

NOI FORMULĂRI DERMATOCOSMETICE UTILIZÂND COMPUȘI BIOACTIVI DIN SURSE NATURALE INDIGENE

Conducător științific

Prof.Dr.Habil.Ing.
Daniela ȘUTEU

Doctorand

BioIng. Delia ZAHARIA
(căs.TURCOV)

IAȘI, 2024

UNIVERSITATEA TEHNICĂ “GHEORGHE ASACHI” DIN IAȘI
R E C T O R A T U L

Către _____

Vă facem cunoscut că, în ziua de 07.06.2024 la ora 11:00, în Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului „Cristofor Simionescu” *, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

“ Noi formulări dermatocosmetice utilizând compuși bioactivi din surse naturale indigene”

elaborate de doamna **Delia Zaharia (căsătorită Turcov)** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|---|------------------------|
| 1. Prof. Univ. Dr. Ing. Măluțan Teodor | președinte |
| Universitatea Tehnică “Ghe. Asachi” din Iași | |
| 2. Prof. Univ. Dr. Habil. Ing. Șuteu Daniela | conducător de doctorat |
| Universitatea Tehnică “Ghe. Asachi” din Iași | |
| 3. Prof. Univ. Dr. Profire Lenuța | referent oficial |
| Universitatea de Medicină și Farmacie “Gr. T. Popa” din Iași | |
| 4. Prof. Univ. Dr. Chim. Trincă Lucia Carmen | referent oficial |
| Universitatea pentru Științele Vieții “Ion Ionescu de la Brad” din Iași | |
| 5. Prof. Univ. Dr. Ing. Galaction Anca-Irina | referent oficial |
| Universitatea Tehnică “Ghe. Asachi” din Iași | |

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

RECTOR,
Prof. Univ. Dr. Ing. Dan CAȘCAVAL

Secretar universitate,
Ing. Cristina NAGĂȚ

*pentru susținerile online se va preciza link-ul și soluția de software

CUPRINS

UNIVERSITATEA TEHNICĂ “GHEORGHE ASACHI” DIN IAȘI ..	2
RECTORATUL ..	2
INTRODUCERE ..	7
Partea I ..	11
STUDIUL DE LITERATURĂ ..	11
Capitolul I.1.	11
COMPUȘI BIOACTIVI ÎN COMBATEREA STRESULUI OXIDATIV ASUPRA PIELII ..	11
I.1.2. Considerente actuale privind acțiunea stresului oxidativ asupra pielii ..	11
Capitolul I.2.	12
ANTIOXIDANȚI – ROL ȘI NECESITATE ÎN ASIGURAREA SĂNĂTĂȚII PIELII ..	12
I.2.1. Antioxidanții în produse dermatocosmetice ..	12
I.2.3. Antioxidanți din surse naturale ..	13
Partea a II-a ..	14
CONTRIBUȚII PERSONALE LA OBTINEREA DE NOI FORMULĂRI DERMATOCOSMETICE PRIN UTILIZAREA COMPUȘILOR BIOLOGIC ACTIVI DIN RESURSE NATURALE INDIGENE ..	14
Capitolul II. 2.	14
MATERIALE ȘI METODE UTILIZATE ..	14
II. 2.1. Materiale utilizate ..	14
II. 2.2. Metode utilizate în dezvoltarea studiilor experimentale ..	14
II.2.2.1.4. <i>Aprecierea eficienței metodelor de extracție</i> ..	15
II.2.2.2. Metode de caracterizare a extractelor vegetale ..	15
Capitolul II. 3.	15

ÎMBUNĂTĂȚIREA CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE A RESVERATROLULUI PRIN COMBINARE CU ACID FERULIC	15
II. 3.1. Determinarea activității antioxidante a amestecului resveratrol – acid ferulic	16
Capitolul II. 4.	18
OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA EXTRACTELOR VEGETALE DIN ȘOFRAN (<i>Crocus sativus</i> L.)	18
II.4.2. Caracterizarea cantitativă a extractelor vegetale de șofran	18
II.4.2.1. <i>Determinarea concentrației totale de flavonoide</i>	18
II.4.2.2. <i>Determinarea conținutului total de polifenoli</i>	19
II.4.2.3. <i>Determinarea cantității de polifenoli și flavonoide din extractele vegetale de șofran-Concluzii</i>	21
II.4.2.4. <i>Evaluarea activității antioxidante</i>	21
II.4.3. Caracterizarea fizico-chimică a extractelor de șofran utilizând spectrofotometria UV-Viz	22
Capitolul II. 5.	23
OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA EXTRACTELOR VEGETALE DIN SÂNZIENE (<i>Galium verum</i>)	23
II.5.2. Obținerea extractelor hidroalcoolice de sânziene (<i>Galium verum</i>)	23
II.5.2.1. <i>Evaluarea eficienței tehnicilor de extracție utilizate în funcție de parametrii fizici care influențează extracția în cazul sânzienelor</i>	23
II.5.2.2. <i>Caracterizarea cantitativă a extractelor vegetale hidroalcoolice</i>	25
II.5.2.2.1.1. <i>Calcularea conținutului de polifenoli și flavonoide pentru extractele din planta uscată</i>	25
II.5.5. Caracterizarea fizico-chimică a extractelor de sânziene utilizând spectroscopia UV-Viz	27

Capitolul II.6.	27
OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA EXTRACTELOR VEGETALE DIN <i>Acmella oleracea</i>	27
<i>II.6.1.2. Randamentul extracției</i>	28
II.6.2. Caracterizarea cantitativă a extractelor vegetale de <i>Acmella oleracea</i>	29
<i>II 6.2.1. Calcularea conținutului de polifenoli</i>	29
<i>II 6.2.2. Calcularea conținutului de flavonoide</i>	31
<i>II.6.2.3. Evaluarea activității antioxidante</i>	32
II.6.3. Caracterizarea fizico-chimică a extractelor de <i>Acmella oleracea</i> utilizând spectrofotometria UV-Viz	32
Capitolul II. 7.	33
FORMULE DERMATOCOSMETICE PE BAZĂ DE EXTRACTE NATURALE DIN SURSE INDIGENE	33
II.7.1. Prepararea emulsiilor	34
<i>II.7.1.1. Componenții emulsiilor</i>	34
II.7.2. Metode de caracterizare a emulsiilor obținute	34
<i>II.7.2.1. Evaluarea omogenității bazelor din structura emulsiilor</i>	34
<i>II.7.2.2. Caracterizarea emulsiilor</i>	36
<i>II.7.3.1. Determinarea pH-ului</i>	38
<i>II.7.3.2. Determinări conductometrice</i>	38
<i>II.7.3.6. Controlul microbiologic</i>	39
<i>II.7.3.7. Activitatea antioxidantă</i>	39
<i>II.7.3.8. Teste reologice</i>	40
II.7.4. Caracterizarea emulsiilor care conțin extract de șofran	43
<i>II.7.4.3. Microscopie optică</i>	43

<i>II.7.4.6. Activitatea antioxidantă a emulsiilor</i>	44
II.7.5. Emulsii care conțin extract din sânziene	45
<i>II.7.5.6. Teste de permeabilitate cu celula Franz</i>	45
<i>II.7.5.6.1. Teste de permeabilitate cu celula Franz prevăzută cu membrană de dializă</i>	45
<i>II.7.5.6.2. Teste de permeabilitate cu celula Franz prevăzută cu membrană din piele de pui</i>	48
II.7.6. Teste de biocompatibilitate pentru emulsiile pe bază de șofran și sânziene	49
<i>II.7.6.1. Teste de citotoxicitate</i>	49
II.7.7. Studiu clinic observațional în cazul emulsiei pe bază de extract de sânziene (<i>Galium verum</i>)	50
II.7.8. Prepararea serurilor pe bază de extracte vegetale	51
<i>II.7.8.1. Componentii serurilor</i>	51
<i>II.7.8.3. Seruri care conțin extract de <i>Acmella oleracea</i></i>	51
<i>II.7.8.3.1. Teste de caracterizare fizică și de evaluare a stabilității serurilor</i>	52
<i>II.7.8.3.3. Evaluarea conținutului de polifenoli și a activității antioxidante a serurilor</i>	53
Capitolul II. 8.	54
CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE	54
BIBLIOGRAFIE	69

Notă: În rezumatul tezei de doctorat se prezintă într-o formă succintă introducerea, materialele și metodele de cercetare și o parte din rezultatele originale obținute, concluziile generale și bibliografia selectivă. La redactarea rezumatului s-au păstrat notațiile și numerotarea pentru capitolele, paragrafele, figurile și tabelele utilizate în cadrul tezei de doctorat.

INTRODUCERE

În centrul multor terapii dermatocosmetice se află de mult timp două concepte de perspectivă, cu o solidă susținere științifică și totodată în continuă analiză experimentală pentru atingerea potențialului estimat: teoria stresului oxidativ și utilizarea extractelor naturale.

Orice stimul de natură socială, psihologică sau fizică perceput de organism ca o amenințare sau o solicitare poate fi numit factor stresor. Acesta determină activarea unor mecanisme neurohormonale de reglare, pentru menținerea homeostaziei. Abilitatea organismului de adaptare și impactul fiziologic al acestor stimuli stresori determină variații ale creșterii, dezvoltării, productivității și stării de sănătate a organismului. Unele variații sunt reversibile în condițiile dispariției stimulului. Expunerea cronică la forme de stres duce la alterarea homeostaziei și reducerea eficienței mecanismelor de adaptare, creșterea riscului de infecții și diverse forme de boală (Rahal și colab., 2014).

În literatura de specialitate sunt descrise trei forme de stres ca fenomene distincte ce impactează organismul uman: eustres, distres și stresul oxidativ (Kupriyanov și Zhdanov, 2014). *Eustresul* este răspunsul fiziologic ce duce la un comportament adaptativ sau, conform altor autori, reprezintă absența reacțiilor negative la condițiile de stres (Kupriyanov și Zhdanov, 2014). *Distresul* este starea de supraîncărcare a organismului sub acțiunea stresorilor endogeni și exogeni, față de care nu se poate apăra. Distresul nu

creează adaptare, ci duce la diferite tipuri de deteriorare structurală și funcțională. *Stresul oxidativ* este dezechilibrul dintre prooxidanți și antioxidanți în organism, în favoarea prooxidanților. În condiții normale și la un nivel incipient acest lucru este inofensiv. Orice alterare a homeostaziei organismului duce la o creștere a producției de radicali liberi care depășesc capacitatea de neutralizare a mecanismelor locale, au capacitate de autopropagare și, prin interacțiuni diverse cu alte molecule generează deteriorări ale componentelor esențiale ale celulei: carbohidrați, lipide membranare, proteine, acizi nucleici etc.

Teza de doctorat abordează o tematică de actualitate și importanță incontestabilă, care se aliniază la tendințele moderne de interdisciplinaritate în cercetarea la nivel național și internațional. Tema se referă la studiul de noi surse de ingrediente bioactive cu beneficii terapeutice, precum și avantaje economice, prin valorificarea unor reziduuri vegetale, propuneri de noi asocieri sau formulări în scopul utilizării lor în îngrijirea pielii, ameliorarea unor afecțiuni dermatologice și menținerea stării de sănătate și aspectului plăcut al pielii. Ca parte a trendului în plină dezvoltare în cosmetica medicală, utilizarea extractelor naturale este pe cât de veche pe atât de provocatoare în continuare, cu multe teme ce nu sunt pe deplin acoperite din punct de vedere științific și experimental (suficiente date clinice, sinergii diverse, metode sigure și performanțe de extracție etc.).

În cadrul tezei de doctorat s-au studiat variante noi de asociere a unor compuși antioxidanți consacrați, caracterizarea fizico-chimică a acestor asocieri, apoi metode de extracție din noi surse vegetale (reziduuri florale ale unor plante de cultură, floră spontană, plante cultivate în scop farmacologic) împreună cu analiza fizico-chimică a extractelor obținute, selectarea celor mai eficiente din punct de vedere al randamentului de extracție și încorporarea în noi formule dermatocosmetice care au fost de asemenea supuse unor teste microbiologice, de stabilitate și investigații dermatologice preliminare de tolerabilitate. Totodată, studiul de literatură prezintă o sinteză actualizată a moleculelor antioxidante raportate în literatura de specialitate ca având efect benefic în profilaxia și ameliorarea unor afecțiuni induse sau agravate de stresul oxidativ (Tabelul 1.2).

Obiectivul general al tezei de doctorat, îl reprezintă formularea și caracterizarea preliminară a unor noi produse dermatocosmetice care au la bază ingrediente cu acțiune antioxidantă obținute din surse naturale indigene.

În acest sens s-a propus efectuarea unor investigații atât pentru resurse vegetale din flora indigenă spontană, cât și din plante de cultură.

Astfel, în cadrul tezei de doctorat intitulată „*Noi formulări dermatocosmetice utilizând compuși bioactivi din surse naturale indigene*” s-a urmărit determinarea metodelor de extracție cu randament optim pentru fiecare plantă (sânziene - *Galium verum*; șofran - *Crocus sativus* și *Acmella oleracea*), evidențierea extractului cu cel mai bun potențial antioxidant și încorporarea extractelor vegetale într-o formulă dermatocosmetică proprie, supusă de asemenea unor teste preliminare specifice care să confirme tolerabilitatea și potențialul farmacologic în direcțiile propuse (îngrijirea optimă a pielii sensibile și combaterea stresului oxidativ).

Teza de doctorat este structurată în două părți. Prima parte cuprinde studiul de literatură ce prezintă stadiul actual al cunoașterii în domeniul stresului oxidativ și al antioxidantilor, cu accent pe dermatologie și implicațiile la nivelul pielii, precum și în domeniul resurselor vegetale ca sursă de compuși bioactivi cu acțiune antioxidantă, alături de metode de extracție lichid – solid pentru obținerea acestora și a metodelor de caracterizare fizico-chimică. A doua parte a tezei prezintă contribuțiile personale aduse de doctorandă acestei zone de interferență între inginerie chimică și dermatologie. Teza de doctorat conține 283 pagini, 71 de figuri, 47 de tabele și 322 referințe bibliografice.

Partea I este structurată în patru capitole și se încheie cu referințele bibliografice aferente. **Capitolul 1** sistematizează considerente generale asupra stresului oxidativ și acțiunea acestuia la nivelul pielii, împreună cu date actuale despre compuși bioactivi în combaterea stresului oxidativ cutanat. **Capitolul 2** prezintă rolul antioxidantilor în sănătatea pielii și sursele naturale de antioxidanți. **Capitolul 3** abordează metodele și tehnicile de obținere și caracterizare a extractelor vegetale cu rol antioxidant, precum și metodele de evaluare a activității antioxidante. Totodată, în acest capitol sunt prezentate asocierile de antioxidanți în produsele dermatocosmetice. **Capitolul 4** prezintă concluziile și ideile de perspectivă în acest domeniu.

Partea a II-a, ce are la bază contribuțiile personale aduse dezvoltării acestui domeniu, este structurată pe opt capitole, Concluzii generale și Bibliografia aferentă fiecărui capitol. **Capitolul 1** prezintă obiectivele lucrării de doctorat, iar în **Capitolul 2** sunt descrise succint metodele și materialele utilizate în realizarea părții experimentale. **Capitolul 3** prezintă strategii de îmbunătățire a capacității antioxidante a resveratrolului prin

combinarea sa cu acid ferulic și caracterizarea fizico-chimică a acestor noi amestecuri. **Capitolele 4, 5 și 6** sistematizează rezultatele studiilor privind obținerea și caracterizarea extractelor vegetale din șofran (*Crocus sativus*), sânziene (*Galium verum*) și *Acmella oleracea*. Sunt studiate trei metode de extracție solid – lichid: macerarea, extracția asistată de ultrasunete (sonoextracția) și refluxarea. Extractelor obținute li se determină conținutul total de polifenoli și flavonoide, precum și activitatea antioxidantă. **Capitolul 7** prezintă noi formule dermatocosmetice utilizând extracte naturale din plante indigene (emulsii și seruri). Sunt abordate protocoale de obținere a acestor produse, metode de caracterizare a stabilității acestora, controlul reologic și microbiologic, teste de permeabilitate prin diferite membrane, teste de tolerabilitate și biocompatibilitate, precum și teste vizând potențialul farmacologic în direcțiile propuse: de îngrijire a pielii sensibile și de combatere a stresului oxidativ. **Capitolul 8** prezintă *Concluziile generale*, respectiv o centralizare și sistematizare a concluziilor prezentate în capitolele anterioare. La finalul părții de contribuții personale este prezentată bibliografia aferentă acestei părți a tezei și lista de abrevieri utilizate pe parcursul tezei.

Finalul tezei îl reprezintă anexa cu lista activităților de diseminare a rezultatelor obținute pe parcursul studiilor de doctorat. Astfel, rezultatele originale obținute au fost diseminate prin: **6** articole publicate în **jurnale cotate ISI** din care 5 în calitate de autor principal, **4** articole publicate în **reviste BDI** în calitate de autor principal, **21** lucrări prezentate la **manifestări științifice naționale și internaționale** sub formă de postere sau comunicări și **un contract de cercetare intern** (Grant intern pentru finanțare proiecte de sprijinire a finalizării tezelor de doctorat din cadrul TUIASI nr. GI /R 18 Drd/2021 - *Noi Formulări Dermatocosmetice Utilizând Antioxidanți Din Surse Naturale Indigene*).

Partea I

STUDIUL DE LITERATURĂ

Capitolul I.1.

COMPUȘI BIOACTIVI ÎN COMBATAREA STRESULUI OXIDATIV ASUPRA PIELII

I.1.2. Considerente actuale privind acțiunea stresului oxidativ asupra pielii

Pielea este cel mai mare organ al corpului, de o complexitate structurală și funcțională înaltă, motiv pentru care noile direcții care vizează asigurarea calității și sănătății populației iau în considerare toate elementele care îi disturbă buna funcționare, unul dintre acestea fiind acțiunea *stresului oxidativ*. În centrul multor terapii dermatocosmetice stau, de multă vreme dar departe de a se fi epuizat, *teoria stresului oxidativ și tendința în creștere a utilizării extractelor naturale în această direcție*.

Există studii ample care confirmă un impact nociv și puternic asupra pielii, impact ce constă în:

- inflamație cu eritem, edem, creșterea temperaturii locale, durere,
- îmbătrânire prematură a pielii,
- scăderea capacității de apărare locală,
- reacții fotoalergice,
- afecțiuni autoimune,
- tumori cutanate.

Astfel, *antioxidanții* devin unele dintre cele mai testate și utilizate ingrediente utilizate în produse farmaceutice, dermatocosmetice și suplimente alimentare. Un argument în plus este acela că fotoprotecția anti UVA și UVB realizată cu filtre minerale și fizice acționează la suprafața pielii absorbind sau reflectând anumite lungimi de undă, fiind limitată de lungimea de undă pe care o pot absorbi, de durata de viață a filtrelor organice sau de alte substanțe care le pot îndepărta pe cele fizice (praf, particule din aer, apă, transpirație).

Capitolul I.2.

ANTIOXIDANȚI – ROL ȘI NECESITATE ÎN ASIGURAREA SĂNĂTĂȚII PIELII

Conform lui Halliwell și Gutteridge în 2007, „orice substanță care întârzie, previne sau elimină deteriorarea oxidativă a unei molecule poate fi considerată un *antioxidant*” (Veskoukis și colab., 2012). Antioxidanții naturali sau sintetici reușesc să instituie un echilibru între producția și neutralizarea speciilor de radicali liberi pe o perioadă determinată sau nedeterminată de timp (Veskoukis și colab., 2012). Există o varietate de antioxidanți exogeni ce oferă protecție împotriva deteriorărilor oxidative și a afecțiunilor corelate, astfel, apărarea antioxidantă reprezintă prima linie de apărare împotriva efectelor nocive ale speciilor de radicali liberi.

Pe baza numărului de antioxidanți utilizați deja în suplimentele alimentare, este nevoie de o analiză suplimentară aprofundată a potențialului antioxidant al altor compuși similari.

