC}_{50}=480.55$ $\mu\text{g/ml}$, iar cea mai mare valoare aparține extractului de *Meliloti herba*, $\text{EC}_{50}=871.20$ $\mu\text{g/ml}$. Astfel, cea mai bună activitate antioxidantă obținută prin metoda FRAP aparține extractului de *Sophorae flos*, iar cea mai redusă este atribuită extractului de *Meliloti herba*. Din punct de vedere al inhibiției radicalului DPPH, cel mai bun efect inhibitor a fost înregistrat pentru extractul de *Sophorae flos* ($\text{IC}_{50}=94.78$ $\mu\text{g/ml}$), apoi extractul de *Ginkgo bilobae folium* ($\text{IC}_{50}=518.49$ $\mu\text{g/ml}$) și extractul de *Calendulae flos* ($\text{IC}_{50}=806.79$ $\mu\text{g/ml}$), iar cel mai redus efect pentru extractul de *Meliloti herba* ($\text{IC}_{50}=972.30$ $\mu\text{g/ml}$). Raportat la activitatea inhibitoare asupra radicalului ABTS, extractul de *Sophorae flos* înregistrează cea mai bună activitate ($\text{IC}_{50}=71.51$ $\mu\text{g/ml}$), urmat de extractul de *Ginkgo bilobae folium* ($\text{IC}_{50}=193.89$ $\mu\text{g/ml}$) și extractul de *Meliloti herba* ($\text{IC}_{50}=234.84$ $\mu\text{g/ml}$). Cea mai redusă activitate aparține extractului de *Calendulae flos* ($\text{IC}_{50}=369.34$ $\mu\text{g/ml}$) [43].

S-au realizat corelații între rezultatele determinărilor de principii active (prin UHPLC și spectrofotometrice) și cele înregistrate prin cele trei metode antioxidante *in vitro*. Raportat la conținutul flavonoidic (FLV) și cel polifenolic (PF) s-a înregistrat o corelație foarte puternică ($|r| > 0.9$) pentru toate metodele de evaluare a activității antioxidante. Raportat la acizii fenolcarboxilici (AFC) și rezultatele din determinarea UHPLC s-a obținut o corelație foarte puternică ($|r| > 0.9$) pentru FRAP și DPPH, respectiv o corelație puternică ($0.7 \leq |r| \leq 0.89$) pentru ABTS. Dintre cele trei metode aplicate, la metoda FRAP s-a remarcat corelație cu semnificație statistică raportat la determinarea prin UHPLC ($p = 0.004$, $p < 0.05$) precum și la determinarea acizilor fenolcarboxilici ($p = 0.022$, $p < 0.05$) și flavonelor ($p = 0.047$, $p < 0.05$). Chiar dacă nu toate corelațiile evaluate au semnificație statistică, s-au observat corelații foarte puternice și puternice între aceste metode ceea ce confirmă importanța determinării activității antioxidante prin mai multe metode [43].

S-au remarcat valori negative ale coeficientului Pearson între conținutul de compuși activi și activitatea antioxidantă, sugerând o corelație inversă. Astfel, valoarea concentrației inhibitoare asupra proceselor oxidative (apreciată prin IC_{50} sau EC_{50}) este cu atât mai mică cu cât extractul conține o cantitate mai mare de compuși activi, imprimând o acțiune antioxidantă superioară.

4.2. Activitatea asupra matrix metaloproteinazelor *in silico*

Conform datelor din literatură, afectarea din boala venoasă cronică duce la nivel crescut al expresiei și activității matrix metaloproteinazelor. Chiar dacă intervenția MMP este importantă în procesul de reepitelizare, o supraexprimare a acestora facilitează procesele patologice [43]. În acest context, se propune evaluarea activității unor componente ale extractelor la nivelul MMP.

Materiale și metodă

S-au pregătit pentru andocare (YASARA Structure [48]) structurile cristaline ale domeniilor catalitice pentru proteinele țintă în complex cu inhibitori cunoscuți: MMP-1 (PDB ID: 1HFC, rezoluție 1.50 Å [49]), MMP-2 (PDB ID: 1HOV [50]), MMP-3 (PDB ID: 4G9L, rezoluție 1.88 Å [51]), și MMP-9 (PDB ID: 1GKC, rezoluție 2.30 Å [52]). S-a pregătit librăria virtuală a compușilor identificați, pe baza codurilor SMILES din PubChem. S-au generat structuri 3D folosind DataWarrior 5.2.1 [53], s-a utilizat algoritmul de andocare AutoDock Vina v1.1.2 [54]. Interacțiunile moleculare precise între liganzi și proteinele țintă s-au analizat prin BIOVIA Discovery Studio Visualizer (versiunea 17.2.0, Dassault Systemes, 2016).

Rezultate și discuții

Inhibarea matrix metaloproteinazelor are la bază în principal interacțiunea cu zincul catalitic. Cu toate că rhamnetina nu a avut interacțiune directă cu zincul catalitic, a înregistrat cea mai mare afinitate prezisă față de MMP-1. Sophoricozida a avut cea mai bună afinitate față de celelalte izoforme (MMP-2, MMP-3, MMP-9), dar a format legături metalice doar cu zincul catalitic al izoformei MMP-9. Șapte fitocompuși au interacționat cu zincul catalitic pentru MMP-1 (calendoflavozida, calendulozida G, isoquercitrina, kaikasaponina III, acidul clorogenic, narcissina, sophoricozida) și pentru MMP-2 (narcissina, calendoflavozida, calendulozida G și H, kaikasaponina III, ginkgolida B și rutozida). Legături cu zincul catalitic din MMP-3 au realizat zece compuși: calendulozidele (E, F, G), narcissina, thyphaneozida, ginkgolida C, isoquercitrina, kaikasaponina III, catechina și rutozida. Cele mai multe interacțiuni cu zincul catalitic s-au înregistrat pentru MMP-9 realizate de 12 fitocompuși: calendoflavozida, thyphaneozida, narcissina, calendulozidele (E, F, G), ginkgolidele (A, B, C), kaikasaponina I, rutozida și sophoricozida. Dintre toți fitocompușii studiați, narcissina și calendulozida G au realizat interacțiuni cu zincul catalitic la nivelul tuturor celor patru izoforme MMP analizate. Așadar, fiecare fitocompus are o afinitate diferită și stabilește un sistem propriu de legături cu diverse tipuri de MMP. În afectarea din boala venoasă cronică intervin mai multe izoforme de MMP, iar extractele vegetale, asimilate ca fitocomplexe de compuși activi, pot inhiba izoformele MMP prin polivalența interacțiunilor dezvoltate de constituenții lor [43].

4.3. Studii de citotoxicitate

Un dezechilibru adițional produs prin administrarea unor substanțe citotoxice trebuie evitat pentru a nu propaga distrucția endotelială. Studiile de citotoxicitate sunt utile pentru compușii naturali izolați, dar mai ales pentru extractele vegetale care sunt fitocomplexe [55]. Unii compuși activi (ex. flavonele) își pot manifesta activitatea bidirecțional. Pot fi atât antioxidanți cât și prooxidanți, dependent de concentrație, tip de celule, condiții de cultură celulară sau context patologic preexistent [55,56]. Astfel, citotoxicitatea extractelor a fost studiată, în cercetarea curentă, pe trei căi: *in vitro*, *in vivo*, *in silico*.

