



Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi”, Iași
Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului
DOMENIUL INGINERIA MATERIALELOR



Noi formulări pe bază de polimeri
și principii api- și fitoterapice
pentru tratamentul leziunilor cutanate

Rezumatul tezei de doctorat



Conducător științific
Prof. univ. em dr. ing. dr. h. c. Popa Marcel

Doctorand
Dr. med. Călin V. Andrițoiu

2017

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI
RECTORATUL

Către _____

Vă facem cunoscut că în ziua de 5 aprilie 2017 la ora 12.00, în Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

**NOI FORMULĂRI PE BAZĂ DE POLIMERI ȘI PRINCIPII API- ȘI
FITOTERAPICE PENTRU TRATAMENTUL LEZIUNILOR CUTANATE**

elaborată de domnul **Andrițolu Călin Vasile** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

1. **GAVRILESCU Mariana**, Prof. univ. dr. ing.,
Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași
2. **POPA Marcel**, Prof. univ. em. dr. ing. dr. h. c.,
Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași
3. **DESBRIÈRES Jacques**, Prof. univ. dr. ing. dr. h. c.,
Université de Pau des Pays de l'Adour, Franța
4. **POPA Ionel Marcel**, Prof. univ. em. dr. ing.
Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași
6. **OCHIUZ Lăcrămioara**, Conf. univ. dr. farm.,
Universitatea de Medicină și Farmacie "Grigore T. Popa" din Iași

Președinte

Conducător de doctorat

Referent oficial

Referent oficial

Referent oficial

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 Nagiț

Motto

"Nimic nu se poate numi *muncă*,
cu excepția situației în care ți-ai fi dorit să faci altceva"
- James M. Barrie

Dedic această lucrare familiei
și Centrului Medical de Apiterapie

MULȚUMIRI

Datorez deosebită stimă și prețuire domnului profesor doctor inginer Marcel Popa care prin sprijinul moral și profesionalismul îndrumării științifice oferite, a făcut posibilă finalizarea prezentei teze de doctorat.

Mulțumiri dintre cele mai alese doresc să adresez domnului profesor doctor inginer Marcel Ionel Popa pentru promptitudine, calitatea și acuratețea răsăunșurilor și sugestiilor acordate cu privire la cele mai complexe provocări științifice apărute pe timpul activității de cercetare.

În mod deosebit doresc să mulțumesc comisiei de îndrumare și referenților tezei.

Le mulțumesc tuturor prietenilor cunoscuți pe parcursul perioadei doctorale, sau chiar mai vechi de atât. Am avut în aceeași măsură onoarea cât și plăcerea să-i întâlnesc și cu mulți dintre ei și să lucrăm pe tărâmul cercetării.

Mulțumesc familiei mele, fără de care nu aș fi putut realiza câte am realizat și nu aș fi devenit ceea ce sunt.

CUPRINS

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	Pag.
CAPITOLUL 1	16
ANATOMIA ȘI FIZIOLOGIA ȚESUTULUI CUTANAT. EVENIMENTE LEZIONALE ȘI TRATAREA ACESTORA	16
1.1. Anatomia și fiziologia țesutului cutanat	16
1.1.1. Aspectul morfologic al pielii	16
1.1.2. Funcții ale pielii	16
1.1.3. Histologia pielii	17
1.1.4. Funcțiile epidermului și anexelor	19
1.2. Leziuni ale țesutului cutanat. Evenimente lezionale în leziunile de tip incizie, excizie și arsură termică.	20
1.2.1. Leziuni cutanate	20
1.2.2. Vindecarea leziunilor – fazele procesului de vindecare al leziunilor	23
1.2.3. Factori interni și externi care interferă cu procesul de vindecare al leziunilor	24
1.2.3.1. Hemostaza	24
1.2.3.2. Faza inflamatorie	25
1.2.3.3. Faza proliferativă	26
1.2.3.4. Angiogeneza și rolul său în vindecarea leziunilor	28
1.2.3.5. Faza de remodelare	28
1.2.3.6. Mecanismul vindecării leziunilor	29
1.3. Stimularea vindecării rănilor	32
CAPITOLUL 2.	35
TRATAMENTUL APITERAPIC ȘI ACTIVITATEA LA NIVELUL ȚESUTULUI CUTANAT A UNOR BIOCOMPUȘI EXISTENȚI ÎN PRODUSELE APICOLE	35
2.1. Efecte ale utilizării propolisului în leziunile cutanate	35
2.2. Efecte ale utilizării mierii în afectarea țesutului cutanat	35
2.3. Acțiunea lăptișorului de matcă la nivelul țesutului cutanat	41
CAPITOLUL 3	43
EXTRACTE DE PLANTE UTILIZATE ÎN LEZIUNILE CUTANATE	43
3.1. Plantele și extractele vegetale, medicamente cu potențial în tratamentul leziunilor cutanate	43
3.2. Utilizarea brusturelui în leziunile cutanate (<i>Arctium lappa</i>)	44
3.3. Utilizarea cătinei în leziunile cutanate (<i>Hippophaë rhamnoides</i>)	44
3.3.1. Compuși din <i>Hippophaë rhamnoides</i>	45
3.3.2. Efecte ale <i>Hippophaë rhamnoides</i>	47
3.3.2.1. Efectul testat în modele experimentale al uleiului de cătină	49
3.3.2.2. Testarea în modelul experimental de tip arsură a uleiului de cătină	50
3.4. Utilizarea gălbenelelor în leziunile cutanate (<i>Calendula officinalis</i>)	51
3.4.1. Compuși prezenți în gălbenele (<i>Calendula officinalis</i>)	52
3.4.2. Efecte ale gălbenelelor (<i>Calendula officinalis</i>)	53
3.5. Ceapa în leziunile cutanate (<i>Allium cepa</i>)	55
3.6. Coada șoricelului în leziunile cutanate (<i>Achillea millefolium</i>)	56
3.6.1. Compuși prezenți în <i>Achillea millefolium</i>	56

3.6.2. Efecte ale <i>Achillea millefolium</i>	57
3.7. Pătlagina în leziunile cutanate (<i>Plantago major</i>)	58
3.7.1. Compuși prezenți în <i>Plantago major</i>	58
3.7.2. Efecte ale <i>Plantago major</i>	59
3.8. Sunătoarea în leziunile cutanate (<i>Hypericum perforatum</i>)	59
3.9. Acțiunea uleiului de măsline (<i>Oleum olivarum</i>) asupra țesutului cutanat	60
3.9.1. Antioxidanți în uleiul de măsline	62
3.9.2. Utilizarea topică a uleiului de măsline	63
CAPITOLUL 4	64
POLIMERI NATURALI UTILIZAȚI ÎN FORMULĂRILE PENTRU TRATAMENTUL LEZIUNILOR CUTANATE	64
4.1. Colagenul	64
4.1.1. Obținerea colagenului din surse naturale	65
4.1.2. Efectul colagenului asupra țesutului cutanat	66
4.1.3. Interacțiunea cu celulele	66
4.1.4. Proprietăți imunologice ale colagenului	67
4.1.5. Degradarea colagenului	67
4.1.6. Aplicații biomedicale ale colagenului	67
4.2. Chitosanul	69
4.2.1. Proprietăți biologice	72
4.2.2. Activitatea hemostatică	72
4.2.3. Activitatea bacteriostatică	73
4.2.4. Efecte ale chitosanului în vindecarea rănilor	74
4.3. Gelanul	77
4.4. Carboximetilceluloza (sarea de sodiu)	79
4.5. Hidrogeluri în leziunile cutanate	80
II. CONTRIBUȚII	84
CAPITOLUL 5	87
MATERIALE ȘI METODE	87
5.1. Materiale și metode pentru obținerea și testarea unguentelor apiterapice, fitoterapice, polimeri și amestecuri	87
5.1.1. Materiale utilizate pentru obținerea unor unguente	87
5.1.1.2. Materiale și reactivi pentru obținerea unguentelor pe bază de fitoterapice	87
5.1.1.3. Materiale și reactivi pentru prepararea unguentelor pe bază de polimeri	88
5.1.1.4. Materiale și reactivi utilizate pentru obținerea unguentelor pe bază de amestecuri	88
5.1.2. Metode utilizate pentru prepararea unguentelor	88
5.1.2.1. Prepararea unguentelor pe bază de produse apiterapice	88
5.1.2.2. Prepararea unguentelor pe bază de extracte vegetale	90
5.1.2.3. Prepararea unguentelor pe bază de polimeri	91
5.1.2.4. Prepararea unguentelor pe bază de amestecuri	91
5.1.3. Metode de caracterizare a unguentelor	93
5.1.3.1. Determinarea cantitativă a polifenolilor totali din unguentele pe bază de apiterapice și analiza HPLC	93
5.1.3.2. Studiul histo-anatomic al materialului vegetal utilizat	94

5.1.3.3. Determinarea cantitativă a polifenolilor totali din unguentelor pe bază de extracte vegetale și analiza HPLC	95
5.1.4. Testarea reologică a unguentelor	96
5.1.5. Testarea <i>in vivo</i> a unguentelor	98
5.1.5.1. Modelele experimentale de leziune cutanată	98
5.1.5.2. Design-ul studiului	98
5.2. Materiale și metode pentru obținerea formulărilor pe bază de hidrogeluri polimerice și extracte fito- și apiterapice	102
5.2.1. Materiale	102
5.2.2. Metode de preparare a sistemelor pe bază de principii api- și fitoterapice incluse în hidrogeluri polimerice	102
5.2.2.1. Prepararea extractului vegetal	102
5.2.2.2. Prepararea extractului de propolis	103
5.2.2.3. Prepararea hidrogelurilor simple și încărcate cu principii fito- și apiterapice	103
5.2.3. Modelul experimental de afectare dermică	104
5.2.3.1. Animalele de experiență	104
5.2.3.2. Design-ul studiului	105
5.2.3.3. Tratament	105
5.2.3.4. Evaluarea parametrilor	105
5.3. Materiale și metode pentru obținerea formulărilor pe bază de filme polimerice de tip complex polielectrolitic și extracte fito- și apiterapice	107
5.3.1. Prepararea filmelor polimerice de tip complex polielectrolitic.	107
5.3.1.1. Prepararea filmelor pe bază de gelan-carboximetil celuloză și chitosan	107
5.3.1.2. Filme pe bază de amestec de gelan-carageenan complexate cu chitosan	108
5.3.2. Prepararea filmelor de tip complex polielectrolitic încărcate cu extracte fito- și apiterapice	108
5.3.3. Evaluarea cineticii de eliberare a principiilor active din filmele de tip complex polielectrolitic	109
CAPITOLUL 6	112
OBȚINEREA, CARACTERIZAREA ȘI TESTAREA UNOR UNGUENTE APITERAPICE LA NIVELUL ȚESUTULUI CUTANAT	112
6.1. Analiza calitativă și cantitativă a extractului de propolis	112
6.2. Analiza reologică a unguentelor apiterapice	113
6.3. Evaluarea clinică, macroscopică a leziunilor cutanate	117
6.4. Rata de contracție a plăgilor	121
6.5. Rezultate de anatomie patologică	123
CAPITOLUL 7	142
CARACTERIZAREA ȘI TESTAREA UNOR UNGUENTE FITOTERAPICE LA NIVELUL ȚESUTULUI CUTANAT	142
7.1. Studiul histo-anatomic al materialelor vegetale	142
7.2. Compoziția calitativă și cantitativă în polifenoli a extractului fitoterapic	143
7.3. Studiul reologic al unguentelor fitoterapice	147
7.4. Rezultatele clinice și macroscopice	150
7.5. Perioada de reepitelizare	154
7.6. Rata de contracție a plăgilor	155

7.7. Rezultate de anatomie patologică	156
7.8. Discuții	160
7.8.1. Efectul unguentului pe bază de cătină asupra leziunilor cutanate	164
7.8.2. Efectul unguentului de gălbenele asupra leziunilor cutanate	166
7.8.2.1. Efectul antiinflamator al unguentului pe bază de gălbenele	166
7.8.2.2. Efectul antiinfecțios al unguentului pe bază de gălbenele	166
7.8.2.3. Efectul unguentului pe bază de gălbenele asupra țesutului de granulație și colagenizării	167
7.8.4. Efectul asupra angiogenezei al unguentului pe bază de gălbenele (Calendula officinalis)	168
7.8.3. Efectul unguentului pe bază de brusture (<i>Arctium lappa</i>)	169
7.8.4. Efectele unguentului pe bază de Coadă-șoricelului (<i>Achillea millefolium</i>)	169
7.8.5. Efectele sinergice ale unguentului pe bază de extract total de plante	170
CAPITOLUL 8	172
OBȚINEREA, CARACTERIZAREA ȘI TESTAREA UNOR UNGUENTE PE BAZĂ DE POLIMERI CU ACTIVITATE BIOLOGICĂ LA NIVELUL ȚESUTULUI CUTANAT	172
8.1. Caracterizarea reologică a unguentelor cu polimeri	172
8.2. Rezultatele clinice și macroscopice	175
8.3. Rata de contracție a plăgilor	178
8.4. Rezultate de anatomie patologică	180
CAPITOLUL 9	195
OBȚINEREA, CARACTERIZAREA ȘI TESTAREA UNOR UNGUENTE PE BAZĂ DE AMESTECURI DE POLIMERI NATURALI ȘI PRINCIPII APITERAPICE ȘI FITOTERAPICE LA NIVELUL UNOR LEZIUNI A ȚESUTULUI CUTANAT	195
9.1. Caracterizarea reologică a unguentelor cu amestecuri de extracte și de polimeri	195
9.2. Rezultatele clinice și macroscopice	197
9.3. Rata de contracție a răni	200
9.4. Rezultate de anatomie patologică.	202
CAPITOLUL 10	216
OBȚINEREA, CARACTERIZAREA ȘI TESTAREA UNOR HIDROGELURI PE BAZA DE POLIMERI NATURALI CA SUPORT PENTRU INCLUDEREA DE PRINCIPII FITO- SI APITERAPICE CU APLICATII LA NIVELUL ȚESUTULUI CUTANAT	216
10.1. Caracterizarea hidrogelurilor	217
10.1.1. Analiza structurală prin pectroscopie FTIR	217
10.1.2. Morfologia hidrogelului	218
10.2. Evaluarea vindecării leziunilor utilizând hidrogeluri polimerice.	219
10.2.1. Rata de contracție a leziunii	219
10.2.2. Rezultate de anatomie patologică	220
10.3 Discuții	223
CAPITOLUL 11	233
OBȚINEREA, CARACTERIZAREA ȘI TESTAREA UNOR FILME DE TIP COMPLEX INTERPOLIMERIC CA SUPORT PENTRU INCLUDEREA DE	233

PRINCIPII FITO- ȘI APITERAPICE CU APLICAȚII LA NIVELUL ȚESUTULUI CUTANAT	
11.1. Studiul cinetic al eliberării unor principii active din filmele de tip complex polielectrolitic pe bază de gelan-carboximetil celuloză și chitosan.	234
11.1.1. Cinetica eliberării in vitro a acidului p-cumaric.	235
11.1.2. Cinetica eliberării in vitro a acidului acidului clorogenic	238
CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE PE CARE LE DESCHIDE STUDIUL	242
Bibliografie	248
Anexe	

INTRODUCERE

Îngrijirea leziunilor cutanate este realmente una dintre preocupările de prim ordin ale cercetării și practicii clinice. Arsurile termice și leziunile asociate reprezintă o cauză majoră de mortalitate și invaliditate la nivel mondial. Este un lucru ilustrativ și suficient pentru a justifica cercetările asupra acestei problematice, derulate în cadrul prezentei teze de doctorat.

Teza de doctorat este organizată în 11 capitole după cum urmează:

Capitolul 1 cuprinde informații legate de anatomia și fiziologia țesutului cutanat și, de asemenea, informații legate de evenimentele lezionale și tratarea acestora.

Capitolul al doilea cuprinde informații legate de tratamentul apiterapic și activitatea la nivelul țesutului cutanat a unor biocompuși existenți în produsele apicole, respectiv propolis, miere și lăptișor de matcă.