I.2.1. Antioxidanții în produse dermatocosmetice

Industria dermatocosmetică este în continuă dezvoltare și are un impact direct asupra societății. Nevoia de noi produse eficiente conduce cercetarea către formule avansate cu asocieri de diferite ingrediente active sau ingrediente similare în diferite concentrații. Mai mult, aceste ingrediente pot fi obținute în condiții economice mai favorabile din surse indigene. O serie de studii au arătat importanța asocierii antioxidantilor pentru creșterea activităților protectoare în celulele și țesuturile corpului, cu dovezi puternice pentru prevenirea și ameliorarea bolilor importante, fie sistemice, fie cutanate. Avantajele suplimentare sunt legate de biodisponibilitatea mai mare și conservarea ingredientului activ. Avantajul major al combinării compușilor bioactivi specifici poate fi creșterea acțiunii de bază, cu rezultate terapeutice mai bune și satisfacție mai bună pentru pacienți și specialiști, îmbunătățind astfel atributele produsului și înlocuind totodată compuși chimici (Turcov și colab., 2020b).

Aplicarea topică a antioxidantilor are rolul de a optimiza protecția antioxidantă la nivelul pielii și de a limita deteriorările cutanate induse de SRO:

- diminuează erupția polimorfă la lumină indusă de UVA,
- diminuează eritemul indus în terapia PUVA (psoralen +UVA)

➤ reduce formarea celulelor de tip “sunburn” (celula afectată masiv și ireversibil de acțiunea UVB, și care este supusă de mediatorii pro-apoptotici, unui proces de moarte celulară indusă, ca prevenție a formării unui fenotip malign) (McDaniel și colab., 2005).

I.2.3. Antioxidanți din surse naturale

Compușii bioactivi din extracte naturale joacă un rol important în industria farmaceutică de zeci de ani, cea dermatocosmetică fiind una dintre ariile majore de aplicabilitate. Beneficiile pentru sănătatea pielii ale ingredientelor bioactive naturale sunt numeroase și au dus la dezvoltarea unei categorii speciale de produse, biocosmetice sau cosmeceutice, o formă intermediară între medicină și cosmetică. Cu alte cuvinte, acestea conțin ingrediente biologice active și se consideră a fi similare cu produsele dermatologice cu utilizare topică (Soto și colab., 2018). Literatura de specialitate oferă următoarele sinonime: produse cosmetice performante, produse cosmetice funcționale, dermaceutice, cosmetice active, fitocosmetice, skinceutice, nutricosmetice, dermatocosmetice (Roncea și colab., 2016).

Ingredientele active naturale acționează ca un adjuvant eficient cu activitate importantă de biorevitalizare, protecție și suport trofic, dovedind activitate farmacologică semnificativă (Ramana și colab., 2014). Tipurile de compuși naturali regăsiți în dermatocosmetice sunt: hormoni, vitamine, enzime, alcaloizi, aminoacizi, antibiotice și antiseptice.

Plantele reprezintă o sursă de bază pentru antioxidanți, cu precădere metaboliții primari și secundari, în continuu studiu și exploatare, datorită interesului farmacologic și economic exercitat (Pietta și colab., 2003).

Pe lângă îmbunătățirea aspectului pielii datorită rolului antiaging, biocosmeticele sau cosmeceuticele și-au dovedit eficiența ca ingrediente active în prevenirea sau ameliorarea unor variate afecțiuni dermatologice (Tagami și colab., 2006). Unele efecte sunt exercitate simultan, cum sunt cele antioxidante, antiinflamatoare, anticarcinogenice, modulatori ale proliferării celulare, în angiogeneză, melanogeneză (Ndiaye și colab., 2011).

Partea a II-a

CONTRIBUȚII PERSONALE LA OBTINEREA DE NOI FORMULĂRI DERMATOCOSMETICE PRIN UTILIZAREA COMPUȘILOR BIOLOGIC ACTIVI DIN RESURSE NATURALE INDIGENE

Capitolul II. 2. MATERIALE ȘI METODE UTILIZATE

II. 2.1. Materiale utilizate

În realizarea tezei de doctorat am ales o serie de plante mai puțin utilizate în zona dermatocosmetică și/sau cosmetică, cultivate pe teritoriul României :

- ✓ Șofran (*Crocus sativus* L.),
- ✓ *Acmella oleracea*.

sau din flora spontană, cum sunt sânziennele (*Galium verum*).

Aceste plante vor fi prezentate și caracterizate în subcapitolele următoare.

Alături de acestea au fost folosite și o serie de reactivi cu proprietăți de principii active, extrase din surse naturale, cum ar fi resveratrolul și acidul ferulic.

De asemenea, am utilizat numeroși reactivi chimici pentru analizele calitative, cantitative sau de caracterizare structurală.

II. 2.2. Metode utilizate în dezvoltarea studiilor experimentale

Realizarea determinărilor experimentale s-a bazat în principal pe două tipuri de metode:

A - metode de obținere a extractelor vegetale;

B - metode de caracterizare calitativă și cantitativă a extractelor vegetale: activitate antioxidantă, conținut de polifenoli și flavonoide, dar și analize structurale – calitative (spectroscopia UV-Viz).

În realizarea obiectivelor studiilor experimentale s-au parcurs următoarele etape:

- (1) pregătirea materialului vegetal pentru extracție;
- (2) obținerea extractului vegetal brut, folosind diferite variante ale extracției lichid – solid.
- (3) caracterizarea structurală, calitativă și cantitativă a extractului brut.

II.2.2.1.4. Aprecierea eficienței metodelor de extracție

Eficacitatea metodelor de extracție folosite s-a făcut în baza valorilor randamentului de extracție, calculat în condiții specifice. Pentru calcularea acestuia s-a respectat următorul protocol: 5mL din fiecare extract au fost introduse într-un creuzet de porțelan, adus la greutate constantă, și supus apoi evaporării la sec într-o etuva model Poleko SLW53, la temperatura constantă de până la 45-50°C. După răcirea creuzetului, în exsicator, acesta a fost recântărit și s-a calculat randamentul cu relația II.2.1.

$$\eta \% = \frac{m_{\text{residuu}} \cdot V_{\text{extract}}}{n_{\text{extract}} \cdot m_{\text{proba solida}}} \cdot 100 \quad (\text{II.2.1.})$$

unde: m_{residuu} reprezintă masa reziduului obținut după evaporare la sec a probei de extract, (g); V_{extract} - volumul probei de extract supus evaporării la sec, (mL); n_{extract} - volumul total de extract obținut în urma extracției lichid-solid, (mL); $m_{\text{proba solidă}}$ - masa de material solid vegetal introdus în procesul de extracție lichid-solid, (g).

II.2.2.2. Metode de caracterizare a extractelor vegetale

Utilizarea extractelor vegetale în formularea diferitor preparate dermatocosmetice presupune mai întâi caracterizarea acestora atât din punct de vedere calitativ, cantitativ cât și al activității antioxidante.

Capitolul II. 3. **ÎMBUNĂTĂȚIREA CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE A** **RESVERATROLULUI PRIN COMBINARE CU ACID** **FERULIC**

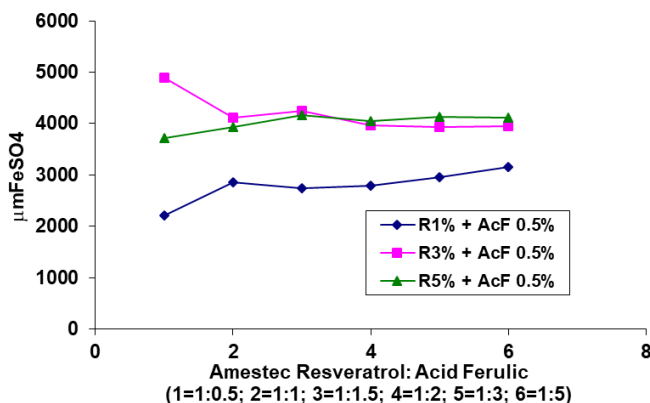
S-a lucrat cu:

- soluții apoase de resveratrol de concentrație 1%, 3% și 5%,
- acid ferulic pregătit sub formă de soluție stoc hidroalcoolică de concentrație 30% (s-a utilizat etanolul pentru solubilizare).

Au fost luate în considerare următoarele amestecuri de resveratrol : acid ferulic (v/v): 1: 1; 1: 2; 1: 3 și 1: 4.

Am determinat activitatea antioxidantă a acestor amestecuri și am comparat-o ulterior cu cea a resveratrolului simplu. Amestecurile au fost, de asemenea, caracterizate fizico-chimic prin analize termogravimetrice și spectrofotometrie UV-Viz (Turcov și colab., 2022a).

II. 3.1. Determinarea activității antioxidante a amestecului resveratrol – acid ferulic



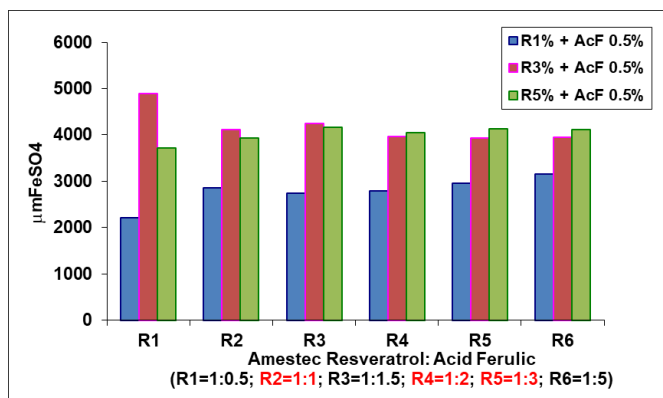


Figura II.3.1. Evaluarea activității antioxidante a amestecurilor de RV și AF prin metoda FRAP (Valorile capacității antioxidante pentru componenții puri: RV-1% = 794,875 μmFeSO_4 ; RV-3% = 698,625; μmFeSO_4 ; RV- 5% =905,625; μmFeSO_4 ; AF- 0,5% = 3186,875; μmFeSO_4)

Rezultatele subliniază că amestecurile de 1% și 3% resveratrol cu 0,5% acid ferulic într-un raport de (v/v) 1:1 și 1:2 asigură îmbunătățirea activității antioxidante a resveratrolului. Performanțele lor în ceea ce privește activitatea antioxidantă sunt aproape similare, criteriul care va face diferența fiind proprietățile terapeutice ale preparatului dermatocosmetic final și raportul cost: beneficiu al produsului final (Turcov și colab., 2022a).

În plus se observă, prin toate cele trei metode utilizate, că o concentrație mai mare de resveratrol (5%, așa cum regăsim în unele produse din piață) nu conduce neapărat și la rezultate semnificativ mărite față de concentrația de 3%.

Capitolul II. 4.

OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA EXTRACTELOR VEGETALE DIN ȘOFRAN (*Crocus sativus* L.)

II.4.2. Caracterizarea cantitativă a extractelor vegetale de șofran

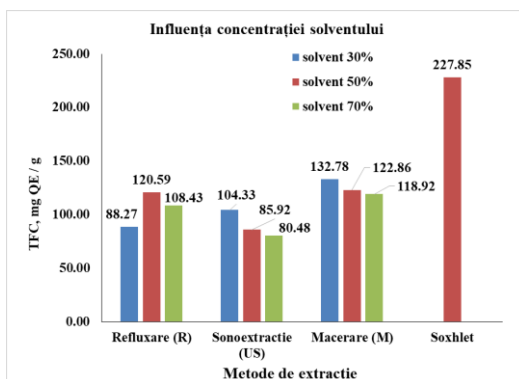
II.4.2.1. Determinarea concentrației totale de flavonoide

Determinarea conținutului de flavonoide (TFC), exprimat în mg quercitină (QE)/g, s-a făcut tratând probele de extract vegetal cu soluție metanolică de AlCl_3 2%, conform metodei descrise în capitolul II.2.2.2.3. Determinările s-au făcut pe fiecare extract obținut conform Tabelului II.4.1., respectiv în funcție de metoda de extracție și factorii de influență.

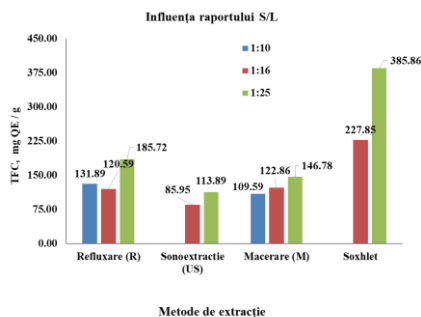
Urmărind compararea metodelor între ele pentru a o alege pe cea mai potrivită, dar intenționând și stabilirea parametrilor optimi pentru o anumită metodă, am ales reprezentarea rezultatelor în două moduri:

(i) comparativ între metodele folosite, selectând aceleași condiții de operare (Figura II.4.2.) și

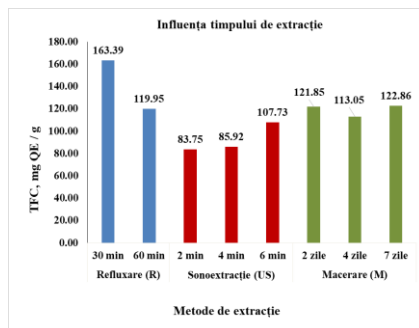
(ii) pentru fiecare metodă de extracție aplicată în funcție de parametrii de influență studiați (Figura II.4.3.).



(a)



(b)



(c)

Figura II.4.2. Conținutul total de flavonoide (TFC) în mg QE/g determinat comparativ pentru metodele de extracție utilizate funcție de parametri fizici luați în considerare (Turcov și colab., 2022)

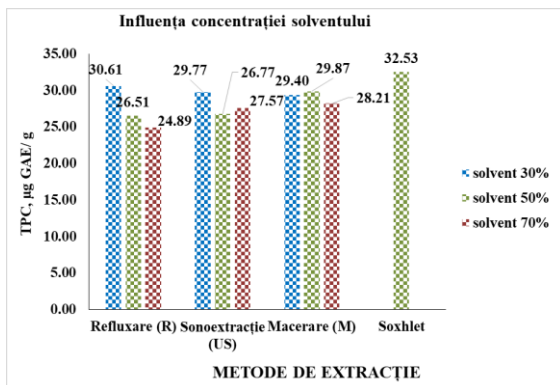
Condiții: (a) S/L = 1:16; R-60 min., M-7 zile, S-90 min. și US- 4 min.; (b) concentrația solventului = 50%; R-60 min., M-7 zile, S-90 min. și US- 4 min.; (c) concentrația solventului = 50%; S/L = 1:16.

II.4.2.2. Determinarea conținutului total de polifenoli

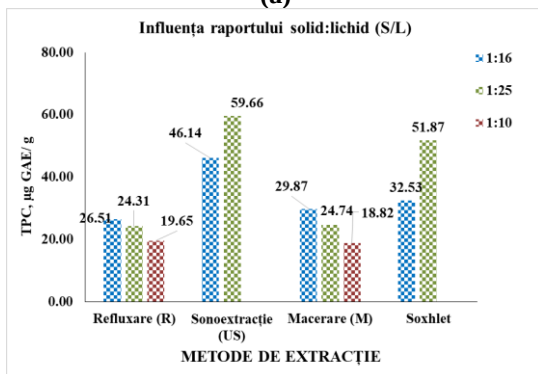
Determinarea conținutului total de polifenoli (TPC) exprimat în μg acid galic (GAE)/g extract, s-a făcut prin metoda Folin-Ciocalteu, descrisă în capitolul II.2.2.2.3. Determinările au fost realizate pentru fiecare tip de extract obținut, identificat conform Tabelului II.4.1., respectiv urmărind metoda de extracție și factorii săi de influență.

Pentru a putea compara metodele de extracție între ele în vederea selectării pe cea mai potrivită, dar intenționând și stabilirea parametrilor optimi pentru o anumită metodă, am ales reprezentarea rezultatelor în două moduri:

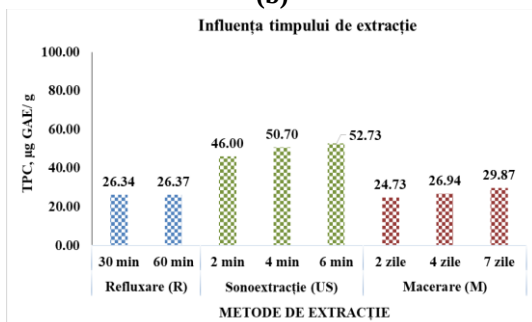
- (i) comparativ între metodele folosite, selectând aceleași condiții de operare (Figura II.4.4.) și
- (ii) pentru fiecare metodă de extracție aplicată în funcție de parametri de influență studiați (Figura II.4.5.).



(a)



(b)



(c)

Figura II.4.4. Conținutul total de polifenoli (TPC) în $\mu\text{g GAE/g}$ în cazul extractelor de șofran, determinat comparativ pentru metodele de extracție utilizate funcție de parametrii fizici luați în considerare (Turcov și colab., 2022). **Condiții:** (a) S/L= 1:16; R-60 min., M-7 zile, S-90 min. și US-4 min.; (b) concentrația solventului = 50%; R-60 min., M-7 zile, S-90 min. și US 4 min.; (c) concentrația solventului = 50%; S/L= 1:16.

II.4.2.3. Determinarea cantității de polifenoli și flavonoide din extractele vegetale de șofran-Concluzii

Sintetizând concluziile parțiale din capitolele II.4.2.1. și II.4.2.2. putem spune că:

- dacă pentru determinarea flavonoidelor se impun metodele bazate pe refluxare (în Soxhlet sau simplă), pentru determinarea polifenolilor primul loc revine sonoextracției urmată de refluxarea în Soxhlet.
- în ceea ce privește condițiile de realizare practică a acestor metode de extracție, se remarcă faptul că pentru ambele tipuri de compuși s-au obținut rezultate apreciable lucrând cu un raport S/L de 1:25 și un solvent de extracție (soluție hidroalcoolică de etanol) de concentrație 50%.
- în funcție de tipul de compuși bioactivi de interes, care urmează a fi extrași, se poate aplica o anumită metodă de extracție solid/lichid alegând parametrii de influență (timp de extracție, concentrație extractant, raport solid/lichid) astfel încât să se obțină cantitățile urmărite.

II.4.2.4. Evaluarea activității antioxidante

Capacitatea antioxidantă s-a determinat pe baza metodelor DPPH și ABTS descrise în capitolul II.2.2.2.2. Dintre extractele obținute s-au ales pentru analiză, aleatoriu, două, respectiv probele R2 și M5. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul II.4.3.

Tabelul II.4.3. Activitatea antioxidantă a unor extracte hidroalcoolice de șofran (Turcov și colab., 2022)

Proba	DPPH (mg TE/mL)	ABTS (mg TE/mL)
R2 (condiții S/L= 1:16; 50%; 60 min.) $C_{\text{polifenoli}} = 26,51 \mu\text{g GAE/g}$ $C_{\text{flavonoide}} = 120,50 \text{ mgQE/g}$	7,38 ± 0,41	28,23 ± 0,60

M5 (condiții S/L 1:16; 50%; 7 zile) $C_{\text{polifenoli}} = 29,398 \mu\text{g GAE/g}$ $C_{\text{flavonoide}} = 122,857 \text{ mgQE/g}$	$5,74 \pm 0,13$	$23,60 \pm 0,52$
---	-----------------	------------------

* Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ abaterea standard (SD) a trei determinări.
 Abrevieri: ABTS - acid 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina) 6-sulfonic; DPPH - 1,1-difenil-2-picrilhidrazil; TE - echivalente trolox.

Extractul obținut prin refluxare (R) a avut o activitate antioxidantă mai mare decât cel obținut prin macerare (M). Valorile parametrilor calculați nu au fost semnificativ diferiți, ceea ce este în concordanță cu conținutul de polifenoli și flavonoide determinat în compoziția acestora (Figurile II.4.2. - II.4.5 .).

II.4.3. Caracterizarea fizico-chimică a extractelor de șofran utilizând spectrofotometria UV-Viz

Rezultă și în acest caz că metoda de extracție influențează clasele de substanțe bioactive extrase, precum flavonoidele, polifenolii sau carotenoizii, precum și diferitele tipuri de compuși prezenți în extractele de șofran.