Materiale și metodă

1. *in vitro*: studiul pe linii celulare endoteliale tip HPAEC (*Primary Pulmonary Artery Endothelial Cells*, ATCC, PCS-100-022) prin testare MTT cu formare de formazan violet colorimetrabil (Tecan Infinite 200 Pro reader, $\lambda = 570$ nm) [55];
2. *in vivo*: testul BSLA – *Brine Shrimp Lethality Assay* care utilizează specia *Artemia salina* (protocol ARTOXKIT), s-au urmărit trei tipuri de efecte: letale, comportamentale și citologice [55];

3. *in silico*: predicția difuziunii prin membrana celulară: s-a realizat cu PerMM (*Permeability of Molecules across Membranes*) [57]; simulări de andocare având ca ținte caspaza-3 (PDB ID: 1QDU [58]), caspaza-8 (PDB ID: 1F9E [59]) ca homodimeri în complex cu inhibitori peptidici și heterodimerul c-Myc/Max în complex cu ADN (PDB ID: 1NKP [60]) preluate din baza de date RCSB PDB [61].

Rezultate și discuții

Asupra liniilor celulare HPAEC extractul de *Ginkgo bilobae folium* este cel mai citotoxic ($IC_{50}=11.17 \mu\text{g/ml}$), urmat de extractul de *Sophorae flos* ($IC_{50}=44.37 \mu\text{g/ml}$), apoi de extractul de *Calendulae flos* ($IC_{50}=66.43 \mu\text{g/ml}$), iar cel mai puțin citotoxic s-a dovedit extractul de *Meliloti herba* ($IC_{50}=136.87 \mu\text{g/ml}$).

Chiar dacă prin test BSLA, din punct de vedere citologic s-au observat deformări ale corpului și incluziuni celulare, extractele analizate nu au afectat viabilitatea larvelor de *Artemia salina* la concentrații sub $1200 \mu\text{g/mL}$, așadar pot fi considerate netoxice [55].

Rezultatele studiilor *in silico* evidențiază permeabilitate mică pentru: calendoflavozidă, calendulozide (G, H), acid clorogenic, rutozidă, sophoricozidă, iar permeabilitate mai bună pentru: calendulozide (E, F), isorhamnetină, ginkgolide (A,B,C), bilobalid, bilobetină, quercetină. După difuziune prin membrană, compușii analizați se localizează la nivel mitocondrial. De asemenea, s-au evidențiat interacțiuni cu componente ale căii apoptotice: caspaza-3, caspaza-8 și heterocomplexul c-Myc-Max [55].

Analiza curentă s-a axat mai mult pe citotoxicitatea compușilor din extractul de *Ginkgo bilobae folium*, deoarece conform rezultatelor *in vitro* (HPAEC) și *in vivo* (BSLA) s-a dovedit cel mai citotoxic, astfel bilobalidul și bilobetina au dovedit potențial de activatori ai caspazei-3, iar ginkgolidele de inhibitori. De remarcat sunt și compușii din extractul de *Calendulae flos*: calendulozidele au avut potențial citotoxic (activatoare ale caspazelor), însă prezența lor în fitocomplex nu pare a imprima citotoxicitate marcantă întrucât extractul de *Calendulae flos* a fost cel mai puțin citotoxic conform analizelor *in vivo* (BSLA) și slab citotoxic *in vitro* (HPAEC), comparativ cu celelalte extracte. Quercetina, isorhamnetina și rutozida, prezente în toate extractele obținute, pot imprima citotoxicitate, dar conform rezultatelor *in silico* au implicații limitate în acest sens.

Așadar, extractele analizate pot fi considerate adecvate integrării în forme farmaceutice complexe pentru valorificarea potențialului lor terapeutic.

5. STUDIUL PRELIMINAR AL INTEGRĂRII EXTRACTELOR ÎN NANOFOMULĂRI ȘI DEZVOLTĂRII UNUI PROTOTIP DE PRODUS FARMACEUTIC TOPIC-TRANSDERMIC

Acest capitol conturează includerea extractelor în nanofomulări pe bază de biopolimeri (PHB, PLGA), caracterizarea fizico-chimică a formulărilor și analiza posibilității de impregnare pe suprafața unui ciorap compresiv.

5.1. Procedeele de obținere a nanofomulărilor și determinarea pH-ului

Materiale și metodă

Formulările cu extracte s-au realizat prin emulsionare ulei-apă și evaporarea solventului. Faza uleioasă: polimerul formator de nanoparticule (PHB, PLGA, amestec PHB:PLGA 1:1 m/m, Merck) dizolvat în cloroform. Faza apoasă: ES, EM, EC, EG și amestec de extracte 1:1:1:1 dizolvat în etanol. Peste amestecul celor două faze se adaugă 100 ml alcool polivinilic 3%. Evaporarea solventului se realizează prin menținere timp de două ore la 1000 rpm (agitator magnetic) [62]. S-a determinat pH-ul utilizând hârtie indicator (Merck).

Rezultate și discuții

Se obțin 15 probe tip suspensii cu particule dispersate în alcool polivinilic. Prin uscarea în strat subțire pe suprafață plană la temperatura camerei (12h) rezultă un film polimeric încărcat cu particule extract-biopolimer. Toate probele obținute au pH 5.5, valori compatibile pentru administrare topic-transdermică [63].

5.2. Determinarea capacității de întindere

Materiale și metodă

S-a aplicat metoda Ojeda-Arbussa: dispozitiv alcătuit din două plăci suprapuse, cu gradație milimetrică pe partea externă a plăcii inferioare. [63,64]. Se calculează suprafața pe care se etalează proba sub acțiunea greutatea.

Rezultate și discuții

Din punct de vedere al biopolimerilor, probele cu PHB au avut capacitate de întindere mai bună față de cele cu PLGA. Cea mai mare suprafață de etalare s-a remarcat pentru proba EC-PHB ($141.72 \pm 7.24 \text{ cm}^2$). Asocierea PHB cu PLGA în amestecul polimeric reduce extensibilitatea PHB, valorile corespunzătoare formulărilor cu PHB-PLGA 1:1 fiind intermediare (PHB>PHB-PLGA>PLGA) [63]. Din punct de vedere al extractelor, probele cu EC și EG au avut capacitate de întindere mai bună față de cele cu EM și ES. Grupele hidroxilice (-OH) și carboxilice (-COOH) prezente în moleculele fitoconstituenților care alcătuiesc extractele pot avea contribuție semnificativă asupra extensibilității prin formare de legături cu

lanțurile polimerice. De asemenea, moleculele compușilor naturali au dimensiune mare și prin interacțiune sterică pot afecta conformația și flexibilitatea lanțurilor polimerice [65,66].

Chiar dacă s-au remarcat variații în funcție de biopolimer și de extract, toate probele prezintă capacitate de întindere adecvată etalării pe piele și pe suprafața materialului ciorapului compresiv.

5.3. Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier în reflexie total atenuată (ATR-FTIR)

Materiale și metodă

Analiza FTIR s-a realizat utilizând spectrofotometrul JASCO FTIR-4200 cu accesoriu ATR-PRO450-S (Tokyo, Japonia). Înregistrarea spectrelor s-a realizat în domeniul numerelor de undă 4000-400 cm^{-1} , rezoluție de 4 cm^{-1} [63,67].

