

**REZUMAT**  
**PN-III-P4-ID-PCE-2020-0620**

**Nanoformulări topice ale extractelor vegetale selective cu proprietăți antiinflamatoare și analgezice performante –  
NANOGELEXPLORE**

**ETAPA 1/2021 - Dezvoltarea metodelor de extracție și de separare a fitocompușilor derivați din *A. toxicum* Reichenb., *H. odorus* Waldst. & Kit. Ex Willd și *A. nemorosa* L.**

Utilizate din cele mai vechi timpuri și în cele mai diverse scopuri, speciile familiei Ranunculaceae sunt recunoscute în medicina tradițională și convențională ca fiind bogate în metaboliți secundari cu proprietăți extrem de atractive, de la ameliorarea imunității la chimioterapia anti-cancer sau inversarea rezistenței la medicamentele antitumorale.

Multe neamuri și popoare utilizează diferite specii de Ranunculaceae în cele mai diverse scopuri, de la otrăvirea săgeților (Teit, 1900, citat de Turner, 1984), la remedii naturiste, la revitalizarea persoanelor inconștiente, la insecticide etc., însă manipularea acestor plante toxice trebuie să se realizeze cu foarte mare atenție, pentru a minimiza consecințele nocive. Despre toxicitatea și potențialul terapeutic al Ranunculaceaelor s-a scris încă de la începutul secolului trecut, dar pentru valorificarea acestora și utilizarea lor sigură în tratarea unor afecțiuni sunt necesare studii și cercetări *in vitro* și *in vivo* suplimentare și aprofundate.

Familia Ranunculaceae (ordinul Ranunculales), include 62 genuri și 2525 specii (Stevens, 2001; Cossard și colab., 2016), cunoscute încă din cele mai vechi timpuri datorită proprietăților terapeutice ale acestora, proprietăți datorate metaboliților secundari existenți din abundență în aceste specii. Cele mai noi studii vizează utilizarea fitometaboliților Ranunculaceaelor, precum alcaloizi, terpenoide, saponine și polizaharide, în chimioterapia anti-cancer, prin blocarea ciclului celular și inducerea apoptozei celulelor canceroase (Khurshid și colab., 2020), prin ameliorarea imunității (Wu și colab., 2012), prin inhibarea proliferării celulare, angiogenezei și metastazării, prin reducerea sau inversarea rezistenței la medicamentele antitumorale (Schink și colab., 2015). Separarea metaboliților secundari din corpul plantelor de componentele inactive ale acestora se realizează prin extracție. Există două tipuri de metode de extracție: metodele convenționale sau clasice și metodele moderne, denumite și „tehnică verzi de extracție”. Există două tipuri de metode de extracție: metode convenționale sau clasice și metode moderne, numite și „tehnică de extracție verde”. Cea mai populară și comună tehnică de extracție este macerarea. Aceasta presupune plasarea materialului vegetal într-un recipient peste care se toarnă solventul specific până când este complet acoperit și menținut la temperatura camerei timp de cel puțin trei zile (Abubakar și Haque, 2020). Tehnica de extracție prin macerare este potrivită pentru extracția compușilor termolabili. Metodele moderne de extracție includ extracția asistată cu microunde (MAE), extracția asistată cu ultrasunete (UAE), extracția cu fluid supercritic (SFE). Au fost folosite diverse metode de extracție pentru a obține un randament cât mai mare de fitochimice, de la anumiți reprezentanți ai familiei Ranunculaceae.

În ultimii ani, s-a observat o creștere a cererii de extracte naturale obținute prin tehnici de extracție „verzi”, neconvenționale de prelucrare a materiilor prime. Aceste tehnici au fost dezvoltate și pentru a rezolva problemele ce apar în cazul utilizării metodelor convenționale de extracție. Tehnica „verde” poate fi definită ca o „metodă de extracție ce se bazează pe descoperirea și proiectarea proceselor de extracție care vor reduce consumul de energie, permițând utilizarea de solvenți alternativi și produse naturale regenerabile și asigură un extract/ produs sigur și de înaltă calitate”. Tehnicile moderne de extracție sunt reprezentate de extracția asistată de microunde, extracția asistată de ultrasunete și extracția cu fluide supercritice.

Etapă de dezvoltare a metodelor de extracție și de separare a fitocompușilor derivați din *A. toxicum* Reichenb., *H. odorus* Waldst. & Kit Ex Willd și *A. nemorosa* L. a constat în colectarea și autentificarea materialului vegetal, din care s-au obținut extracte folosind solvenți diferiți (H<sub>2</sub>O:EtOH 40:60, H<sub>2</sub>O:MeOH 40:60, apă) și utilizând patru tehnici de extracție, macerarea, extracția asistată de ultrasunete, extracția asistată de microunde și extracția cu fluide supercritice (metanol, cosolvent). Considerând toate variabilele (materialul vegetal, solventul, tehnica de extracție) au fost obținute în total 35 de extracte, care au fost caracterizate pentru identificarea de fitocompuși cu proprietăți antiinflamatoare și analgezice. Dependent de specie, în extractele obținute au fost identificate diverse flavonoide și alcaloizi.