Capitolul II. 5.
OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA EXTRACTELOR
VEGETALE DIN SÂNZIENE (*Galium verum*)

II.5.2. Obținerea extractelor hidroalcoolice de sânziene (*Galium verum*)

II.5.2.1. Evaluarea eficienței tehnicilor de extracție utilizate în funcție de parametrii fizici care influențează extracția în cazul sânzienelor

Eficiența tehnicilor de extracție utilizate a fost apreciată folosind randamentul de extracție, care a fost calculat pentru fiecare variantă în parte, în funcție de parametrii stabiliți, precum: raportul solid/lichid, timpul de contact, starea plantei (verde sau uscată) și concentrația solventului de extracție. Randamentul de extracție a fost calculat cu ajutorul relației II.2.1. În acest scop 5 mL de extract de probă au fost prelucrate prin evaporarea la sec într-o etuvă termostatăă Poleko SLW53 (temperatură până la 50°C). Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelele II.5.4. și II.5.5.

Tabelul II.5.5. Randamentul extracției în cazul obținerii de extracte din planta uscată (sz) de *Galium verum*

Metoda de extracție	Proba	Caracteristici			Grad de extracție (%)
		Timp	Raport S:L	Concentrație solvent (%)	
Macerare (M)	M1 sz			30%	26,59
	M2 sz	8 zile	1:15	50%	26,59
	M3 sz			70%	22,11
	M4 sz			30%	28,34
	M5 sz	8 zile	1:20	50%	28,29
	M6 sz			70%	27,54
	M7 sz			30%	29,31
	M8 sz	8 zile	1:30	50%	28,06
	M9 sz			70%	27,43
	M10 sz	4 zile	1:15	50%	34,40

	M11 sz	11 zile	1:15	50%	33,75
Extracție prin refluxare (R)	R1 sz	60 min.	1:20	30%	33,59
	R2 sz	60 min.	1:20	50%	33,19
	R3 sz	60 min.	1:20	70%	34,38
	R4 sz	60 min.	1:15	50%	31,82
	R5 sz	60 min.	1:30	50%	31,82
	R6 sz	30 min.	1:20	50%	33,60
	R7 sz	90 min.	1:20	50%	32,77
Extracția asistată de ultrasunete (US)	US 1 sz			30%	15,18
	US 2 sz	4 min.	1:20	50%	14,77
	US 3 sz			70%	12,30
	US 4 sz	4 min.	1:15	50%	13,80
	US 5 sz	4 min.	1:30	50%	16,19
	US 6 sz	2 min.	1:20	50%	15,2
	US 7 sz	6 min.	1:20	50%	17,6
Extracție Soxhlet (Sx)	Sx1		1:20	70%	57,18
	Sx2		1:20	50%	42,79
	Sx3	90min.	1:30	70%	23,19
	Sx4		1:30	50%	31,52

Cele mai bune randamente de extracție s-au obținut în cazul plantei uscate, ceea ce se observă din valorile aproape duble față de cazul plantei umede, în aceleași condiții. O primă explicație ar fi aceea că planta uscată (cu doar 8,4% umiditate) este folosită în cantități mai mari în analize, deoarece în cazul plantei proaspete se adaugă și o cantitate considerabilă de apă (69,25 %) din umiditate, care se pierde prin uscare dar și cu o cantitate de compuși chimici mai volatili.

II.5.2.2. Caracterizarea cantitativă a extractelor vegetale hidroalcoolice

II.5.2.2.1.1. Calcularea conținutului de polifenoli și flavonoide pentru extractele din planta uscată

Pentru calcularea conținutului total de polifenoli (TPC) exprimat în μg acid galic (GAE)/g extract, am folosit metoda Folin-Ciocalteu (capitolul II.2.2.2.3). Rezultatele obținute prin prelucrarea datelor experimentale sunt sistematizate în figura II.5.1.

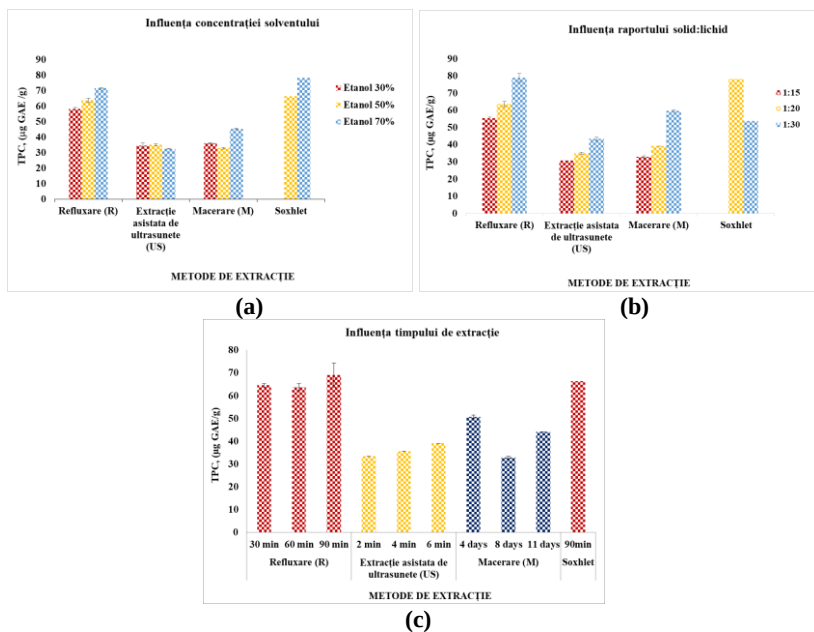


Figura II.5.1. Conținutul total de polifenoli (TPC) (μg GAE/g) din extractele vegetale obținute din planta uscată *Galium verum* în funcție de tipul de extracție și de parametri fizici luați în considerare. **Parametri variabili de lucru:** (a) R: S/L = 1:20; timp de extracție-60 min; M: S/L = 1:15; timp de extracție-8 zile; US: S/L = 1:20; timp de extracție-4 min; Soxhlet : S/L = 1:20; timp de extracție-90 min ; (b) concentrație solvent = 50%; R: timp de extracție-60 min, M: timp de extracție-8 zile; US : timp de extracție-4 min și Soxhlet: timp de extracție-90min; (c) concentrație solvent = 50%; R: S/L = 1:20; M: S/L = 1:15; US: S/L = 1:20; Soxhlet : S/L = 1:20.

La o privire de ansamblu, se poate spune că cele mai bune rezultate pentru **extracția polifenolilor din planta uscată de *Galium verum*** au fost obținute prin tehnica refluxării în cele două variante: refluxare simplă: 78,894 μg GAE/g (în condiții S/L = 1:30; 60 minute și concentrație alcool

etic 50%), urmată de refluxarea în Soxhlet: 78,21 μg GAE/g (în condiții S/L = 1:20; 90 minute și concentrație alcool etilic 50%).

Pentru calcularea *conținutului de flavonoide (TFC)* exprimat în mg quercitină (QE)/g extract, am folosit protocolul prezentat în capitolul II.2.2.2.3. iar rezultatele obținute prin prelucrarea datelor experimentale sunt sistematizate în figura II.5.2.

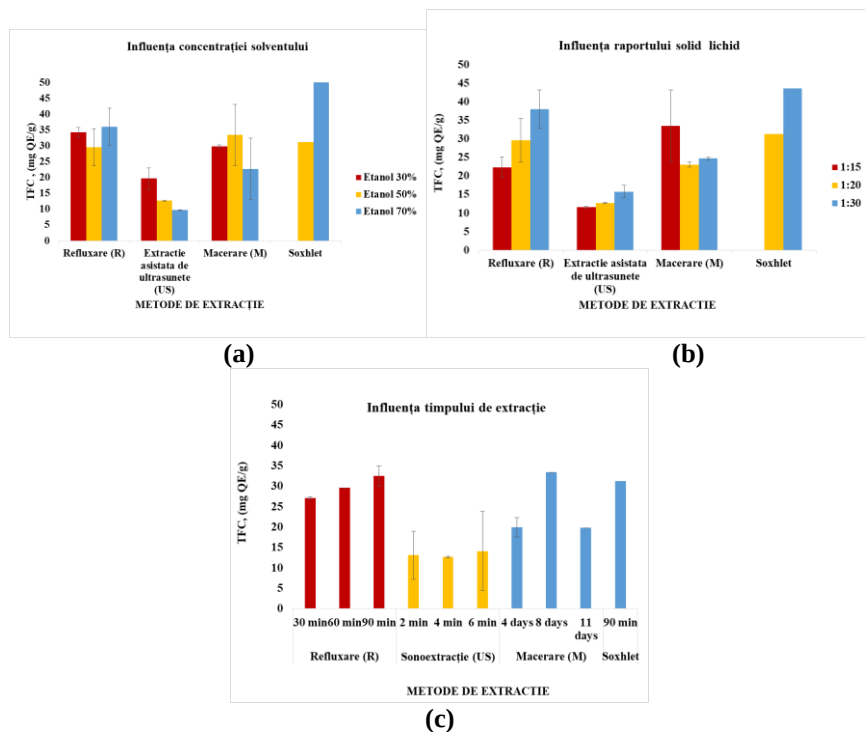


Figura II.5.2. Conținutul total de flavonoide (*TFC*, mg QE/g) din extractele vegetale obținute de planta uscată de *Galium verum* în funcție de metoda de extracție și de parametrii fizici considerați. **Parametri de lucru:** (a) R: S/L=1:20 și timp de extracție-60 min; M:S/L=1:15 și timp de extracție -8 zile; US: S/L=1:20 și timp de extracție-4 min; Soxhlet: S/L=1:20 și timp de extracție-90 min; (b) R:concentrație solvent = 50% și timp de extracție-8 zile; US:concentrație solvent = 50% și timp de extracție- 4 min; Soxhlet:concentrație solvent -50% și timp de extracție-90 min; (c) R: concentrație solvent = 50% și

S/L=1:20; M: concentrație solvent - 50% și S/L=1:15; US: concentrație solvent - 50% și S/L=1:20; Soxhlet: S/L=1:20; concentrație solvent-50%

Ca o concluzie la obținerea de extracte din planta de *Galium verum* uscată se poate spune că:

(1) a fost determinată o cantitate de flavonoide mai mare decât cea de polifenoli. Această observație este, de asemenea, în acord cu alte studii din literatură care specifică o varietate calitativă și cantitativă mai mare de flavonoide (de exemplu rutin, quercetin și derivații săi, kaempferol) în comparație cu polifenolii (cel mai ușor și cel mai frecvent identificat fiind acidul rosmarinic) (Zaichikova și colab., 2020);

II.5.5. Caracterizarea fizico-chimică a extractelor de sânziene utilizând spectroscopia UV-Viz

Rezultatele relevă peak-uri ale absorbantei specifice pentru principalii constituenți ai extractului de *Galium verum*: acid clorogenic (290/330 nm), rutin (260/356 nm), acid ferulic (310/340 nm), kaempferol (265/365 nm), **quercitina (206/255/369 nm)** și isoquercitina (268/370 nm), valori apropiate de cele oferite în literatura de specialitate. Spectrele confirmă faptul că extractul mai bogat în compuși este cel obținut din planta uscată, prin refluxare.

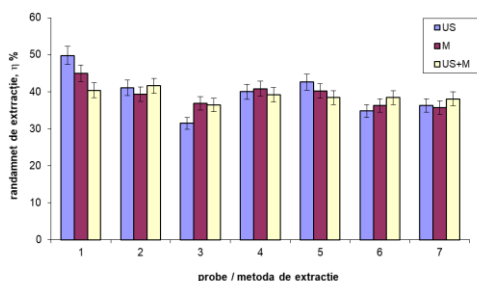
Se confirmă și din această analiză faptul că metoda de extracție influențează tipul de substanțe bioactive extrase.

Capitolul II.6.

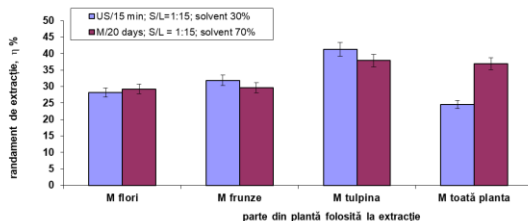
OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA EXTRACTELOR VEGETALE DIN *Acmella oleracea*

II.6.1.2. Randamentul extracției

Eficiența acestor metode a fost monitorizată în funcție de trei parametri: raportul solid-lichid (1:15; 1:20; 1:30), concentrația extractantului (30%, 50% și 70%) și timpul de extracție (specific fiecărei metode de extracție studiată), protocol de lucru fiind sistematizat în Tabelul II.6.1.



(a)



(b)

Figura II.6.1. Randamentul de extracție: (a) în cazul extracției din planta întreagă (notațiile 1...6 corespunzând notațiilor probelor din Tabelul II.6.1. pentru fiecare metodă de extracție); (b) în cazul extracției din diferite părți de plantă (Turcov și colab., 2024)

Folosind experimental întreaga plantă pentru extracție, deși s-au obținut randamente apropiate în cazul celor trei metode de extracție testate, totuși se observă că macerarea (M) și sonoextracția (US) au condus la valori ușor mai crescute ale randamentului (Figura II.6.1.a). În Figura II.6.1b sunt prezentate rezultatele, exprimate în procente de extracție, obținute considerând ca metode de extracție macerarea (M) în condiții de timp de extracție – 20 zile; raport S/L = 1:15 și concentrația solventului = 70% și

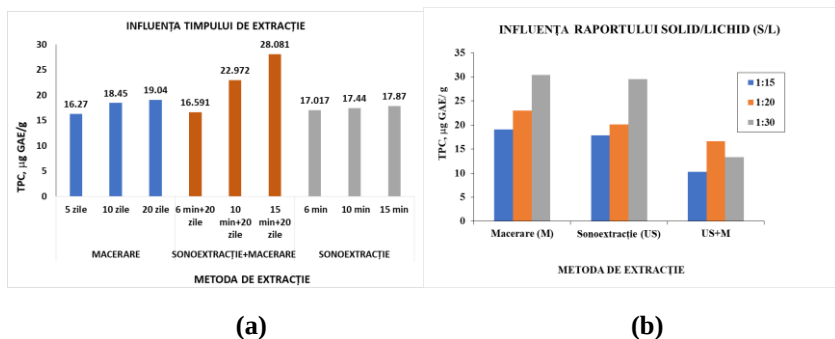
sonoextracția (US) în condiții de timp de extracție – 15 minute; raport S/L = 1:15 și concentrație de solvent = 30%, iar ca material de extracție s-au folosit diferite părți ale plantei. Rezultatele obținute (Figura II.6.1.b) au condus la concluzia că în cazul extracției din tulpina plantei s-au obținut cele mai bune rezultate.

II.6.2. Caracterizarea cantitativă a extractelor vegetale de *Acmella oleracea*

Caracterizarea cantitativă a extractelor obținute s-a realizat prin determinarea conținutului total de polifenoli (TPC) și a celui de flavonoide (TFC) pe baza protocolului descris în capitolul II.2.2.2.3.

II 6.2.1. Calcularea conținutului de polifenoli

Determinările s-au bazat pe metoda Folin – Ciocâlțeu, iar exprimarea conținutului total de polifenoli s-a făcut în micrograme de acid galic (μg GAE/mL)/g extract. Determinarea cantităților de polifenoli (TPC), realizată în triplicat, s-a făcut pentru toate tipurile de extracte de *Acmella oleracea* obținute, scopul urmărit fiind acela de a găsi extractului cel mai bogat în polifenoli cu identificarea modului de extracție și a condițiilor experimentale care au condus la aceste rezultate. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura II.6.2



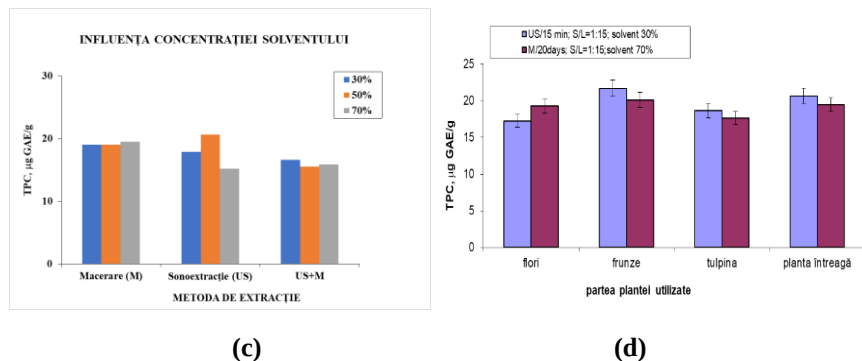


Figura II.6.2. Conținutul total de polifenoli (TPC) (µg GAE/g) din extractele de *Acmella oleracea* obținute din planta întreagă (a-c) și din diverse părți ale plantei (d), funcție de metoda de extracție utilizată și factorii care influențează procesul (a-c). **Condiții:** (a) S/L = 1:15; M-20 zile, US-15 min, US-M-10min+20zile (Turcov și colab., 2024).

În ceea ce privește conținutul de polifenoli din extractele obținute din diferite părți ale plantei, rezultă ca metodele folosite pentru extracție: macerarea (S/L=1:15, timp de extracție de 20 de zile și concentrație extractant de 70%) și sonoextracția (S/L=1:15, timp de extracție de 15 minute și concentrație extractant de 30%) au condus la rezultate comparabile privind cantitatea de polifenoli. Aceste rezultate arată că din frunze s-a extras o cantitate de polifenoli ușor mai mare, astfel:

- ✓ sonoextracție: 21,69 µg GAE/g din frunze și 20,63 µg GAE/g din toată planta;
- ✓ macerare: 20,099 µg GAE/g din frunze și 19,46 µg GAE/g din toată planta.

Aceste rezultate se înscriu pe linia celor rezultate din reprezentarea grafică din Figura II.6.1b (chiar dacă aici au fost luate în considerare totalul extractibilelor).

O concluzie preliminară ar fi că lucrările ulterioare folosind extractul din întreaga plantă ar putea oferi rezultate foarte bune în ceea ce privește conținutul total de polifenoli - substanțe antioxidante care intervin în combaterea stresului oxidativ asupra pielii.

II 6.2.2. Calcularea conținutului de flavonoide

Caracterizarea cantitativă a extractelor obținute s-a realizat și prin determinarea conținutului de flavonoide (TFC) pe baza protocolului descris în capitolul II.2.2.2.3. Determinările au avut la bază tratarea extractului cu soluție metanolică de AlCl_3 (2%) și citirea absorbanței soluției colorate la lungimea de undă de 510 nm . Rezultatele s-au exprimat în mg quercitină (mg QE/g).

Și în cazul determinărilor de flavonoide experimentele s-au realizat în triplicat și s-au făcut pentru toate tipurile de extracte din *Acmella oleracea*. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura II.6.3.

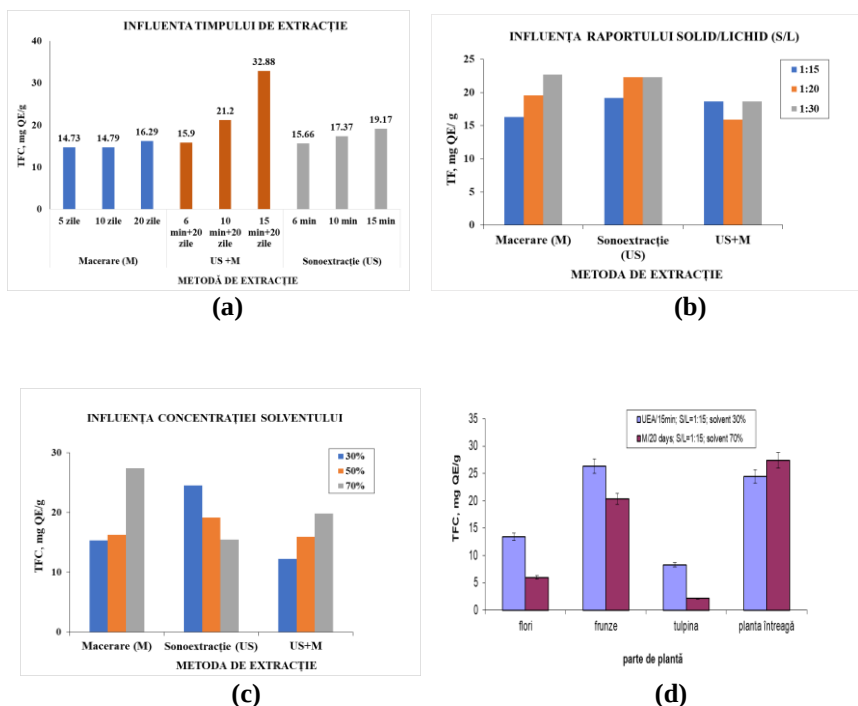


Figura II.6.3. Conținutul de flavonoide (TFC în mg QE/g) din extractele de *Acmella oleracea* obținute din planta întreagă (a-c) și din diverse părți ale plantei (d), funcție de metoda de extracție utilizată și factorii care influențează

procesul (a-c). **Condiții:** (a) S/L = 1:15; M-20 zile, US-15 min, US-M-10min+20zile (Turcov și colab., 2024).