Rezultate și discuții

Specetrele componentelor de bază ale formulărilor se redau în figura 5.1.

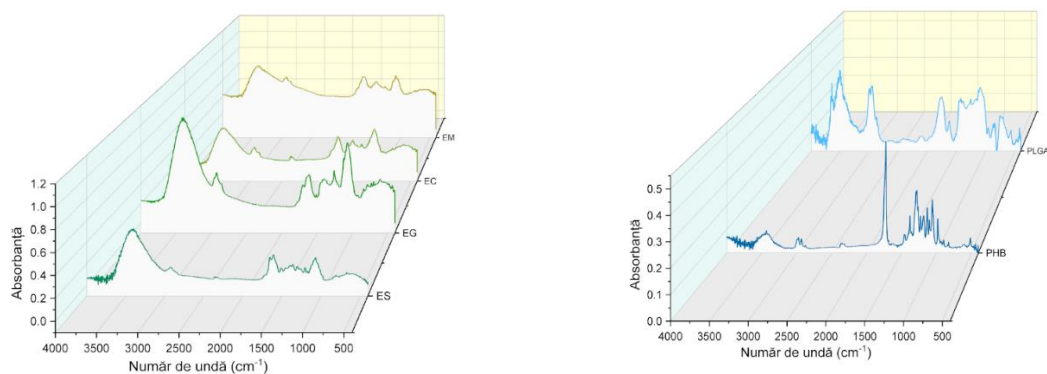
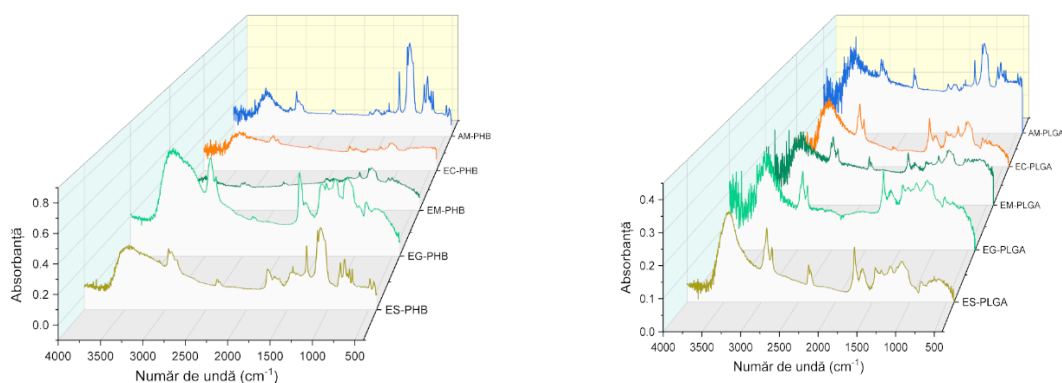


Figura 5.1. Spectrele ATR-FTIR caracteristice componentelor de bază ale formulărilor. ES = extract *Sophorae flos*; EG = extract *Ginkgo bilobae folium*; EM = extract *Meliloti herba*; EC = extract *Calendulae flos*; AM = amestec extracte 1:1:1:1; PHB = polihidroxitbutirat; PLGA = acid polilactic co-glicolic.

Specetrele formulărilor se redau în figura 5.2.



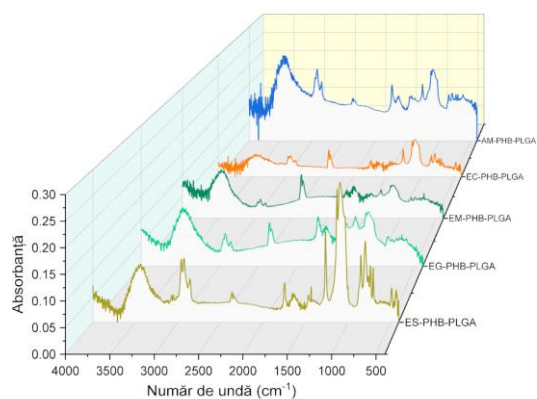


Figura 5.2. Spectrele ATR-FTIR caracteristice formulărilor extract-biopolimer. ES = extract *Sophorae flos*; EG = extract *Ginkgo bilobae folium*; EM = extract *Meliloti herba*; EC = extract *Calendulae flos*; AM = amestec extracte 1:1:1:1; PHB = polihidroxibutirat; PLGA = acid polilactic co-glicolic.

Tratând spectrele comparativ: spectrele compușilor de bază ai formulărilor vs. spectrul formulării se pot observa modificări de intensitate ale picurilor. Interacțiunile între extracte și biopolimeri pot fi variate având în vedere fitocomplexul care definește extractul și se traduc prin modificarea nivelelor vibraționale. Totodată se remarcă atât deplasări ale picurilor la numere de undă mai mari cât și la numere de undă mai mici. Spre exemplu, în cazul formulării ES-PHB, pentru regiunea $4000\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$, picurile caracteristice vibrației O-H pentru ES (3407.9 cm^{-1}) și pentru PHB (3430.1 cm^{-1}) au ambele valoare inferioară picului formulării ES-PHB (3461.7 cm^{-1}). Dintre toate formulările obținute, cea mai vizibilă reducere în intensitate a benzilor se remarcă la formulările cu EC. Se poate explica pe baza conținutului mare de acid clorogenic (determinat prin analiza UHPLC-HRMS cantitativ), care prin prezența grupelor carboxil ($-\text{COOH}$) poate fi implicat în mai multe interacțiuni cu polimerii rezultând în reducerea intensității picurilor grupărilor $-\text{OH}$. Toate aceste deplasări ale picurilor sugerează interacțiuni între extracte și biopolimeri cu posibilitatea formării de complexe (traduse prin modificări ale intensității picurilor) sau aducți (evidențierea unor noi picuri sau modificări majore ale picurilor deja existente care indică noi legături).

5.4. Analiza prin difractometrie de raze X (XRD)

Materiale și metodă

Analiza s-a realizat cu difractometrul Rigaku Ultima IV (Rigaku Co., Tokyo, Japonia) în câmp geometric paralel cu radiație $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5406\text{ \AA}$), fantă de divergență 1.00 mm cu limitare la 10 mm , analiză 2θ între 10° și 60° , la viteză de $2^\circ/\text{min}$ cu pas la 0.02° . Analiza s-a realizat pe probele în film polimeric [63,67].

Rezultate și discuții

S-a evidențiat obținerea unor formulări predominant amorse. Lipsa organizării moleculare cristaline poate constitui un avantaj prin solubilizarea mai bună și eliberarea mai rapidă a componentei active din structură, comparativ cu formulările cristaline [68]. Rezultatele sunt în concordanță cu cele raportate în literatură, spre exemplu s-a observat că atât quercetina cât și

catechina, compuși regăsiți și în extractele analizate, interacționează cu polimerii fiind dispersați în matricea polimerică în fază necristalină [69].