Magnoflorina și alți alcaloizi, glicozide cardiace, flavonoide cu proprietăți antitumorale și activitate citotoxică împotriva celulelor tumorale umane au fost extrase din plantele Ranunculaceae. *Aconitum* sp. au fost folosite în medicina tradițională chineză pentru a trata artrita, paralizia și infarctul, dar și ulcerul duodenal și gastroenterita. Activitatea antibacteriană a fost demonstrată asupra bacteriilor din specia *Staphylococcus aureus*, efectele farmacologice datorându-se flavonoidelor, compușilor fenolici, terpenoidelor, polizaharidelor (Hao, 2019; Yin și colab., 2019). Preparatele obținute din rizomi de anemone sunt utilizate în tratamentul dizenteriei, ulcerelor, malariei și altor boli parazitare, faringolaringitei, hepatitei. Efectul substanțelor din compoziția chimică a acestor plante este antiinflamator, antimicrobian, antitumoral, sedativ și analgezic, dar și antihistaminic, anticonvulsivant, antipiretic. Datorită conținutului ridicat al acestor substanțe, rizomii proveniți de la specia *Anemone raddeana* sunt folosiți pentru ameliorarea nevralgiilor și a simptomelor reumatice. *Anemona coronaria* a fost utilizată pe scară largă ca antinevralgic și antireumatic în medicina tradițională din Liban (Raafat și El-Lakany, 2018). Pulberea obținută din rădăcinile de *Pulsatilla chinensis* a prezentat un efect antibacterian evidențiat în tratamentul sindromului diareic indus la șoareci prin inocularea bacteriilor enterotoxigene *E. coli* O101 (Yu și colab., 2017). Utilizarea acestor plante în diferite terapii este limitată de efectul toxic pe care îl pot avea dacă nu sunt respectate concentrațiile potrivite (Wang și colab., 2020).

În vederea realizării cercetărilor asumate prin cererea de finanțare, am utilizat părțile subterane și supraterane ale plantelor din speciile *Helleborus odorus* Waldst. & Kit. ex Willd., *Anemone nemorosa* L. și *Aconitum toxicum* Reichenb.

Materialul vegetal de la specia *H. odorus* a constat în rizomi și tulpina floriferă, provenind din populații bine reprezentate numeric, din mai multe puncte de colectare răspândite într-o suprafață de cca 30 ha din situl de importanță comunitară ROSCI0405, din dealurile Strehaia-Bătlanele, județul Mehedinți. Localizarile GPS ale punctelor de colectare sunt: N 44° 35' 19,2", E 023° 07' 38,1"; N 44° 35' 16,5", E 023° 08' 11,5"; N 44° 35' 13,0", E 023° 07' 56,9"; N 44° 35' 12,5", E 023° 07' 50,7".

Rizomii și partea supraterană înflorită de la *A. nemorosa* au fost colectate în data de 25 aprilie 2021, precum și rizomi și partea supraterană fructificată, în 6 mai 2021, din Pădurea Trivale din municipiul Pitești, cu următoarea localizare GPS: N 44°51'09.7" E 24°51'07.8"; N 44°51'17.6", E 24°51'25.5"; N 44°51'13.2", E 24°51'15.1".

Plantele întregi de *A. toxicum* au fost colectate în perioada de înflorire din Valea Rudăriței (Munții Leaota) – 31.07.2021, iar din Valea Vâlsanului în 13.08.2021 și 20.08.2021.

Dintre plantele de *A. toxicum* (colectată din Cheile Rudăriței), *A. nemorosa* și *H. odorus* au fost alese și presate exemplarele voucher, care au fost înregistrate în colecția de herbar a Muzeului Județean Argeș, primind următoarele numere: *Aconitum toxicum* Reichenb. – exemplar voucher nr. 11376, *Anemone nemorosa* L. – exemplar voucher nr. 11377, *Helleborus odorus* Waldst et Kit. – exemplar voucher nr. 11378.

Rizomii/ frunzele/ florile s-au folosit pentru a obține extracte cu diverși fitocompuși, în special pentru determinarea părților de plante bogate în alcaloizi și flavonoizi. Solvenții utilizați pentru macerare au fost etanol 96° și metanol 96°. Extractele alcoolice au fost preparate prin măcinarea a 10 g de plante în 100 ml alcool timp de 48 de ore la temperatura camerei.

Pentru MAE, UAE și SFE: raportul de solvenți utilizat: H<sub>2</sub>O: EtOH 40:60, H<sub>2</sub>O:MeOH 40:60; raport plante: solvent 1: 10.

Etapetele prelucrării primare a materialului vegetal: (1) plantele proaspete au fost uscate la 40 °C în cuptorul Memmert timp de 48 h; (2) cu ajutorul balanței termice KERN MLB50-3N s-a determinat umiditatea relativă pentru fiecare parte a plantei; (3) plantele uscate au fost pre-măcinate cu moara de laborator RETSCH GM200 timp de 3 minute la 4000 rpm și măcinate timp de 10 secunde la 10.000 rpm; (4) cantitatea necesară de pulbere a fost cântărită cu balanța analitică METTLER. Extracția asistată cu microunde a fost efectuată timp de 5 min în vasul de extracție de NEOS MILESTONE GR sub agitare continuă, 220W, 63-67 °C. Extracția asistată cu ultrasunete a fost efectuată timp de 10 min. în vasul de extracție cu răcire al echipamentului HIELSCHER UP200ST, sub acțiunea sonotrodului la o amplitudine de 72 μm.

Extractele obținute au fost centrifugate la 6000 rpm timp de 5 min folosind dispozitivul EBA200 - HETTIC. După centrifugare, supernatantul a fost filtrat sub vid prin hârtie de filtru cu filtrare medie. Extracția cu CO<sub>2</sub> supercritic a fost efectuată pe echipamentul SFT-110 SFE SYSTEM la următorii parametri: CO<sub>2</sub>: MeOH 20: 1; 3000 psi; debit: 6 mL/min CO<sub>2</sub>; 0,3 ml/min MeOH; extracție statică: 10 min (4 cicluri); extracție dinamică: 10 min (4 cicluri). Toate extractele obținute au fost păstrate la o temperatură de 4 °C.