Rezultatele obținute pentru determinarea celor două tipuri de compuși activi permit alegerea metodei și condițiilor de lucru în funcție de scopul urmărit și de condițiile economice disponibile la un moment dat.

II.6.2.3. Evaluarea activității antioxidante

O altă metodă pentru caracterizarea extractelor vegetale o reprezintă evaluarea activității antioxidante. În acest scop am ales aleatoriu, un extract cu o compoziție medie de polifenoli și flavonoide, dar cu cel mai mare randament în extractibile (49,8%), respectiv extractul obținut din toată planta prin sonoextracție (US1) în condiții de raport S/L=1:15, 15 minute timp de extracție, folosind ca solvent de extracție etanolul sub formă de soluție apoasă de 30% concentrație. Am folosit pentru determinarea activității antioxidante două metode: DPPH și ABTS al căror protocol a fost prezentat în capitolul II.2.2.2.2.

Rezultatele au fost următoarele: $737.96 \pm 20.25 \mu\text{g TE/g}$ extract prin DPPH și $2387.67 \pm 31.34\mu\text{g TE/g}$ extract prin ABTS (TE reprezintă echivalenți de Trolox). Aceste rezultate vor fi deosebit de utile la formularea serului pe bază de extract de *Acmella oleracea* (Turcov și colab., 2024).

II.6.3. Caracterizarea fizico-chimică a extractelor de *Acmella oleracea* utilizând spectrofotometria UV-Viz

Vârful major ar putea fi atribuit spilantholului - componenta principală în extractele de plante din specia *Acmella* (Savic și colab., 2021; Stein și colab., 2021).

De asemenea, în Figura II.6.5. sunt prezentate spectrele trasate pentru extractele obținute prin sonoextracție folosind diferite părți ale plantei de *Acmella oleracea*. Sonoextracția a avut loc în următoarele condiții experimentale: raport S/L = 1:15, timp de extracție 15 minute, concentrație solvent de extracție 30%.

Din Figura II.6.5 se observă că aliura spectrelor este foarte asemănătoare ceea ce sugerează o compoziție calitativă asemănătoare și a extractelor respective indiferent de modalitatea de obținere, ceea ce coincide cu rezultatele prezentate anterior (Figura II.6.2.-II.6.3.).

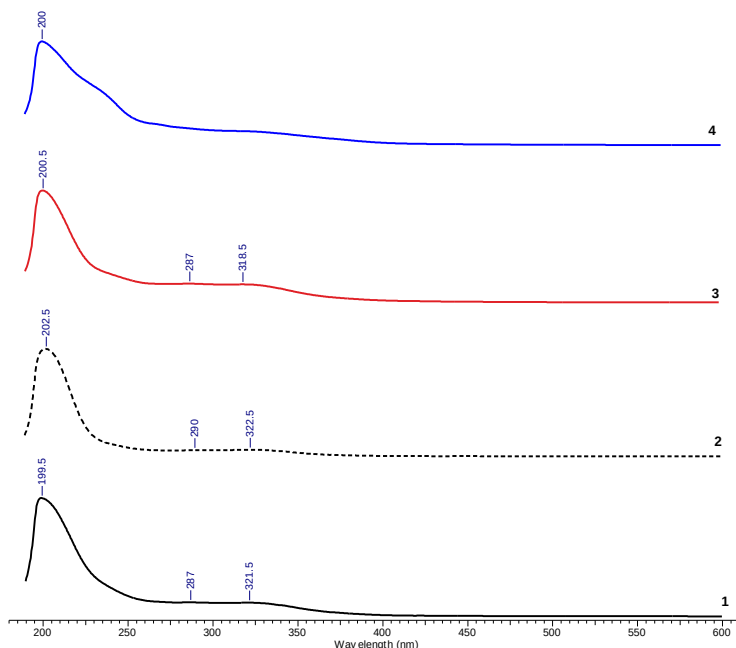


Figura II.6.5. Spectrele UV-Viz ale extractelor de *Acmella oleracea* preparate prin sonoeextracție folosind: 1 – plantă întreagă; 2 – tulpină; 3 – frunze și 4 – flori (Turcov și colab., 2024).

Capitolul II. 7.

FORMULE DERMATOCOSMETICE PE BAZĂ DE EXTRACTE NATURALE DIN SURSE INDIGENE

Acest capitol reprezintă etapa de concretizare a obiectivului general prezentat în Capitolul II.1, prin „formularea și caracterizarea preliminară a unor noi produse dermatocosmetice care au la bază ingrediente cu acțiune antioxidantă obținute din surse naturale indigene, atât din flora spontană cât și din plante de cultură”, precum și prezentarea pe larg a produselor formulate, împreună cu investigațiile multiple realizate asupra acestora.

II.7.1. Prepararea emulsiilor

II.7.1.1. Componentii emulsiilor

Pentru realizarea emulsiilor ulei/apă (U/A) s-au folosit trei baze inițiale, acestea având compoziții chimice diferite (emulgator, co-emulgatori și stabilizator), fiecare component având un rol bine determinat în formularea finală (Tabelul II.7.1.) (Turcov și colab., 2022b).

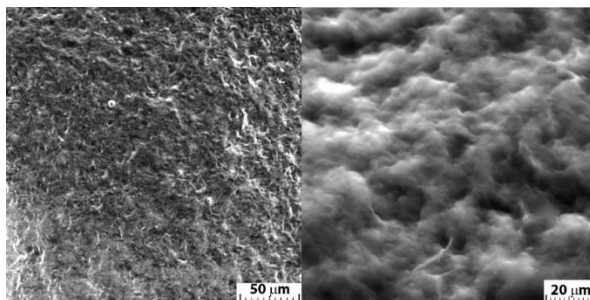
Aceste trei baze au fost testate pentru a identifica formula unei emulsii finale care să ofere cea mai bună compatibilitate cu pielea (absorbție și penetrare rapidă și uniformă), proprietăți senzoriale plăcute după aplicare și cea mai bună complianță pentru pacient.

II.7.2. Metode de caracterizare a emulsiilor obținute

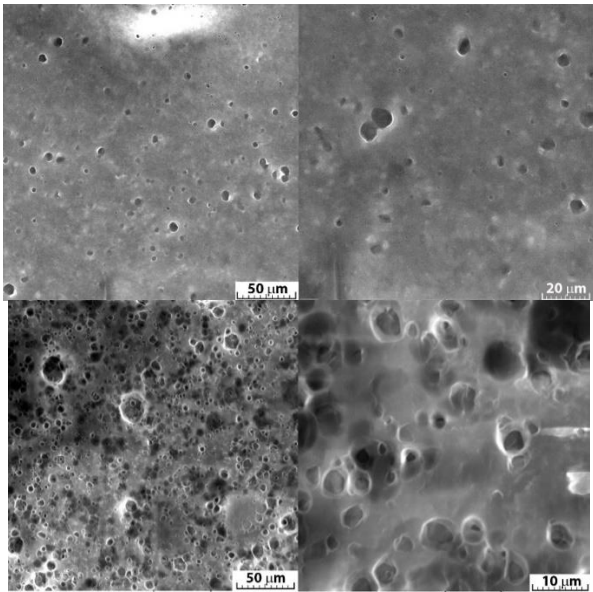
II.7.2.1. Evaluarea omogenității bazelor din structura emulsiilor

Înainte de pregătirea emulsiilor de lucru, cele trei baze au fost analizate din punct de vedere al omogenității structurii folosind în acest scop două metode de analiză: microscopia electronică (SEM) și spectroscopia cu dispersie de raze X (EDX).

Sunt prezentate micrografiile (Figura II.7.2) și distribuții elementare pentru fiecare probă de bază (Figura II.7.3.).



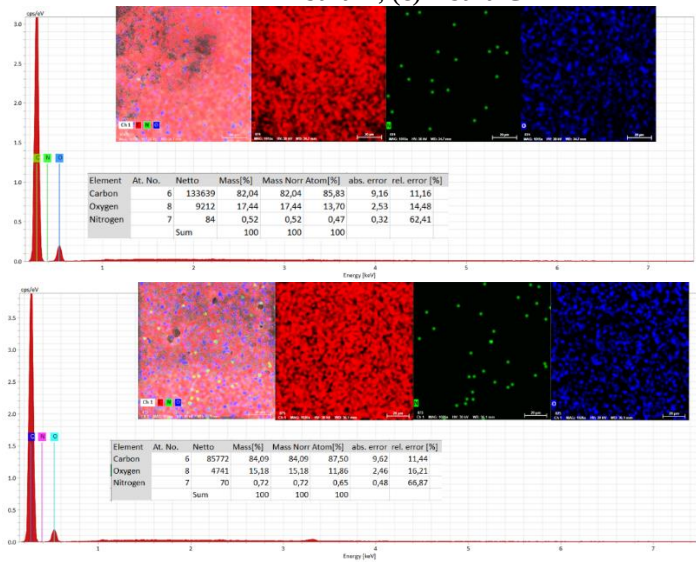
(a)



(b)

(c)

Figura II.7.2. Imagini SEM pentru cele trei baze folosite: (a) – baza A; (b) – baza B; (c) – baza C



(a)

(b)

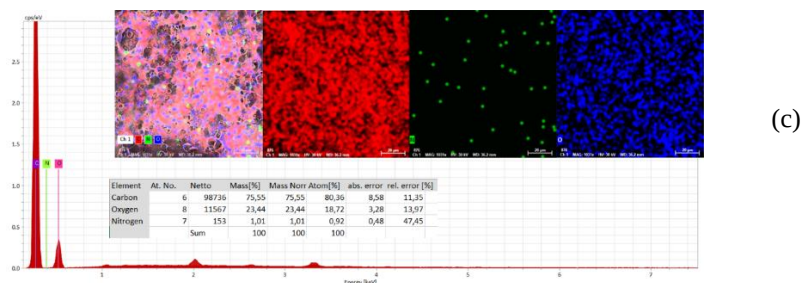


Figura II.7.3. Spectre EDX pentru cele trei baze folosite: (a) – baza A; (b) – baza B; (c) – baza C

În Figura II.7.2.a. emulsia prezintă aspect de fibră, posibil datorat ingredientelor din baza emulsiei (polyglyceryl stearatului, emulsifiantul bazei A). În Figura II.7.2.b. se observă o peliculă care dovedește scoaterea apei din sistem în urma vidării de 24 de ore. Aspectul este omogen, ceea ce înseamnă că ingredientele sunt compatibile între ele. În Figura II.7.2.c. este identificată rețeaua caracteristică gumei de xanthan sau polimerilor naturali.

Compoziția chimică a bazelor utilizate în formularea unor emulsii dermatocosmetice a fost caracterizată folosind spectroscopie cu raze X (EDX). S-au făcut determinări în trei zone de pe suprafața materialului (1mm²) și s-a folosit o medie. Analiza spectrelor bazelor (Figura II.7.3.) a identificat C, O, Na și N la diferite energii de raze X și în proporții asemănătoare, și în acord cu datele din Tabelele II.7.2. – II.7.4.

Imaginile confirmă omogenitatea emulsiilor, dovadă a compatibilității bune între ingredientele acestora.

II.7.2.2. Caracterizarea emulsiilor

Probele supuse oricărei analize au fost aduse la temperatura camerei. Determinările de stabilitate (pH, conductivitate și test de centrifugare) au fost efectuate în momente diferite de timp, cum ar fi: imediat după preparare, după 7 zile și după o luna de la preparare și depozitare în condiții normale (temperatura de până la 25 °C, în recipiente fără aer din material care împiedică pătrunderea razelor de lumina - Figura II.7.4.).



Figura II.7.4. Recipiente pentru depozitarea emulsiilor

II.7.3. Emulsii pe bază de resveratrol – acid ferulic

Folosind cele trei baze pregătite anterior, de compoziții chimice diferite (emulgator, co-emulgatori și stabilizator) (Figura II.7.8) au fost preparate șase tipuri de emulsii comerciale de tipul U/A folosind resveratrol și acid ferulic sub forma amestecurilor studiate în capitolul II.3. : RV (3%) și AF (0,5 % (g/g), precum și o emulsie pe bază de resveratrol + acid ferulic dar și cu adaos de extract vegetal de șofran (6,66 %(v/w). Rolul extractului a fost de a mări capacitatea antioxidantă a amestecului inițial. Aceste emulsii sunt prezentate în Tabelul II.7.5.

Table II.7.5. Tipuri de emulsii pregătite pe bază de resveratrol și acid ferulic

Baza	Faze, % (w/w)		Substanțe active, % (w/w)
	Dispersă (U)	Continuă (A)	
A	28	67,3	4,7
B	29	67	4
C	37	58,3	4,7

Notații: **A1**—Baza A + 0,5% AF + 3% RV; **A3**—Baza A + 0,5% AF + 3% RV + 1 mL extract șofran; **B1**—Baza B + 0,5% AF + 3% RV; **B3**—Baza B + 0,5% AF + 3% RV + 1 mL extract de șofran; **C1**—Baza C + 0,5% AF + 3% RV; **C3**—Baza C + 0,5% FA + 3% RV + 1 mL extract de șofran.

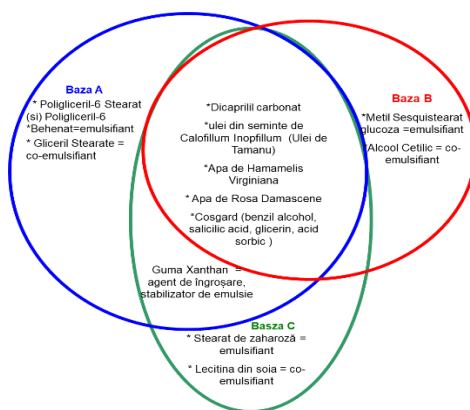


Figura II.7.8. Compușii chimici ai bazelor implicate în formularea celor trei emulsii dermatocosmetice comerciale (Turcov și colab., 2022a)

Emulsiile preparate au fost caracterizate din punct de vedere al comportamentului reologic și stabilității la posibila contaminare microbiologică în timpul depozitării sau utilizării preparatului dermatocosmetic. Toate determinările experimentale care au vizat stabilitatea emulsiilor au fost efectuate în trei exemplare.

II.7.3.1. Determinarea pH-ului

Determinarea pH-ului a arătat valori cuprinse între 4,65–5,005 în cazul emulsiilor din seria bazei A; 4,7–5,001 pentru emulsii cu bază B și 4,7–5,004 pentru emulsii din seria C.

II.7.3.2. Determinări conductometrice

Analiza conductometrică a fost utilizată pentru a determina modul în care se comportă substanța activă (extractul vegetal) care a fost limitată în faza interioară a emulsiei primare. Este bine cunoscut faptul că ingredientul activ este liber să se deplaseze în faza apoasă externă și că efectele vor fi mai puțin de lungă durată cu cât un electrolit este eliberat mai mult. Dacă valorile conductivității cresc în timp ce produsul este depozitat, acest lucru se poate datora faptului că ingredientul activ difuzează, fazele interne și apoase se coalescează sau pelicula de ulei este distrusă de presiunea osmotică și scurgerea fazei apoase interne (Mahmood și Akhtar, 2013; Kim și colab., 2020; Hu și colab., 2017). Valorile măsurătorilor demonstrează stabilitatea

emulsiilor examinate în timp. Determinările de conductivitate au arătat valori între 0,21 și 0,48 mS (Turcov și colab., 2022a).

II.7.3.6. Controlul microbiologic

Emulsiile dermatocosmetice conțin, în general, nutrienți favorabili care susțin creșterea microbiană; prin urmare, menținerea calității este extrem de importantă: acestea ar trebui să fie lipsite de microorganisme patogene, iar încărcătura bacteriană aerobă totală ar trebui să fie sub limite pentru a nu provoca infecții ale pielii (Aleem și colab., 2020). De obicei, contaminarea microbiană are două puncte de plecare diferite: procesul de producție, inclusiv ingredientele, ustensilele și umplerea recipientelor; și, secundar, în timpul utilizării de către consumator/pacient. Tabelul II.7.8. prezintă rezultatele testelor microbiologice exprimate prin numărul de unități formatoare de colonii măsurate per gram de probă (UFC/g) (Turcov și colab., 2022a).

Tabel II.7.8. Rezultatul testelor microbiologice la 3 luni (citirea plăcii după 24/48 h) după inoculare pentru proba aparținând formelor inclusiv baza A, B și C

Emulsia	Numărul total de microorganisme viabili, UFC/g	Conținutul total de bacterii viabile, UFC/g	Conținut total de drojdii și fungi, UFC/g
Baza A	0	0	0
A1	0	0	0
A3	10	0	10
Baza B	0	0	0
B1	10	10	0
B3	10	0	10
Baza C	0	0	0
C1	0	0	0
C3	0	0	0

Valorile din Tabelul II.7.8 arată că emulsiile prezintă o bună stabilitate, cu valori ale UFC <100 UFC/g, încadrate în limitele stabilite de standardele în vigoare în acest domeniu (ISO 18415:2007).

II.7.3.7. Activitatea antioxidantă

Studiile privind activitatea antioxidantă a emulsiilor preparate și analizate au urmărit, în primă fază, determinarea cantității de compuși cu acțiune antioxidantă, respectiv polifenoli (TPC) și flavonoide (TFC), și determinarea activității antioxidante a emulsiilor folosind metoda DPPH și

ABTS. Rezultatele acestor analize sunt prezentate în Tabelul II.7.9 (Turcov și colab., 2022a).

Tabel II.7.9. Conținutul de polifenoli, flavonoide și activitatea antioxidantă a emulsiilor studiate

Proba	TPC ($\mu\text{g GAE/g}$ emulsie)	TFC (mg RE/g emulsie)	DPPH (mg TE/g emulsie)	ABTS (mg TE/g emulsie)
A1	$21,32 \pm 0,40$	$0,17 \pm 0,01$	$4,38 \pm 0,02$	$10,85 \pm 0,08$
A3	$6,25 \pm 0,38$	$0,10 \pm 0,01$	$5,63 \pm 0,09$	$12,77 \pm 0,26$
B1	$20,68 \pm 1,35$	$0,29 \pm 0,02$	$9,41 \pm 0,05$	$13,14 \pm 0,14$
B3	$8,24 \pm 0,81$	$0,65 \pm 0,05$	$7,90 \pm 0,01$	$11,65 \pm 0,03$
C1	$23,31 \pm 0,95$	$0,06 \pm 0,001$	$7,74 \pm 0,06$	$12,72 \pm 0,22$
C3	$21,96 \pm 0,88$	$0,27 \pm 0,02$	$8,57 \pm 0,11$	$13,48 \pm 0,15$

Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ abaterea standard (SD) a trei determinări. Abrevieri: ABTS—acid 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolină) 6-sulfonic; DPPH-1,1-difenil-2-picrilhidrazil; GAE, echivalenți de acid galic; RE—echivalenți de rutină; TE—echivalenți de trolox; TFC - conținut total de flavonoide; TPC - conținutul total de polifenoli.

Diferențele între rezultatele obținute se datorează aparent doar activelor din cele două tipuri de emulsii studiate. În ceea ce privește activitatea antioxidantă măsurată prin DPPH și ABTS se remarcă o creștere ușoară în emulsiile care au pe lângă RV+AF și extract de șofran, după cum se vede în cazul celor cu bază A și C, explicată prin acțiunea sinergică a tuturor componentelor formulei analizate.