Capitolul trei se referă la efectele unor extracte vegetale cu potențial în tratamentul leziunilor cutanate, respectiv ale unor plante existente în flora României: brusturele (*Arctium lappa*), cățina (*Hippophaë rhamnoides*), gălbenelele (*Calendula officinalis*), ceapa (*Allium cepa*), coada șoricelului (*Achillea millefolium*), ptagina (*Plantago major*), sunătoarea în leziunile cutanate (*Hypericum perforatum*).

Capitolul 4 prezintă date de actualitate în ceea ce privește efectul unor polimeri naturali utilizați în tratamentul leziunilor cutanate. Capitolul, pe lângă polimerii studiați - colagenul, chitosanul, gelanul, carboximetilceluloza -, aduce informații despre efectul utilizării hidrogelurilor în tratamentul leziunilor cutanate.

Capitolul 5 constă într-o prezentare detaliată a materialelor și metodelor utilizate pentru obținerea unor noi materiale terapeutice, respectiv a unor unguente apiterapice, fitoterapice, polimerice, a unor amestecuri dintre acestea și, de asemenea a unor hidrogeluri și fime care au fost caracterizate și testate asupra efectelor terapeutice exercitate *in vivo*.

Partea de contribuții proprii a tezei de doctorat se extinde pe parcursul capitolelor 6-11 în modul următor:

Primul experiment întreprins, care face obiectul capitolului 6, și-a propus obținerea și caracterizarea unui nou unguent apiterapic bazat pe încorporarea într-o nouă bază de unguent a mierii de albine, propolisului, lăptișorului de matcă și apilarnilului. Pentru a investiga proprietățile terapeutice ale unguentului au fost efectuate trei modele experimentale *in vivo*, asupra animalelor de laborator, respectiv șobolanilor Wistar: leziuni de tip incizie liniară, excizie circulară și arsură

termică. Tratamentul a fost aplicat topic, o dată pe zi, timp de 21 de zile. S-a realizat determinarea ratei de contracție a leziunii, perioada de reepitelizare și examinarea histopatologică. Rezultatele demonstrează că unguentul nou testat are un efect semnificativ în vindecarea leziunilor pielii, fiind optim pentru utilizare.

Capitolul 7, care reprezintă al doilea experiment prezentat în lucrare, și-a propus să formuleze și să caracterizeze un nou unguent fitoterapic bazat pe un extract total de produse vegetale, testate în prealabil, respectiv, *Plantago speciae*, *Hippophaë rhamnoides*, *Allium cepa*, *Calendula officinalis*, *Arctium lappa*, *Hypericum perforatum*, *Achilea millefolium*, inclus într-o nouă bază de unguent.

Al treilea experiment descris în acest studiu, prezentat în capitolul 8, și-a propus să formuleze și să caracterizeze un nou unguent bazat pe includerea unor polimeri (colagenul, chitosanul albușul de ou liofilizat) într-o nouă bază de unguent.

Al patrulea experiment face obiectul capitolul 9, și și-a propus obținerea și caracterizarea unui nou unguent bazat pe încorporarea într-o bază de unguent a produselor apiterapice, extractelor vegetale, precum și a polimerilor naturali utilizați în experimentul anterior.

Cel de al cincelea experiment întreprins, prezentat în capitolul 10, și-a propus studierea eficienței unor hidrogeluri polimerice încărcate cu principiu apiterapic, respectiv amestec de principiu apiterapic și extract vegetal, asupra leziunilor cutanate.

Al șaselea experiment, prezentat în capitolul 11, a vizat obținerea de noi filme polimer - principiu apiterapic, testate pe leziuni cutanate induse.

Teza de doctorat este structurată în 11 capitole, dezvoltându-se pe 290 pagini, care cuprind 49 figuri, 61 tabele, și se încheie cu un capitol de concluzii, o listă bibliografică și anexe.

În rezumat se face o prezentare selectivă a rezultatelor obținute în urma cercetării, păstrându-se notațiile utilizate în teză (numerotarea capitolelor și subcapitolelor, figurilor, tabelelor, bibliografiei).

Obiectivele tezei de doctorat

Obiectivul principal al tezei de doctorat îl constituie obținerea, caracterizarea și testarea de noi formulări pe bază de principii fito- și apiterapice asociate cu polimeri naturali – amestecuri fizice, hidrogeluri, filme - cu potențiale aplicații în tratarea unor afecțiuni la nivelul țesutului cutanat.

Selectarea polimerilor naturali în vederea obținerii unor suporturi pentru principii active s-a bazat pe caracterul lor biocompatibil și a lipsei de toxicitate, condiții absolut obligatorii pentru realizarea de materiale cu aplicații în domeniul farmaceutic și medical.

Realizarea obiectivului principal al cercetării presupune îndeplinirea mai multor **obiective asociate și conexe** precizate în cele ce urmează.

- Elaborarea, prepararea, caracterizarea și testarea unor unguente apiterapice la nivelul țesutului cutanat. Caracterizarea presupune analiza cantitativă și calitativă a extractului de propolis, analiza reologică a unguentelor obținute, evaluarea clinică macroscopică și microscopică precum și calcularea ratei de contracție a rănilor.
- Elaborarea, prepararea, caracterizarea și testarea unor unguente pe bază de extracte vegetale, selectate pe baza literaturii de specialitate, la nivelul țesutului cutanat. Caracterizarea acestui tip de formulări presupune studiul histo-anatomic al materialelor vegetale, compoziția calitativă și cantitativă în polifenoli a extractelor fitoterapice și testarea *in vivo* a unguentelor obținute.
- Obținerea, caracterizarea și testarea unor unguente pe bază de polimeri naturali care prezintă activitate biologică la nivelul țesutului cutanat.

Pe baza rezultatelor obținute și analiza acestora se trece la elaborarea unor noi formulări care să îmbine sinergic efectele produselor testate.

- Obținerea, caracterizarea și testarea unor unguente pe bază de amestecuri de polimeri naturali și principii apiterapice și fitoterapice la nivelul unor leziuni a țesutului cutanat.
- Obținerea, caracterizarea și testarea unor hidrogeluri pe bază de polimeri naturali dublu reticulați, ca suport pentru includerea de principii fito- și apiterapice cu aplicații la nivelul țesutului cutanat; evaluarea efectelor terapeutice *in vivo* ale noilor sisteme polimer-principiu activ
- Obținerea, caracterizarea și testarea unor filme pe bază de polimeri naturali, de tip complex polielectrolitic, ca suport pentru includerea de principii fito- și apiterapice cu aplicații la nivelul țesutului cutanat; evaluarea efectelor terapeutice *in vivo* ale noilor sisteme polimer-principiu activ.

CAPITOLUL 6

OBȚINEREA, CARACTERIZAREA ȘI TESTAREA UNOR UNGUENTE APITERAPICE LA NIVELUL ȚESUTULUI CUTANAT

6.1. Analiza calitativă și cantitativă a extractului de propolis.

O primă etapă în realizarea studiului a constituit-o cunoașterea compoziției calitative și cantitative în polifenoli a extractului apiterapic. Rezultatele obținute aplicând metode Florin-Ciocâlțu și cromatografia PLC relevă următoarele: conținutul total în polifenoli (exprimat convențional prin cantitatea de acid galic – mg/g extract) este de aproximativ 228 mg/g extract de propolis.

Analiza cromatografică prin HPLC (Figura 9) oferă o imagine exactă a compușilor identificați în extract precum și a cantității acestora ($\mu\text{g/ml}$ extract).

S-a pornit de la o soluție mamă cu o concentrație de 50 $\mu\text{g/ml}$ care prin diluări succesive a permis obținerea soluțiilor cu concentrația situată în domeniul dorit.

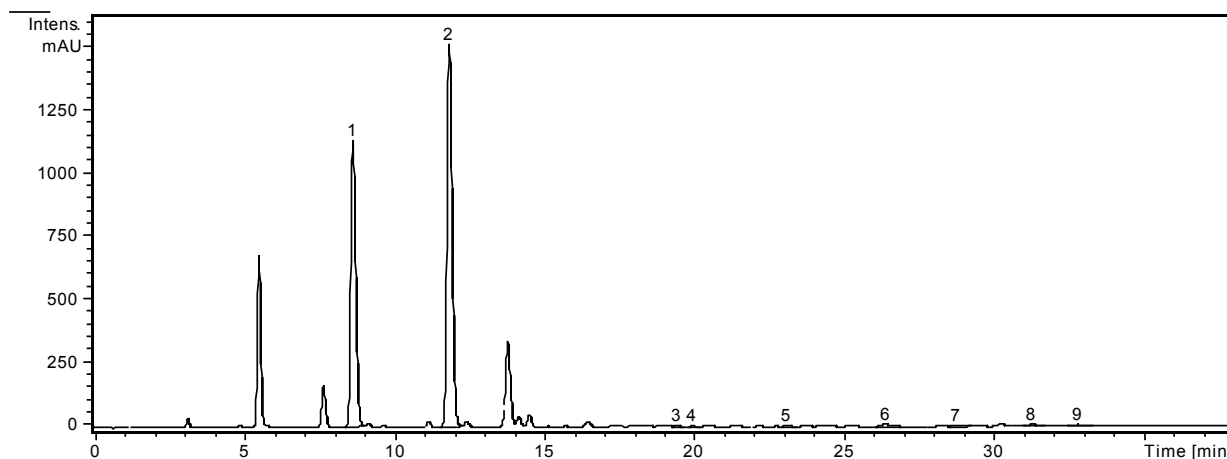


Figura 9. Cromatograma HPLC pentru extractul de propolis.

În tabelul 2 sunt listați compușii polifenolici posibil a intra în compoziția extractului de propolis, cu mențiunea că nu toți aceștia au fost regăsiți în preparat într-o concentrație măsurabilă. Pentru compușii polifenolici identificați în extract atât prin spectroscopie UV cât și prin MS, este menționată și concentrația acestora (coloana finală).

În afara polifenolilor menționați, în extractul de propolis au fost regăsiți acidul cafeic, acidul clorogenic și flavone. Cei doi acizi precum și tipurile de flavone identificate au fost dozați și cantitativ, rezultatele fiind prezentate în Tabelele 3 și 4.

Tabel 2. Compuși polifenolici identificați în extractul de propolis.

Nr. pe cromatogramă	Compus	Nr.	Identificat UV	Identificat calitativ MS	Concentrație în extract (μg/ml)
	Ac gentisic	2	NU	DA	urme
	Ac cafeic	3	NU	DA	urme
1	Ac p-cumaric	5	DA	DA	1516.119
2	Ac ferulic	6	DA	DA	1771.669
	Hyperozid	8	NU	DA	urme
3	Isoquercitrin	9	DA	DA	1.009
4	Rutozid	10	DA	DA	0.823
	Miricetol	11	NU	DA	urme
5	Quercitrin	13	DA	DA	11.573
6	Quercetol	14	DA	DA	18.295
7	Luteolina	16	DA	DA	6.604
8	Kaempferol	17	DA	DA	19.537
9	Apigenina	18	DA	DA	19.195

Tabel 3. Concentrațiile acidului cafeic și clorogenic în extractul de propolis

Probă	Acid cafeic	Acid clorogenic
	Concentrație, μg/ml extract furnizat	
PROPOLIS	796.40	1.67

Tabelul 4. Concentrațiile flavonelor în extractul de propolis

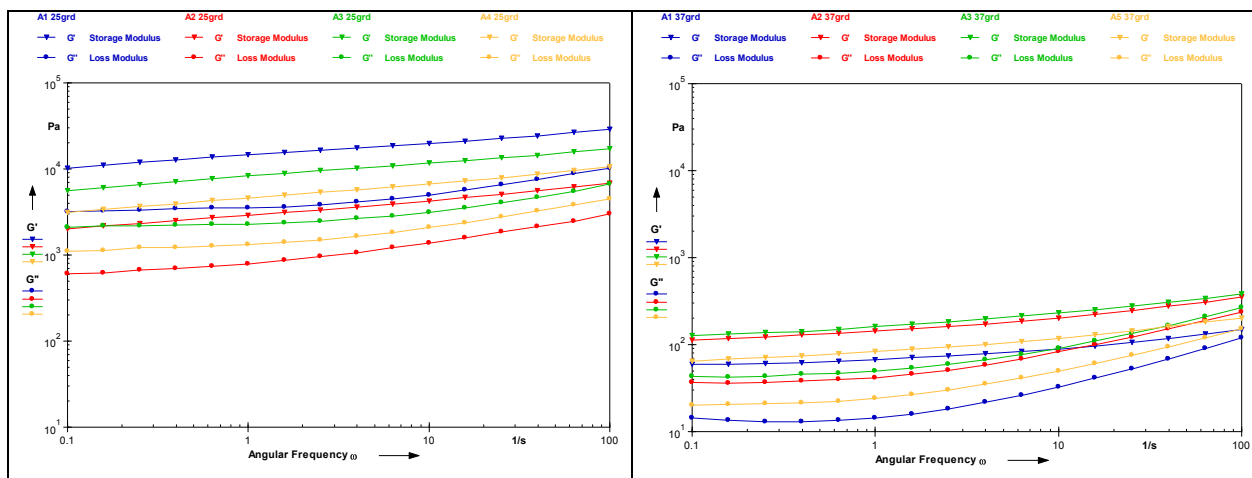
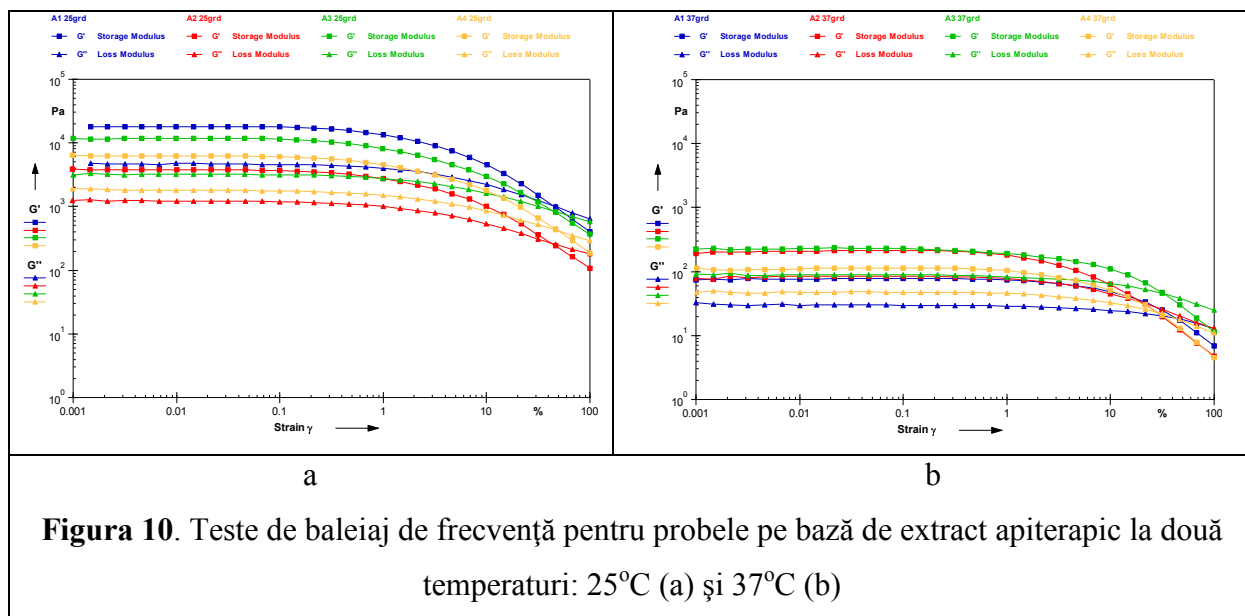
	Eupatorin	Eupatilin	Acacetin	Jaceosidin	Casticin	Hispidulin
Cod proba	Concentrație (μg/ml)					
PROPOLIS	0.00	0.00	613.60	820.98	0.00	393.02

6.2. Analiza reologică a unguentelor apiterapice

O caracteristică importantă a unei formulă utilizate ca unguent, fie în aplicații cosmetice fie în tratarea unor leziuni ale dermei, o constituie capacitatea de etalare pe suprafața pielii, dar și stabilitatea structurală. Informații despre aceste proprietăți pot fi obținute prin efectuarea de teste reologice. Au fost testate din acest punct de vedere 4 formulări, pregătite conform tehnicilor de lucru descrise anterior (capitolul 5). Pe lângă cele conținând extract de propolis (a cărei compoziție a fost prezentată în Tabelul 2, au mai fost testate cele conținând apilarnil, lăptișor de matcă și miere de albine.