5.5. Analiza prin microscopie de forță atomică (AFM)

Materiale și metodă

Analiza s-a derulat utilizând microscopul de forță atomică XE-100 (Park Systems Corporate) cu scanner XY/Z decuplat și vârf NSC36B (MicroMasch) operat în mod non-contact, cu următoarele caracteristici: raza curburii mai mică de 8 nm, unghi de con complet de 40°, lungimea de 90 μm, lățimea de 32 μm, grosimea de 1 μm, înălțimea de 15 μm, cu frecvența de rezonanță de 130 kHz. Înregistrarea imaginilor s-a realizat cu programul XEI (v 1.8.0, Park Systems) [63,70].

Rezultate și discuții

Rezultatele confirmă ipoteza obținerii unor nanoformulări și conturează o perspectivă complexă asupra acestora.

Dintre formulările cu PHB, ES-PHB are aspectul cel mai compact și mai uniform, EM-PHB, EG-PHB, EC-PHB fiind caracterizate de pori mai mari, iar pentru AM-PHB se observă nanostructuri cu margini neregulate tip agregate. Rugozitatea variază astfel: EC-PHB>EM-PHB>AM-PHB>ES-PHB>EG-PHB (scala 8×8 μm²) și AM-PHB>EC-PHB>ES-PHB>EM-PHB>EG-PHB (scala 2×2 μm²).

Pentru formulările cu PLGA, ES-PLGA și EM-PLGA prezintă nanostructuri mari (400-500 nm), iar EG-PLGA și EC-PLGA nanoparticule mici (30-40 nm). Cea mai mare valoare pentru rugozitate aparține ES-PLGA la ambele scale analizate, indicând cea mai rugoasă suprafață. Succesiunea de variație a rugozității la 8×8 μm² este: ES-PLGA>AM-PLGA>EG-PLGA>EC-PLGA>EM-PLGA, iar la 2×2 μm² este: ES-PLGA>AM-PLGA>EM-PLGA>EG-PLGA>EC-PLGA, pentru probele cu EM, EG și EC valorile fiind apropiate.

Raportat la formulările cu PHB-PLGA (1:1), EM-PHB-PLGA prezintă cele mai puțin definite porozități, fiind caracterizată în principal de nanoparticule mici. Variația rugozității este: AM-PHB-PLGA>ES-PHB-PLGA>EM-PHB-PLGA>EG-PHB-PLGA>EC-PHB-PLGA>EG-PHB-PLGA (scala 8×8 μm²) și ES-PHB-PLGA>AM-PHB-PLGA>EG-PHB-PLGA>EC-PHB-PLGA>EM-PHB-PLGA (scala 2×2 μm²).

Probele cu amestec de extracte sunt cele mai complexe, de aceea aspectul lor topografic diferă semnificativ. Scala mai largă a permis examinarea caracteristicilor pe suprafață mai extinsă, uniformitatea are importanță mai ales pentru formarea filmelor subțiri rezultate prin uscarea probelor. Scala mai îngustă (2×2 μm²) a permis analiza în detaliu cu evidențierea agregatelor care sugerează informații despre stabilitatea probelor și care pot determina

modificarea caracteristicilor la scală mai largă prin formarea nanostructurilor mai mari. Aspectele topografice ale probelor pot avea impact ulterior în posibilitatea de adeziune și impregnare pe matricea ciorapului compresiv.

5.6. Analiza posibilității de impregnare pe materialul ciorapului compresiv

Materiale și metodă

Imersarea matricei ciorapului compresiv (bucăți $2 \times 2 \text{ cm}^2$) în suspensia cu nanoparticule, menținerea în contact timpuri diferite (30 min, 60 min și 90 min) și evaluare prin cântărire și analiză la stereomicroscop.

Rezultate și discuții

Nu s-au observat diferențe importante de masă între timpurile de imersie: $30 \text{ min} \cong 60 \text{ min} \cong 90 \text{ min}$, prin urmare o imersie pe o perioadă de 30 de minute este suficientă. Prin analiza la stereomicroscop a bucăților de material uscate, s-a remarcat dispunerea nanoformulărilor ca film polimeric pe suprafața materialului ciorapului compresiv.

5.7. Analiza termogravimetrică (TGA)

Materiale și metodă

S-a utilizat termogravimetrul Mettler Toledo TGA-SDTA851e (Mettler-Toledo, Greifensee, Elveția) operat la următorii parametrii: flux de aer sub 80 mL/min , rata de încălzire de $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$ [63].

Rezultate și discuții

Analiza termogravimetrică a avut utilitate bidirecțională, pe de-o parte s-a evidențiat stabilitatea nanoformulărilor, pe de altă parte a permis evaluarea gradului de impregnare. Nanoformulările au prezentat pierdere de masă treptată în intervalul $25\text{-}115^\circ\text{C}$ (pierdere solvenți volatili) și în intervalul $200\text{-}650^\circ\text{C}$ (caracteristic substanțelor organice). Totodată, prin diferența între pierderile de masă, s-a evaluat capacitatea de impregnare pe matricea ciorapului compresiv. Variația este cuprinsă în intervalul $2.7\text{-}12.4\%$. Dintre cele 15 probe analizate, doar două probe (EM-PHB și EG-PHB-PLGA) au avut impregnare sub 5% , majoritatea (11 probe) au condus la un grad de impregnare în intervalul $5\text{-}10\%$ și două probe (EM-PHB-PLGA și EM-PLGA) au depășit procentul de 10% .

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Concluzii generale

Cercetarea curentă, ca analiză preliminară în dezvoltarea unui produs util în tratamentul bolii venoase cronice, a urmărit obținerea și caracterizarea fitochimică a unor extracte derivate din surse vegetale cu potențial terapeutic. Totodată, studiul vizează evaluarea activității și citotoxicității precum și includerea în formulări complexe cu polimeri biodegradabili alături de investigarea posibilității de funcționalizare a unei matrici de ciorap compresiv.

Având la bază datele din literatura de specialitate, s-au selectat patru surse vegetale remarcate pentru proprietățile antioxidante, antiinflamatoare, drenoare veno-limfatice, capilaroprotectoare și favorizante ale reepitelizării: *Sophorae flos* (produs vegetal cunoscut mai ales pentru conținutul de rutozidă), *Ginkgo bilobae folium*, *Meliloti herba* și *Calendulae flos*. S-au obținut patru extracte uscate (ES, EG, EM, EC) prin extracție cu etanol apoi liofilizare. Screeningul fitochimic realizat asupra extractelor a condus la identificarea cu succes a compușilor de interes terapeutic, unii fiind comuni (ex. rutozida, quercetina, isoquercetina), iar alții fiind particulari anumitor extracte: sophoricozida (ES), bilobalid, bilobetină, ginkgolide (EG), acid melilotic (EM) și calendulozide (EC). Din punct de vedere cantitativ, toate extractele prezintă cantități importante de flavone, acizi fenolcarboxilici și polifenoli, dar se distinge extractul de *Sophorae flos* cu cele mai mari valori, mai ales pentru conținutul de flavone (37.45%). Raportat la principiile active identificate (UHPLC-HRMS/MS), pentru ES, în cele mai mari cantități se regăsesc: rutozida, isorhamnetina și quercetina. Nici celelalte extracte nu sunt de neglijat întrucât dispun de cantități importante de principii active.

Din punct de vedere al stabilității pe o perioadă de 12 luni, toate extractele analizate au dovedit o stabilitate relativ bună, conținutul de flavonoide înregistrând cele mai reduse variații.