II.7.3.8. Teste reologice

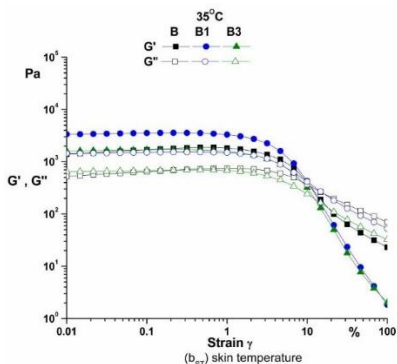
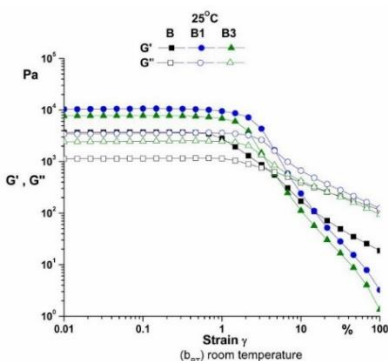
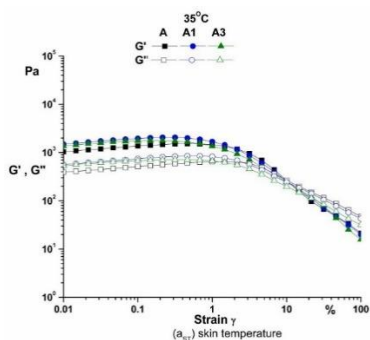
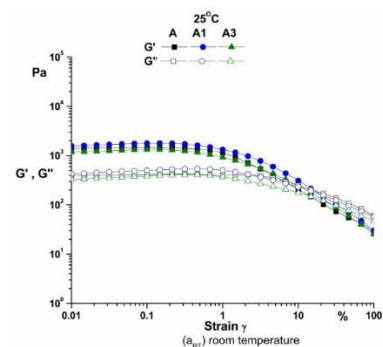
Testele reologice oferă informații cantitative despre proprietățile unui produs prin măsurarea comportamentului la curgere și la deformare a unei probe (Tabilo-Munizaga și colab., 2005; Adejokun și colab., 2020). Înțelegerea și controlul comportamentului reologic sunt foarte importante pentru fabricarea, transportul, depozitarea și aplicarea emulsiilor (Dimitrova et. al. și colab., 2004). Emulsiile cosmetice sunt amestecuri multicomponente

care conțin stabilizatori, agenți de îngroșare, agenți tensioactivi, co-surfactanți și alte ingrediente (Kwak și colab., 2015), cu parametri reologici care depind de proprietățile și interacțiunea componentelor (Dimitrova și colab., 2004). Aplicarea și acceptarea de către consumatori a emulsiilor cosmetice depind de comportamentul reologic al produselor finale (Herh și colab., 1998; Colo și colab., 2004; Kwak și colab., 2015).

Teste oscilatorii

Baleiajul de amplitudine

Modulul de acumulare (G') este mai mare decât modulul de pierdere (G'') indicând un comportament de tip solid (Tabelul II.7.10, Figura II.7.10) (Eren și colab., 2015).



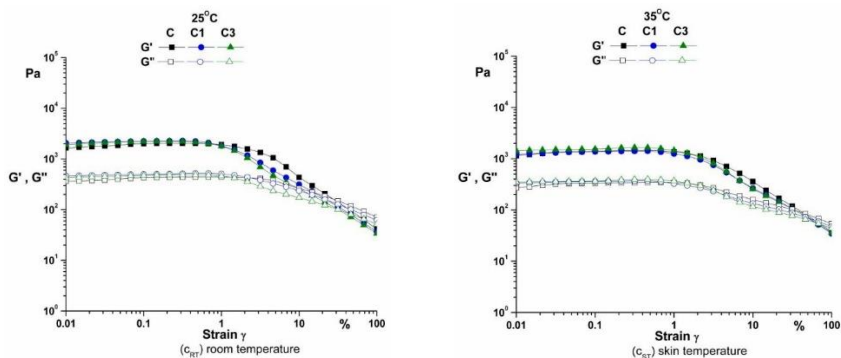


Figura II.7.10. Baleiajul de amplitudine al emulsiilor (Turcov și colab., 2022a)

Teste de baleiaj de temperatură

Modulii dinamici ai emulsiilor dermatocosmetice scad odată cu creșterea temperaturii (Figura II.7.12.).

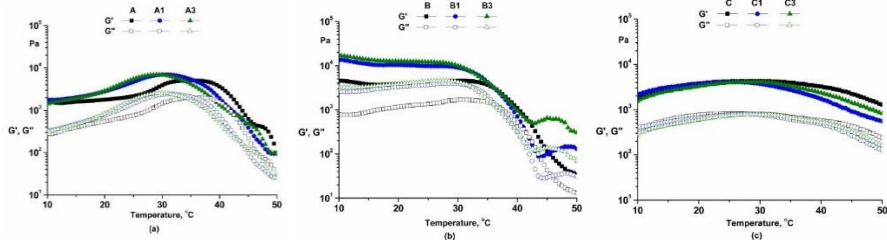


Figura II.7.12. Teste de baleiaj de temperatură în regim oscilatoriu pentru emulsii A, A1, A3 (a), B, B1, B3 (b) și C, C1, C3 (c) (Turcov și colab., 2022a).

Teste de baleiaj de timp

Testele de baleiaj de timp în regim oscilatoriu au fost efectuate pentru a estima stabilitatea structurală în timp a emulsiilor dermatocosmetice preparate. Aceste teste (Figura II.7.13.) au evidențiat o stabilitate foarte bună în timp a probele analizate.

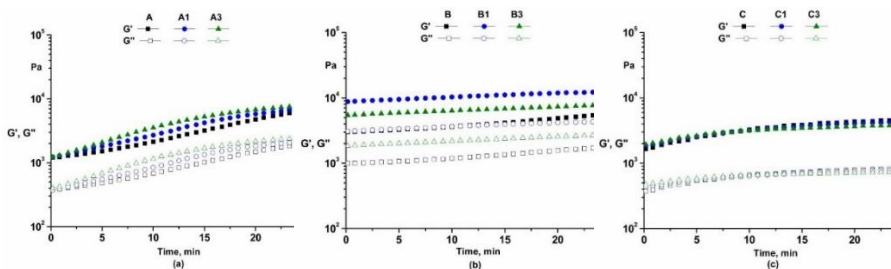


Figura II.7.13. Teste de baleiaj de timp în regim de oscilatoriu pentru emulsiile A, A1, A3 (a), B, B1, B3 (b) și C, C1, C3 (c).

Pentru unele emulsiile cosmetice, s-a observat o ușoară creștere a modulilor dinamici în timp. Acest lucru poate fi explicat prin posibilele efecte de evaporare care conduc la concentrarea probei.

Concluzii caracterizare reologică

Emulsiile dermatocosmetice prezintă valori diferite ale pragului de curgere, care pot fi corelate cu senzația pe care consumatorii o au la contactul produsului cu pielea în timpul utilizării. Probele analizate prezintă un comportament pseudoplastic. Acest comportament este corelat cu capacitatea de etalare a emulsiilor dermatocosmetice atunci când sunt aplicate pe pielea umană. Testele oscilatorii confirmă comportamentul vâscoelastic al acestor emulsiile dermatocosmetice. Probele analizate au un comportament caracteristic de tip solid, o proprietate care poate explica stabilitatea la depozitare a emulsiilor dermatocosmetice.

II.7.4. Caracterizarea emulsiilor care conțin extract de șofran

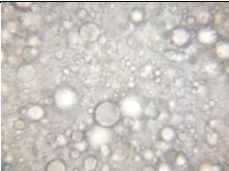
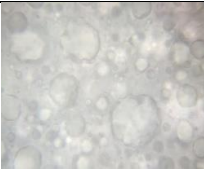
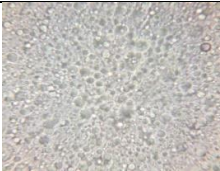
Caracterizarea preliminară a emulsiilor dermatocosmetice preparate s-a desfășurat după un plan ce include studiul stabilității (analiza organoleptică, determinarea pH-ului, aprecierea omogenității, efectul forțelor mecanice (centrifugă și vibrațională), controlul microbiologic), tolerabilității și eficienței (biocompatibilitate și determinarea acțiunii antioxidante – *in vitro*, tolerabilitate și efect asupra pielii – *in vivo*).

II.7.4.3. Microscopie optică

Pentru a studia morfologia și omogenitatea probelor, s-a folosit analiza la nivel microscopic folosind un microscop binocular Optika B-159 (OPTIKA S.r.l., Ponteranica (BG), Bergamo, Italia), a fost folosită mărirea—1000. În acest scop s-au prelevat probe din emulsiile respective

după 7 zile și, respectiv, o lună de la preparare și păstrare în condiții normale. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul II.7.11.

Tabel II.7.11. Caracterizarea preliminară a emulsiilor pe bază de extract de șofran

Metoda	Emulsii		
	A2	B2	C2
imagini după centrifugare			
stabilitate după centrifugare	Textura și aspectul sunt intacte	Apariția unui strat superior subțire de spumă ușoară	Textura și aspectul sunt intacte
aspect microscopic la 7 zile de la preparare			

Toate formulările au prezentat o bună stabilitate fizică și chimică. Încorporarea produsului natural nu a afectat negativ stabilitatea formulărilor dermatocosmetice studiate.

II.7.4.6. Activitatea antioxidantă a emulsiilor

Tabel II.7.13. Conținutul de polifenoli (TPC) și flavonoide (TFC) și activitatea antioxidantă a emulsiilor dermatocosmetice pe bază de șofran

Proba	TPC	TFC	DPPH	ABTS
	(mg GAE/g emulsie)	(mg RE/g emulsie)	(mg TE/g emulsie)	(mg TE/g emulsie)
A1	21,32 ± 0,40	0,17 ± 0,01	4,38 ± 0,02	10,85 ± 0,08

B1	20,68 ± 1,35	0,29 ± 0,02	9,41 ± 0,05	13,14 ± 0,14
C1	23,31 ± 0,95	0,06 ± 0,001	7,74 ± 0,06	12,72 ± 0,22

Datele sunt prezentate ca medie ± abaterea standard (SD) a trei determinări. Abrevieri: ABTS—acid 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-sulfonic; DPPH-1,1-difenil-2-picrilhidrazil; GAE, echivalenți de acid galic; RE—echivalenți de rutină; TE—echivalenți de trolox; TFC - conținut total de flavonoide; TPC - conținutul total de polifenoli.

Rezultatele prezentate în Tabelul II.7.13. arată clar că emulsia cu bază B prezintă activitate antioxidantă mărită comparativ cu celelalte două, fiind urmată de emulsia cu bază C. Aceste rezultate sunt o sursă valoroasă de informații care, împreună cu rezultatele celorlalte determinări, vor constitui criteriile de selectare a emulsiilor care vor urma cursul testelor *in vitro*.

II.7.5. Emulsii care conțin extract din sânziene

Au fost preparate trei tipuri de emulsii comerciale U/A, folosind cele trei baze prezentate și caracterizate anterior (subcapitolul II.7.1.; Tabelul II.7.1.): A, B și C și ca activ 1mL de extract de *Galium verum* obținut prin refluxare (R) realizată în condiții de raport S/L = 1:20 și concentrație de solvent = 50% EtOH. Emulsiile au fost notate A4, B4, C4. Aceste emulsii s-au diferențiat prin compoziția chimică a bazelor utilizate (emulgator, co-emulgatori și stabilizator).

În obținerea emulsiilor s-a respectat protocolul descris în subcapitolul II.7.1. Pentru studiile ulterioare pe emulsii, probe de câte 15g au fost cântărite și ambalate în recipiente brune, fiind păstrate în camere răcoroase până la analiză, o perioadă de maximum 90 de zile.

Emulsiile au fost caracterizate preliminar printr-o serie de analize pentru a le evidenția caracteristicile organoleptice, a le determina valoarea pH-ului, a studia comportarea fazelor sub acțiunea unor forțe mecanice (forța centrifugă și/sau vibrațională), determinarea conductibilității.

Înainte de orice analiză, probele au fost lăsate să revină la temperatura camerei. Rezultatele obținute sunt sistematizate în tabelul II.7.14.

II.7.5.6. Teste de permeabilitate cu celula Franz

II.7.5.6.1. Teste de permeabilitate cu celula Franz prevăzută cu membrană de dializă

Au fost considerate două tipuri de emulsii care conțin extract de *Galium verum* ca ingredient activ, cu două baze diferite (A și B) având

compoziția (Tabelul II.7.16) stabilită pentru a permite o performanță crescută a produsului caracterizat printr-o permeabilitate ridicată și, de asemenea, o textură plăcută și caracteristici senzoriale optime agreate de pacienți.

Ingredientul activ utilizat la prepararea acestor emulsiilor este un extract hidroalcoolic din *Galium verum*-plantă uscată, obținut prin refluxare în Soxhlet, metodă realizată în următoarele condiții: S/L = 1:20; timp de extracție = 90 minute; reactiv de extracție EtOH 70%. Concentrația de polifenoli din acest extract a fost de 35,0182 $\mu\text{g/g}$.



Figura II.7.17. Celula Franz experimentală

Rezultatele obținute sunt exprimate în trei moduri, cu semnificații diferite și anume:

- polifenolii eliberați în 5mL din compartimentul receptor, exprimați în TPC, $\mu\text{g/mL}$ în funcție de timp (Figura II.7.18),
- viteza de eliberare a polifenolilor, exprimată în TPC $\mu\text{g/mL/t}$ (Figura II.7.19);
- eficiența de penetrare a polifenolilor prin membrană (Figura II.7.20) calculate cu relația II.7. 1.

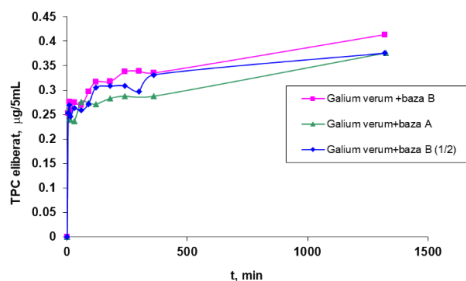


Figura II.7.18. Cantitatea de polifenoli (TPC), exprimată în $\mu\text{g GAE}/5\text{mL}$, eliberată în compartimentul receptor (5mL), în funcție de timp (Turcov și colab., 2022d)

Viteza de eliberare foarte mare poate fi observată clar la începutul procesului de eliberare când gradientul de concentrație este maxim, după care scade la valoarea minimă în aproximativ 24 de ore. Comportamentul este similar pentru toate cele 3 probe analizate.

Ținând cont de faptul că sistemul în ansamblu are o dinamică relativ limitată, în special în compartimentul donor, dar și de faptul că formulările utilizate sunt relativ vâscoase, eficiența scăzută de eliberare se explică prin faptul că principiile active sunt eliberate în principal din straturile superficiale, cele situate spre membranele de dializă.

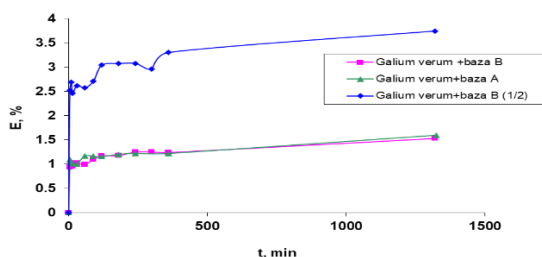


Figura II.7.20. Eficiența trecerii polifenolilor prin membrana de dializă (E%) (Turcov și colab., 2022d)

De asemenea, din analiza datelor prezentate în Figurile II.7.18-II.7.20., se pare că tipul de bază folosit pentru a crea cele două formule de emulsie nu influențează semnificativ modul în care principiul activ este eliberat din acestea. De asemenea, folosirea unei cantități mai mici de emulsie în compartimentul donor a condus la valori superioare pentru gradul de trecere al polifenolilor prin membrane.

II.7.5.6.2. Teste de permeabilitate cu celula Franz prevăzută cu membrană din piele de pui

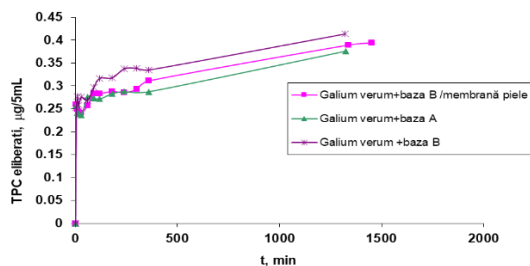


Figura II.7.21a. Cantitatea de polifenoli eliberați în 5mL din camera receptorului, exprimați în TPC, $\mu\text{g}/\text{mL}$ în funcție de timp, în cazul utilizării ca mediu de permeație membrană pielea de pui

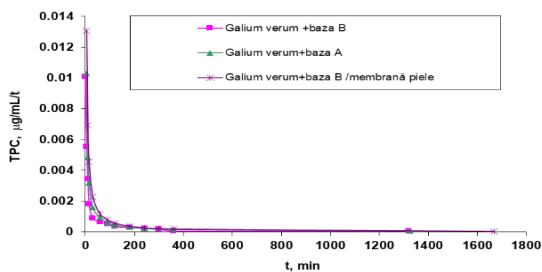


Figura II.7.21b. Viteza de eliberare a polifenolilor (TPC), exprimată în $\mu\text{g GAE} / \text{mL}/\text{t}$ în cazul utilizării ca mediu de permeație membrană pielea de pui

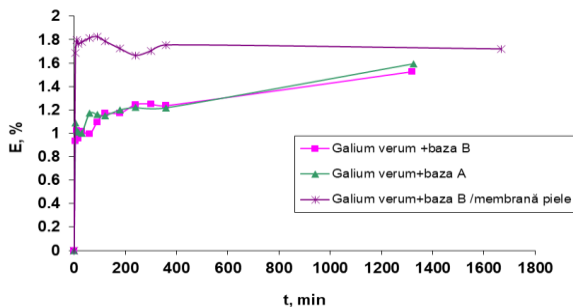


Figura II.7.21c. Eficiența de penetrare a polifenolilor prin membrană, % în cazul utilizării ca mediu de permeație membrană pielea de pui

Obiectivul în apărarea antioxidantă vizează structuri celulare și extracelulare atât din epiderm cât și din derm, dar nu urmărește depășirea acestor zone prin transport total transdermal. Implicațiile absorbției sistemice a compușilor activi sunt vaste și necesită investigații ample și complexe de siguranță legate de impactul moleculelor atât ale activelor cât și ale excipienților asupra sistemelor în care sunt transportate, pentru a elimina riscul de reacție generală cu potențial nociv.

II.7.6. Teste de biocompatibilitate pentru emulsiile pe bază de șofran și sânziene

Emulsiile investigate constau în formulări similare, inclusiv emulgatori și co-emulgatori (ingrediente diferite pentru fiecare emulsie), fază apoasă, stabilizator și conservant (același compus pentru fiecare emulsie) și ingrediente active diferite (*Galium verum* pentru **emulsia A** și *Crocus sativus* pentru **emulsia B**).

II.7.6.1. Teste de citotoxicitate

II.7.6.1.3. Studiul biocompatibilității prin evaluarea morfologiei celulelor

Evaluarea morfologiei celulelor vii (necolorate) din cultură, după o incubare cu extractele A și B, timp de 24, 48 și 72 ore, a fost efectuată microscopic, cu ajutorul microscopiei în contrast de fază, cu ajutorul microscopului Leica DMIL. Imaginile microscopice au fost preluate la obiectiv de mărire 10x. (Turcov și colab., 2023b).

Contactul celulelor cu un compus potențial nociv poate afecta viabilitatea celulară, dar poate, de asemenea, induce modificări la nivelul citoscheletului celular, afectând forma și capacitatea celulelor de a adera la substrat sau de a interacționa între ele.

În urma evaluării morfologiei celulelor vii la 24, 48 și 72 de ore de incubare cu extractele A și B (Tabel II.7.17), a rezultat că forma celulelor nu a suferit modificări în comparație cu cea din cultura de control.

De asemenea, din imaginile prezentate în Tabelul II.7.17 rezultă, că o creștere constantă a densității celulelor, precum și formarea unui monostrat uniform, fără semne de apoptoză sau moarte celulară.