Au fost efectuate ambele tipuri de teste reologice - oscilatorii și rotaționale. Reproducibilitatea rezultatelor s-a verificat prin efectuarea testelor reologice pe 3 erșantioane din fiecare unguent analizat. Primul test reologic oscilatoriu a fost cel de baleiaj de amplitudine pentru a se determina atât

limita domeniului vâscoelastic liniar, cât și pentru a estima stabilitatea structurală a unguentelor. Figura 6 permite constatări privind stabilitatea structurală a probelor în domeniul deformațiilor mici la două temperaturi. La temperatura de 25 °C probele prezintă o rigiditate mare și structura este mai sensibilă la deformații. La temperatura de 37°C, selectată pentru că reprezintă temperatura fiziologică, structura devine mai flexibilă și unguentele au un aspect mai catifelat și sunt mai ușor de etalat pe piele.



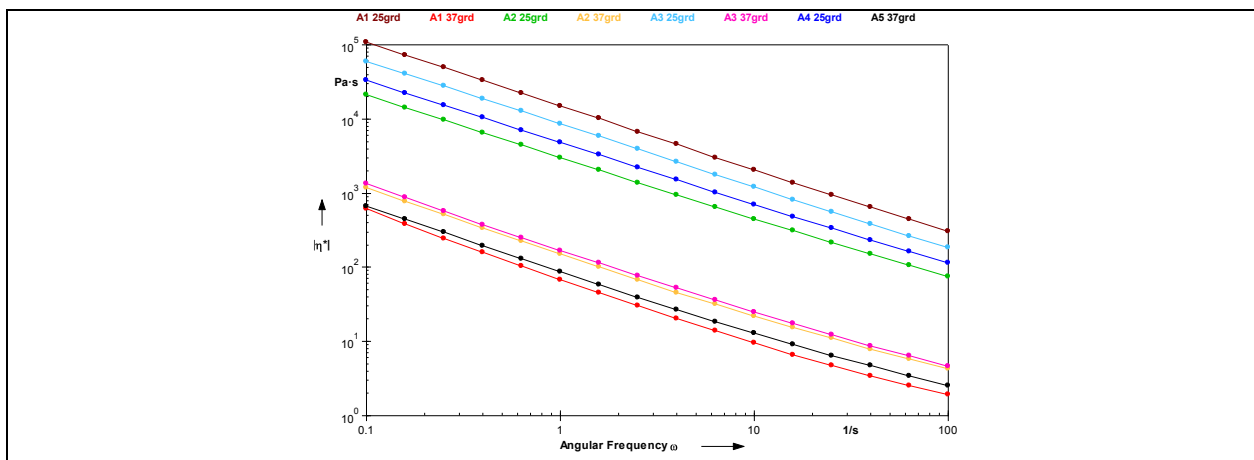


Figura 11. Teste de baleiaj de amplitudine pentru probe pe bază de extract apiterapic la două temperaturi: 25°C (a) și 37°C (b)

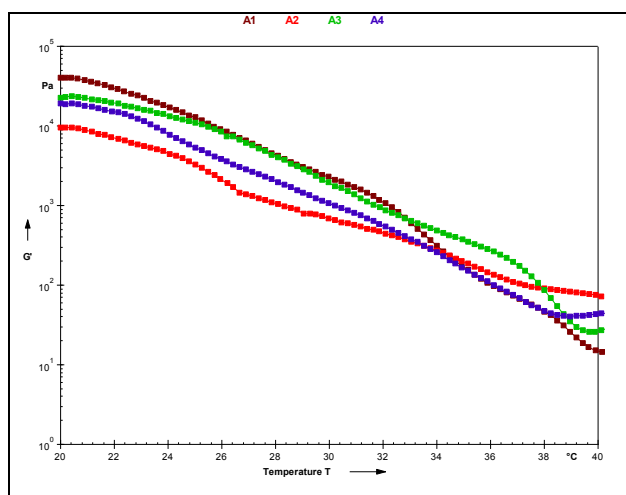


Figura 12. Testele reologice de temperatură pentru unguente pe bază de extract apiterapic

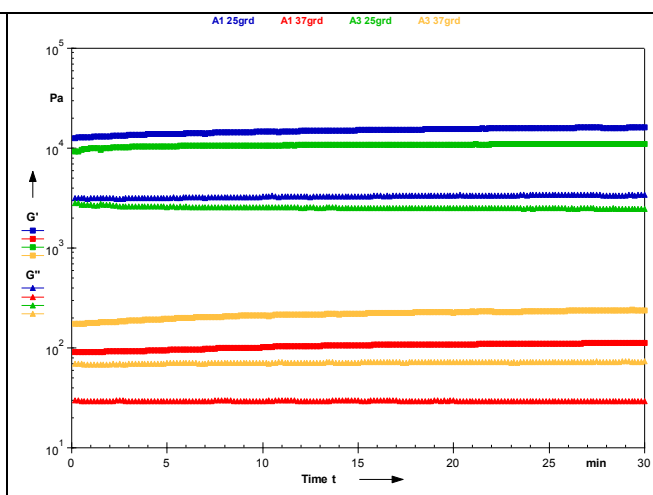


Figura 13. Testele reologice de timp pentru unguentele pe bază de extract apiterapic

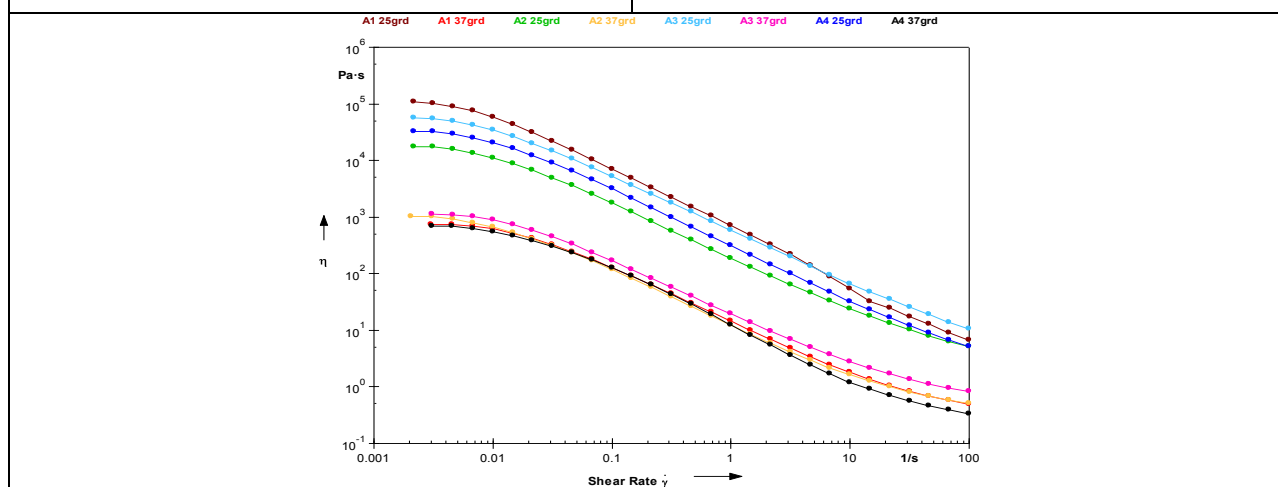


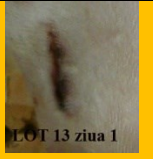
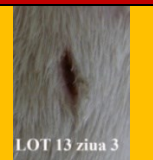
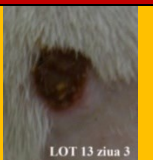
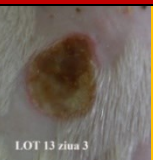
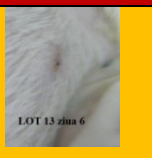
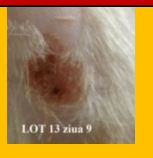
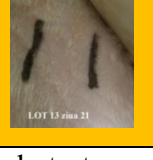
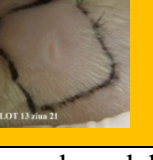
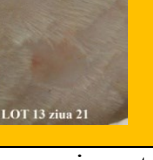
Figura 14. Curbele de curgere pentru unguentele pe bază de extract apiterapic

Probele analizate prezintă un comportament de tip solid la ambele temperaturi (Figura 10), stabilitate structurală și un grad bun de fluidizare ale unguentelor la temperatura fiziologică (Figura 11), stabilitate structurală la teste de temperatură (Figura 12), stabilitatea structurală (Figura 14). Valorile G' sunt mai mari decât cele G'' pe întreg domeniul de frecvențe, indicând caracterul pronunțat elastic al probei analizate. Această afirmație este susținută și de valoarea mică a raportului G''/G' , consolidând ideea că această probă are un caracter elastic pronunțat. Consistența este corelată direct cu valorile maxime și minime ale parametrilor reologici măsurați. În funcție de acești parametri se pot obține materiale cu calificative bune în ceea ce privește stabilitatea structurală și capacitatea de distribuire la nivelul pielii (Lukic *et al.*, 2012).

6.3. Evaluarea clinică, macroscopică a leziunilor cutanate

Dintre unguentele testate, prezentăm rezultatele obținute de unguentul pe bază de total produse apicole. Prima coloană corespunzând unei zile de testare se referă la leziuni de tip incizie, a doua se referă la leziuni de tip excizie și cea de a treia, la leziuni termice. Precizarea este valabilă pentru toate tabelele din prezentate în teză, corespunzătoare diferitelor tipuri de formulări testate.

Tabel 9. Rezultatele macroscopice ale testării unguentului apiterapic

0			1		
					
2			3		
					
6			9		
					
12			21		
					

Vindecarea clinică a avut loc după șase zile de tratament în cazul modelului experimental de **incizie**, unde urma de cicatrizare dermică este greu vizibilă. În cazul modelului experimental de **excizie**, procesul de vindecare s-a produs prin contracția leziunii, în ziua 9 de tratament,

înregistrându-se înhiderea completă a răni, cu debridarea unei mici cruste, punând în evidență o zonă de țesut cutanat nou format. Pentru **leziunea termică** s-a înregistrat debridarea crustei lezionale, cu evidențierea unui epiteliu de regenerare, calitativ atât din punct de vedere al elasticității cât și estetic, a fost înregistrată la ziua 12 de tratament.

6.4. Rata de contracție a plăgilor

Aria leziunilor a fost măsurată în zilele 0, 6 și 9, în ziua a 12-a nemaifiind posibilă calcularea deoarece leziunile prezentau deja o arie de reepitelizare. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 10 și sunt exprimate ca medie $\pm$ eroarea medie standard (SEM), în timp ce tabelul 11 prezintă rezultate privind valorile ratei de contracție a leziunii de tip excizie după 6 și 9 zile.

Tabel 10. Evoluția ariei leziunii de tip excizie pentru unguentelor pe bază de produse apicole

LOTURI		ARIA RĂNII (mm ²)			Aria de epitelizare
		ZIUA 0	ZIUA 6	ZIUA 9	ZIUA 12
1	Lot miere	64 (8x8)	20 (4x5)	4 (2x2)	1.5x2 mm
2	Lot propolis	64 (8x8)	16 (4x4)	1.5 (1x1.5)	1x1 mm
3	Lot lăptișor de matcă	64 (8x8)	25 (5x5)	9 (3x3)	2x2 mm
4	Lot apilarnil	64 (8x8)	25 (5x5)	9 (3x3)	2x2 mm
5	Lot total apiterapice	64 (8x8)	18 (4x4.5)	2 (1x2)	1x1.2 mm
6	Lot bază unguent	64 (8x8)	45,5 (6,5x7)	40,8 (6x6,8)	-
7	Lot netratat	64 (8x8)	61,6 (7,7x8)	56,25 (7,5x7,5)	-

Tabel 11. Valorile ratei de contracție a leziunii de tip excizie la ziua 6 și ziua 9

Loturi experimentale	WCR (%) (media $\pm$ deviația standard)	
	Ziua 6	Ziua 9
Lot martor	5,78 $\pm$ 1,86	14,85 $\pm$ 2,95
Lot baza unguent	26,74 $\pm$ 2,13*	33,79 $\pm$ 2,21*
Lot miere	69,38 $\pm$ 0,63	93,65 $\pm$ 0,28
Lot propolis	73,06 $\pm$ 1,36	97,97 $\pm$ 0,16
Lot lăptișor de matcă	62,23 $\pm$ 0,68	84,34 $\pm$ 0,80
Lot apilarnil	63,93 $\pm$ 2,26	84,69 $\pm$ 0,68
Lot total apiterapice	72,50 $\pm$ 0,36	96,54 $\pm$ 0,18

*p=0,0001(lot unguent pe bază de apiterapic raportat la lot martor și lot bază unguent)

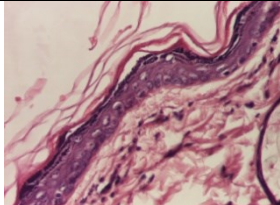
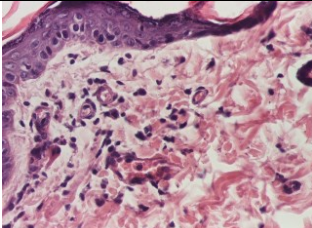
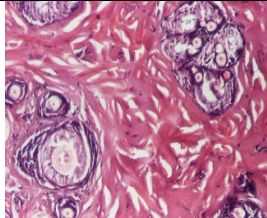
Tratamentul cu unguent cu **total produse apicole** prezintă efecte favorabile din a 6-a zi a experimentului, în comparație cu grupul tratat cu baza de unguent (72,50 $\pm$ 0,36 *versus*

26,74±1,23) și mai ales în comparație cu grupul martorului negativ (netratat) (72,50±0,36 *versus* 5,78±1,79). În ziua a 9-a de tratament, rezultatele sunt în mod evident pozitive, pentru grupul cu unguent *total apiterapice*, procentul de contracție a rănilor fiind de 96.54±0.18 *versus* 33,79±1,28 (contracția răni pentru grupul tratat cu baza de unguent) sau față de 14,85±1,7 pentru grupul netratat. În ziua a 12-a de tratament, procesul de reepitelizare a fost finalizat pentru modelul de excizie a răni, în ziua 21 epidermul reepitelizat fiind de 2 mm.

6.5. Rezultate de anatomie patologică

Rezultatele de anatomie patologică au fost analizate la zilele 1, 3, 6, 12 și 21 ale experimentului. Datorită spațiului limitat ne mărginim să prezentăm rezultatele obținute în prima zi a experimentului și în ultima zi a acestuia (Tabelele 12 și 18).