Cu scopul de a evidenția implicațiile în tratamentul bolii venoase cronice ale extractelor obținute și pentru a evalua citotoxicitatea, s-au derulat analize *in vitro*, *in vivo* și *in silico*. S-au aplicat trei metode *in vitro* pentru determinarea activității antioxidante, înregistrând cele mai bune rezultate pentru extractul de *Sophorae flos*. Pentru celelalte extracte, activitatea antioxidantă urmează succesiunile: EC>EG>EM (FRAP), EG>EC>EM (DPPH) și EG>EM>EC (ABTS). Valoarea concentrației inhibitorii asupra radicalilor (IC₅₀ sau EC₅₀) este cu atât mai mică cu cât concentrația de principii active este mai mare (corelație inversă apreciată prin coeficient Pearson negativ). *In silico*, s-au remarcat interferențe cu zona zinc-catalitică a MMP (izoforme MMP1, MMP2, MMP3, MMP9) pentru unii constituenți activi din extracte (ex. isoquercitrină, narcissină, catechină, sophoricozidă). Inhibarea acestor enzime poate fi

considerată un mecanism complementar activității antioxidante pentru anihilarea proceselor patologice din boala venoasă cronică.

Analiza de citotoxicitate *in vitro*, prin testare MTT pe linii celulare endoteliale (tip HPAEC), a evidențiat că, după 72 de ore de expunere la extractele analizate, viabilitatea celulară este afectată în ordinea: EG>ES>EC>EM. *In silico*, s-a urmărit posibilitatea de pătrundere intracelulară, de atingere a țintelor intracelulare și de interacțiune a unor fitoconstituenți din extracte cu posibilele căi apoptotice. Astfel, cea mai bună permeabilitate celulară aparține următorilor compuși: calendulozide, isorhamnetină, ginkgolide, bilobalid, bilobetină și quercetină. Totodată s-a evidențiat pătrunderea la nivel mitocondrial și interacțiuni cu caspaza-3, caspaza-8 și heterocomplexul c-Myc-Max ce ar putea explica implicațiile citotoxice. *In vivo*, prin testare BSLA (*Artemia salina*) s-au observat modificări citologice la 24h: deformări ale corpului, pierderea aderenței de cuticulă (ES), incluziuni celulare (EG, EC, EM), dar pentru niciunul dintre extracte nu s-au evidențiat efecte letale asupra larvelor la concentrații sub 1200 μg/mL, concluzionând că sunt netoxice.

Extractele au fost integrate în formulări cu biopolimeri (PHB, PLGA), rezultând 15 probe tip suspensii care după uscare formează film polimeric. Testul de extensibilitate (metoda Ojeda-Arbussa) a evidențiat o capacitate mare de etalare (mai ales pentru probele cu PHB, iar dintre extracte, probele cu EC și EG). Toate formulările au pH 5.5, concluzionând că sunt adecvate unei administrări topic-transdermice (compatibile cu pH-ul pielii). Prin analiză ATR-FTIR comparativă între spectrele componentelor de bază și formulări s-au observat deplasări ale benzilor la numere de undă mai mari, precum și modificări ale intensității acestora, confirmând formarea de aducți sau complecși între extracte și biopolimeri. Aceste modificări au fost cel mai bine reprezentate pentru probele EC. Prin analiza XRD, s-a remarcat faptul că formulările obținute sunt amorfe. Analiza AFM a confirmat obținerea nanoparticulelor și a conturat profilele topografice ale nanoformulărilor prin evaluare la două scale ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$, $8 \times 8 \mu\text{m}^2$). S-au observat diferențe atât dependent de polimer cât și dependent de extract. Pentru formulările cu PHB, cea mai redusă rugozitate (apreciată prin Rq, rugozitate medie pătratică) aparține EG-PHB. Raportat la probele cu PLGA, cea mai mare rugozitate se observă pentru ES-PLGA. Pentru probele cu amestecul de polimeri, s-a remarcat topografia duală a probei cu EM, care la scală mai largă are o rugozitate intermediară, rugozitatea se reduce la scală mai mică, conturând cea mai fină suprafață dintre toate probele analizate. Probele cu amestec de extracte sunt cele mai complexe și prezintă diferențe semnificative de aspect topografic. Pentru unele probe s-a observat și formarea de agregate.

S-a investigat potențialul de funcționalizare a unei matrici de ciorap compresiv. Imersarea timp de 30 de minute a ciorapului compresiv în nanoformulare și uscare timp de 12h la temperatura camerei duce la formarea unui film polimeric pe suprafața materialului compresiv.

Prin analiza termogravimetrică s-a conturat profilul de degradare al nanoformulărilor, observând pierdere de masă treptată pentru solvenți volatili în intervalul 25-115°C și pierdere de masă a substanțelor organice în intervalul 200-650°C. S-a determinat și capacitatea de impregnare a extractelor pe matricea de ciorap compresiv. Majoritatea probelor au înregistrat un grad de impregnare între 5-10%.

În concluzie, rezultatele prezentei cercetări reprezintă un punct de orientare către dezvoltarea de noi produse farmaceutice având la bază extracte vegetale, biopolimeri și matrici compresive, constituind noi oportunități terapeutice pentru tratamentul bolii venoase cronice. Rezultatele obținute au fost diseminate în literatura de specialitate prin intermediul a trei articole originale.

Elemente de originalitate

În contextul acestui proiect de cercetare gradul de originalitate se regăsește în următoarele elemente:

- selecția produselor vegetale pentru acoperirea cât mai cuprinzătoare a manifestărilor de afectare vasculară induse de boala venoasă cronică: *Sophorae flos* (remarcat pentru conținut mare de flavonoide antioxidante, antiinflamatoare și capilaroprotectoare), *Ginkgo bilobae folium* (conținut de ginkgolide cu efecte antitrombotice), *Meliloti herba* (cunoscut ca drenor veno-limfatic) și *Calendulae flos* (recunoscut pentru efectul cicatrizant și de reepitelizare) și evidențierea fitocompușilor activi de interes terapeutic în extractele obținute din aceste materii prime vegetale (Capitolul 3);
- aplicarea de metode *in vitro*, *in vivo* și *in silico* pentru caracterizarea detaliată a extractelor obținute și a constituenților activi de interes, atât din punct de vedere al implicațiilor terapeutice (Capitolul 4 – 4.1., 4.2.) cât și al citotoxicității (Capitolul 4 – 4.3.);
- integrarea celor patru extracte în nanoformulări alături de biopolimeri precum și realizarea de nanoformulări cu amestecul extractelor pentru a obține beneficiile terapeutice cumulate ale acestora (Capitolul 5 – 5.1.);
- caracterizarea fizico-chimică prin metode avansate și realizarea de comparații extinse între formulările obținute (Capitolul 5 – 5.2., 5.3., 5.4., 5.5.);

- investigarea posibilității de administrare concomitente a terapiei farmacologice și compresive prin analiza de impregnare a nanoformulărilor pe matricea ciorapilor compresivi în vederea obținerii unor ciorapi compresivi funcționalizați, care să favorizeze complianța (Capitolul 5 – 5.6., 5.7.)