Extractele de analizat au fost filtrate prin filtre de 0,22 μm pentru a îndepărta eventualele depuneri. Extractele filtrate au fost transferate în flacoane de unică folosință pentru analiza HPLC. Un sistem LC Agilent seria 1200, constând dintr-o pompă cuaternară, un detector cu matrice de diode și un prelevator de mostre automate. Analiza aconitinei a fost efectuată pe o coloană ZORBAX Eclipse plus C18 (150 mm × 4,6 mm i.d.; dimensiunea particulei 5 μm; Agilent Technologies Inc., SUA) la 30 °C. Solvenții utilizați pentru separarea HPLC a compusului țintă din probe au fost acetoneitrilul (A) și o soluție tampon (B) care conține 40 mmol/mL acetat de amoniu ajustată cu soluție de amoniac la pH 10,0. Debitul a fost de 1,0 ml/min și gradientul de eluare a fazei mobile a fost 15 - 70% (A) în 0 - 45 min și 70% (A) în 45 - 50 min. Detectarea a fost efectuată la 240 nm. Curba de calibrare a fost construită în domeniul de concentrații 0-50 mg/L. Standardele utilizate au fost aconitină, hipaconitină, mezaconitină și magnoflorine. Acetonitrilul, apa și acetatul de amoniu au fost de calitate HPLC.

Compușii naturali identificați în extractele de plante au fost aconitina, mesaconitina, hipaconitina, magnoflorina, flavonoidele specifice și alți compuși fenolici la 280-300 nm și 300-350 nm.

#### Bibliografie selectivă

1. Teit J.A. 1900. The Thompson Indians of British Columbia. American Museum of Natural History, Memoires No. 2, p. 243.
2. Cossard G., Sannier J., Sauquet H. et al. 2016. Subfamilial and tribal relationships of Ranunculaceae: evidence from eight molecular markers. *Plant Syst Evol.* 302: 419-431.
3. Schink M., Garcia-Käuffer M., Bertrams J. et al. 2015. Differential cytotoxic properties of *Helleborus niger* L. on tumour and immunocompetent cells. *J Ethnopharmacol.* 159: 129-36.
4. Abubakar A.R., Haque M., 2020. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *J Pharm Bioallied Sci.* 12(1): 1-10.
5. Hao D.-C. 2019. Mining chemodiversity from biodiversity: Pharmacophylogeny of Ranunculaceae medicinal plants. In: *Ranunculales Medicinal Plants*, 35-71.
6. Yu J., Zhang Y., Song X. et al. 2017. Effect of modified *Pulsatilla* powder on enterotoxigenic *Escherichia coli* O101-induced diarrhea in mice. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017:3687486
7. Wang S-S., Zhou S-Y., Xie X-Y. et al. 2020. Comparison of the acute toxicity, analgesic and anti-inflammatory activities and chemical composition changes in *Rhizoma anemones Raddeanae* caused by vinegar processing. *BMC Complement Altern Med.* 20: 7.

#### ETAPA 2/2022 - Caracterizarea fizico-chimică a extractelor crude, amestecurilor nanostructurate și nanoparticulelor metalice. Evaluarea bioactivității extractelor crude, fitocompușilor izolați și a amestecurilor nanostructurate

Proprietățile nanoparticulelor metalice (NPs) și bio-nano-interacțiunile sunt influențate de o multitudine de factori, printre care compoziția elementală a coroanei, dimensiunea, forma și suprafața, cristalinitatea suprafeței, interfața solid-lichid, suprafața de contact cu o moleculă organică, factori de micromediu. În funcție de această multitudine de factori, bio-nano-interacțiunile pot induce o mare varietate de răspunsuri celulare.

Utilizând extracte de *A. toxicum*, *H. odorus* și *A. nemorosa* ca agenți reducători, au fost dezvoltate 33 de variante experimentale definite de 8 variabile, respectiv specia, organul vegetal, metoda de extracție, tipul solventului utilizat pentru obținerea extractelor, concentrația extractului și concentrația HAuCl<sub>4</sub>/AgNO<sub>3</sub>, timpul și temperatura de de incubare.

Biosinteza nanoparticulelor metalice a fost confirmată prin variația de culoare a extractelor, de analizele spectrale FTIR și UV-Vis, analiza STEM-EDS și analiza prin difracție cu radiații X. Compartiv cu extractele obținute cu ultrasunete, testul DPPH a indicat o activitate antioxidantă mai ridicată a extractelor obținute cu microunde, indiferent de specie și de organul vegetal.

Dependent de metoda de biosinteză, unele extractele suplimentate cu nanoparticule metalice au manifestat fitotoxicitate (inhibarea creșterii rădăcinilor și tulpinilor, inhibarea germinăției, diminuarea biomasei), citogenotoxicitate (inhibarea diviziunii celulare, aberații cromozomiale în celulele meristemice de ceapă) și hepatotoxicitate. Suplimentarea extractelor cu nanoparticule metalice a intensificat efectul antimicrobian al extractelor indiferent de variabilele de incubare pentru biosinteză. Extractele de *H. odorus* au avut un efect antimicrobian mai

pronunțat asupra tulpinilor de *B. subtilis* și *C. albicans*, cel mai slab efect fiind evidențiat față de *E. coli*. Extractele obținute cu ajutorul metanolului au dovedit un efect inhibitor mai slab decât cele obținute cu ajutorul etanolului.

Prin modelul experimental al edemului urechii indus de xilen, respectiv al edemul labei indus de caragenan, s-a observat că în funcție de metoda de obținere a extractelor și de biosinteza a nanoparticulelor metalice potențialul antiinflamator a înregistrat variații importante, cele mai bune rezultate fiind determinate de extractele obținute cu ultrasunete.

Un număr de 21 de compuși au fost analizați din punct de vedere bioinformatic (aconitina, hipaconitina, mezacontina, magnoflorine, acid galic, catechin, acid caffeic, acid ferulic, acid clorogenic, epicatechina, delphinidina, acid cumaric, daidzein, hiperozid, rutin, naringin, malvidina, quercitina, naringenin, genistein, acid siringic).

Pentru evaluarea caracterului de posibil medicament compușii au fost prelucrați în baza de date ExPasy [<https://www.expasy.org/>], și testați pentru a respecta regulile de chimie medicală: regula Lipinski, Egan, Muegge. Pentru compușii menționați s-a calculat masa moleculară, hidrofobicitatea, ponderea atomilor donori/acceptori de legături de hidrogen, ponderea numărului de legături rotabile, suprafața moleculară polară etc. Prin calculul bioinformatic al caracterului drug-like am constatat că o parte dintre compuși analizați respectă profilul de drug-like (acid galic, catechin, acid ferulic, acid cafeic, acid clorogenic, epicatechin, acid cumaric, quercitina etc).