Tabel 12. Rezultate histologice la ziua 1 de testare a unguentelor apiterapice

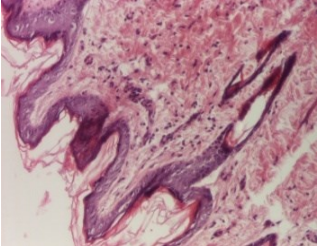
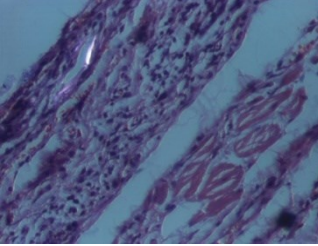
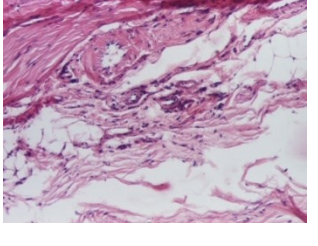
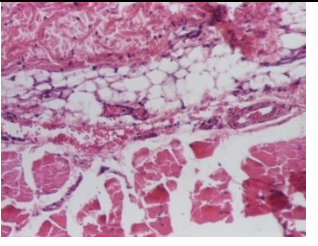
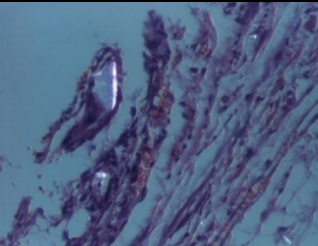
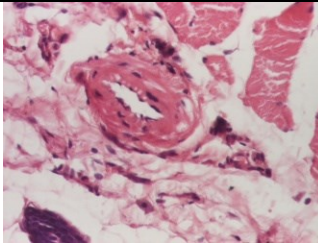
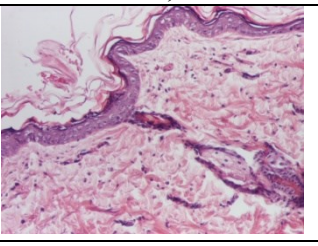
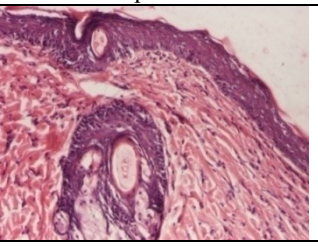
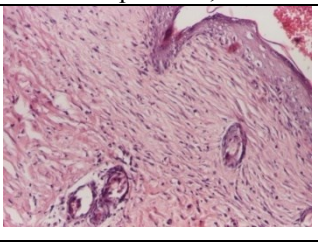
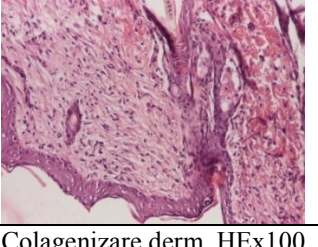
Ziua 1		
Incizie	Excizie	Arsură termică
		
Limfocite, epiderm și derm, HEx200	Edem ușor, limfocite perivascular, HEx200	Colagenizare dermică severă, HEx100

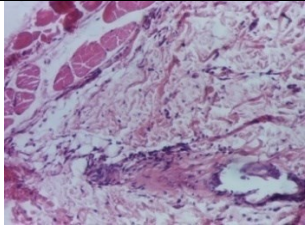
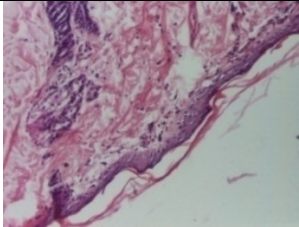
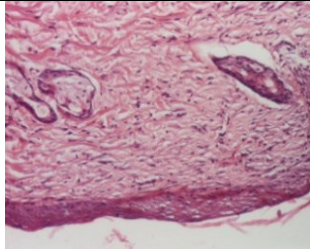
Cele trei modele, incizie, excizie și arsură termică, prezintă aspecte similare în ceea ce privește numărul limfocitelor (1-2/hpf), fibroblastelor, 2-3/hpf pentru excizie și 3-4/hpf pentru incizie și arsură termică, cu edem discret în derm. Fibroza este discretă în dermul superficial cu ușoară accentuare a membranei bazale (excizie), puțin mai accentuată în incizie și severă în arsura termică. Edemul dermic este discret în cele trei modele. Epidermul conține 1-2 straturi în excizie și incizie.

Pentru lotul tratat cu unguent pe bază de **total apiterapice**, în ziua 21 a experimentului, se constată colagenizare dermică și rare limfocite în jurul unor foliculi piloși de aspect normal pentru leziunea de tip incizie. Se observă rare limfocite în leziunea de tip excizie și colagenizare pentru leziunea de tip arsura termică. Unguentul ce include cele patru apiterapice testate, respectiv miere, propolis, lăptișor de matcă și apilarnil, asigură prezența sinergică a principiilor apiterapice cu efect cicatrizant și regenerativ celular și tisular.

Abrevierile utilizate în tabel au următoarele semnificații: lot control negativ (GCN), lot bază unguent (GBU); lot unguent cu *miere* (GTM); lot unguent cu *propolis* (GTP); lot unguent cu *apilarnil* (GTA); lot tratat cu un unguent *cu total produse apiterapice* (GTA).

Tabel 18. Rezultate histologice la ziua 21 de testare a unguentelor apiterapice

Loturi	Modele experimentale		
	Incizie	Excizie	Arsură termică
GCN			
	Edem și infiltrat inflamator, HEx100	Inflamație în stratul muscular, detaliu cu polarizare, HEx200	Limfocite în hipoderm, HEx100
GBU			
	Hipoderm cu infiltrat inflamator, HEx100	Infiltrat inflamator în hipoderm, detaliu cu polarizare HEx200	Vas cu perete îngroșat, limfocite prezente, HEx200
Miere GM			
	Derm cu discret edem, HEx100	Colagenizare dermică, HEx100	Colagenizare dermică importantă, HEx100
Propolis GP			
	Colagenizare derm, HEx100	Colagenizare dermică importantă, HEx100	Colagenizare dermică importantă, HEx100
Apilarnil GA			
	Anexe cutanate, HEx100	Colagenizare dermică și infiltrat inflamator asociat, HEx100	

GTA Total api			
	Folicul pilos, cu rare limfocite, HEx100	Rare limfocite, HEx100	Colagenizare dermică importantă, HEx200

Datorită complexității pricipiilor active, prezente în preparatul testat, timpul de vindecare după folosirea unguentului apiterapic realizat este mai scurt decât cel prezentat în studiile publicate (Hafezi, *et al.*, 2010; Csupor *et al.*, 2010; Akkol *et al.*, 2011).

Ceea ce este nou în acest experiment a fost faptul că nu s-a practicat excizarea zonei arse, cum este prezentat modelul în studiile de literatură, deoarece în acest fel am fi avut pentru tratament tot o leziune de tip excizie. Mai mult, ideea a fost de a menține tegumentul ars, ca un pansament protector, realizându-se puncții bioptice perilezional. Edemul perilezional, evident clinic în primele zile ale tratamentului, părea descurajant pentru noua idee de tratament. Însă s-au întâmplat două lucruri îmbucurătoare: în primul rând prin puncția bioptică s-a produs drenajul și, în al doilea rând infiltrarea unguentului perilezional, unde dealtfel era nevoie de tratament. Țesutul lezat prin arsură a servit drept mediu protector dar a fost menținut umed și hrănit prin aplicarea unguentelor de testare. Procesul de vindecare s-a produs perilezional conducând în cele din urmă la împingerea crustei de arsură pe măsura evoluției procesului de vindecare.

Este demonstrat că aplicarea topică de miere conduce la eradicarea rapidă a infecțiilor bacteriene, reduce utilizarea antibioticelor și de asemenea, reduce perioada de spitalizare, scurtând perioada de vindecarea rănilor, rezultatul fiind o cicatrice minimă, lucru observat la pacientele cu infecții postoperatorii ale leziunilor rezultate în urma operațiilor de cezariană sau histerectomii (Al-Waili și Saloom, 1999).

De asemenea a fost evidențiată acțiunea pozitivă a lăptișorului de matcă aplicat local asupra vitezei de cicatrizare a plăgilor cauzate de arsuri și a rănilor superficiale, precum și în tratamentul unor boli de piele (Piana, 1989), putem afirma că lăptișorul de matcă, chiar dacă este mai mult utilizat în preparatele de îngrijire corporală, acesta ar putea intra cu succes în noi formulări ce vizează tratamentul leziunilor cutanate.

Un alt compus care a condus către vindecarea nevicioasă a țesutului cutanat este CAPE (esterul fenetic al acidului cafeic) (Serarslan *et al.*, 2007). Dezvoltarea rapidă a epiteliului de regenerare fost pusă în evidență histopatologic.

CAPITOLUL 7

CARACTERIZAREA ȘI TESTAREA UNOR UNGUENTE FITOTERAPICE LA NIVELUL ȚESUTULUI CUTANAT

7.1. Studiul histo-anatomic al materialelor vegetale

În vederea evaluării calității materialului vegetal recoltat, a fost realizat studiul histo-anatomic pentru organele vegetale (tulpină, frunze sau fructe).

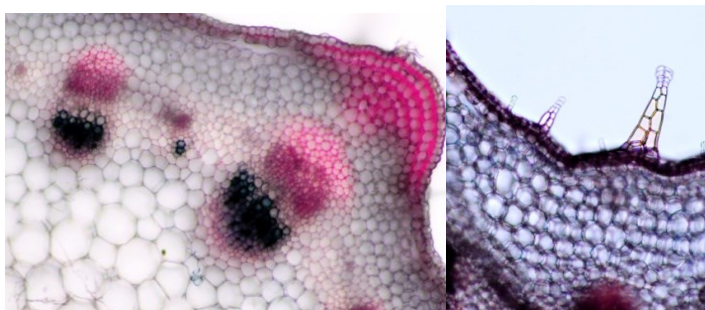


Figura. 15 Tulpina de *Calendula officinalis*: secțiune transversală

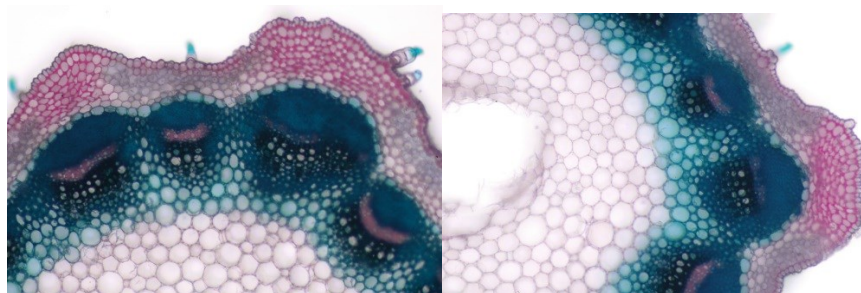


Figura 16. Tulpina de *Achillea millefolium*: secțiune transversală

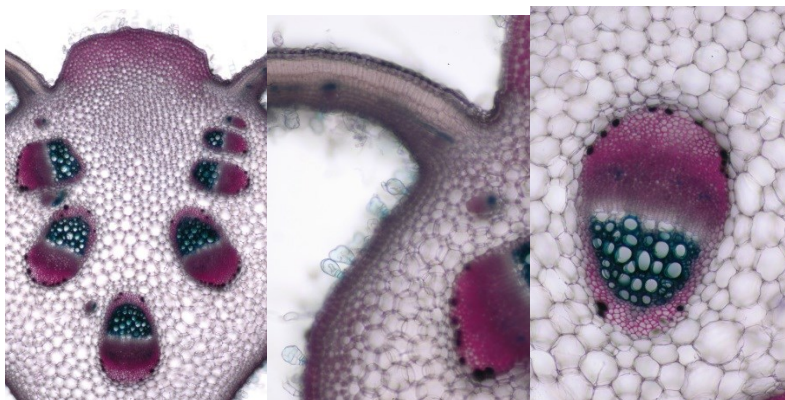


Figura 17. Frunza de *Arctium lappa*: secțiune transversală

7.2. Compoziția calitativă și cantitativă în polifenoli a extractului fitoterapic

Un număr mare de studii leagă efectul terapeutic al speciilor vegetale de conținutul în polifenoli. În cadrul prezentei cercetări, cantitatea de polifenoli totali determinată a variat între $22,76 \pm 0,33$ mg

acid galic/g extract pentru *Calendula officinalis* și $63,99 \pm 0,31$ mg acid galic/g extract pentru extractul de *Achillea millefolium*, după cum relevă Figura 18.

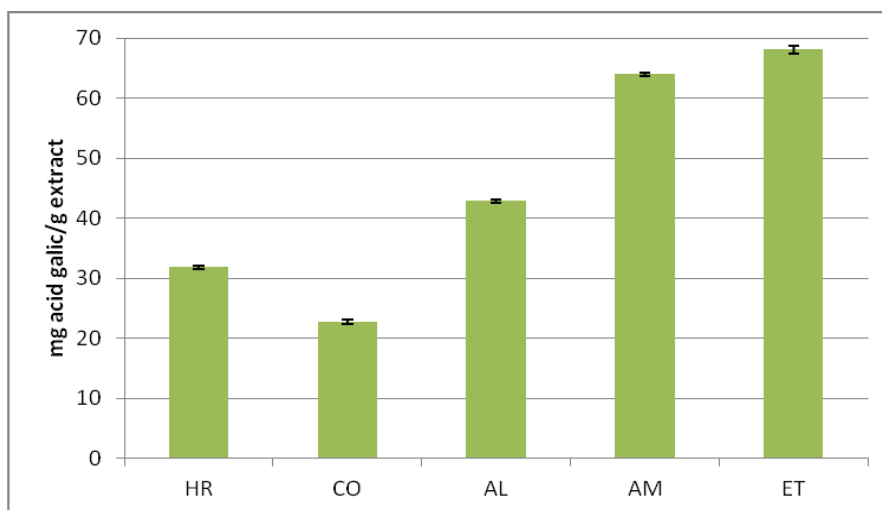


Figura 18. Conținutul în polifenoli totali al extractelor vegetale (CO- *Calendula officinalis*, HR-*Hippophaë rhamnoides*, AL-*Arctium lappa*, AM-*Achillea millefolium*, ET – total plante)

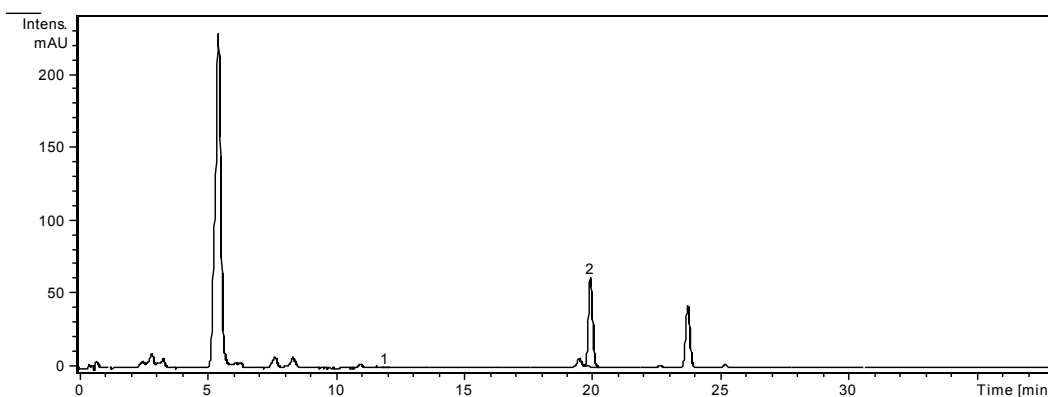


Figura 19. Cromatograma HPLC a extractului de *Arctium lappa* (1- acid ferulic, 2-rutoside)

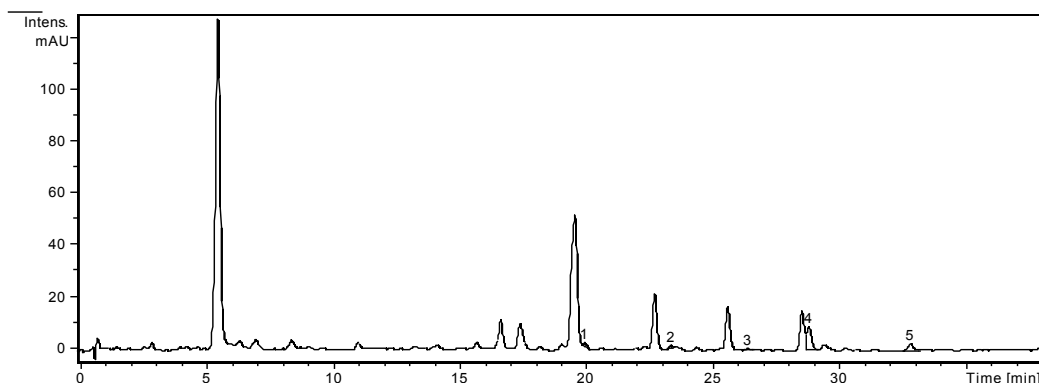


Figura 20. Cromatograma HPLC a extractului de *Achillea millefolium* (1-rutoside, 2-quercitrin, 3-quercetin, 4-luteolin, 5-apigenin)

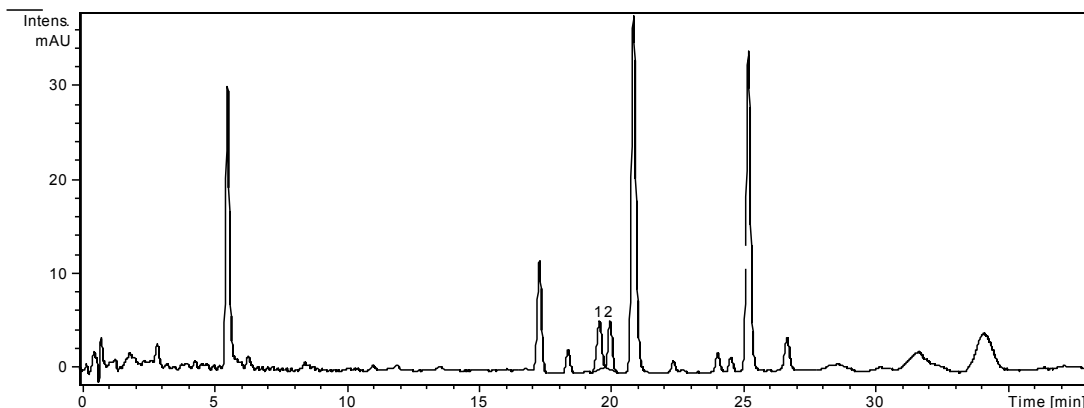


Figura 21. Cromatograma HPLC a extractului de *Calendula officinalis* (1-isoquercitrin, 2-rutoside)

Datele din literatura de specialitate menționează valori diferite pentru conținutul în polifenoli al extractelor vegetale. Analiza calitativă și cantitativă a extractelor a fost efectuată prin HPLC, cromatogramele obținute evidențiind tipurile de polifenoli (Figurile 19 – 21), iar Tabelele 20, 21 prezentând concentrațiile acestora.