Perspective de cercetare

Întrucât demersul de cercetare prezent constituie o analiză preliminară ca prim pas către dezvoltarea unor produse farmaceutice complexe, perspectivele de cercetare sunt extensive. Ca etapă consecutivă studiului curent se va analiza stabilitatea nanoformulărilor în timp și posibilitatea optimizării acestora în vederea deprinderii unor proprietăți fizico-chimice foarte bine definite ce ar permite o reproductibilitate optimă unui viitor flux tehnologic. Totodată evaluarea cedării *in vitro* a principiilor active din aceste nanoformulări reprezintă o direcție de analiză ulterioară, precum și studiul permeabilității transcutanate atât a nanoformulărilor ca atare cât și a principiilor active cedate. De asemenea, o posibilitate de optimizare pentru modul de impregnare ar putea fi considerată realizarea unei forme farmaceutice tip spray cu nanoparticule extract-biopolimer și analiza particularităților farmacotehnice pentru acest tip de produs. Introducerea filmului polimeric, rezultat după uscarea nanoformulărilor, într-o matrice tip plasture transdermic este o direcție de investigat. Izolarea nanoparticulelor din nanoformulare și reintegrarea acestora în alte forme farmaceutice reprezintă o pistă de cercetare promițătoare. Posibilitatea dezvoltării unor produse farmaceutice variate, având la bază aceste nanoformulări, vine aditiv cu perspectivele de caracterizare a acestora din punct de vedere biofarmaceutic, farmacocinetic, farmacodinamic și farmacotoxicologic.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Eklof B, Perrin M, Delis KT, Rutherford RB, Gloviczki P. Updated terminology of chronic venous disorders: The VEIN-TERM transatlantic interdisciplinary consensus document. *Journal of Vascular Surgery*. 2009 Feb;49(2):498–501. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2008.09.014>
2. Wittens C, Davies AH, Bækgaard N, Broholm R, Cavezzi A, Chastanet S, et al. Editor's Choice – Management of Chronic Venous Disease. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2015 Jun;49(6):678–737. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2015.02.007>
3. De Maeseneer MG, Kakkos SK, Aherne T, Bækgaard N, Black S, Blomgren L, et al. Editor's Choice – European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2022 Clinical Practice Guidelines on the Management of Chronic Venous Disease of the Lower Limbs. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2022 Feb;63(2):184–267. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2021.12.024>
4. Gloviczki P, Lawrence PF, Wasan SM, Meissner MH, Almeida J, Brown KR, et al. The 2023 Society for Vascular Surgery, American Venous Forum, and American Vein and Lymphatic Society clinical practice guidelines for the management of varicose veins of the lower extremities. Part II. *Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders*. 2024 Jan;12(1):101670. <https://doi.org/10.1016/j.jvsv.2023.08.011>
5. Feodor T, Baila S, Mitea IA, Branisteanu DE, Vittos O. Epidemiology and clinical characteristics of chronic venous disease in Romania. *Exp Ther Med*. 2018 Dec 5; <https://doi.org/10.3892/etm.2018.7059>
6. Mansilha A, Sousa J. Benefits of venoactive drug therapy in surgical or endovenous treatment for varicose veins: a systematic review. *Int Angiol*. 2019 Sep;38(4). <https://doi.org/10.23736/S0392-9590.19.04216-0>
7. Bottaro E, Paterson J, Zhang X, Hill M, Patel VA, Jones SA, et al. Physical Vein Models to Quantify the Flow Performance of Sclerosing Foams. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019 May 21;7:109. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00109>
8. McArdle M, Hernandez-Vila EA. Management of Chronic Venous Disease. *Texas Heart Institute Journal*. 2017 Oct 1;44(5):347–9. <https://doi.org/10.14503/THIJ-17-6357>
9. Faccini FP, Ermini S, Franceschi C. CHIVA to treat saphenous vein insufficiency in chronic venous disease: characteristics and results. *J vasc bras*. 2019;18:e20180099. <https://doi.org/10.1590/1677-5449.009918>
10. Faccini FP, Arendt AL, Pereira RQ, Oliveira AR de. CHIVA to spare the small and great saphenous veins after wrong-site surgery on a normal saphenous vein: a case report. *J vasc bras*. 2019;18:e20180077. <https://doi.org/10.1590/1677-5449.007718>
11. Lurie F, Branisteanu DE. Improving Chronic Venous Disease Management with Micronised Purified Flavonoid Fraction: New Evidence from Clinical Trials to Real Life. *Clin Drug Investig*. 2023 Jun;43(S1):9–13. <https://doi.org/10.1007/s40261-023-01261-y>
12. Rauly-Lestienne I, Heusler P, Cussac D, Lantoine-Adam F, de Almeida Cyrino FZG, Bouskela E. Contribution of muscarinic receptors to in vitro and in vivo effects of Ruscus extract. *Microvascular Research*. 2017 Nov;114:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2017.05.005>
13. Dudek-Makuch M, Studzińska-Sroka E. Horse chestnut – efficacy and safety in chronic venous insufficiency: an overview. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2015 Sep;25(5):533–41. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.05.009>
14. Raffetto JD, Khalil RA. Ca²⁺-dependent contraction by the saponoside escin in rat vena cava: Implications in venotonic treatment of varicose veins. *Journal of Vascular Surgery*. 2011 Aug;54(2):489–96. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2011.01.043>
15. Dudek-Makuch M, Studzińska-Sroka E, Korybalska K, Czepulis N, Łuczak J, Rutkowski R, et al. Biological activity of Aesculus hippocastanum flower extracts on vascular endothelial cells cultured in vitro. *Phytochemistry Letters*. 2019 Apr;30:367–75. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.02.031>
16. Azhdari M, Zilae M, Karandish M, Hosseini SA, Mansoori A, Zendehdel M, et al. Red vine leaf extract (AS 195) can improve some signs and symptoms of chronic venous insufficiency, a