Structurile chimice în format Smiles au fost încărcate în softul MOE și transformate în fișiere.mol2. Aceste fișiere au fost utilizate pentru calculul de proprietăți fizico-chimice precum flexibilitatea exprimată în numărul de legături rotabile, refractivitatea ( $\text{\AA}^2$ ), suprafața moleculară polară ( $\text{\AA}^2$ ), hidrofobicitatea și solubilitatea în apă. Rezultatele au indicat că flexibilitatea este mare, în special în seria compușilor din clasa alcaloizilor. Compușii au o hidrofobicitate medie și prezintă un caracter hidrofil mediu.

Rezultatele pe ținte indică predicție mare pe anhidrazele carbonice isoforme, predicție nesemnificativă pe aconitine și derivați.

Rezultatele predictive pentru profilul ADME-Tox au arătat că majoritatea compușilor prezintă o bună absorbție la nivel intestinal; compușii nu sunt inhibitori pentru receptorii OCT2/ OCT, iar în cazul profilului farmacogenomic s-a înregistrat o activitate redusă ca substrat/inhibitor la nivelul situsului citocromului CYP2D6.

Un număr semnificativ de itemi reprezentând toxicitatea a fost analizat pentru compușii naturali analizați: Ames (mutageneza), carcinogenitatea, toxicitatea pentru diferite specii (crustacee, albine, pești), nefrotoxicitatea, hepatotoxicitatea, cardiotoxicitatea, toxicitatea mitocondrială, toxicitatea pentru receptorii nucleari, etc. Rezultatele au arătat că la nivelul organismului uman unii compuși induc hepatotoxicitate, nu sunt nefrotocici și cardiotoxici.

### **ETAPA 3/2023 Dezvoltarea nanogelurilor încărcate cu compuși bioactivi și AuNPs/ AgNPs. Validarea tehnologiei pentru obținerea nanogelurilor funcționalizate cu extracte naturale și nanoparticule metalice**

Nanogelurile sau nanohidrogelurile sunt sisteme coloidale formate dintr-o rețea tridimensională de polimeri hidrofilii, care pot încorpora substanțe active în matricea lor. Nanohidrogelurile prezintă avantaje ca sisteme de eliberare controlată a medicamentelor, cum ar fi stabilitatea fizică, biocompatibilitatea, capacitatea de solubilizare și protecția substanțelor active de degradare. Nanohidrogelurile pot fi aplicate pe piele, mucoase sau pot fi injectate în organism, în funcție de scopul terapeutic (Chander și colab., 2021; Wang și colab., 2023).

Pentru obținerea de nanohidrogeluri, este necesară alegerea unei formulări optime de excipienți, care să asigure proprietățile dorite ale produsului final. Excipienții sunt substanțe care nu au efect farmacologic, dar care contribuie la stabilizarea, conservarea, îmbunătățirea biodisponibilității sau facilitarea administrării substanțelor active. Excipienții folosiți în formularea nanohidrogelurilor pot fi clasificați în trei categorii: polimeri, agenți de reticulare și aditivi (Patel și colab., 2020).

În cazul nanohidrogelurilor cu extracte din plante, care au proprietăți antioxidante, antiinflamatoare, antimicrobiene sau anticancerose, alegerea formulării optime de excipienți este influențată de următorii factori: compatibilitatea dintre extractul vegetal și polimer, stabilitatea extractului vegetal în condițiile de preparare și depozitare, eliberarea controlată a extractului vegetal în funcție de pH-ul și temperatura mediului, biodisponibilitatea și bioactivitatea extractului vegetal la locul de acțiune (Kyriakoudi și colab., 2021).

Un exemplu de formulare optimă de excipienți pentru obținerea de nanohidrogeluri cu extracte din plante este cea bazată pe carbopol, Tween 80 și trietanolamină.

Carbopolul este un polimer sintetic, derivat al acidului acrilic, care are proprietăți de gelificare, vâscozitate, stabilizare și mucoadezivitate. Carbopolul poate forma nanohidrogeluri prin reticulare fizică, prin variații de pH sau prin adăugarea de electroliți. Carbopolul este biocompatibil, biodegradabil și non-toxic, fiind folosit în diverse aplicații farmaceutice, cosmetice și alimentare (Bonacucina și colab., 2004).

Tween 80 este un emulgator non-ionic, derivat al acidului oleic, care are proprietăți de solubilizare, dispersare, umeectare și stabilizare. Tween 80 poate facilita formarea de nanogeluri prin reducerea tensiunii superficiale și prin îmbunătățirea compatibilității dintre fazele apoasă și uleioasă. Tween 80 este biocompatibil, biodegradabil și non-toxic, fiind folosit în diverse aplicații farmaceutice, cosmetice și alimentare (Nielsen și colab., 2016).

Trietanolamina este o substanță alcalină, derivată din amoniac, care are proprietăți de tamponare, neutralizare, solubilizare și emulsionare. Trietanolamina poate contribui la formarea de nanogeluri prin ajustarea pH-ului și prin favorizarea interacțiunilor electrostatice dintre polimer și extractul vegetal. Trietanolamina este biocompatibilă, biodegradabilă și non-toxică, fiind folosită în diverse aplicații farmaceutice, cosmetice și alimentare (URL1).

Utilizarea carbopolului și a trietanolaminei în formulările de tip gel reprezintă o alegere strategică pentru dezvoltarea de produse farmaceutice și cosmetice cu proprietăți terapeutice. Aceste componente furnizează stabilitate, vâscozitate controlată, consistență optimă precum și o eliberare eficientă a substanțelor active, contribuind astfel la eficacitatea și acceptarea produselor de către utilizatori.