II.7.7. Studiu clinic observațional în cazul emulsiei pe bază de extract de sânziene (*Galium verum*)

Acest studiu *in vivo*, își propune să obțină un feedback referitor la confortul pe piele creat de produsul preparat cu ingredientele prezentate în formulele de mai sus (emulsii și/sau ser) și eventuala sa contribuție la ameliorarea unor parametri ce țin de aspectul pielii pacientului.

Rezultatele monitorizării timp de o lună sunt prezentate în Figura II.7.24.

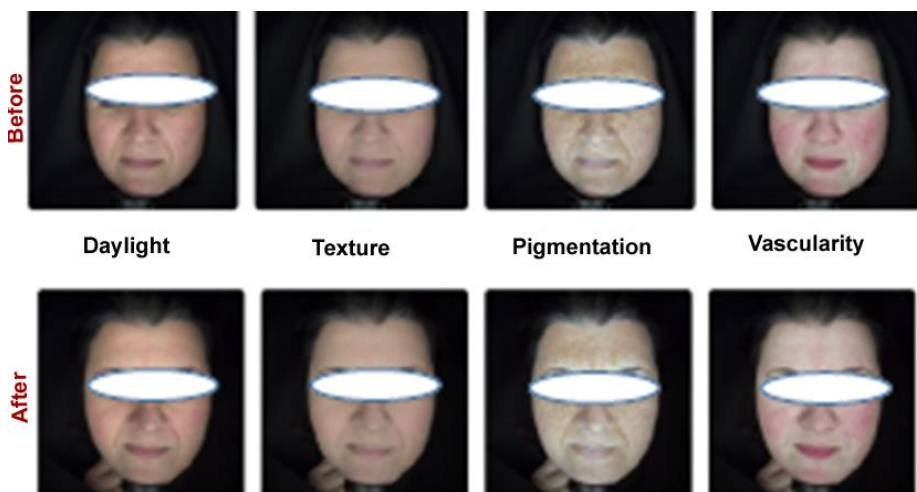


Figura II.7.24. Impactul clinic al utilizării emulsiei timp de 4 săptămâni

Imaginile din Figura II.7.24 au fost realizate cu echipamentul profesionist Observ 520x, Sylton Olanda, ce captează imagini în diverse spectre luminoase, aplicând filtre diverse (spectru vizibil, lumină polarizată și cross-polarizată, lumină UV și de tip lampă Wood) pentru evidențierea unor structuri profunde și generarea unor imagini imposibil de vizualizat cu ochiul liber, legate de textură a pielii, pigmentație, vascularizație, producție de sebum, încărcătură microbiologică. Imaginile obținute confirmă rezultatele bune atât sub aspectul tolerabilității (dovedite de lipsa unei reacții specifice de intoleranță), cât și în privința eficienței în ameliorarea eritemului după 4 săptămâni de utilizare a emulsiei cu bază A ce conține extract de *Galium verum*, remarcându-se o îmbunătățire a eritemului existent la momentul evaluării inițiale, înaintea utilizării preparatului studiat. În același

timp, produsul a fost caracterizat favorabil de către paciențe, sub aspectul texturii, confortului pielii și satisfacției de utilizare. Paciențele din fotografie au folosit exclusiv emulsia din studiu, pe toată durata evaluării.

Testarea preliminară *in vivo* cu rezultate bune atât pentru tolerabilitate, cât și eficiență în ameliorarea eritemului după 4 săptămâni de utilizare a emulsiei A pe bază de extract de *Galium verum*, au relevat nu numai o tolerabilitate bună dovedită prin lipsa unei reacții specifice de intoleranță, dar chiar și o îmbunătățire a roșeții existente.

II.7.8. Prepararea serurilor pe bază de extracte vegetale

II.7.8.1. Componentii serurilor

Pentru aceste studii s-au preparat două tipuri de seruri pe bază de acid hialuronic (HA) multimolecular (cu greutatea moleculare diferite), în două formule care diferă între ele prin existența în una din formule a unui ingredient cu rol de a crește a penetrării în piele (Tabelul II.7.17) .

II.7.8.3. Seruri care conțin extract de *Acmella oleracea*

Extractul de *Acmella oleracea* introdus în serurile dermatocosmetice a fost obținut prin sonoextracția plantei întregi, un timp de 15 minute, cu solvent EtOH de concentrație 30% și respectând raportul S/L de 1:15. Compoziția serurilor de bază a fost prezentată în Tabelul II.7.17.

Au fost formulate două tipuri de seruri pe bază de acid hialuronic multimolecular și extract de *Acmella oleracea* (Tabel II.7.18):

- un prim ser a fost cel clasic, notat HA-MM
- al doilea tip de ser are un conținut de 0.4% gumă xanthan și s-a notat cu HA –XNTN.

Tabel II.7.18. Formula serurilor pe bază de acid hialuronic multimolecular cu extract de *Acmella oleracea*

Ingredient (denumire INCH)
Ser acid hialuronic multimolecular " HA- MM+ AO extract "
3,75g ser HA -MM +25ml extract de <i>Acmella oleracea</i> (1 mL extract la 15 mL ser)
Ser acid hialuronic cu xanthan "HA-XNTN + AO extract "
3,75g ser " HA- XNTN" + 25 ml extract de <i>Acmella oleracea</i> (1mL extract + 15mL)

II.7.8.3.1. Teste de caracterizare fizică și de evaluare a stabilității serurilor

Pentru evaluarea calității unui produs nou sunt necesare pe lângă teste de caracterizare fizică și fizico-chimică și o anumite de analize care urmăresc stabilitatea. În acest sens, conform standardelor de calitate, am efectuat o serie de analize pentru serurile preparate în condiții specifice printre care: evaluări organoleptice, determinarea pH-ului, studiul comportării fazelor sub influența forței centrifuge sau vibratorii, determinarea conductibilității și evaluarea omogenității după protocolul descris pentru emulsii în subcapitolul II.7.2. Toate probele testate au fost examinate la temperatura camerei. Rezultatele acestor teste sunt prezentate în Figura II.7.25.

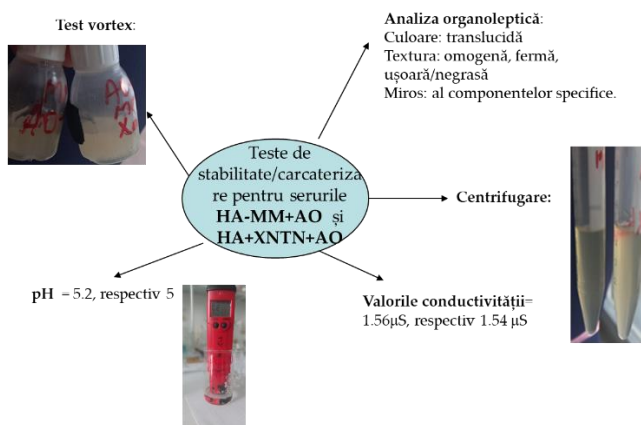


Figura II.7.25. Rezultatele testelor de caracterizare și stabilitate pentru serurile cu extract de *Acmella oleracea* (Turcov și colab., 2024)

Rezultatele obținute în urma acestor determinări (Figura II.7.25) arată că serurile obținute și analizate au un pH acceptabil în zona dermatocosmetica și o bună stabilitate sub acțiunea forțelor mecanice (forfecare sau vibrație) care ar putea acționa asupra serului, indirect, în principal în procesul de transport, depozitare și utilizare. Aceste rezultate le califică pentru noi teste, de exemplu testarea *in vitro* privind difuzia prin membrană.

II.7.8.3.3. *Evaluarea conținutului de polifenoli și a activității antioxidante a serurilor*

Conținutul de polifenoli (TPC) s-a determinat prin metoda Folin – Ciocâlteu după protocolul descris în II.2.2.2.3 și s-a exprimat în $\mu\text{g GAE/mL}$ ser. Activitatea antioxidantă a fost evaluată prin două metode: DPPH și ABTS conform protocolului descris în capitolul II.2.2.2.2. Activitatea antioxidantă s-a exprimat ca micrograme de echivalenți Trolox ($\mu\text{g TE/mL}$ ser). Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul II.7.19.

Tabel II.7.19. Conținutul de polifenoli și activitatea antioxidantă a serurilor ce conțin extract de *Acmella oleracea* (Turcov și colab., 2024)

Probă	TPC ($\mu\text{g GAE/g ser}$)	DPPH ($\mu\text{g TE/g ser}$)	ABTS ($\mu\text{g TE/g ser}$)
AO	1057,52 $\pm$ 34,04	737,96 $\pm$ 20,25	2387,67 $\pm$ 31,34
HA + MM	16,25 $\pm$ 0,74	58,52 $\pm$ 1,21	352,64 $\pm$ 12,50
HA- MM+AO	131,01 $\pm$ 8,07	96,48 $\pm$ 3,01	992,53 $\pm$ 40,69
HA + XNTN	16,78 $\pm$ 0,89	52,04 $\pm$ 1,52	284,91 $\pm$ 7,63
HA + XNTN+AO	121,69 $\pm$ 4,21	83,52 $\pm$ 5,69	740,31 $\pm$ 18,14

Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ abaterea standard (SD) a trei determinări. Abrevieri: ABTS - acid 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina) 6-sulfonic; DPPH - 1,1-difenil-2-picrilhidrazil; GAE, echivalenți de acid galic; TE - echivalente trolox; TPF - conținut total de polifenoli; AO- Extract de *Acmella Oleracea*; HA+MM – ser simplu pe bază de acid hialuronic (HA) multimolecular (MM); HA-MM+AO – ser simplu pe bază de HA multimolecular (HA-MM) cu AO; HA + XNTN – ser pe bază de HA și gumă xantan (XNTN); HA+XNTN+AO - ser pe bază de AO, acid hialuronic (HA) cu gumă xantan

Se observa de aici o îmbogățire a conținutului total de polifenoli în cazul serurilor preparate cu extract vegetal comparativ cu serul simplu. De asemenea, și activitatea antioxidantă a serurilor a crescut ca urmare a prezenței extractului de *Acmella oleracea*. Din aceste rezultate se deduce că adaosul de extract de *Acmella oleracea* și-a atins scopul urmărit, acela de a contribui la creșterea activității antioxidante totale a formulei dermatocosmetice obținute.

Capitolul II. 8.

CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE

Studiul compușilor bioactivi cu acțiune antioxidantă are următoarele concluzii:

I. Creșterea capacității antioxidante a resveratrolului prin asocierea cu acidul ferulic:

- ✓ Asocierea resveratrolului cu acidul ferulic este extrem de benefică, îmbunătățind incontestabil capacitatea sa antioxidantă, menținând în același timp și proprietățile sale biologice active recunoscute.
- ✓ Amestecurile care constau în **resveratrol 1% + 0,5% acid ferulic** într-un raport de (v /v) 1: 1 și 1: 2 sau **resveratrol 3% + acid ferulic 0,5%** în raport (v /v) 1: 1 s-au dovedit a fi eficiente în această direcție.
- ✓ Performanța acestor 3 amestecuri finale în ceea ce privește activitatea antioxidantă s-a dovedit a fi similară una față de alta, dar în mod clar superioară resveratrolului simplu. Criteriile care vor face diferența în utilizarea uneia dintre ele în practică vor fi reprezentate de proprietățile terapeutice ale preparatului dermatocosmetic final și de raportul final cost-beneficiu.
- ✓ Analiza termogravimetrică a amestecurilor a condus la concluzia că schimbarea temperaturii T_{peak} în prima etapă de descompunere la temperaturi cu 7°C mai mari în eșantionul 2 comparativ cu acidul ferulic poate sugera interacțiuni scăzute între acesta și resveratrol.
- ✓ Analiza spectrelor nu prezintă modificări semnificative în spectrul amestecului de compuși, ci doar atenuări ale maximelor benzilor caracteristice, ceea ce sugerează că nu există reacții chimice între componentele amestecului, această observație este în acord cu concluzia analizei termogravimetrice.
- ✓ Pe baza rezultatelor experimentale, putem considera asocierea RV : AF în concentrațiile și raportul evidențiat, o cale de urmat pentru valorificarea efectelor biologice ale amestecului, într-o formulare modernă, performantă, documentată științific.
- ✓ Cu o mai bună înțelegere a concentrației ingredientelor și a raportului amestecului pentru cea mai bună activitate antioxidantă, am câștigat o perspectivă mai mare de îndeplinire a criteriilor legate de eficacitatea terapeutică superioară.

II. Obținerea de extracte vegetale:

1. *Extracte vegetale din reziduuri florale de șofran (Crocus sativus L.):*

✓ Procesul de extracție hidroalcoolică din deșeuri florale de șofran (*Crocus sativus* L.) depinde de **tipul metodei de extracție**, de **timpul de extracție**, de **concentrația solventului** de extracție și de **raportul solid/lichid**.

Considerând **eficiența extracției** drept criteriu de evaluare a eficienței metodelor de extracție studiate (refluxare clasică, refluxare în Soxhlet, macerare, extracție asistată de ultrasunete), se pot analiza, într-o primă etapă, rezultatele obținute prin aceeași metodă, în funcție de factorii experimentali luați în considerare, cum sunt raportul S/L și concentrația solventului.

- ✓ Cel mai bun randament se obține în cazul extracției prin refluxare în Soxhlet, 86,74%, pentru un timp de extracție de 90 de minute, concentrație a solventului de 50% și un raport S/L de 1:16. Rezultatul este superior oricărei alte metode studiate în cadrul tezei.
- ✓ Pentru macerare (M), randamentele maxime de 69,254%, 67,618% și 66,929% au fost obținute în următoarele condiții: timp de macerare de 7 zile și concentrația solventului de 30%. În ceea ce privește raportul S /L, s-au obținut valori mari, dar foarte apropiate, în ordinea: 1:16; 1:25 și 1:10, alegerea unui anumit raport fiind dictată în acest caz strict de condițiile economice.
- ✓ Pentru refluxare (R), randamentele de 63,53% și 61,15% au fost obținute la un timp de extracție de 60 de minute folosind un solvent hidroalcoolic de 50% și la un raport solid : lichid de 1:16, respectiv, 1:25.
- ✓ Pentru extracția asistată cu ultrasunete (US), randamentele obținute sunt mult mai mici (48.701% - 48.307%), dar cea mai mare a fost obținută pentru un timp de extracție de 4 minute, concentrația de solvent de 50%, raport solid/lichid de 1:25 și 1:10.
- ✓ O concluzie general valabilă implică în continuare o modelare a procesului și o analiză de optimizare astfel, se poate spune că, indiferent de metoda de extracție utilizată, atunci când se lucrează cu un raport solid /lichid de 1:25 sau 1:16 și cu un solvent hidroalcoolic de 50% s-ar putea asigura un randament optim al procesului.

Considerând **analiza cantitativă** drept criteriu de performanță a metodelor de extracție și determinând **conținutul total de polifenoli și flavonoide**, rezultatele sunt următoarele:

- ✓ În cazul polifenolilor, în funcție de concentrația solventului de extracție, cele mai bune rezultate se obțin în cazul folosirii pentru extracție a solventului de concentrație 30% diferit față de cazul flavonoidelor unde optim a fost cel de 50%.
- ✓ În funcție de raportul S / L, cele mai bune rezultate au fost înregistrate, ca și în cazul flavonoidelor, la raportul de 1:25.
- ✓ În funcție de timpul de extracție, cele mai bune valori se obțin în cazul extracției asistate de ultrasunete la timpul de 6 minute și cel de 4 minute, la macerare timpul optim este de 7 zile, iar în cazul refluxării, rezultatele nu diferă semnificativ cu timpul de extracție.
- ✓ În ansamblu, cel mai mare conținut de polifenoli se observă în cazul extracției asistate de ultrasunete (US) la un raport S / L ratio de 1:25, concentrație solvent de 50% și durată de 4 minute 59,66 $\mu\text{g GAE} / \text{g}$, urmată tot de US, 52,732 $\mu\text{g GAE/g}$ la 6 minute, 1:16, 50%), apoi de refluxare în Soxhlet în condiții de raport S / L de 1:25, concentrație solvent de 50%, timp de 90 minute (51,87 $\mu\text{g GAE} / \text{g}$).
- ✓ În cazul flavonoidelor, luând drept criteriu concentrația solventului de extracție, s-au obținut cele mai bune rezultate la folosirea solventului de 50%.
- ✓ În cazul flavonoidelor, având în vedere valoarea raportului solid/lichid, cele mai bune rezultate au fost înregistrate în cazul unui raport de 1:25.
- ✓ În funcție de timp, cea mai mare cantitate de flavonoide se obține în cazul macerării la 6 minute, în cazul refluxării pentru 30 de minute, iar în cazul macerării la timpul de 7 zile.
- ✓ În concluzie, se poate considera că pentru flavonoide, cele mai bune rezultate se obțin prin refluxare în Soxhlet, în condiții de concentrație a solventului de 50%, raport S/L de 1:25 (385,86 $\text{mg QE} / \text{g}$) și 1:16 (227,854 $\text{mg QE} / \text{g}$), urmată de refluxare simplă la aceeași concentrație a solventului de 50%, raport S/L de 1:25 și un timp de extracție de 60 de minute (185,72 mgQE / g).
- ✓ Extractele din plante obținute prin orice metodă și ulterior analizate prin metode fizico-chimice conțin o cantitate mult mai mare de flavonoide decât compuși fenolici.

- ✓ Metodele bazate pe refluxare simplă sau în aparat Soxhlet sunt cele mai eficiente pentru obținerea unei cantități optime de flavonoide, iar sonoextracția și refluxarea în Soxhlet pot fi considerate mai eficiente pentru obținerea polifenolilor.
- ✓ Raportul de 1:25 și concentrația solventului de 50% pot asigura rezultate mai bune atât pentru polifenoli cât și pentru flavonoizi.
- ✓ Metoda de extracție și parametrii de lucru se aleg în funcție de compușii bioactivi de interes.

Evaluarea activității antioxidante și caracterizarea fizico-chimică au dus la următoarele concluzii:

- ✓ În cazul celor 2 extracte selectate aleatoriu, extractul obținut prin refluxare a avut o activitate antioxidantă mai mare decât cel obținut prin macerare, fapt confirmat și de spectrofotometria UV-Viz, care relevă un conținut mai bogat în compuși extrași decât în cazul extractului obținut prin macerare.
- ✓ De asemenea, împreună cu principalii metaboliți, există o serie de alți compuși secundari, unii cu proprietăți antioxidante valoroase.
- ✓ Metoda de extracție influențează clasele de substanțe bioactive extrase, cum ar fi flavonoidele, polifenolii sau carotenoizii, precum și diferitele tipuri de compuși prezenți în extractele de șofran.

Concluzia generală este: extractele hidroalcoolice din reziduuri de șofran (*Crocus sativus* L.) (petale, sepal și porțiunea superioară a tulpinii) preparate prin macerare, refluxare simplă, refluxare în Soxhlet și extracție asistată cu ultrasunete oferă rezultate satisfăcătoare în funcție de tipul metodei de extracție și parametrii aplicați.

2. *Extracte vegetale din sânziene (Galium verum):*

Considerând **randamentul de extracție** hidroalcoolică drept criteriu de performanță a metodelor de extracție, rezultatele sunt următoarele:

- ✓ Ca metode de extracție s-au utilizat macerarea, extracția asistată de ultrasunete și refluxarea simplă pentru planta proaspătă, iar pentru planta uscată macerarea, extracția asistată de ultrasunete, extracția prin refluxare simplă și refluxare în aparat Soxhlet, precum și metoda combinată de sonoextracție urmată de macerare.
- ✓ Analiza datelor experimentale obținute subliniază în mod clar că procesul de extracție studiat depinde de starea plantei utilizate pentru extracție (uscată sau proaspătă) și tehnica de extracție aplicată. În

cadrul aceleiași tehnici, este evidentă dependența randamentului de extracție de concentrația solventului utilizat pentru extracție, de timpul de extracție, precum și de raportul solid/lichid utilizat.