- systematic review. *Phytotherapy Research*. 2020 Oct;34(10):2577–85. <https://doi.org/10.1002/ptr.6705>
17. Wadworth AN, Faulds D. Hydroxyethylrutosides: A Review of its Pharmacology, and Therapeutic Efficacy in Venous Insufficiency and Related Disorders. *Drugs*. 1992 Dec;44(6):1013–32. <https://doi.org/10.2165/00003495-199244060-00009>
 18. Aziz Z, Tang WL, Chong NJ, Tho LY. A systematic review of the efficacy and tolerability of hydroxyethylrutosides for improvement of the signs and symptoms of chronic venous insufficiency. *J Clin Pharm Ther*. 2015 Apr;40(2):177–85. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12247>
 19. Martínez-Huélamo M, Rodríguez-Morató J, Boronat A, de la Torre R. Modulation of Nrf2 by Olive Oil and Wine Polyphenols and Neuroprotection. *Antioxidants*. 2017 Sep 26;6(4):73. <https://doi.org/10.3390/antiox6040073>
 20. Belščak-Cvitanović A, Durgo K, Hudek A, Bačun-Družina V, Komes D. Overview of polyphenols and their properties. In: *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. 2018. p. 3–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00001-4>
 21. Pinho-Ribeiro FA, Hohmann MSN, Borghi SM, Zarpelon AC, Guazelli CFS, Manchope MF, et al. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: Role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF-κB. *Chemico-Biological Interactions*. 2015 Feb;228:88–99. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.01.011>
 22. Lichota A, Gwozdziński L, Gwozdziński K. Therapeutic potential of natural compounds in inflammation and chronic venous insufficiency. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019 Aug;176:68–91. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.04.075>
 23. Zaragoza C, Monserrat J, Mantecón C, Villaescusa L, Zaragoza F, Álvarez-Mon M. Antiplatelet activity of flavonoid and coumarin drugs. *Vascular Pharmacology*. 2016 Dec;87:139–49. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.09.002>
 24. Nagula RL, Wairkar S. Recent advances in topical delivery of flavonoids: A review. *Journal of Controlled Release*. 2019 Feb;296:190–201. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.01.029>
 25. Panat NA, Maurya DK, Ghaskadbi SS, Sandur SK. Troxerutin, a plant flavonoid, protects cells against oxidative stress-induced cell death through radical scavenging mechanism. *Food Chemistry*. 2016 Mar;194:32–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.078>
 26. Antignani PL. Medical Treatment of Chronic Venous Disease. *SM Journal of Pharmacology and Therapeutics*. 2017;3(1):1015. https://www.jsmcentral.org/sm-pharmacology/fulltext_smjpt-v3-1015.pdf (accesat 23 Iun 2024)
 27. Gaspar-Pintilieșcu A, Stanciuc AM, Craciunescu O. Natural composite dressings based on collagen, gelatin and plant bioactive compounds for wound healing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019 Oct;138:854–65. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.155>
 28. Jiménez RA, Millán D, Suesca E, Sosnik A, Fontanilla MR. Controlled release of an extract of *Calendula officinalis* flowers from a system based on the incorporation of gelatin-collagen microparticles into collagen I scaffolds: design and in vitro performance. *Drug Deliv and Transl Res*. 2015 Jun;5(3):209–18. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0217-3>
 29. Buzzi M, de Freitas F, de Barros Winter M. Therapeutic effectiveness of a *Calendula officinalis* extract in venous leg ulcer healing. *J Wound Care*. 2016 Dec 2;25(12):732–9. <https://doi.org/10.12968/jowc.2016.25.12.732>
 30. Ajazuddin, Saraf S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *Fitoterapia*. 2010 Oct;81(7):680–9. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.05.001>
 31. Gibis M, Zeeb B, Weiss J. Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. *Food Hydrocolloids*. 2014 Jul;38:28–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.014>
 32. Zorzi GK, Carvalho ELS, von Poser GL, Teixeira HF. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2015 Jul;25(4):426–36. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.015>

33. Guliani A, Singla R, Kumari A, Yadav SK. Liposomal and Phytosomal Formulations. In: Yadav SK, editor. *Nanoscale Materials in Targeted Drug Delivery, Theragnosis and Tissue Regeneration*. Singapore: Springer Singapore; 2016. p. 81–102. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0818-4_4
34. Alexander A, Ajazuddin, Patel RJ, Saraf S, Saraf S. Recent expansion of pharmaceutical nanotechnologies and targeting strategies in the field of phytopharmaceuticals for the delivery of herbal extracts and bioactives. *Journal of Controlled Release*. 2016 Nov;241:110–24. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.017>
35. Paudel KS, Milewski M, Swadley CL, Brogden NK, Ghosh P, Stinchcomb AL. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. *Therapeutic Delivery*. 2010 Jul;1(1):109–31. <https://doi.org/10.4155/tde.10.16>
36. Khogta S, Patel J, Barve K, Londhe V. Herbal nano-formulations for topical delivery. *Journal of Herbal Medicine*. 2020 Apr;20:100300. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100300>
37. Sala M, Diab R, Elaissari A, Fessi H. Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018 Jan;535(1–2):1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.046>
38. Zhou X, Hao Y, Yuan L, Pradhan S, Shrestha K, Pradhan O, et al. Nano-formulations for transdermal drug delivery: A review. *Chinese Chemical Letters*. 2018 Dec;29(12):1713–24. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2018.10.037>
39. Yang H, Wu X, Zhou Z, Chen X, Kong M. Enhanced transdermal lymphatic delivery of doxorubicin via hyaluronic acid based transfersomes/microneedle complex for tumor metastasis therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019 Mar;125:9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.230>
40. Bilia AR, Bergonzi MC, Guccione C, Manconi M, Fadda AM, Sinico C. Vesicles and micelles: Two versatile vectors for the delivery of natural products. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2016 Apr;32:241–55. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.09.007>
41. Cândido TM, De Oliveira CA, Ariede MB, Velasco MVR, Rosado C, Baby AR. Safety and Antioxidant Efficacy Profiles of Rutin-Loaded Ethosomes for Topical Application. *AAPS PharmSciTech*. 2018 May;19(4):1773–80. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-0994-3>
42. Horosanskaia E, Minh Nguyen T, Dinh Vu T, Seidel-Morgenstern A, Lorenz H. Crystallization-Based Isolation of Pure Rutin from Herbal Extract of *Sophora japonica* L. *Org Process Res Dev*. 2017 Nov 17;21(11):1769–78. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.7b00247>
43. Ungureanu AR, Chițescu CL, Luță EA, Moroșan A, Mihaiescu DE, Mihai DP, et al. Outlook on Chronic Venous Disease Treatment: Phytochemical Screening, In Vitro Antioxidant Activity and In Silico Studies for Three Vegetal Extracts. *Molecules*. 2023 Apr 23;28(9):3668. <https://doi.org/10.3390/molecules28093668>
44. Luță EA, Biță A, Moroșan A, Mihaiescu DE, Ghica M, Mihai DP, et al. The Influence of Phytosociological Cultivation and Fertilization on Polyphenolic Content of *Menthae* and *Melissae* folium and Evaluation of Antioxidant Properties through In Vitro and In Silico Methods. *Plants*. 2022 Sep 14;11(18):2398. <https://doi.org/10.3390/plants11182398>
45. Gîrd CE, Duțu LE, Popescu LM, Iordache AT, Tudor I, Costea T. Bazele teoretice și practice ale analizei farmacognostice. Ediția a II-a. Vol. I. București: Editura Curtea Veche; 168–245
46. Gîrd CE, Duțu LE, Popescu LM, Nencu I, Costea T. Farmacognozie Practică. Vol. I. București: Editura Universitară Carol Davila; 2020. 66–96
47. Costea L, Chițescu CL, Boscencu R, Ghica M, Lupuliasa D, Mihai DP, et al. The Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of Five Vegetal Extracts with Hepatoprotective Potential. *Plants*. 2022 Jun 24;11(13):1680. <https://doi.org/10.3390/plants11131680>
48. Land H, Humble MS. YASARA: A Tool to Obtain Structural Guidance in Biocatalytic Investigations. In: Bornscheuer UT, Höhne M, editors. *Protein Engineering*. New York, NY: Springer New York; 2018. p. 43–67. (Methods in Molecular Biology; vol. 1685). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7366-8_4