Pentru obținerea a 50 mL de nanogel corespunzător fiecărei variante experimentale de extract vegetal, s-au utilizat: 5 mL din fiecare tip de extract, apă distilată, Tween 80, carbopol și trietanolamină (TEA).

Astfel, s-a amestecat apa distilată cu extractul. Jumătate din acest volum s-a introdus într-un pahar Berzelius și s-a agitat pe plita de laborator la 80 °C. Când s-a atins această temperatură, s-a pipetat 6,25 mL Tween 80 și s-a lăsat 15 minute la agitat la aceeași temperatură. Cealaltă jumătate de amestec de apă și extract, s-a introdus într-un pahar Berzelius și s-a agitat pe plita de laborator la 40 °C. Când s-a ajuns la această temperatură, s-a adăugat cantitatea de carbopol și s-a continuat agitarea până la solidificarea medie a acestuia. Apoi, primul amestec a fost din nou supus agitării pe plita de laborator, tot la 80 °C, după care s-a adăugat treptat și restul cantității de Tween 80, continuându-se agitarea pentru încă

5 minute. Ulterior, primul amestec a fost adăugat peste cel de-al doilea, sub agitare la 80 °C. După încorporarea celor două amestecuri, s-a pipetat TEA. Amestecul final s-a omogenizat cu ajutorul unui omogenizator de laborator, timp de 3 min.

Analizele SEM-EDS a gelurilor obținute din complexii fitochimici nanostructurați de *A. nemorosa* L. s-au efectuat folosind microscopul electronic HITACHI SU500 din cadrul Centrului Regional de Cercetare-Dezvoltare pentru materiale, produse și procese inovatoare destinate industriei de automobile (CRC&D - AUTO). Microscopul electronic HITACHI SU500 este echipat cu un *cooling stage* capabil să aducă proba până la -30 °C și să o mențină la temperatura prestabilită în timpul analizei.

Modulul de lucru în presiune variabilă (30Pa) și vid scăzut a permis analiza morfologică a gelurilor înghețate pe *cooling stage* fără a fi necesar *sputtering*-ul.

Modul de lucru a fost următorul: s-a prelevat o mostră de gel și s-a întins o cantitate infimă pe suportul de probă (*cooling stage*); s-a adus suportul de probă (*cooling stage*) la temperatura de -20 °C până ce proba de gel a înghețat; s-a închis incinta microscopului și s-a adus până la o presiune de 30Pa; s-a efectuat analiza SEM a morfologiei gelului; după finalizarea analizei, se aduce incinta la presiune atmosferică, se curăță suportul de probă și se reia analiza pentru următoarea mostră. Micrografia la mărirea 100x obținute pentru mostra de gel RAnU<sub>2</sub>-25% este prezentată în Fig. 1.

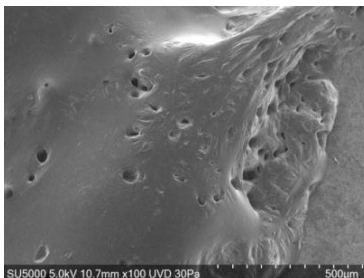


Figura 1. Proba por-gel RAnU<sub>2</sub>-25%. Micrografie SEM x100

Pentru extractele hidroalcoolice morfologia particulelor este aproximativ sferică, iar dimensiunile și dispersia diferă de la un extract la altul. În continuare sunt prezentate micrografiile la diferite mărimi obținute pentru proba RAnU<sub>2</sub>T<sub>1</sub>t<sub>1</sub>. Analiza SEM-EDS pentru extractele hidroalcoolice confirmă prezența particulelor de Ag cu dimensiuni nanometrice, sub 50 nm.

S-a constatat că pentru extractele hidroalcoolice morfologia particulelor este aproximativ sferică iar dimensiunile și dispersia diferă de la un extract la altul. De asemenea, pentru extractele hidroalcoolice se confirmă prezența particulelor de argint cu dimensiuni nanometrice, sub 50 nm.

Evaluarea *in vivo* a potențialului antiinflamator al nanogelurilor la soareci Wistar a fost efectuată prin două metode:

- Metoda edemului auricular. Animalele au fost grupate în 4 loturi experimentale: lotul sănătos (tratată cu apă distilată), lotul de control (tratată doar cu TPA pentru inducerea edemului), lotul experimental (tratată cu TPA și gelurile de experimentat) și lotul tratat cu TPA și indometacină.

Edemul urechii (urechea dreaptă) a fost indus prin aplicarea locală multiplă (timp de 6 zile, o dată pe zi) a 2.5 μg/ureche de TPA (12-O-tetradeca noylphorbol-13-acetate) dizolvat în 20 μL etanol (10 μL pe ambele fețe ale urechii tratate) (Tratamentul cu gel s-a făcut simultan cu aplicarea TPA (20mg/zi/ureche timp de 6 zile). Ca referință a efectului antiinflamator a fost utilizat medicamentul indometacină (1mg/g/zi/ureche).

La 4 ore după ultima administrare animalele au fost sacrificate prin luxație cervicală (după anestezie prealabilă cu 0,01 ml dietil eter - Sulaiman și colab., 2008).) Au fost prelevate cu un perforator cu diametrul de 8 mm urechile drepte și stângi ale șoarecilor și cântărite imediat (Gou și colab., 2017). A fost calculată diferența de greutate a edemului dintre urechea dreaptă și stângă a aceluiași animal.

Procentul de inhibiție a fost comparat cu lotul de control, după următoarea formulă:

$$\% \text{ Inhibiție} = \frac{\text{greutatea edemului (control)} - \text{greutatea edemului (test)}}{\text{greutatea edemului (control)}} \times 100$$

Cel mai mare efect antiinflamator al gelurilor experimentate a fost constatat la varianta cu gel cu extract de rizom obținut la ultrasunete și AgNPs incubate 48 ore la temperatura de 40 °C (cu un procent de inhibare a edemului de 24,1%). Nu au fost constatate diferențe semnificative antiinflamatorii între aplicarea gelurilor fără AgNPs în funcție de modalitatea de extracție, procentele de inhibiție a edemului fiind însă mai mici comparativ cu administrarea extractelor prin gavaj.