Tabel 19. Identificarea polifenolilor în extractele vegetale

Polyphenols	<i>Arctium lappa</i>			<i>Achillea millefolium</i>			<i>Calendula officinalis</i>		
	U V	MS	Conc. μg/mL	UV	MS	Conc. μg/mL	UV	MS	Conc. μg/mL
Gentisic acid	-	*							
Caffeic acid			0.74			1.63			1.74
Chlorogenic acid	-	*	339.06		*	238.57		*	46.35
p-coumaric acid							-	*	-
Ferulic acid	*	*	0.153						
Hyperoside				-	*	-			
Isoquercitrin				-	*	-	*	*	9.905
Rutoside	*	*	99.279	*	*	1.599	*	*	7.983
Quercitrin				*	*	1.487	-	*	-
Quercetin				*	*	0.394			
Luteolin				*	*	7.796			
Apigenin				*	*	3.226			

* determinare UV

** determinare calitativă MS

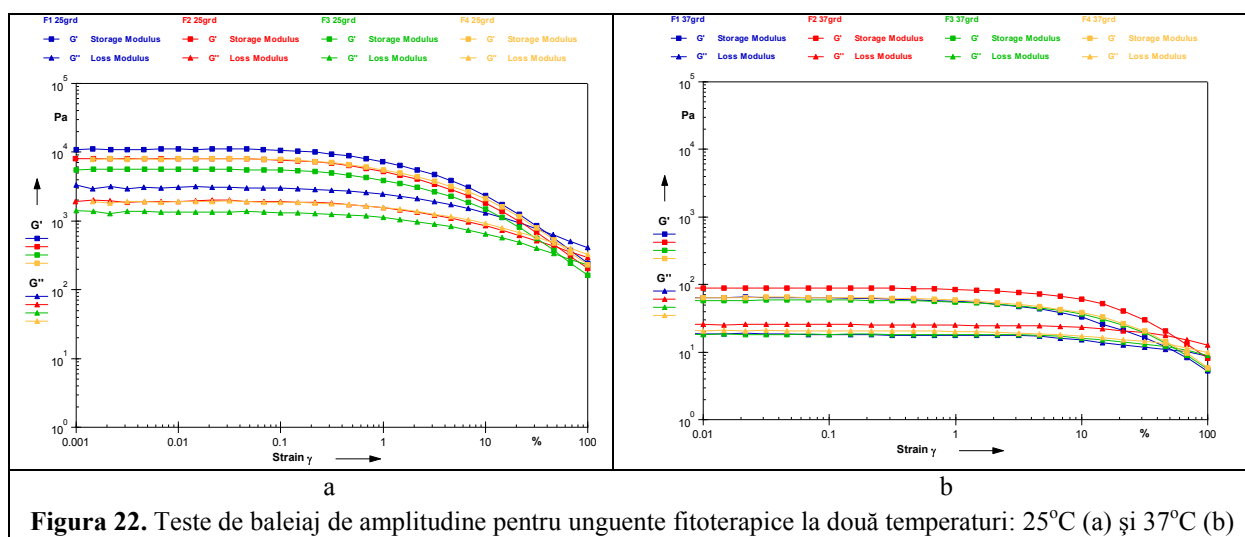
Tabel 20. Concentrația sterolilor în extractele vegetale

Sterols (μg/mL)	<i>Arctium lappa</i>	<i>Achillea millefolium</i>	<i>Calendula officinalis</i>
Stigmasterol	-	1,036	1,584
Beta-sitosterol	1,139	7,700	3,264
Campesterol		0,3121	0,116
Brassicasterol	-	0,166	-

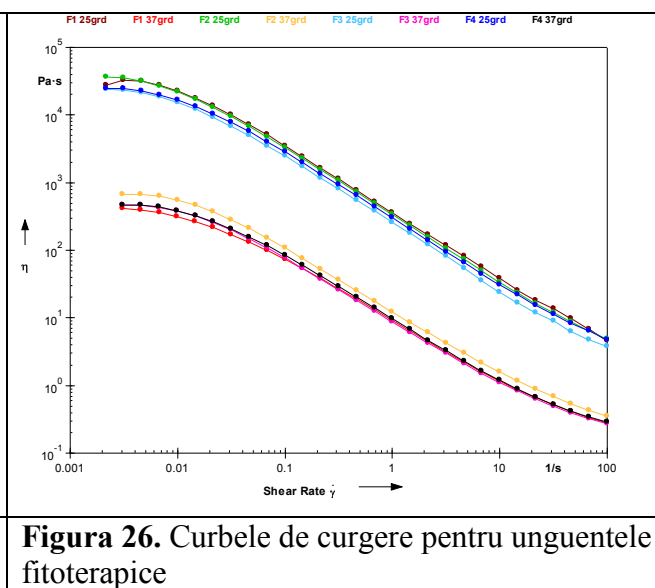
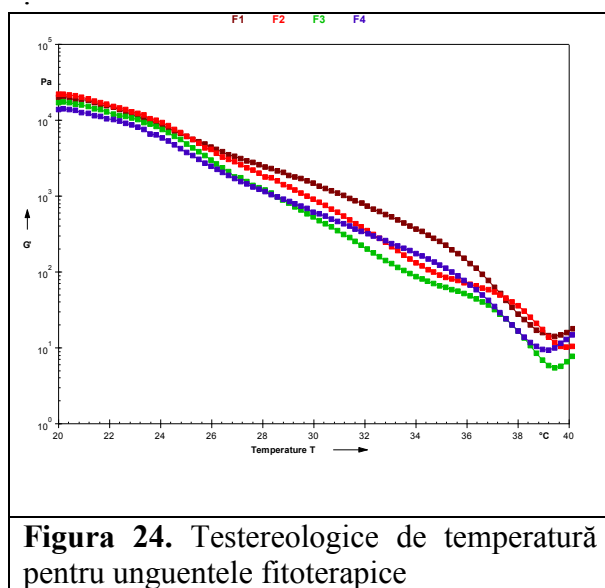
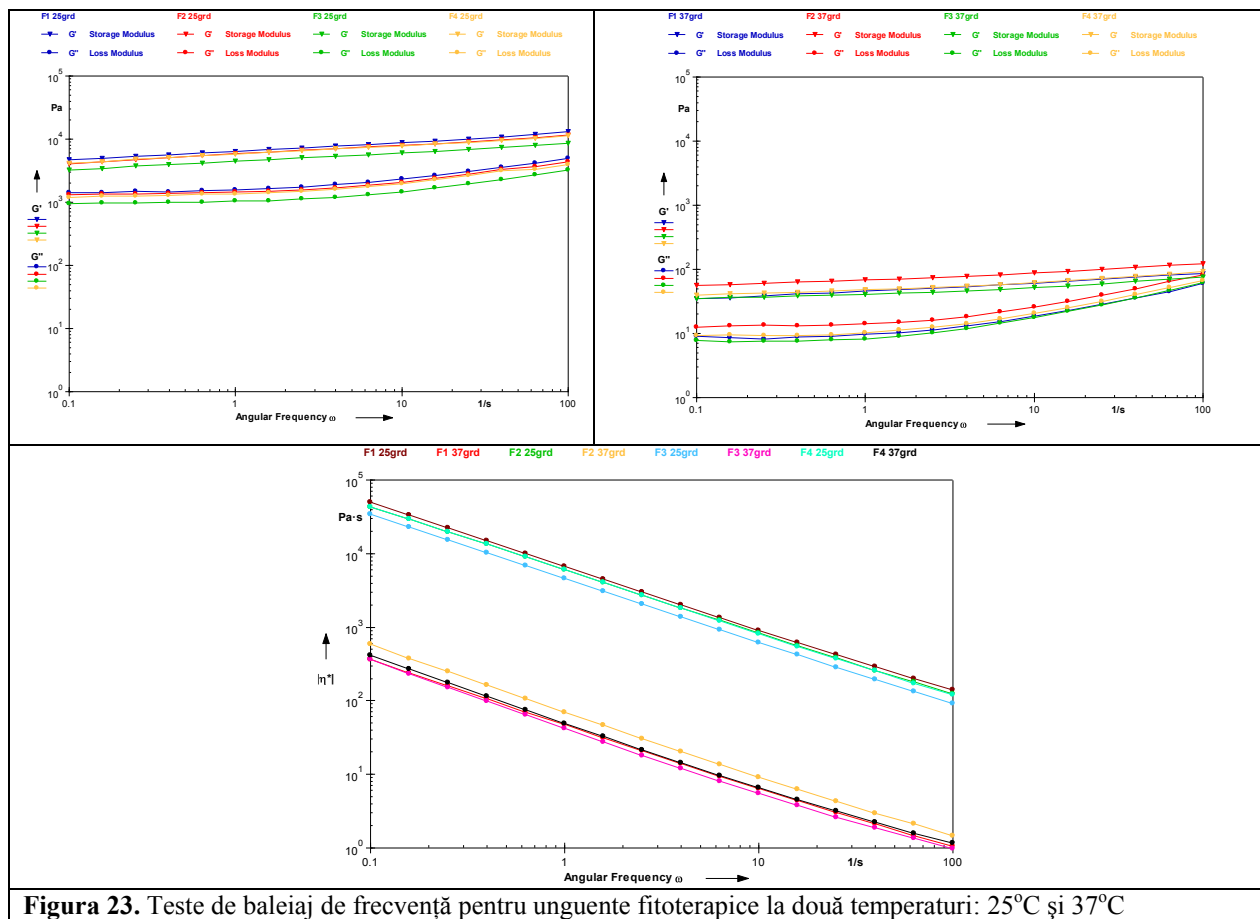
Rezultatele obținute indică prezența acidului cafeic, clorogenic și rutozidului în toate probele analizate (Tabel 19). Extractul de coada șoricelului se remarcă prin identificarea a 7 polifenoli, acidul clorogenic fiind în cantitatea cea mai mare (238,57 $\mu\text{g/ml}$). Analiza flavonelor polimetoxilate, a permis identificarea lor doar în extractul de *Achillea millefolium*, și anume: acacetin (107,12 ng/ml), casticin (63,56 ng/mL) și hispidulin (877,78 ng/mL). Din analiza datelor se observă că sterolul dominant în cele trei extracte vegetale este beta-sitosterolul (tabel 20). În extractul de *Achillea millefolium* au mai fost identificați și stigmasterolul, campesterolul și brassicasterolul, în timp ce în extractul de *Calendula officinalis* s-au determinat cantitativ stigmasterolul și campesterolul.

7.3. Studiul reologic al unguentelor fitoterapice.

În scopul obținerii de informații privind stabilitatea structurală și caracteristicile de etalare, noile formulări au fost supuse testelor reologice (Figurile 22-25).



Stabilitatea structurală și gradul de fluidizare ale unguentelor la temperatura fiziologică (37 °C) au fost evidențiate cu ajutorul testelor reologice de temperatură care s-au realizat la o frecvență constantă ($\omega = 10 \text{ rad/s}$) și o amplitudine constantă în domeniul vâscoelastic liniar. Testele reologice de timp realizate la ambele temperaturi (25°C și 37°C), la o frecvență constantă ($\omega = 10 \text{ rad/s}$) și amplitudine constantă în limita domeniului vâscoelastic liniar, au evidențiat stabilitatea structurală în timp a unguentelor analizate.



Testele rotaționale s-au realizat în domeniul vitezelor de forfecare de $0,001 \div 100 \text{ s}^{-1}$. Valorile mari ale vâscozității la forfecare zero calculate cu modelul Carreau-Yasuda din curbele de curgere evidențiază, o dată în plus, stabilitatea structurală a probelor analizate.

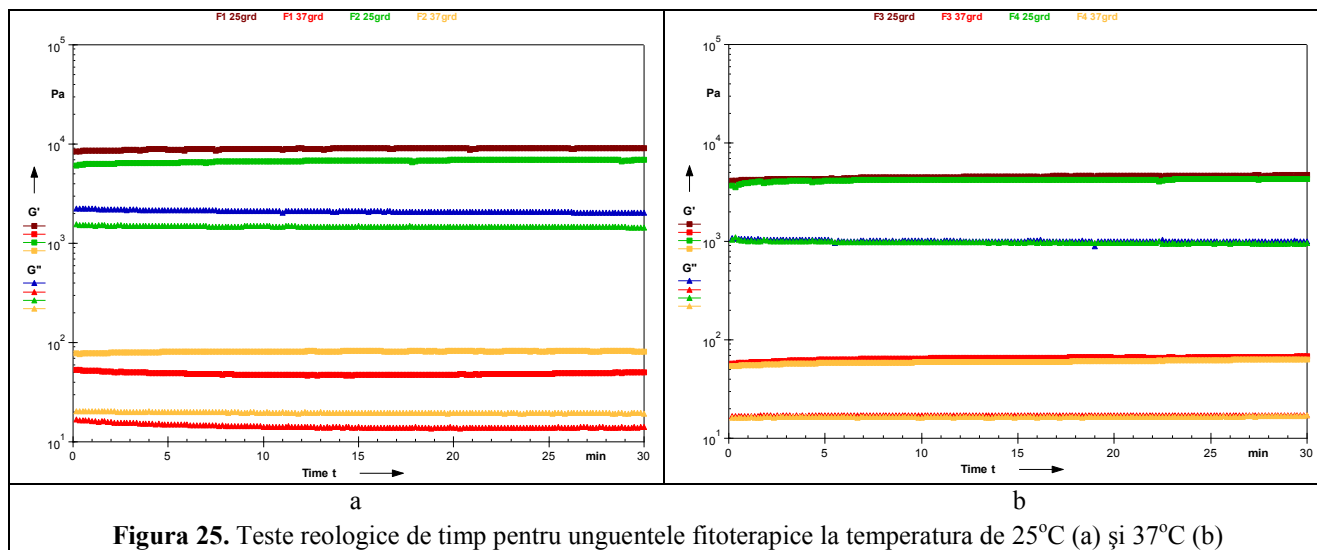


Figura 25. Teste reologice de timp pentru unguentele fitoterapice la temperatura de 25°C (a) și 37°C (b)

7.4. Rezultatele clinice și macroscopice.

Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 26.