- ✓ Este foarte ușor de observat că solventul cu cele mai bune rezultate, indiferent de tehnica de extracție hidroalcoolică, dar și după criteriul eficienței economice, se dovedește a fi cel de concentrație 50%.
- ✓ Pentru macerare (M), se înregistrează randamente maxime între 34,4% (condiții S/L = 1:15; 4 zile; solvent 50%) și 33,75% (condiții S/L = 1:15; 11 zile; solvent 50%) în cazul plantei uscate și între 14,28% (condiții S/L = 1:30; 8 zile; solvent 70%) și 12,57% (condiții S/L = 1:30; 8 zile; solvent 50%) în cazul plantei proaspete.
- ✓ Pentru extracția prin refluxare (R), s-au obținut randamente maxime între 34,38 (condiții S/L = 1:20; 60 minute; solvent 70%) și 33,59% (condiții S/L = 1:20; 60 minute; solvent 30%), respectiv 33,6% (condiții S/L = 1:20; 30 minute; solvent 50%) când s-a utilizat planta uscată și între 15,59% (condiții S/L = 1:20; 30 minute; solvent 50%) și 14,4% (condiții S/L = 1:15; 60 minute; solvent 50%), respectiv 14,38% (condiții S/L = 1:20; 30 minute; solvent 70%) în cazul plantei proaspete.
- ✓ Pentru extracția asistată cu ultrasunete (US) s-au obținut următoarele randamente maxime: 17,6% (condiții S/L = 1:20; 6 minute; solvent 50%) și 16,19% (condiții S/L = 1:30; 4 minute; solvent 50%) pentru planta uscată și între 6,02% (condiții S/L = 1:30; 4 minute; solvent 50%) și 3,19% (condiții S/L = 1:20; 4 sau 2 minute; solvent 30% sau 50 %) în cazul plantei proaspete.
- ✓ Pentru extracția prin refluxare în Soxhlet (Sx) folosită doar în cazul plantei uscate, cele mai bune rezultate de 57,18% s-au obținut în condiții de: S/L=1:20 și solvent de extracție de 70% concentrație în alcool etilic, urmată de varianta caracterizată de S/L = 1:20 și concentrație a solventului de extracție de 50% (42,79%).
- ✓ Cele mai bune randamente de extracție au fost obținute în cazul plantei uscate, cu valori aproape duble față de cazul plantei umede/proaspete, în aceleași condiții.
- ✓ Din punct de vedere al randamentului de extracție obținut din sânziene uscate, putem concluziona că ordinea eficienței tehnicilor de extracție utilizate este după cum urmează: extracție prin refluxare în Soxhlet, extracție prin macerare și refluxare clasică.

Considerând **analiza cantitativă** drept criteriu de performanță a metodelor de extracție din planta uscată și determinând (în duplicat) **conținutul total de polifenoli și flavonoide**, rezultatele sunt următoarele:

- ✓ În cazul polifenolilor, pentru diferite concentrații ale solventului s-au extras cele mai mari cantități de polifenoli la concentrația de 70% alcool etilic.
- ✓ Pentru un raport diferit S/L, cele mai mari cantități de polifenoli au fost extrase în cazul raportului 1:30 și 1:20.
- ✓ În ceea ce privește timpul de extracție, cele mai mari cantități de polifenoli au fost obținute prin refluxare simplă sau în Soxhlet la 90 minute.
- ✓ În concluzie, cele mai bune rezultate pentru extracția polifenolilor au fost obținute prin refluxare simplă: 78,894 $\mu\text{g GAE/g}$ (în condiții S/L = 1:30; 60 minute și concentrație alcool etilic 50%), urmată de refluxarea în Soxhlet: 78,21 $\mu\text{g GAE/g}$ (în condiții S/L = 1:20; 90 minute și concentrație alcool etilic 50%).
- ✓ În cazul conținutului de flavonoide, luând drept criteriu concentrația solventului de extracție, cele mai bune rezultate au fost obținute la concentrația agentului de extracție de 70% etanol.
- ✓ Având în vedere valoarea raportului solid/lichid, cele mai bune rezultate au fost înregistrate în condiții de raport S/L=1:30.
- ✓ Atunci când timpul de extracție a fost criteriul de apreciere, cele mai bune rezultate au fost obținute în cazul macerării la un timp de extracție de 8 zile, pentru refluxarea simplă sau Soxhlet un timp de extracție de 90 minute, iar pentru sonoextracție la un timp de 6 minute.
- ✓ În concluzie, pentru conținutul de flavonoide, cele mai bune rezultate au fost obținute la extracția prin refluxare în Soxhlet (66,053 mg QE/g în condiții de raport S/L de 1:20, concentrație de solvent de 70% și timp de extracție de 90 minute și 43,557 mg QE/g) în condiții de raport S/L de 1:30, concentrație de solvent de 70% și timp de extracție de 90 minute și refluxare simplă (37,984 mg QE/g) în condiții de raport S/L de 1:30, concentrație de solvent de 70% și timp de extracție 60 minute.
- ✓ În cazul extractelor analizate, cantitatea de flavonoizi este mai mare decât cantitatea de polifenoli, rezultat confirmat de informațiile din literatură.
- ✓ Metoda de extracție din care rezultă cea mai mare cantitate de compuși bioactivi este refluxarea în Soxhlet, urmată de refluxarea simplă.

- ✓ Utilizând metoda refluxării timp de 60 de minute, cu un raport S/L de 1:30 și solvent de concentrație 50% se poate obține cea mai mare cantitate de polifenoli (78,894 $\mu\text{g GAE/g}$), iar prin refluxare în Soxhlet în condiții de raport S/L de 1:30, timp de extracție de 90 min. și concentrație de solvent de extracție de 70%, se obțin cele mai mari cantități atât de flavonoide (66,0536 mg QE /g).
- ✓ În cazul plantei proaspete, cantitatea de flavonoide extrase este de asemenea mult mai mare decât cea de polifenoli;
- ✓ Comparativ cu planta uscată, cantitatea de polifenoli și flavonoide este mult sub valorile obținute, explicația fiind aceeași ca și în cazul randamentului de extracție.
- ✓ Pentru cantitatea de polifenoli extrasă se remarcă metoda de extracție prin refluxare când s-au obținut 14,741 $\mu\text{g GAE/g}$ în condiții de raport S/L = 1:20, timp de extracție de 90 minute și concentrația solventului de 50% EtOH.
- ✓ Pentru obținerea flavonoidelor se remarcă toate variantele de refluxare, dintre care au condus la valorile cele mai mari refluxarea în condiții de S/L= 1:15, timp de extracție de 60 minute și concentrație a reactivului de extracție de 50% EtOH (14,12 mg QE/g) urmată de cea în condiții de raport S/L = 1:30, timp de extracție de 60 minute și concentrația reactivului de extracție de 50% EtOH (11,72 mgQE/g).
- ✓ În cazul extractelor utilizând solvent hidro-glicerol, eficiența metodelor s-a analizat prin evaluarea conținutului de polifenoli și flavonoide.
- ✓ Indiferent de concentrația în glicerol a reactivului de extracție folosit, în urma refluxării simple s-au obținut cele mai mari cantități de polifenoli: (45,519-56,821) $\mu\text{g GAE/g}$ (timp de extracție de 60 minute și raport solid/lichid de 1:15, reactiv de concentrație de 50%.
- ✓ Folosind rapoarte diferite solid/lichid, cele mai bune rezultate în polifenoli, net superioare față de celelalte metode, s-au obținut tot în extractele din urma refluxării. Cea mai mare valoare este de 84.979 $\mu\text{g GAE/g}$ (timp de extracție de 60 minute și concentrație reactiv de extracție de 50%).
- ✓ Influența timpului de extracție a dus la concluzia că cele mai bune rezultate, 29,02 $\mu\text{g GAE/g}$, s-au obținut în cazul macerării, varianta realizată în condiții de raport solid/lichid de 1:15 și concentrație a reactivului de extracție de 50%.

- ✓ În funcție de concentrația în glicerină a amestecului de extracție folosit, se observă că refluxarea conduce și la cele mai mari cantități de flavonoide, atunci când concentrația este de 80%, timpul este de 60 minute și raportul S/L=1:15 (116,977 mgQE/g);
 - ✓ În funcție de raportul solid/lichid stabilit se constată că în cazul refluxării folosind un raport S/L de 1:30 și 1:20 se obțin cele mai bune rezultate (116,977 mgQE/g și 84,911 mgQE/g), urmată de macerare în cazul tuturor celor trei rapoarte (1:15 – 56,1 mgQE/g; 1:20 – 53,55 mgQE/g; 1:30 - 51.807 mgQE/g) și metoda combinata sonoextracție+macerare în cazul raportului S/L=1:30 când s-au obținut flavonoide în cantitate de 53,494 mgQE/g.
 - ✓ Timpul nu are o influență semnificativă asupra procesului de extracție a flavonoidelor, totuși, în cazul macerării se obțin cele mai mari cantități de flavonoide în funcție de timp (56,1-51, 51 mgQE/g).
 - ✓ În cazul extractelor utilizând ca solvent glicerină-apă-alcool, cea mai mare cantitate de polifenoli (53,321 μ g GAE/g) s-a obținut în cazul extractului rezultat în urma metodei combinate (sonoextracție + macerare) realizată cu soluție de solvent S1 (30 % glicerină + 50 % alcool + 20 % apă), un timp de 6 minute US+3zile M și folosind raport S/L=1:15, iar cea mai mare cantitate de flavonoide (36,08 mg QE/g) în cazul extractului rezultat în urma metodei combinate (sonoextracție + macerare) realizată cu soluție de solvent S2 (50 % glicerină și 50% etanol de 96%) un timp de 6 minute + 9zile și folosind un raport S/L de 1:20 .
 - ✓ Prin refluxare simplă și solvent hidro-glicerice, pot fi obținute din planta uscată de *Galium verum*, cea mai mare cantitate de flavonoide (116,977 mg QE/g), dublă față de utilizarea unui solvent hidro-alcoolic) și cea mai mare cantitatea de polifenoli (84,979 μ g GAE/g), rezultat superior celui obținut cu solvent hidro-alcoolic.
- Evaluarea activității antioxidante și caracterizarea fizico-chimică prin spectroscopia UV-Viz duc la următoarele concluzii:
- ✓ Se observă că valorile obținute sunt mult mai mari în cazul utilizării plantei uscate, rezultat în acord cu cele obținute la determinarea polifenolilor și flavonoidelor.
 - ✓ Extractul cu cel mai bogat conținut în compuși extrași apare ca fiind cel obținut din planta uscată, prin refluxare.

- ✓ Din punct de vedere al conținutului de antioxidanți (determinat ca flavonoide și polifenoli totali), extractul de *Galium verum* - planta uscată, se dovedește a fi satisfăcător și corespunde ideii de înlocuire a activelor chimice cu cele naturale în formularea anumitor preparate dermatocosmetice.

• **Concluzia generală** este: extracția solid-lichid din plante de *Galium verum* uscate realizată prin refluxarea clasică, în prezență de solvent hidroglicerol este cea mai eficientă, conducând la cele mai ridicate cantități de polifenoli și flavonoide.

3. *Extracțe vegetale din Acemella oleracea:*

În ceea ce privește randamentul de extracție, reies următoarele concluzii:

- ✓ În cazul extracției din întreaga plantă, cele trei metode testate au dus la performanțe relativ asemănătoare.
- ✓ Cel mai bun randament obținut din extracția întregii plante a fost prin macerare, timp de 20 de zile, raportul 1:15 S/L și solventul ETOH 70%, urmat de sonoextracție 15 minute, raportul S/ L 1:15 și 30% EtOH.
- ✓ Considerând separat părțile diferite ale plantei, tulpina a dus la obținerea celor mai mari valori ale randamentului, prin sonoextracție (timp de extracție – 15 minute, raport S/L = 1:15 și concentrația solventului de 30%).
- ✓ Valorile obținute pentru evaluarea cantității de polifenoli și flavonoide diferă în funcție de metoda aplicată și de partea de plantă din care s-a realizat extracția.
- ✓ În ceea ce privește conținutul de polifenoli, rezultatele sunt următoarele:
- ✓ În funcție de raportul S /L, cele mai bune rezultate au fost înregistrate pentru macerare urmată de sonoextracție, ambele la un raport de 1:30.
- ✓ În funcție de concentrația amestecului de extracție, cele mai bune rezultate s-au obținut în urma sonoextracției la o concentrație a solventului de 50%, urmată de macerare cu toate cele 3 concentrații.
- ✓ În funcție de timpul de extracție, cele mai bune rezultate s-au obținut în urma aplicării metodei combinate US+M cu un timp de extracție de 6 sau 15 minute + 20 zile.

-
- ✓ Astfel, pentru întreaga plantă, macerarea (M) în condiții de $S/L = 1:20$, concentrație solvent de extracție de 50% și timp de extracție de 20 zile a asigurat obținerea celui mai bun rezultat, a 30,4195 $\mu\text{g GAE/g}$ polifenoli, urmată de sonoextracție (US) în condiții de $S/L = 1:30$, concentrație agent extracție de 50% și timp de extracție de 15 minute a asigurat obținerea a 29,569 $\mu\text{g GAE/g}$ polifenoli și sonoextracție combinată cu macerarea (US +M) în condiții de $S/L = 1:20$, concentrație agent extracție de 50% și timp de extracție de 6 minute +20 zile a asigurat obținerea a 28,081 $\mu\text{g GAE/g}$ polifenoli.
 - ✓ În ceea ce privește diferitele părți ale plantei, rezultă ca atât frunzele cât și întreaga plantă conduc la cantități relativ egale de polifenoli.
 - ✓ În ceea ce privește conținutul de flavonoide, rezultatele sunt următoarele:
 - ✓ în funcție de raportul S/L , se observă obținerea unei cantități mai mari de flavonoide în cazul macerării, urmată de sonoextracție, ambele în condiții de $S/L = 1:30$.
 - ✓ considerând concentrația reactivului de extracție, cele mai bune rezultate privind cantitatea de flavonoide s-a obținut în urma macerării la 70% concentrația solventului de extracție, urmată de sonoextracție în condiții de concentrație a solventului de extracție de 30%.
 - ✓ după timpul de extracție, cele mai bune rezultate s-au obținut în urma aplicării metodei combinate US+M la un timp de extracție de 15 sau 10 minute + 20 zile.
 - ✓ Astfel, pentru întreaga plantă, sonoextracția combinată cu macerarea (US +M) în condiții de $S/L = 1:20$, concentrație solvent de extracție de 50% și timp de extracție de 15 minute +20 zile a asigurat obținerea celei mai mari cantități de flavonoide, 32,88 mg QE/g flavonoide și aceeași metodă realizată în condiții de $S/L = 1:20$, concentrație agent extracție de 50% și timp de extracție de 10 minute +20 zile a asigurat obținerea a 21,2 mg QE/g flavonoide.
 - ✓ Privind cumulativ rezultatele obținute putem spune că folosind ca metodă de extracție sonoextracția combinată cu macerarea (US+M) în condiții de raport $S/L = 1:20$, concentrație a reactivului de extracție de 50% și timp de extracție de 15 minute + 20 zile se obține și cantitatea maximă de polifenoli (28,081 mg QAE/g) cât și cea de flavonoide (32,88 mgQE/g).

- ✓ Rezultatele obținute pentru determinarea celor două tipuri de compuși activi permit alegerea metodei și condițiilor de lucru în funcție de scopul urmărit și de condițiile economice disponibile la un moment dat.

Evaluarea activității antioxidante și caracterizarea fizico-chimică prin spectroscopie UV-Viz arată următoarele rezultate:

- ✓ Toate spectrele prezintă un pic major la lungimi de undă maxime în intervalul 199,5 – 2120 nm care poate fi atribuit spilantholului, principalul constituent al extractului din *Acmella oleracea*, conform literaturii de specialitate.
- **Concluzia generală** este: extractul obținut prin macerare sau sonoextracție din *Acmella oleracea* poate fi considerat o resursă naturală importantă pentru ingrediente antioxidante, anestezice și antiinflamatoare, cu potențial promițător pentru produsele dermatocosmetice

III. Caracterizarea preliminară a produselor dermatocosmetice pe baza extractelor vegetale obținute

Studiul extractelor vegetale obținute din reziduuri florale de *Crocus sativus* (șofran), din *Galium verum* (sânziene) și din *Acmella oleracea*, continuat cu analiza preparatelor dermatocosmetice în care au fost incluse, au arătat că încorporarea extractului natural nu a afectat negativ stabilitatea formulelor studiate.

Caracterizarea preliminară a emulsiilor pe bază de extract din reziduuri florale de *Crocus sativus* și extract de *Galium verum* și a serurilor pe bază de extract din *Acmella oleracea*

- ✓ Stabilitatea fizico-chimică a emulsiilor cosmetice, evaluată printr-o serie de analize fizico-chimice, cum ar fi pH-ul, testul de stabilitate la acțiunea forței centrifuge și vibraționale și evaluarea caracteristicilor organoleptice (miros, culoare și aspect general), efectuate în trei momente de la preparare: la 24 de ore după formulare, la 7 zile și 21 de zile de depozitare la temperatura ambiantă în recipientul de stocare, atestă caracteristici satisfăcătoare, plăcute, cu o bună stabilitate fizico-chimică după mai mult de 72 de ore, chiar la 30 de zile de la preparare.
- ✓ Toate emulsiile dermatocosmetice testate și bazele de la care a plecat procesul de preparare a acestora, arată un grad ridicat de stabilitate la

acțiunea stimulilor fizici și o compatibilitate bună a componentelor în timp.

- ✓ De asemenea, pH-ul emulsiei cosmetice cu extract de reziduuri florale de șofran a variat de la 4,99 la 5,04, valoare considerată adecvată pentru a evita riscul de iritare la aplicarea pe piele și pentru eficiența penetrării produsului în piele.
- ✓ Determinările pH-ului pentru emulsiile ce conțin amestec de 3 % RV-0,5 % AF au arătat valori între 4,65–5.005 în cazul emulsiilor cu bază A, 4,7–5.001 pentru emulsiile cu bază B și 4,7–5.004 pentru emulsiile din seria C, de asemenea valori cu o bună compatibilitate cu pH-ul care poate fi înregistrat la nivelul epidermei, adecvate pentru o tolerabilitate și penetrare bună la nivelul pielii.
- ✓ Pentru emulsiile ce conțin extract de sânziene, pH-ul nu prezintă variații în timpul depozitării (4,99 până la 5,04)
- ✓ Datele experimentale și rezultatele acestora arată că serurile obținute și analizate, încorporând extractul din *Acmella oleracea*, au un pH acceptabil în zona dermatocosmetică și o bună stabilitate sub acțiunea forțelor mecanice (centrifugă sau vibrațională), forțe ce pot acționa indirect asupra serului, în principal în procesul de transport, depozitare și utilizare. Aceste rezultate le califică pentru noi teste, optând pentru testarea in vitro în ceea ce privește difuzia prin membrană.
- ✓ Încorporarea produsului natural nu a avut un impact negativ asupra stabilității formulilor cosmetice studiate. Acest aspect poate fi atribuit valorilor de conductivitate stabilă, dar și absenței oricărei degradări chimice, astfel încât emulsiile pot fi considerate potrivite pentru aplicarea topică și acceptabile pentru a evita riscul de iritare atunci când sunt aplicate pe piele
- ✓ **Stabilitatea microbiologică:** în urma analizelor și testelor efectuate asupra emulsiilor obținute, s-a constatat că acestea au o rezistență bună la contaminarea microbiologică.
- ✓ **Testele de permeabilitate** au dus la concluzii ce vizează criterii diferite:
- ✓ Viteza de eliberare a polifenolilor, care este mai mare la începutul procesului de difuzie, când gradientul de concentrație este maxim, este similară pentru ambele tipuri de emulsii și sugerează o eficiență terapeutică bună prin timpul scurt în care se instalează efectul biologic. Faptul că tipul de bază utilizată la formularea emulsiilor nu

influențează în mod semnificativ modul în care principiul activ este eliberat din sistemul multifazic are de asemenea avantajul că alegerea acesteia rămâne strict legată de preferințele asupra texturii și tipului de piele destinatar.