- Testarea efectului antiinflamator prin modelul experimental al edemului labei indus de caragenan. Gelurile realizate din extractele de rizom de *A. nemorosa* testate, cu și fără AgNPs fitosintetizate au prezentat acțiune antiinflamatorie în modelul experimental al edemului labei indus de caragenan, cu excepția extractului realizat cu ajutorul microundelor (fără nanoparticule metalice fitosintetizate), pentru care rezultatele au fost neconcludente. Și în acest caz, cele mai bune rezultate antiinflamatoare au fost obținute pentru extractele realizate prin metoda cu ultrasunete.

În general, creșterea procentuală a volumului labei a fost mai redusă în variantele cu gel (comparativ cu rezultatele antiinflamatorii ale extractelor raportate în faza anterioară a proiectului).

Scopul experimentelor realizate în cercetarea de față a fost și acela de a testa efectul antimicrobian al nanogelurilor în care au fost încorporate extracte vegetale de rizom de *A. nemorosa* obținute prin MAE și UAE, cu sau fără nanoparticule fitosintetizate, asupra a șase tulpini microbiene (două fungice din genul *Candida* și patru bacteriene: trei Gram pozitive și una Gram negativă) de referință. Cele 6 variante experimentale sunt prezentate în Tabelul 1, iar tulpinile microbiene de referință folosite sunt prezentate în Tabelul 2.

Metoda folosită pentru testarea efectului antimicrobian al gelurilor cu extracte vegetale a fost o variantă adaptată a metodei difuzimetrice Kirby-Bauer (Balouiri, 2016), în care în locul discurilor standard impregnate cu antibiotice au fost folosite discuri sterile de hârtie de filtru pe care au fost depuse gelurile în strat subțire (în două repetiții), dar și o metodă difuzimetrică utilizând godeuri realizate în stratul de mediu solid.

Pe lângă gelurile cu extracte vegetale au fost utilizați: martorul negativ (Tween 80) și martorii pozitivi reprezentați de antibiotic (Gentamicină 10μg/disc) și antifungic (Fluconazol 25μg/disc) sub formă de microcomprimate standardizate.

**Tabel 1.** Variante experimentale pentru testarea efectului antimicrobian al nanogelurilor

Variante experimentale	Tipul de extract	Concentrație AgNO <sub>3</sub> (mM)	Temperatură incubare (°C)	Timp incubare (h)	Codul variantei
RAnU2 25%	UAE	-	-	-	<b>1</b>
RAnU2T1t1		5mM (U2)	22°C (T1)	24h (t1)	<b>3</b>
RAnU2T2t1			40°C (T2)	24h (t1)	<b>4</b>
RAnM2 25%	MAE	-	-	-	<b>2</b>
RAnM2T1t1		5mM (M2)	22°C (T1)	24h (t1)	<b>5</b>
RAnM2T2t2			40°C (T2)	48h (t2)	<b>6</b>

**Tabel 2.** Tulpini microbiene de referință folosite

Tulpinile microbiene de referință	Simbolul folosit	Mediul utilizat pentru testarea efectului antimicrobian
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	S.a.	Geloza Müller Hinton
<i>Bacillus subtilis</i> ISM 68/53 (echivalent ATCC 6633)	B.s.	Geloza Müller Hinton
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	E.c.	Geloza Müller Hinton
<i>Streptococcus pyogenes</i>	S.p.	Geloza Müller Hinton suplimentată cu 5% sânge de berbec
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	C.a.	Sabouraud
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	C.p.	Sabouraud

Experimentele realizate cu extracte din rizom de *A. nemorosa* în absența AgNPs nu au prezentat efect antibacterian în experimente anterioare. Gelurile cu astfel de extracte utilizate în experimentul de față (codificate 1 și 2) nu au determinat nici ele o acțiune antimicrobiană prin metoda difuzimetrică cu discuri, nici asupra bacteriilor, nici asupra drojdiilor testate. În schimb variantele de geluri care au avut în compoziția lor extracte vegetale cu nanoparticule de argint au exercitat un efect antimicrobian evidențiat printr-o zonă de inhibiție a creșterii microbiene.

Gelul din varianta 4 (RAnU2T2t1) a avut efect asupra a 3 dintre cele 4 tulpini bacteriene, iar gelul din varianta 6 (RAnM2T2t2) a produs o ușoară inhibiție a două tulpini bacteriene (*S. aureus* și *B. subtilis*) și a tulpinii de *C. parapsilosis*. O singură tulpină bacteriană (cea Gram negativă) a fost ușor inhibată de Tween 80, dar toate zonele de inhibiție determinate au fost mult inferioare celor produse de matorii pozitivi (antibiotic/antifungic). Deși extractele de *A. nemorosa* cu AgNPs au avut efect antimicrobian mai puternic atunci când au fost obținute cu microunde, sub formă de geluri au acționat mai intens cele obținute cu ajutorul ultrasunetelor, mai ales printr-o incubare la 40 °C.

În cazul metodei godeurilor a existat o ușoară inhibiție a bacteriilor *E. coli* și *B. subtilis* exercitată de gelurile cu extracte nesuplimentate cu nanoparticule de argint (6,5 mm diametru), dar efectul antimicrobian a fost mai evident în cazul celor cu AgNPs. Din nou varianta 4 de gel a determinat inhibiția creșterii bacteriene mai mult decât celelalte variante testate. Drojdiile testate nu au fost sensibile la acțiunea gelurilor folosite.