Tabel 26. Rezultate macroscopice ale testării unguentului extract total plante



7.5. Perioada de reepitelizare

Reepitelizarea, pentru leziunea de tip excizie a fost observată în ziua a 12-a de tratament pentru toate unguentele testate, ceea ce reprezintă un rezultat superior comparativ cu lotul bază

de unguent (ziua 18 a experimentului), sau cu grupul de control negativ (ziua 21) (Tabelul 27). Aria de reepitelizare pentru unguentele utilizate fiind diferite, cel mai bun rezultat fiind înregistrat pentru lotul tratat cu unguent pe bază de brusture (1x2 mm) și total fitoterapice (1x2 mm).

Abrevierile utilizate în tabel au următoarele semnificații: lot I control negativ (CN), lot II bază unguent (BU), lot III tratat cu unguent de *Hippophaë rhamnoides* (cătină) (HR); lot IV tratat cu unguent de *Calendula officinale* (gălbenele) (CO); lot V tratat cu unguent de, *Arctium lappa* (brusture) (AL); lot VI tratat cu unguent de *Achillea millefolium* (coada șoricelului) (AM); lot VII tratat cu unguent pe bază de extract total de plante (ET).

Aria leziunilor a fost măsurată în zilele 0, 6 și 9. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 27 și sunt exprimate ca valoare medie $\pm$ eroarea medie standard (SEM).

Tabel 27. Aria leziunii, aria de reepitelizare pentru leziunea de tip excizie a loturilor tratate cu unguente pe bază de produse vegetale

LOTURI	Aria răni (mm ²)			Aria de reepitelizare (mm)
	ZIUA 0	ZIUA 6	ZIUA 9	ZIUA 12
Lot HR	64 (8x8)	36 (6x6)	7.5 (2.5x3)	2x2.5
Lot CO	64 (8x8)	28 (4x7)	5 (2x2.5)	1.5x2
Lot AL	64 (8x8)	15 (3x5)	3.4 (1.7x2)	1x2 mm
Lot AM	64 (8x8)	32.5 (5x6.5)	7,5 (2.5x3)	2x3 mm
Lot ET	64 (8x8)	20.25 (4.5x4.5)	4 (1.8x2)	1x2 mm
Lot BU	64 (8x8)	45,5 (6,5x7)	40,8 (6x6,8)	-
Lot CN	64 (8x8)	61,6 (7,7x8)	56,25 (7,5x7,5)	-

*p=0,0001(lot unguent pe bază de fitoterapic raportat la lot martor și lot bază unguent)

7.6. Rata de contracție a plăgilor (tratate cu unguente pe bază de produse vegetale)

Tabel 28. Contracția răni pentru leziunea de tip excizie

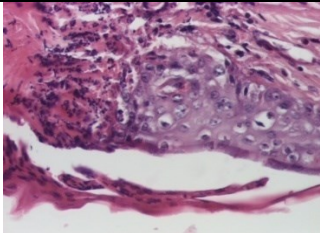
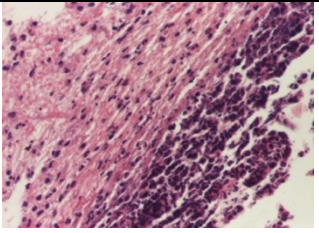
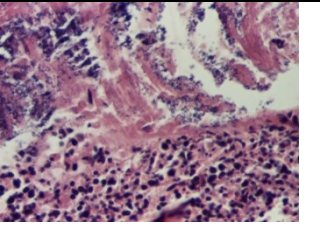
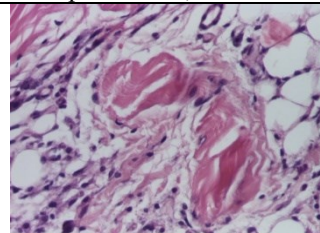
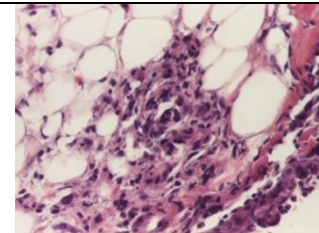
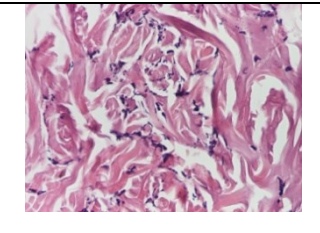
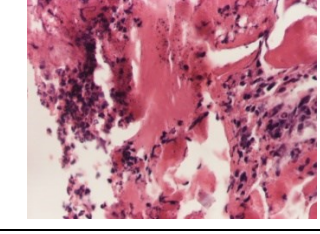
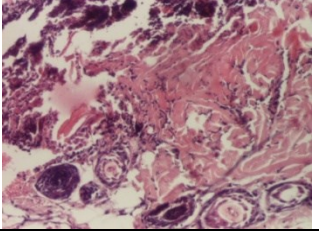
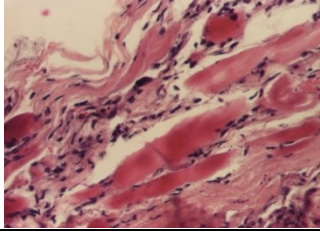
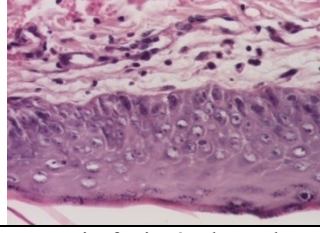
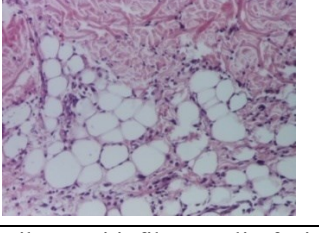
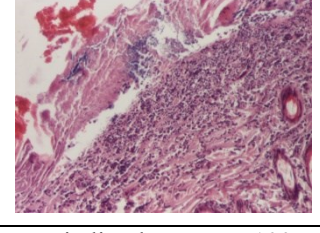
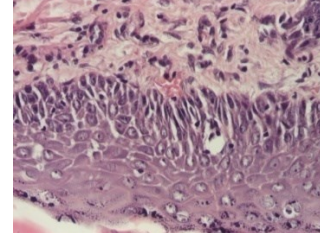
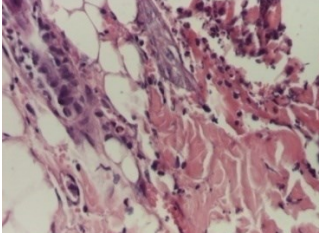
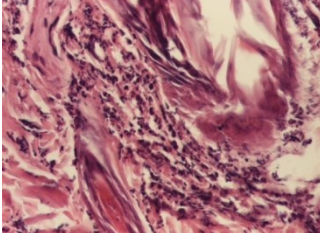
LOTURI	WCR (%) (media $\pm$ deviația standard)	
	Ziua 6	Ziua 9
Lot HR	69,38 $\pm$ 0,83	88,22 $\pm$ 0,50
Lot CO	57,29 $\pm$ 1,80*	92,70 $\pm$ 0,47*
Lot AL	77,66 $\pm$ 0,68	94,29 $\pm$ 0,26
Lot AM	51,30 $\pm$ 1,14	87,50 $\pm$ 0,41
Lot ET	68,82 $\pm$ 1,44	94,95 $\pm$ 0,43
Lot BU	26,74 $\pm$ 2,13*	33,79 $\pm$ 2,21 *
Lot CN	5,78 $\pm$ 1,86	14,85 $\pm$ 2,95

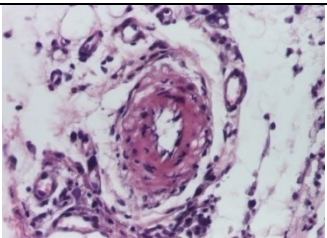
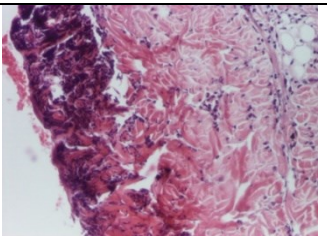
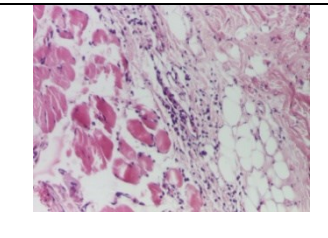
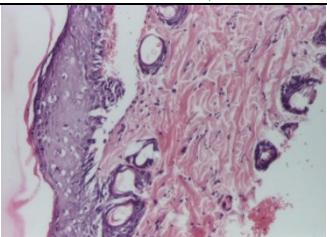
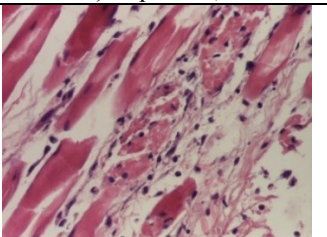
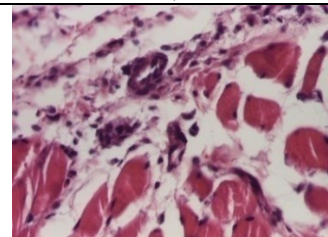
În final, lotul tratat cu total fitoterapice se situează pe primul loc în ceea ce privește contracția, ceea ce justifică afirmarea efectelor sinergice ale plantelor utilizate.

7.7. Rezultate de anatomie patologică

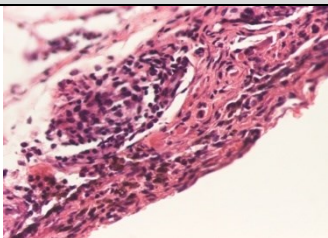
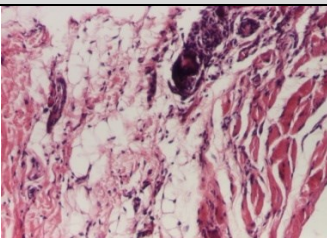
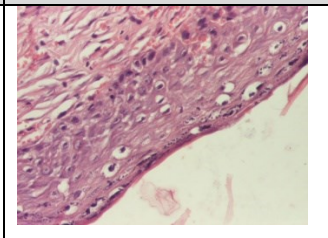
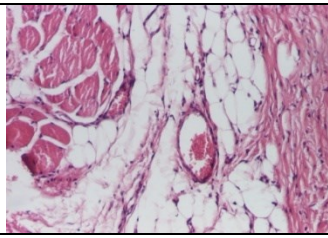
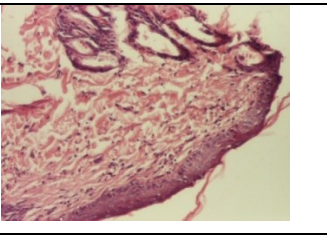
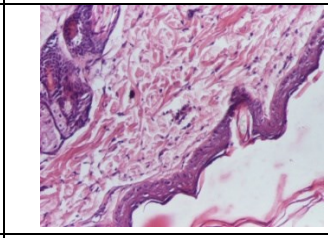
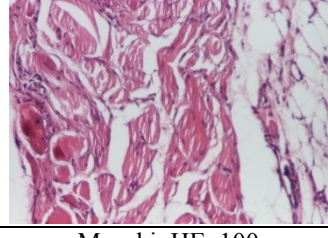
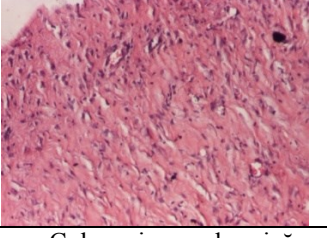
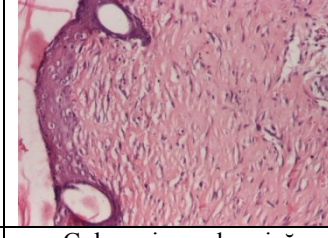
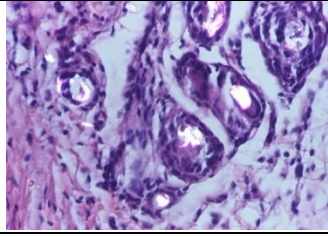
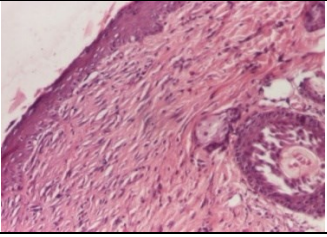
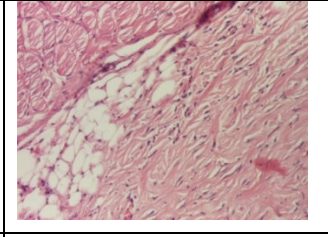
Tabelele 30 și 33 prezintă rezultatele analizei histologice.

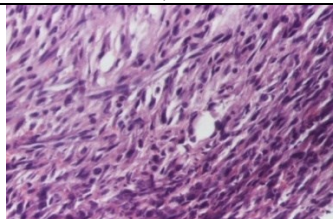
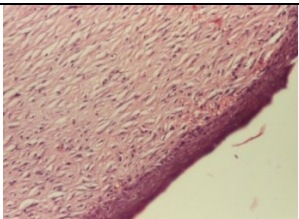
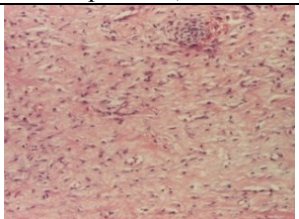
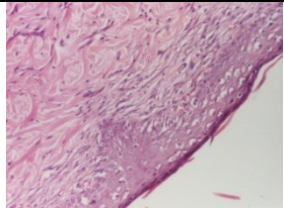
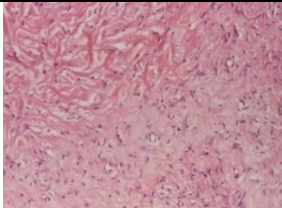
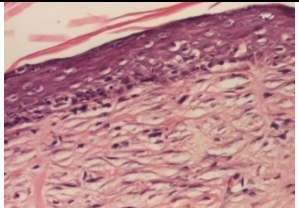
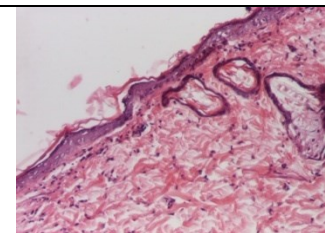
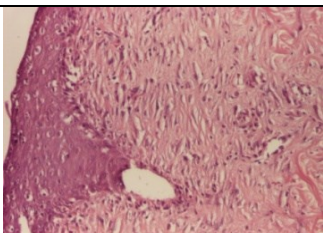
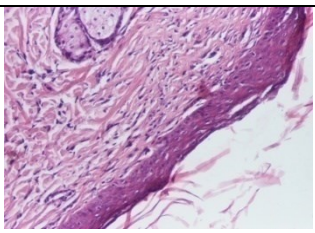
Tabel 30. Rezultate histologice la ziua a 3-a de testare a unguentelor fitoterapice

Loturi	Modele experimentale		
	Incizie	Excizie	Arsură termică
GCN			
	Abces cu ulcerarea epidermului, HEx200	Exudat purulent, HEx200	Ulceratie și colonii bacteriene HEx400
GBU			
	Infiltrat inflamator, HEx200	Inflamație, HEx200	Edem dermic, HEx200
GTC Cătină			
	Limfocite perivascular, intramuscular, HEx200	Numeroase limfocite, PMN, HE x100	Infiltrat inflamator în stratul muscular, HEx200
GTG Gălbenele			
	Limfocite în dermul superficial, HEx200	Fibroză și infiltrat cu limfocite, HEx100	Epiteliu ulcerat HEx100
GTB Brusture			
	Congestie vasculară și limfocite, HEx200	Infiltrat inflamator în hipoderm, HEx200	Infiltrat inflamator perianexial, HEx200

GTCS Coadă șoricelului			
	Infiltrat inflamator, HEx200	Ulcerare epiderm, HEx100	Limfocite, HEx100
GT ETP			
	Infiltrat limfocitar, HEx100	Miozită, HEx200	Limfocite, HEx200

Tabel 33. Rezultate histologice la ziua 21 a testării unguentelor fitoterapice

Loturi	Modele experimentale		
	Incizie	Excizie	Arsură termică
GCN			
	Bogat infiltrat inflamator, HEx200	Edem dermic, HEx100	Degenerescență vacuolară, HEx200
GBU			
	Congestie vasculară, HEx100	Ușor edem, HEx100	Limfocite, HEx100
GTC Cătină			
	Mușchi, HEx100	Colagenizarea dermică, HEx100	Colagenizare dermică, HEx100
GTG Gălbenele			
	Infiltrat moderat,colagenizare	Colagenizare dermică, HEx100	Colagenizare dermică

	dermică, HEx200		importantă, HEx100
GTB Brusture			
	Țesut de granulație matur, HEx200	Țesut de granulație matur, HE x100	Țesut de granulație matur, HEx 100
GTCS Coadă șoricelului			
	Colagenizare dermică, HEx100	Colagenizare dermică, HEx100	Colagenizare dermică, HEx200
GTTP Total plante			
	Limfocite, HEx100	Colagenizare dermică, Hex100	Colagenizare dermică, HEx100

Studiile asupra efectului uleiului de **cătină** atestă eficiența sa în tratamentul rănilor (Ito *et al.*, 2014). A fost observat efectul antiinflamator (Nand *et al.*, 2012; Parente *et al.*, 2012; Tanideh *et al.*, 2013), antiinfecțios (Efstratiou *et al.*, 2012), colagenizant (Naeini *et al.*, 2012) a unguentului de **gălbenele** (Faria *et al.*, 2011; Okuma *et al.*, 2015).