49. Spurlino JC, Smallwood AM, Carlton DD, Banks TM, Vavra KJ, Johnson JS, et al. 1.56 Å structure of mature truncated human fibroblast collagenase. *Proteins*. 1994 Jun;19(2):98–109. <https://doi.org/10.1002/prot.340190203>
50. Feng Y, Likos JJ, Zhu L, Woodward H, Munie G, McDonald JJ, et al. Solution structure and backbone dynamics of the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2 complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2002 Jul;1598(1–2):10–23. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(02\)00307-2](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(02)00307-2)
51. Belviso BD, Caliendo R, Siliqi D, Calderone V, Arnesano F, Natile G. Structure of matrix metalloproteinase-3 with a platinum-based inhibitor. *Chem Commun*. 2013;49(48):5492. <https://doi.org/10.1039/c3cc41278d>
52. Rowsell S, Hawtin P, Minshull CA, Jepson H, Brockbank SMV, Barratt DG, et al. Crystal Structure of Human MMP9 in Complex with a Reverse Hydroxamate Inhibitor. *Journal of Molecular Biology*. 2002 May;319(1):173–81. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00262-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00262-0)
53. Sander T, Freyss J, von Korff M, Rufener C. DataWarrior: An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. *J Chem Inf Model*. 2015 Feb 23;55(2):460–73. <https://doi.org/10.1021/ci500588j>
54. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*. 2009;NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
55. **Ungureanu AR**, Popovici V, Oprean C, Danciu C, Schröder V, Olaru OT, et al. Cytotoxicity Analysis and In Silico Studies of Three Plant Extracts with Potential Application in Treatment of Endothelial Dysfunction. *Pharmaceutics*. 2023 Aug 11;15(8):2125. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15082125>
56. Matsuo M, Sasaki N, Saga K, Kaneko T. Cytotoxicity of Flavonoids toward Cultured Normal Human Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2005;28(2):253–9. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.253>
57. Lomize AL, Hage JM, Schnitzer K, Golobokov K, LaFaive MB, Forsyth AC, et al. PerMM: A Web Tool and Database for Analysis of Passive Membrane Permeability and Translocation Pathways of Bioactive Molecules. *J Chem Inf Model*. 2019 Jul 22;59(7):3094–9. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00225>
58. Blanchard H, Kodandapani L, Mittl PR, Marco SD, Krebs JF, Wu JC, et al. The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure*. 1999 Sep;7(9):1125–33. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80179-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80179-8)
59. Blanchard H, Donepudi M, Tschopp M, Kodandapani L, Wu JC, Grütter MG. Caspase-8 specificity probed at subsite S 4 :crystal structure of the caspase-8-Z-DEVD-cho complex 1 |Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology*. 2000 Sep;302(1):9–16. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4041>
60. Nair SK, Burley SK. X-Ray Structures of Myc-Max and Mad-Max Recognizing DNA. *Cell*. 2003 Jan;112(2):193–205. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01284-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01284-9)
61. Berman HM. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*. 2000 Jan 1;28(1):235–42. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
62. Lee SY, Kim SY, Ku SH, Park EJ, Jang DJ, Kim ST, et al. Polyhydroxyalkanoate Decelerates the Release of Paclitaxel from Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles. *Pharmaceutics*. 2022 Aug 2;14(8):1618. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081618>
63. **Ungureanu AR**, Ozon EA, Musuc AM, Anastasescu M, Atkinson I, Mitran RA, et al. Preparation and Preliminary Analysis of Several Nanoformulations Based on Plant Extracts and Biodegradable Polymers as a Possible Application for Chronic Venous Disease Therapy. *Polymers*. 2024 May 10;16(10):1362. <https://doi.org/10.3390/polym16101362>
64. Rincón M, Silva-Abreu M, Espinoza LC, Sosa L, Calpena AC, Rodríguez-Lagunas MJ, et al. Enhanced Transdermal Delivery of Pranoprofen Using a Thermo-Reversible Hydrogel Loaded with

- Lipid Nanocarriers for the Treatment of Local Inflammation. *Pharmaceuticals*. 2021 Dec 24;15(1):22. <https://doi.org/10.3390/ph15010022>
65. Cerruti P, Santagata G, Gomez d' Ayala G, Ambrogi V, Carfagna C, Malinconico M, et al. Effect of a natural polyphenolic extract on the properties of a biodegradable starch-based polymer. *Polymer Degradation and Stability*. 2011 May;96(5):839–46. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2011.02.003>
66. Fan Z, Sun J, Yang X, Du J, Miao Y, Dong H, et al. Influence of steric configurations in the conjugated polymers using acridine-triazine derivates as green chromophores. *Synthetic Metals*. 2024 Jan;301:117531. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2023.117531>
67. Musuc AM, Badea-Doni M, Jecu L, Rusu A, Popa VT. FTIR, XRD, and DSC analysis of the rosemary extract effect on polyethylene structure and biodegradability. *J Therm Anal Calorim*. 2013 Oct;114(1):169–77. <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2909-y>
68. Jog R, Burgess DJ. Pharmaceutical Amorphous Nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017 Jan;106(1):39–65. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.09.014>
69. Pool H, Quintanar D, Figueroa JDD, Marinho Mano C, Bechara JEH, Godínez LA, et al. Antioxidant Effects of Quercetin and Catechin Encapsulated into PLGA Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*. 2012;2012:1–12. <https://doi.org/10.1155/2012/145380>
70. Popovici V, Matei E, Cozaru GC, Bucur L, Gird CE, Schröder V, et al. Design, Characterization, and Anticancer and Antimicrobial Activities of Mucoadhesive Oral Patches Loaded with *Usnea barbata* (L.) F. H. Wigg Ethanol Extract F-UBE-HPMC. *Antioxidants*. 2022 Sep 13;11(9):1801. <https://doi.org/10.3390/antiox11091801>

Listă cu lucrările științifice publicate

Articole publicate în reviste cotate ISI

1. **Andreea Roxana Ungureanu**, Carmen Lidia Chițescu, Emanuela Alice Luță, Alina Moroșan, Dan Eduard Mihaiescu, Dragoș Paul Mihai, Liliana Costea, Emma Adriana Ozon, Ancuța Cătălina Fița, Teodora Dalila Balaci, Rica Boscencu, Cerasela Elena Gîrd. Outlook on Chronic Venous Disease Treatment: Phytochemical Screening, In Vitro Antioxidant Activity and In Silico Studies for Three Vegetal Extracts (2023). *Molecules*, 28(9), 3668, ISSN: 1420-3049, <https://doi.org/10.3390/molecules28093668>
2. **Andreea Roxana Ungureanu**, Violeta Popovici, Camelia Oprean, Corina Danciu, Verginica Schröder, Octavian Tudorel Olaru, Dragoș Paul Mihai, Liliana Popescu, Emanuela-Alice Luță, Carmen Lidia Chițescu, Cerasela Elena Gîrd. Cytotoxicity Analysis and In Silico Studies of Three Plant Extracts with Potential Application in Treatment of Endothelial Dysfunction (2023). *Pharmaceutics*, 15(8), 2125, ISSN: 1999-4923, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15082125>
3. **Andreea Roxana Ungureanu**, Emma Adriana Ozon, Adina Magdalena Musuc, Mihai Anastasescu, Irina Atkinson, Raul-Augustin Mitran, Adriana Rusu, Liliana Popescu, Cerasela Elena Gîrd. Preparation and Preliminary Analysis of Several Nanoformulations Based on Plant Extracts and Biodegradable Polymers as a Possible Application for Chronic Venous Disease Therapy (2024). *Polymers*, 16(10), 1362, ISSN: 2073-4360, <https://doi.org/10.3390/polym16101362>