Testarea *in vitro* a extractelor vegetale înainte și după fitosinteza nanoparticulelor metalice utilizând culturi de celule umane normale și tumorale, respectiv analiza cantitativă pentru testul cometei alcaline, a arătat o creștere nesemnificativă a dimensiunii cozii cometei după tratamentul cu extracte de *A. nemorosa*, cu și fără AgNPs indicând absența deteriorării ADN. Cuantificarea momentului cozii a confirmat scăderea acestuia în variantele experimentale caracterizate de prezenta AgNPs, cea mai mică valoare fiind caracteristică probei RAnU2T2t2. Aceste date permit evaluarea deteriorării ADN. Totodată, cantitatea de ADN din capul cometelor a fost mai mare în cazul celulelor tratate cu extracte de *A. nemorosa* suplimentate cu AgNPs, comparativ cu extractele crude, sugerând efectul genoprotector al acestora.

#### **Preconizarea beneficiilor nanoformulărilor topice de extracte vegetale selective cu proprietăți antiinflamatoare și analgezice**

Inflamația este asociată cu diverse boli, iar persistența inflamației indică în mod sistemic disfuncția și afectarea diferitelor organe.

Exceptând efectele antiinflamatorii și analgezice, printre **beneficiile preconizate** ale nanoformulărilor topice de extracte vegetale selective se numără:

- creșterea capacității de penetrare a pielii a substanțelor active hidrofiele/lipofie și controlul eliberării firocompușilor activi;
- nanoparticulele metalice pot reduce inflamația pielii indusă de alergeni;
- prin compoziția bogată în compuși fenolici, exercită un efect antioxidant, protejând pielea de atacul radicalilor liberi care se formează sub efectul radiațiilor UV și care pot provoca leziuni celulare;
- efectele antibacteriene și prevenirea infectării rănilor;
- ameliorarea biodisponibilității principiilor active;
- protecția principiilor active împotriva degradării enzimatică și hidrolitice și ameliorarea stabilității.

#### **Beneficiile nanoformulărilor topice de extracte vegetale selective cu proprietăți antiinflamatoare și analgezice, propuneri și proiectii ale studiilor viitoare**

Dintre extractele testate, cele de *A. nemorosa* s-au remarcat prin cel mai mare conținut de rutină, catechină și malvidină. Rutina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavonă-3-ramnoglucozidă) este un flavonoid pentru care a fost demonstrată o serie de activități farmacologice, precum activități antioxidante, citoprotectoare, vasoprotectoare, anticancerigene, cardioprotectoare, inclusiv prevenirea neuroinflamației (Khan și colab., 2009; Ganeshpurkar și Saluja, 2017). De asemenea, catechinele derivate din plante asigură stabilizarea răspunsului antiinflamator pe baza unei activități antioxidante excelente și sunt eficiente în suprimarea stresului inflamator pe termen scurt și lung (Kim și Heo, 2022).

De altfel, cea mai pronunțată activitate antioxidantă (DPPH) a fost determinată pentru varianta RAnU2, definită de extractele hidrometanolice obținute din rizom de *A. nemorosa* prin extracție cu ultrasunete.

Pentru toate probele analizate, ulterior fitosintezei de nanoparticule metalice s-a confirmat prezența particulelor de Ag cu dimensiuni nanometrice, sub 50 nm.

Totodată, extractele de *A. nemorosa* au avut un efect inhibitor mai pronunțat față de bacteriile Gram negative și pozitive testate comparativ cu celelalte extracte obținute din *H. odorus* și *A. toxicum*.

Extractele de *A. nemorosa* suplimentate cu AgNPs au exprimat un efect inhibitor evident în toate variantele experimentale prin comparație cu extractele lipsite de AgNPs, în absența AgNPs efectul antimicrobian fiind nul. Tulpina de *E. coli* a fost cel mai puțin sensibilă la acțiunea extractelor de *A. nemorosa*, iar cel mai pronunțat efect antibacterian a fost exercitat asupra tulpinii de *K. pneumoniae*. Prin comparație cu antibioticele folosite ca martori pozitivi, respectiv Amikacină 30 μg pentru *S. aureus*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae* și Gentamicină 120 μg pentru *E. coli*, acțiunea antimicrobiană a extractelor a fost mai slabă.

În privința extractelor de *A. nemorosa* obținute cu microunde, în absența AgNPs (RAnM), efectul antimicrobian a fost absent. Pentru toate celelalte extracte obținute efectul antimicrobian a fost prezent.

Prin incubarea culturilor de *S. aureus* și *B. subtilis* (bacterii Gram pozitive) cu extracte din rizom de *A. nemorosa* obținute cu ultrasunete s-au format zone de inhibiție de până la 14 mm. Temperatura aplicată pentru sinteza de AgNPs în extracte de *A. nemorosa* a influențat efectul antibacterian exercitat de acestea asupra bacteriilor Gram pozitive folosite.

Față de bacteriile Gram negative testate s-a constatat că extractele de *A. nemorosa* au avut un efect inhibitor mai pronunțat asupra tulpinii *K. pneumoniae* decât asupra tulpinii de *E. coli*.

**Important de subliniat** este faptul că toate extractele de rizom de *A. nemorosa* testate, cu și fără AgNPs fitosintetizate au prezentat acțiune antiinflamatorie în modelul experimental al edemului urechii indus de xilen și al edemului labei indus de caragenan. **Cele mai bune rezultate au fost obținute pentru extractele realizate prin metoda cu ultrasunete.** De asemenea, acțiunea antiinflamatoare a extractelor studiate s-a observat printr-o tendință de creștere a numărului de eritrocite și trombocite, în paralel cu scăderea numărului de leucocite. Asociat creșterii numărului de eritrocite se observă creșterea cantității de hemoglobină și a procentului globular (hematocrit). O ușoară creștere a numărului de elemente figurate a fost înregistrată în cazul administrării extractelor vegetale ce conțin nanoparticule fitosintetizate.

Caracterizarea și cuantificarea fizico-chimică a proprietăților antiinflamatorii și analgezice ale alcaloizilor și flavonoizilor din extractele de *A. toxicum*, *H. odorus* și *A. nemorosa*, standardizarea fitosintezei nanoparticulelor metalice, definirea celor mai eficienți excipienți în funcție de biocompușii activi și tipul de nanoparticule metalice au adus o contribuție semnificativă la îmbogățirea cunoștințelor în domeniu. Proiectul reprezintă o sursă importantă de informații pentru standardizarea metodelor de extracție și izolare a alcaloizilor și flavonoizilor din membrii familiei Ranunculaceae.