În ceea ce privește lotul tratat cu unguent pe bază de **total extracte vegetale**, în leziunea de tip incizie, dermul e reprezentat de un țesut de granulație matur ce prinde mai mult de 2/3 din grosimea sa. În leziunea de tip excizie, 1/3 din grosimea dermului (derm superficial) este reprezentat de țesut de granulație matur. Dermul mijlociu (1/3), prezintă aspecte de colagenizare iar derm profund (1/3) prezintă fibroză marcată (+++). Hipodermul prezintă inflamație minimă, congestie și este redus în dimensiune (atrofiat, retractat). Rezultatele evidențiate în experimentul de tip arsură termică sunt similare cu rezultatele evidențiate în leziunea de tip incizie. Epidermul în cele trei modele este de aspect cvasinormal, cu zone rectilinii atrofice.

CAPITOLUL 8

OBȚINEREA, CARACTERIZAREA ȘI TESTAREA UNOR UNGUENTE PE BAZĂ DE POLIMERI CU ACTIVITATE BIOLOGICĂ LA NIVELUL ȚESUTULUI CUTANAT

Unul dintre obiectivele tezei de doctorat l-a constituit obținerea de noi formulări, de această dată doar pe bază de polimeri naturali – proteine și polizaharide. Aceștia au fost ulterior utilizați și pentru obținerea de hidrogeluri sau filme capabile să includă principiile fito- și apiterapice a căror eficacitate în tratarea unor afecțiuni ale dermei constituie obiectul cercetării în prezenta lucrare.

8.1. Caracterizarea reologică a unguentelor cu polimeri

Din Figura 27 se pot trage concluzii privind stabilitatea structurală a probelor în domeniul deformațiilor mici, la două temperaturi. La temperatura de 25 °C probele prezintă o rigiditate mare și structura este mai sensibilă la deformații. Cu creșterea temperaturii, structura devine mai flexibilă, unguentele având un aspect mai catifelat și o etalare mai bună pe piele.

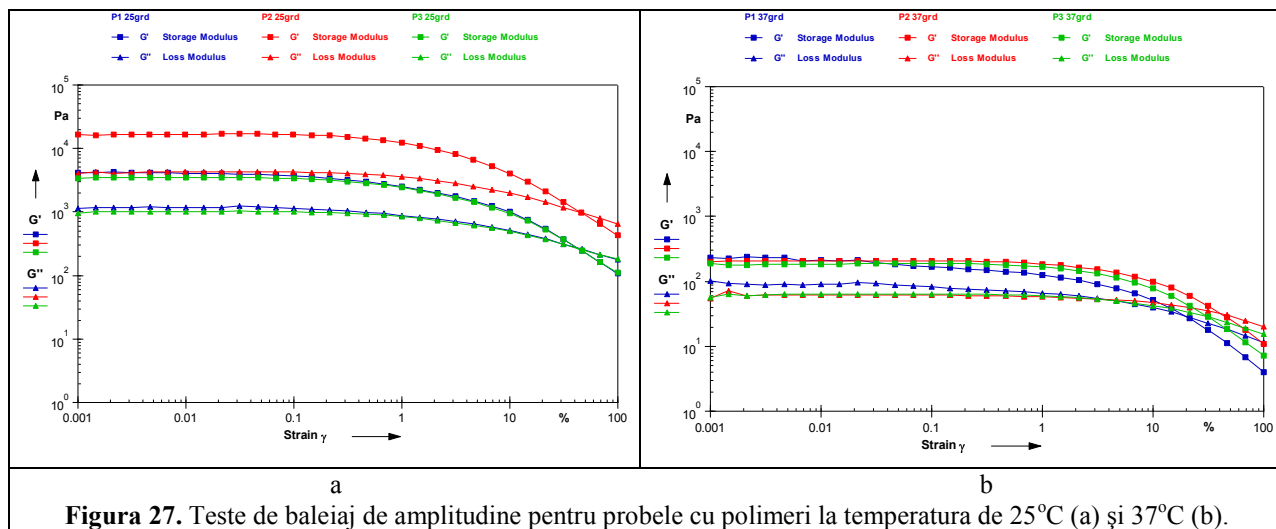


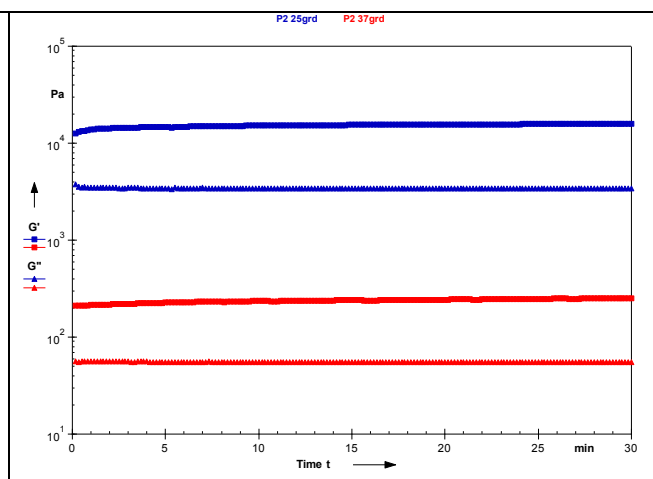
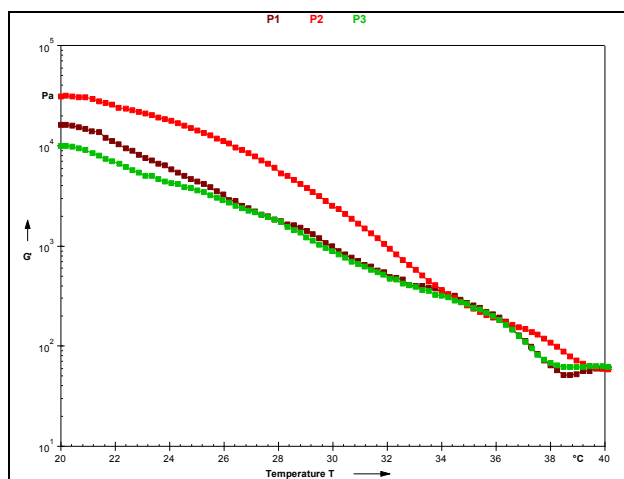
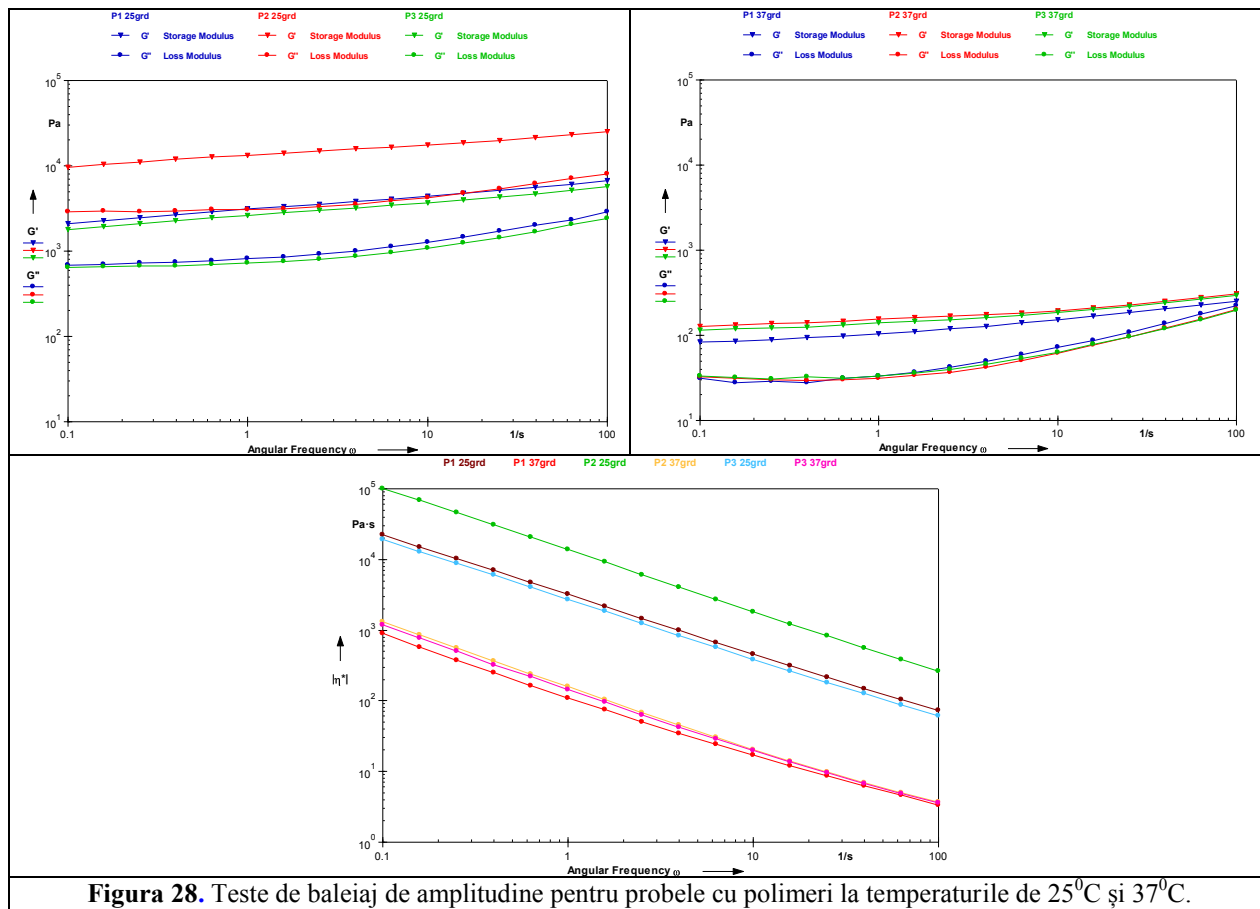
Figura 27. Teste de baleiaj de amplitudine pentru probele cu polimeri la temperatura de 25°C (a) și 37°C (b).

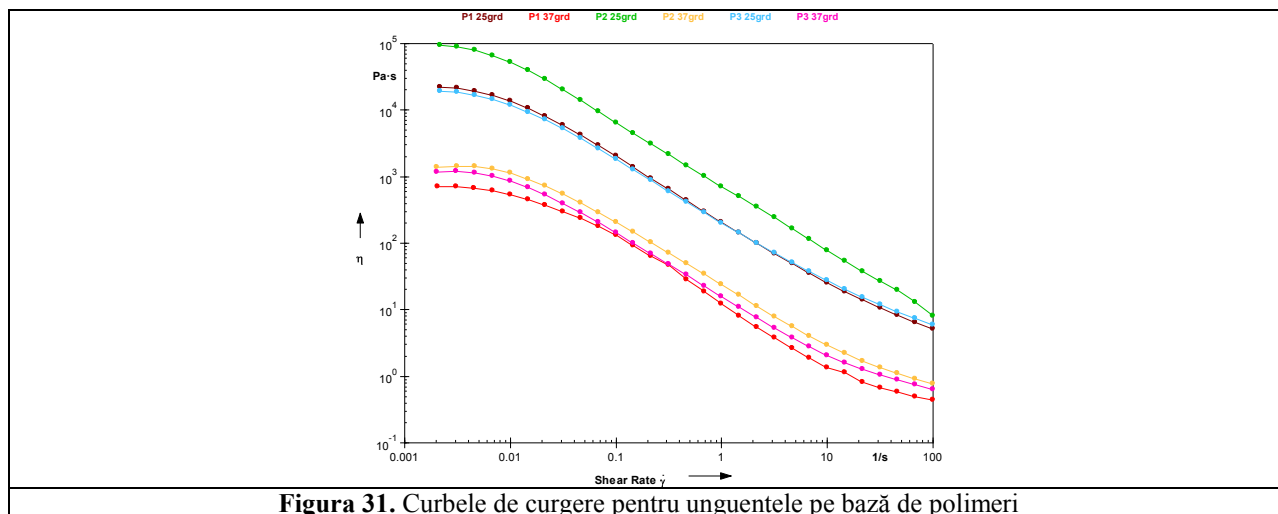
În cazul testelor de baleiaj de frecvență, se constată că valorile G' sunt mai mari decât cele G'' pe întreg domeniul de frecvențe studiat, deci probele analizate prezintă un comportament de tip solid la ambele temperaturi (Figura 28).

Stabilitatea structurală și gradul de fluidizare ale unguentelor la temperatura fiziologică au fost evidențiate cu ajutorul testelor reologice de temperatură care s-au realizat la frecvență și amplitudine constante (Figura 29). Testele reologice de timp realizate la ambele temperaturi (25°C și 37°C), la frecvență și amplitudine, au evidențiat stabilitatea structurală în timp a unguentelor analizate (Figura 30). În cazul curbelor de curgere, valorile mari ale vâscozității la forfecare zero

calculate cu modelul Carreau-Yasuda din curbele de curgere (Figura 31) argumentează și ele stabilitatea structurală a probelor analizate.

Evident, comparativ cu unguentele realizate doar pe bază de extracte fito- sau apiterapice, valorile modulelor în cazul celor pe bază de polimeri sunt mai ridicate datorită aportului adus de compusul macromolecular. Diferențele nu sunt însă foarte mari, cauzate și de proporția redusă de polimer introdus în baza de unguent, comparativ cu cantitățile de extract.

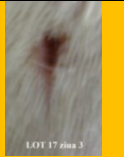
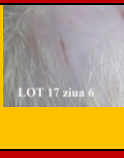
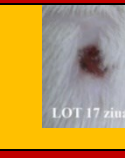
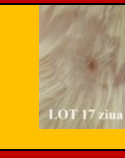
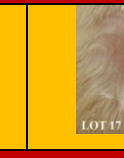
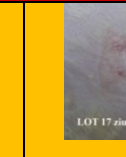




8.2. Rezultatele clinice și macroscopice

Evaluarea macroscopică pentru leziunea de tip incizie, evidențiază evoluția favorabilă, aceasta fiind vindecată practic complet din punct de vedere clinic în ziua a șasea de tratament. Pentru leziunea de tip arsură termică, între ziua a șasea și ziua a noua, crusta de apărare lezională suferă procesul de debridare, etalând în ziua a 12-a un epiteliu nou format, subțire, fin, elastic, care urmează procesul de maturizare până la ziua 21 (Tabel 37).