- ✓ Eficiența difuziei polifenolilor prin membrana de dializă
- ✓ Scopul de a sublinia funcționalitatea sistemului de difuzie în contextul utilizării unei noi emulsii a fost realizat, iar acest studiu servește ca un prim pas esențial pentru cercetarea viitoare (*in vivo*).
- ✓ De asemenea, din analiza datelor rezultate se pare că adăugarea gumei xantan în formularea celui de-al doilea ser nu influențează semnificativ modul în care este eliberat principiul activ.
- ✓ **Testele reologice:** Probele analizate au un comportament caracteristic de tip solid, o proprietate care poate explica stabilitatea la depozitare a emulsiilor dermatocosmetice.
- ✓ **Analiza conductometrică:** Rezultatele măsurărilor (valori între 0,21 și 0,48 mS) demonstrează stabilitatea emulsiilor în timp.
- ✓ **Microscopia optică**
- ✓ Imagini microscopice ale eșantioanelor de emulsii, la 7 zile de depozitare în condiții normale de temperatură (temperatura camerei),
- ✓ Caracterizarea microscopică a evidențiat structura omogenă a emulsiilor, cu globule de dimensiuni diferite, în funcție de baza formulei, respectiv 4–28 μm în cazul emulsiilor din seriile A și B și 2–8 μm în cazul emulsiilor din seria C, dar și uniformitatea eșantionului, sugerând menținerea compatibilității și omogenitatea fazelor în timpul perioadei de stocare.
- ✓ Acest fapt poate fi atribuit compoziției diferite a bazei C (prezența a doi compuși distincți din categoria “green”: stearat de zaharoză și lecitină din soia cu rol de emulgator și co-emulsificator) comparativ cu bazele A și B.
- ✓ Introducerea extractului de *Galium verum* în prepararea unei emulsii dermatocosmetice permite obținerea unui preparat cu o textură fină care este ușor absorbită de piele și de componentele care sunt stabile din punct de vedere mecanic, fizic și al biocompatibilității.
- ✓ Aceste rezultate încurajează dezvoltarea unor teste suplimentare privind stabilitatea microbiologică, testele *in vivo* și testele dermatologice preliminare pentru aceste preparate.
- ✓ **Studii de biocompatibilitate și tolerabilitate**

- ✓ Studiile de citotoxicitate efectuate (metoda MTT) oferă rezultate ce indică lipsa citotoxicității eșantioanelor de emulsie pe bază de șofran și, separat, pe bază de sânziene, în conformitate cu standardul internațional ISO 10993-5 (Evaluarea biologică a dispozitivelor medicale — Partea 5: Testele pentru citotoxicitate *in vitro*),
- ✓ Emulsia cu extract de sânziene are valori mai mari ale viabilității celulare, comparativ cu emulsia cu extract de șofran.
- ✓ În urma evaluării morfologiei celulelor vii la 24, 48 și 72 de ore de incubare cu probele (emulsie cu extract de șofran și emulsie cu extract de sânziene), s-a dovedit că forma celulelor nu s-a schimbat în comparație cu cea a culturii de control.
- ✓ Rezultatele prezintă, de asemenea, o creștere constantă a densității celulare, precum și formarea unui monostrat uniform, fără semne de apoptoză sau moarte celulară.
- ✓ Testarea preliminară *in vivo* a relevat nu numai o tolerabilitate bună dovedită de lipsa unei reacții specifice de intoleranță, ci chiar o îmbunătățire a eritemului existent după 4 săptămâni de utilizare a emulsiei pe bază de extract de *Galium verum*.
- ✓ Evaluarea biocompatibilității emulsiilor pe bază de extract de *Crocus sativus* și *Galium verum* a evidențiat proprietățile non-citotoxice ale compuşilor evaluați.
- ✓ În urma analizei funcțiilor metabolice, a formei și comportamentului celulelor din cultură, emulsia cu extract de *Galium verum* și cea cu extract de *Crocus sativus* sunt non-citotoxice la concentrația analizată.
- ✓ Sunt necesare investigații suplimentare pentru a determina proprietățile efectului de doză.

CONCLUZII FINALE

- ✓ *Crocus sativus*, *Galium verum* și *Acmella oleracea* reprezintă resurse naturale importante pentru ingrediente antioxidante, cu potențial promițător pentru produsele dermatocosmetice.
- ✓ Rezultatele au arătat că încorporarea extractelor naturale nu a afectat negativ stabilitatea emulsiilor și serurilor dermatocosmetice studiate.
- ✓ Aceste rezultate încurajează dezvoltarea de teste stabilitate microbiologică, teste *in vivo* și teste dermatologice preliminare extinse pentru aceste preparate.

- ✓ Testul de permeabilitate pe celulele Franz evidențiază procesul de difuzie și susține strategia de investigație ulterioară privind eficacitatea formulei farmaceutice pe bază de extracte vegetale.
- ✓ Rezultatele preliminare obținute sugerează un bun potențial al extractului de *Crocus sativus*, *Galium verum* și *Acmella oleracea* pentru a fi utilizate în emulsii și seruri de interes dermatocosmetic, de aceea, studiile vor fi continuate și aprofundate cu analize specifice pentru a identifica principalele componente ale extractului și pentru a efectua teste dermatologice direct pe pacienți.
- ✓ Rezultatele testelor in vitro prezentate în această lucrare lasă deschisă calea aprofundării studiilor privind aceste extracte și formulele obținute cu acestea ca active biologice și subliniază faptul că acestea ar putea fi transformate în noi formulări dermatocosmetice cu o perspectivă reală în combaterea stresului oxidativ asupra pielii.
- ✓ Rezultatele preliminare obținute sugerează un bun potențial al extractului de plante selectat pentru a fi utilizat în emulsii/ seruri de interes dermato-cosmetic, acesta este motivul pentru care studiile vor fi continuate și aprofundate cu analize pentru a identifica principalele componente ale extractelor și pentru a efectua teste dermatologice direct pe pacienți.
- ✓ Emulsiile pot fi transformate în formulări dermatocosmetice noi, cu scopul de a reduce stresul oxidativ la suprafața pielii.

PERSPECTIVE

- ✓ Optimizarea și modelarea procesului de extracție pentru a găsi un extract cu cele mai mari performanțe sub aspect cost-beneficiu, ținând cont de faptul că extractele vegetale implică costuri mai ridicate decât produsele de sinteză.
- ✓ Există încă mai multe direcții de cercetare care caută răspunsuri care pot crește performanța terapeutică în multe afecțiuni ale pielii, inclusiv:
 - Ce măsuri de siguranță pot fi luate în selectarea antioxidanților în scopuri terapeutice?
 - Ce alte combinații și doze de antioxidanți cresc performanța terapeutică?
 - Pot fi evaluate comparativ toate moleculele antioxidante?

- ✓ În ceea ce privește evaluarea dermatologică, orice studiu clinic ar trebui să ia în considerare complexitatea fenomenelor redox, fluxul de specii radicale de oxigen și localizarea subcelulară și tipul de celule.
- ✓ Un subiect important pentru cercetările ulterioare este descoperirea sinergismului potrivit și a asocierilor optime între compuși antioxidanți, dar și cercetări avansate privind mecanismul și efectele biologice ale noilor antioxidanți, cum ar fi licopenul și acidul ferulic.
- ✓ Completarea studiilor cu investigații suplimentare despre impactul clinic: tolerabilitate și eficiență, studii extinse pe patologii, număr de pacienți etc.
- ✓ Studii aprofundate de farmacologie: necesitatea adăugării în formulă a altui ingredient.
- ✓ Studii de dozaj în cazul *Galium verum* și *Acmella oleracea*.
- ✓ Investigații în sensul extinderii potențialului extractelor obținute (pentru acțiunea antiinflamatoare în cazul extractelor din reziduuri florale de șofran și sânziene, acțiunea antirid și anestezică a extractului de *Acmella oleracea*).

BIBLIOGRAFIE

- Abla, M.J., Banga, A.K. Quantification of skin penetration of antioxidants of varying lipophilicity. *Int.J.of Cosmetic Sci.*, **2012**, 1-8, doi: 10.1111/j.1468-2494.2012.00728.x
- Adejokun, D.A., Dodou, K. Quantitative Sensory Interpretation of Rheological Parameters of a Cream Formulation. *Cosmetics*, **2020**, 7, 2. doi.org/10.3390/cosmetics7010002
- Bickers R.D., Athar M. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Skin Disease. *Journal of Investigative Dermatology*, **2006**, 126(12), 2565-2575. doi.org/10.1038/sj.jid.5700340.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Tech.*, **1995**, 28(1): 25-30.
- Colo, S.M., Herh, P.K.W., Roye, N., Larsson, M. Rheology and the texture of pharmaceutical and cosmetic semisols. *Am. Lab.* **2004**, 36, 26-30.
- Da Porto, C., Natolino, A. Extraction kinetic modelling of total polyphenols and total anthocyanins from saffron floral bio-residues: Comparison of extraction methods, *Food Chemistry*, **2018**, 258, 137-143, doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.059
- Dimitrova, T.D., Leal-Calderon, F. Rheological properties of highly concentrated protein-stabilized emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2004, 108-109, 49-61. doi: 10.1016/j.cis.2003.10.002

- Eren, N.M., Santos, P.H.S., Campanella, O. Mechanically modified xanthan gum: Rheology and polydispersity aspects. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *134*, 475–484. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.07.092
- Grochowski, D.M., Uysal, S., Aktumsek, A., Granica, S., Zengin, G., Ceylan, R., Locatelli, M., Tomczyk, M. In vitro enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical profile of *Potentilla thuringiaca*. *Phytochem. Lett.* **2017**, *20*, 365–372, doi.org/10.1016/j.phytol.2017.03.005
- Herh, P., Tkachuk, J., Wu, S., Bernzen, M., Rudolph, B. The rheology of pharmaceutical and cosmetic semisolids. *Am. Lab.* **1998**, *30*, 12–14.
- Hu, Y.T., Ting, Y., Hu, J.Y., Hsieh, S.C. Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems. *J. Food Anal.* **2017**, *25*, 16–26. doi: 10.1016/j.jfda.2016.10.021
- Islam, M.T., Rodriguez-Hornedo, N., Ciotti, S., Ackermann, C. Rheological characterization of topical carbomer gels neutralized to different pH. *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1192–1199.
- ISO 18415:2007; Cosmetics—Microbiology—Detection of Specified and Non-Specified Microorganisms. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2007.
- Jurca, T., Pallag, A., Vicaș, L., Marian, E., Mureșan, M., Ujhelyi, Z., Fehér, P., Bácskay, I. Formulation and antioxidant investigation of creams containing *Robinia pseudacaciae flos* L. ethanolic extract. *Farmacia*, **2021**; *69*(4): 697–704. doi.org/10.31925/farmacia.2021.4.9
- Kim, K.M., Oh, H.M., Lee, J.H. Controlling the emulsion stability of cosmetics through shear mixing process. *Korea-Aust.Rheol.J.*, **2020**, *32*, 243–249
- Kruk J., Duchnik, E. Oxidative stress and skin diseases: possible role of physical activity, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **2014**, *15*(2), 561–568, doi: 10.7314/apjcp.2014.15.2.561.
- Kupriyanov, R., Zhdanov, R. The Eustress Concept: Problems and Outlooks, *World Journal of Medical Sciences*, **2014**, *11*(2), 179–185, doi:10.5829/idosi.wjms.2014.11.2.8433.
- Kwak, M.S., Ahn, H.J., Song, K.W. Rheological investigation of body cream and body lotion in actual application conditions. *Korea-Aust. Rheol. J.*, **2015**, *27*, 241–251.
- Liguori, I., Russo, G., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., Abete, P. Oxidative stress, aging and diseases, *Clinical Interventions in Aging*, **2018**, doi: 10.2147/CIA.S158513
- Mahmood, T., Akhtar, N. Stability of a cosmetic multiple emulsion loaded with green tea extract. *Sci.World J.*, **2013**, *2013*, 153695. doi.org/10.1155/2013/153695.
- Mason, T.G. New fundamental concepts in emulsion rheology. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, *4*, 231–238.

- McDaniel, H.D., Neudecker, A.B., DiNardo, C.J., Lewis, A.J., Maibach, I.H. & I. Idebenone: a new antioxidant – Part I. Relative assessment of oxidative stress protection capacity compared to commonly known antioxidants, *J Cosmet Dermatol.*, **2005**, 4(1), 10-7. doi: 10.1111/j.1473-2165.2005.00152.x
- Ndiaye M., Philippe C., Ahmad N., The Grape Antioxidant Resveratrol for Skin Disorders: Promise, Prospects, and Challenges, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2011**, 508(2), 164-170, doi: 10.1016/j.abb.2010.12.030.
- Pavun, L., Dikanovic, P., Jelikic-Stankov, M., Durdevic, D., Uskokovic-Markovic, S. Detremination of flavonoids and total polyphenols contents in commercial apple juices, *Czech J. Food Sci.*, **2018**, 36, 233-238
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci.*, **2008**, 4(2), 89-96.
- Pietta P., Minoggio M.S., Bramati, L. Plant Polyphenols: Structure, Occurrence and Bioactivity in Bioactive Natural Products (Part I), *Atta-ur Rahman (Ed.), Elsevier Science B.V. Studies in Natural Products Chemistry*, **2003**, doi:10.1016/S1572-5995(03)80143-6.
- Gabriele Pizzinon.** Natasha Irrera, Mariapaola Cucinotta, Giovanni Pallio, Federica Mannino, Vincenzo Arcoraci, Francesco Squadrito, Domenica Altavilla and Alessandra Bitt 2017.
- Rahal A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K. Oxidative stress, prooxidants and antioxidants: the interplay, *BioMed Research International*, **2014**, Article ID 761264. doi: 10.1155/2014/761264.
- Ramana, V., Singhal, S.S., Reddy, B.A. Therapeutic Potential of Natural Pharmacological Agents in the Treatment of Human Diseases, *BioMed Research International*, **2014**, Article ID 573452, dx.doi.org/10.1155/2014/573452.
- Roncea, F., Miresan, M., Rosca, C., Cazacincu, R. Cosmetic vs. Cosmeceuticals (in Romanian), *Farmacist.ro (Dermato-cosmetology supplement (Supliment dermato-cosmetologie))*, **2016**, Editorial Group MEDICHUB MEDIA.
- Savic, S., Petrovic, S., Savic, S., Cekic, N. Identification and photostability of N-alkylamides from *Acmella oleracea* extract. *Journal of Pharmaceutical and Bio-medical Analysis*, **2021**, 195, 113819. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113819
- Soto, M. L., Parada, M., Falqué, E., Domínguez, H. Personal-Care Products Formulated with Natural Antioxidant Extracts, *Cosmetics*, **2018**, 5, 13; doi:10.3390/cosmetics5010013.
- Souto, E.B., Gohla, S.H., Müller, R.H. Rheology of nanostructured lipid carriers (NLC®) suspended in a viscoelastic medium. *Die Pharm. Int. J. Pharm. Sci.*, **2005**, 60, 671–673.
- Stein, R., Berger, M., Santana de Cecco, B., Peixoto Mallmann, L., Barros Terraciano, P., Driemeier, D., Rodrigues, E., Beys-da-Silva, W. O., Konrath,

- E. L., Chymase inhibition: A key factor in the anti-inflammatory activity of ethanolic extracts and spilanthol isolated from *Acmella oleracea*. *Journal of Ethnopharmacology*, **2021**, 270, 113610. doi: 10.1016/j.jep.2020.113610
- Tabilo-Munizaga, G., Barbosa-Cánovas, G.V. Rheology for the food industry. *J. Food Eng.*, **2005**, 67, 147–156.
- Tagami, H., Kobayashi, H., O’goshi K., Kikuchi, K. Atopic Xerosis: Employment of Noninvasive Biophysical Instrumentation for the Functional Analyses of the Mildly Abnormal Stratum Corneum and for the Efficacy Assessment of Skin Care Products. *Journal of Cosmetic Dermatology*, **2006**, 5(2), 140-149, doi:10.1111/j.1473-2165.2006.00241.x
- Turcov, D., Rusu, L., Zbranca, A., Şuteu, D. New dermatocosmetic formulations using bioactive compounds from indigenous natural sources. *Buletinul Institutului Politehnic din Iaşi, publicat de Universitatea “Gheorghe Asachi” din Iaşi*, **2020b**, 66 (70) (2), Secţia Chimie şi Inginerie Chimică, 67-76.
- Turcov, D., Zbranca, A., Horciu, I.L., Şuteu, D. Resveratrol in the prevention and treatment of oxidative stress., *Buletinul Institutului Politehnic din Iaşi publicat de Universitatea “Gheorghe Asachi” din Iaşi*, **2020a**, 66 (70) (2), Secţia Chimie şi Inginerie Chimică, 53-65.
- Turcov, D., Zbranca, A., Rusu, L., Şuteu, D. Lycopene – background, perspectives and challenges in dermato-cosmetic formulas. *Bull. IPI, Secţiunea: Chimie şi Inginerie chimică*, **2021**, 67 (71) (2), 9-20
- Turcov, D., Barna, A. S., Blaga, A. C., Ibanescu, C., Danu, M., Trifan, A., Zbranca, A., Suteu, D. Dermatocosmetic Emulsions Based on Resveratrol, Ferulic Acid and Saffron (*Crocus sativus*) Extract to Combat Skin Oxidative Stress-Trigger Factor of Some Potential Malignant Effects: Stability Studies and Rheological Properties. *Pharmaceutics*, **2022a**, 14(11), 2376. doi.org/10.3390/pharmaceutics14112376
- Turcov, D., Barna, A.S., Trifan, A., Blaga, A.C., Tanasa, A.M., Suteu, D. Antioxidants from *Galium verum* as Ingredients for the Design of New Dermatocosmetic Products, *Plants- Basel*, **2022b**, 11(19). 2454, doi: 10.3390/plants11192454
- Turcov, D., Barna, A.S., Apreutesei (Ciuperca), O.T., Puitel, A.C., Suteu, D. Preliminary processing of floral bio-residues of saffron (*Crocus Sativus* L.) as an innovative resource for development of high added-value cosmetic products. *BioResource*, **2022c**, 17(3), 4730-4744. doi: 10.15376/biores.17.3.4730-474.
- Turcov, D., Peptu A.C., Barna, A.S., Zbranca, A., Suteu D. *In vitro* evaluation of the dermatocosmetic emulsions based on Lady's Bedstraw (*Galium verum*) alchoolic extracts. *The 10th IEEE International Conference on E-Health and Bioengineering - EHB 2022*, Grigore T. Popa University of Medicine and Pharmacy, Iasi, Romania, November 17-18, **2022d**.

-
- Turcov, D., Peptu, A.C., Zbranca, A., Suteu, D. In vitro evaluation of the dermatocosmetic emulsions based on saffron (*Crocus sativus*) alchoolic extracts, *Bull.I.P.I.*, **2023a**, 69 (73), 2, 39-46.
- Turcov, D., Butnaru M., Zbranca-Toporas, A., Suteu, D. Biocompatibility Investigation and Preliminary Tolerability Observational Study of the Dermatocosmetic Emulsions Based on Saffron (*Croccus sativus*) and Lady's Bedstraw (*Galium verum*) extract, *The 11th IEEE International Conference on E-Health and Bioengineering - EHB 2023*, Grigore T. Popa University of Medicine and Pharmacy, Iasi, Romania, November 9-10, **2023b**.
- Veskoukis, S.A., Aristidis, M., Tsatsakis, A.M., Kouretas, D. Dietary Oxidative Stress and Antioxidant Defense with an Emphasis on Plant Extract Administration, *Cell Stress Chaperones*, **2012**, 17(1), 11-21, doi: 10.1007/s12192-011-0293-3 (2012).
- Zaichikova, S.G., Bokov, D.O., Kiselevskii, M.V., Antsyshkina, A.M., Bondar, A.A., Prostodusheva, T.V., Shchepochkina, O.Y., Gegechkori, V.I. Determination of the Chemical Composition of Lady's Bedstraw (*Galium verum* L.) Herb Extract by GC-MS. *Pharmacogn. J.* **2020**, 12, 857–863. doi:10.5530/pj.2020.12.123
- Turcov, D., Maxim, C., Zbranca-Toporaș, A., Trifan, A., Puitel, A. C., Suteu, D., Barna. A. S. Preliminary studies about dermatocosmetic serums to combat skin oxidative stress based on *Acmella Oleracea* extract. **2024**, *in press*