Rezultatele acestui proiect deschid și alte direcții de cercetare: micropropagarea *in vitro* a speciilor *A. toxicum*, *H. odorus* și *A. nemorosa* în scopul de a controla conținutul constituenților activi, abordări holistice *in vivo*, modificări ale transcriptomului și proteomului, și studiile clinice, producția la scară industrială de medicamente utile și produse noi în domeniul specializării inteligente. Rezultatele proiectului direcționează valorificarea resurselor naturale autohtone și revitalizează medicina tradițională în concordanță cu medicina modernă.

#### Bibliografie selectivă

1. Chander S., Kulkarni G.T., Dhiman N., Kharkwal H., 2021. Protein-Based Nanohydrogels for Bioactive Delivery. *Frontiers in Chemistry*, 9:573748.
2. Ganeshpurkar A, Saluja AK. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharm J.* 2017; 25(2): 149-164.
3. Gou KJ, Zeng R, Dong Y, Hu QQ, Hu HWY, Maffucci KG, Dou QL, Yang QB, Qin XH, Qu Y. Anti-inflammatory and Analgesic Effects of Polygonum orientale L. Extracts. *Front Pharmacol.* 2017
4. Kim JM, Heo HJ. The roles of catechins in regulation of systemic inflammation. *Food Sci. Biotechnol.*, 2022; 31: 957–970.
5. Nielsen C.K., Kjems J., Mygind T., Snabe T., Meyer R.L., 2016. Effects of Tween 80 on Growth and Biofilm Formation in Laboratory Media. *Frontiers in Microbiology*, 7:1878.
6. Patel R., Barker J., ElShaer A., 2020. Pharmaceutical Excipients and Drug Metabolism: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21):8224.
7. Sulaiman MR, Zakaria ZA, Daud IA, Ng FN, Ng YC, Hidayat MT. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of Kaempferia galanga leaves in animal models. *J Nat Med.* 2008 Apr;62(2):221-7.
8. URL: [https://www.atamanchemicals.com/triethanolamine\\_u24919/](https://www.atamanchemicals.com/triethanolamine_u24919/)
9. Wang Q., Yan Zhang Y., Ma Y., Wang M., Guoqing Pan G., 2023. Nano-crosslinked dynamic hydrogels for biomedical applications. *Materials Today Bio*, 20:100640.

#### NU AU FOST ÎNREGISTRATE NEREALIZĂRI FAȚĂ DE REZULTATELE ESTIMATE

##### • Impactul estimat al rezultatelor obținute, cu sublinierea celui mai semnificativ rezultat obținut.

Integrarea datelor rezultate din experimente de extracție și separare a principiilor fitochimice (alcaloizi, flavonoide), de fitosinteza a nanoparticulelor metalice, de evaluare *in vitro*, *in vivo* și *in silico* a bioactivității extractelor și nanoformulărilor și din studiul farmacodinamicii și farmacocineticii biocompușilor activi a făcut posibilă selecția și ameliorarea proprietăților antiinflamatoare și analgezice ale nanoformularilor topice de *A. nemorosa*. **Cel mai semnificativ rezultat obținut în cadrul cercetărilor realizate** a fost evidențierea unui semnificativ efect antiinflamator și analgezic al extractelor obținute din rizomi de *A. nemorosa* prin extracție cu ultrasunete, cu și fără nanoparticule de argint biosintetizate. Important de subliniat este faptul că cea mai importantă activitate antiinflamatoare și analgezică a fost determinată de nanoformulările RAnU2T2t2, obținute prin incubarea extractelor de *A. nemorosa* cu soluție de AgNO<sub>3</sub> 5 mM pentru biosinteza AgNPs, la o temperatură de 40 °C, timp de 48h. Totodată, această nanoformulare, precum și nanogelul corespunzător au indus și cel mai important efect antimicrobian, precum și cea mai scăzută citogenotoxicitate asupra fibroblastelor umane normale. Screening-ul literaturii de specialitate evidențiază faptul că acesta este primul studiu care demonstrează prin studii *in vitro*, *in vivo* și *in silico* potențialul antiinflamator și analgezic al extractelor obținute din rizomi de *A. nemorosa* și al nanoformulărilor acestora.

Proiectul a permis dezvoltarea unui laborator de culturi de celule umane și crearea unei echipe de cercetare competitivă, capabilă să abordeze, să dezvolte și să cuantifice studiul extractelor selective cu proprietăți antiinflamatoare și analgezice și să crească excelența în cercetare.

Astfel, studii ulterioare privind manipularea nanoparticulelor metalice pentru controlul eliberării fitocompușilor activi și ameliorarea biodisponibilității principiilor active, protecția principiilor active împotriva degradării enzimaticice și hidrolitice și ameliorarea stabilității, precum și dezvoltarea de nanoformulări antialergice/ antitumorale/ antioxidante/ antimicrobiene pot fi abordate prin intermediul noilor echipamente de laborator achiziționate și a membrilor echipei de cercetare.

#### **Promovarea și diseminarea rezultatelor la nivelul proiectului**

În cadrul proiectului au avut loc numeroase activități pentru promovarea și diseminarea rezultatelor obținute la nivelul proiectului, respectiv: 2 workshop-uri care au marcat deschiderea și închiderea proiectului, participarea la 19 manifestări științifice naționale și internaționale, publicarea a 13 lucrări științifice în reviste cotate ISI, 4 capitole de cărți și înaintarea către OSIM a două cereri de brevet. De asemenea, proiectul a fost promovat prin intermediul paginii web [http://nanogeexplore.upit.ro/diseminare\\_en.html](http://nanogeexplore.upit.ro/diseminare_en.html).

Director proiect,  
(Șuțan Nicoleta Anca, Semnătura)