Tabel 37. Rezultate macroscopice ale leziunilor tratate cu amestec de polimeri

0			1		
					
2			3		
					
6			9		
					
12			21		
					

8.3. Rata de contracție a plăgilor

Aria leziunilor a fost măsurată în zilele 1, 6 și 9. Rezultatele semnificative sunt prezentate în tabelul 38 și sunt exprimate ca valoarea medie $\pm$ eroarea medie standard (SEM). Tabelul 39 prezintă rezultate privind rata de contracție a leziunii de tip excizie.

Tabel 38. Aria leziunii de tip excizie la ziua a 6-a și a 9-a a experimentului de testare a unguentelor pe bază de extracte vegetale

LOTURI		ARIA RĂNII (mm ²)			
		ZIUA 0	ZIUA 6	ZIUA 9	ZIUA 12
1	Lot netratat	64 (8x8)	61,6	56,25	neepitelizat
2	Lot bază unguent	64 (8x8)	45,5	40,8 (6x6,8)	neepitelizat
3	Lot collagen	64 (8x8)	39	6	Epiderm reepitelizat (aria de reepitelizare 2x2 mm)
4	Lot chitosan	64 (8x8)	36 6x6)	4 (2x2)	Epiderm reepitelizat (aria 2x1 mm)
5	Lot albuș de ou liofilizat	64 (8x8)	22,5 4,5x5	2 (1x2)	Epiderm reepitelizat (aria 1x1 mm)
6	Lot total polimeri	64 8x8)	25 (5x5)	6 (2x2,7)	Epiderm reepitelizat (aria de 1x1 mm)

Tabel 39. Evaluarea ratei de contracție a leziunii de tip excizie

Loturi experimentale	WCR (%) (media $\pm$ deviația standard)	
	Ziua 6	Ziua 9
Lot martor	5,78 $\pm$ 1,86	14,85 $\pm$ 2,95
Lot baza unguent	26,74 $\pm$ 2,13*	33,79 $\pm$ 2,21*
Lot collagen	40,00 $\pm$ 0,94	89,53 $\pm$ 0,68
Lot chitosan	44,69 $\pm$ 0,83	93,43 $\pm$ 0,33
Lot albuș de ou liofilizat	64,06 $\pm$ 0,45	97,14 $\pm$ 0,14
Lot total polimeri	60,42 $\pm$ 0,52	91,46 $\pm$ 0,45

În ziua a 9-a de tratament, rezultatele sunt în mod evident pozitive, pentru grupul cu unguent pe bază de albuș de ou liofilizat procentul de contracție a ranilor fiind de 97,14 $\pm$ 0.14 versus 33,79 $\pm$ 1,28 (contracția răni pentru grupul tratat cu baza de unguent) sau față de 14,85 $\pm$ 1,7 pentru grupul netratat. În ziua a 12-a de tratament, procesul de reepitelizare a fost finalizat pentru modelul de excizie a răni.

8.5. Rezultate de anatomie patologică

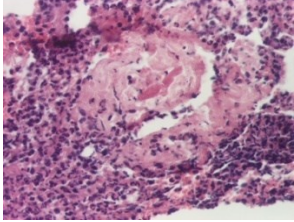
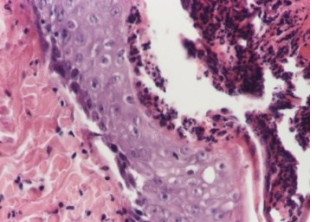
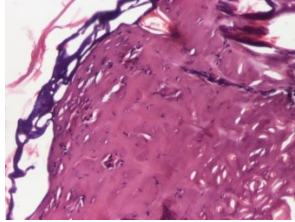
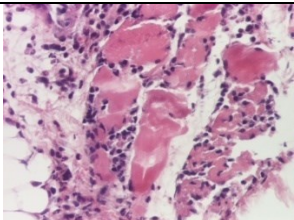
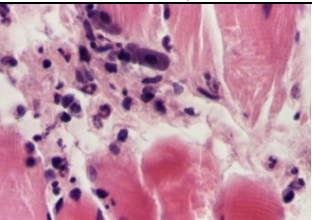
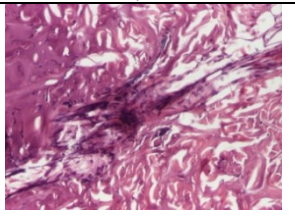
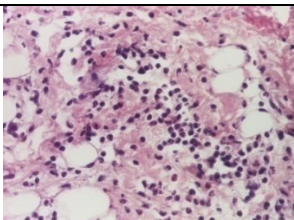
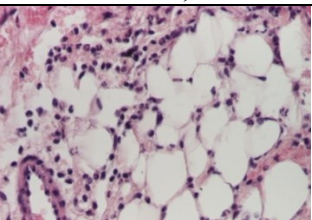
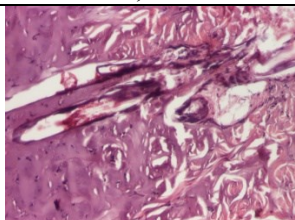
Includerea polimerilor naturali în unguentele de testare s-a bazat pe ideia că răspunsul mediilor biologice (respectiv țesuturile vii: răni, plăgi, sau diverse stadii de intervenții chirurgicale pe diverse țesuturi și organe) la contactul acestora cu materialele colagenice se

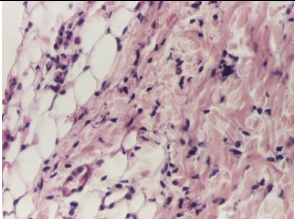
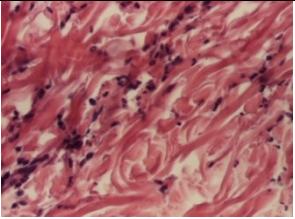
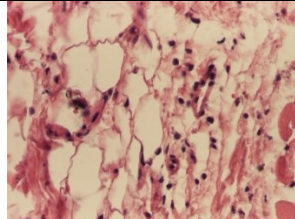
concretizează prin diverse fenomene specifice: hemostază, răspuns imunologic și proliferare celulară așa cum este prezentat și în literatura de specialitate. Tabelele 41 și 44 prezintă rezultatele histologice obținute după a doua și a 21-a zi de testare a unguentelor, momente considerate relevante pentru evoluția vindecării.

Matricile de collagen stimulează producerea de collagen de neoformație de către celule (în cadrul testelor pe culturi de celule), proprietate neîntâlnită la biomaterialele sintetice. Acest fapt se datorează domeniilor sale de legare a integrinelor, care favorizează atașarea celulelor din cultură, fenomen necesar pentru creșterea, diferențierea și activitatea metabolică a celulelor. Proprietatea hemostatică și capacitatea de a genera un țesut nousunt printre cele mai importante proprietăți biologice ale materialelor collagenice (Ochi *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006)

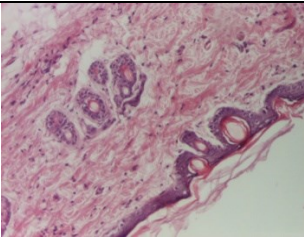
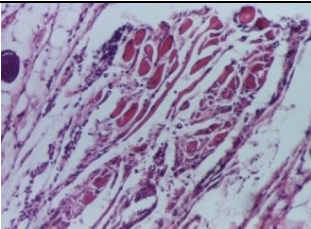
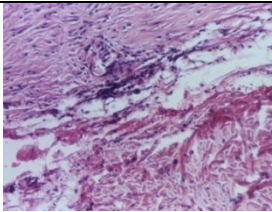
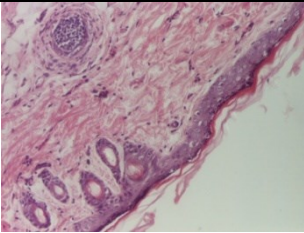
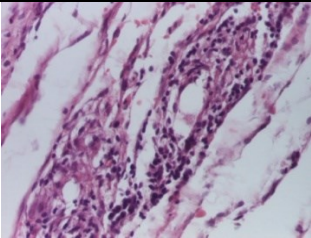
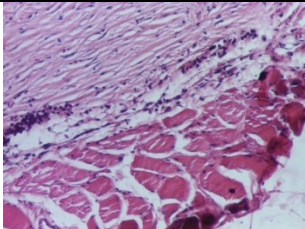
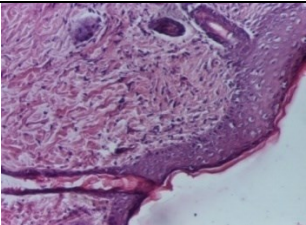
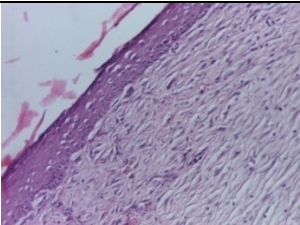
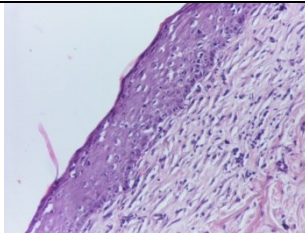
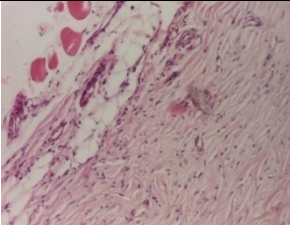
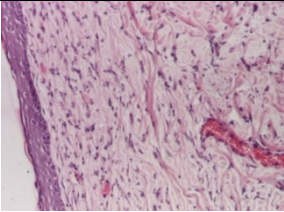
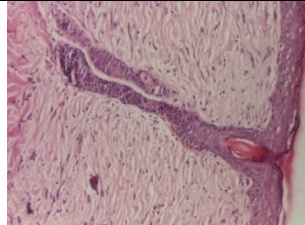
Abrevierile utilizate în tabel au următoarele semnificații: lot control negativ (GCN), lot bază unguent (GBU), lot tratat cu un unguent de testare *pe bază de collagen* (GTC_{Co}), lot tratat cu unguent de testare pe bază de chitosan (GTCh), lot tratat cu unguent de testare pe bază de albuș de ou liofilizat (GTA), lot tratat cu unguent de testare pe bază de total polimeri (GTP).

Tabel 41. Rezultate histologice după a doua zi de testare a unguentelor pe bază de polimeri

Loturi	Modele experimentale		
	Incizie	Excizie	Arsură termică
GCN			
	Important infiltrat inflamator, HEx200	Ulcerație epiderm cu depozit leucocitar, HEx200	Colagenizare dermică severă, HEx100
GBU			
	Infiltrat inflamator, HEx200	Infiltrat inflamator în stratul muscular, HEx400	Colagenizare dermică severă, HEx100
GTC_{Co}			
	Infiltrat inflamator în hipoderm, HEx200	Infiltrat inflamator în hipoderm, HEx200	Colagenizare dermică severă, HEx100

GTCh			
	Limfocite în hypoderm și perivascular HEx200	Limfocite, HEx200	Limfocite în hipoderm, HEx200

Tabel 44. Rezultate histologice după a 21-a zi de testare a unguentelor polimerice

Loturi	Modele experimentale		
	Incizie	Excizie	Arsură termică
GCN			
	Edem, HEx100	Inflamație în mușchiul striat, HEx100	Infiltrat inflamator, HEx100
GBU			
	Edem, HEx100	Infiltrat inflamator în hipoderm, detaliu, HEx200	Infiltrat inflamator, HEx100
GTA			
	Colagenizare dermică, HEx100	Țesut de granulație matur, colagenizare dermică, HEx100	Colagenizare dermică importantă HEx100
GTP			
	Colagenizare dermică important, HEx100	Ușoară colagenizare dermică, HEx100	Colagenizare dermică importantă, HEx100

În organismul uman, chitosanul este degradat, conducând la produși de degradare (Patil *et al.*, 2000) care sunt capabili să stimuleze macrofagele, să influențeze pozitiv sedimentarea colagenului și, în consecință, să accelereze procesul de tratarea a rănilor (Zhang și Neau, 2001; Thierry *et al.*, 2005).

În cazul prezentului studiu s-a observat o colagenizare normală ca urmare a utilizării chitosanului care a fost inclus în baza de unguent, ceea ce a condus la o cicatrizare de tip *restitutio ad integrum*. Este cunoscut că un nivel prea ridicat de colagen poate compromite rezultatul final al injuriei. Mecanismele responsabile pentru această acțiune pot include proliferarea keratinocitelor, care are ca rezultat desprinderea de corneocite (Baumann *et al.*, 2005) și pot fi, de asemenea, asociate cu formarea de colagen nou în dermul superior (Gilchrest, 1997), ceea ce reprezintă un real avantaj, mai ales, post-injurie dermică. Moleculele de chitosan pot induce o migrare a celulelor inflamatorii și fibroblaștilor, stimulând producerea de citokine și vindecarea răni. Mai mult, este demonstrat că vindecarea rănilor cu ajutorul chitosanului stimulează nu numai migrarea și proliferarea fibroblaștilor, ci și producția de colagen de tip III (Ueno *et al.*, 1999). Fibroblaștii stimulați de moleculele de chitosan secretă interleukină-8 (IL-8), care este un factor angiogenic și chemotactic al ambelor tipuri de celule (endoteliale și epidermice), care produc fibrozarea și epitelizarea (Ishihara *et al.*, 2002).

În ceea ce privește unguentul ce însumează polimerii de testare, s-a observat și în prezentul studiu, în prima zi, când s-au realizat modelele experimentale, pentru leziunile de tip incizie și excizie, o capacitate de hemostază crescută, pentru ca mai apoi să intervină favorabil în procesele de regenerare, remarcându-se țesut de granulație, iar în final un epiteliu nou format, tânăr, în curs de maturare care este elastic și fără urme de vindecare vicioasă, ceea ce este realmente remarcabil și de luat în seamă.

În cazul prezentului studiu s-a utilizat amestecarea colagenului cu chitosanul și albușul de ou liofilizat. Albușul de ou liofilizat este folosit în medicina populară în caz de leziuni, și mai ales în cele de tip arsură termică, în stare proaspătă, prin aplicare directă, acesta formând o peliculă protectoare, proteică, la suprafața leziunii. Preparatul polimeric obținut în cadrul prezentului studiu, conține compuși, citați în literatura de specialitate, de a fi biocompatibili cu organismul uman. Dealtfel rezultatele obținute în prezentul experiment, utilizând testarea unor unguente ce au presupus înglobarea amestecului de polimeri în baza de unguent, atât din punct de vedere clinic, cât și prin analizarea probelor histologice relevă un efect terapeutic superior în ceea ce privește regenerarea țesutului cutanat.

CAPITOLUL 9

OBȚINEREA, CARACTERIZAREA ȘI TESTAREA UNOR UNGUENTE PE BAZĂ DE AMESTECURI DE POLIMERI NATURALI ȘI PRINCIPII APITERAPICE ȘI FITOTERAPICE LA NIVELUL UNOR LEZIUNI A ȚESUTULUI CUTANAT

Primele tipuri de unguente raportate în prezenta teză sunt pe bază fie numai de principii biologice active (extracte fito- sau apiterapice) fie doar pe bază de polimeri naturali. Următorul stadiu al cercetării a vizat, firesc, utilizarea simultană în baza de unguent a tuturor componentelor cu activitate biologică – respectiv extracte și polimeri – fiind de dorit/așteptat un efect sinergetic, proprietăți structurale și de etalare superioare.

9.1. Caracterizarea reologică a unguentelor cu amestecuri de extracte și de polimeri

Au fost efectuate și în acest caz ambele tipuri de teste reologice - oscilatorii și rotaționale. Reproducibilitatea rezultatelor s-a verificat prin efectuarea testelor reologice în triplicat pentru fiecare unguent analizat.

Din Figura 24 se poate constata stabilitatea structurală a probelor în domeniul deformațiilor mici la ambele temperaturi. Cu creșterea temperaturii, formulările sunt mai ușor de etalat pe piele, au un aspect mai catifelat, efect al faptului că structura devine mai flexibilă.

În cazul testului de baleiaj de frecvență, valorile G' sunt mai mari decât cele G'' pe întreg domeniul de frecvențe studiat, deci probele analizate prezintă un comportament de tip solid la ambele temperaturi (Figura 25). Modulii dinamici sunt aproape paraleli și variază foarte puțin cu frecvența ceea ce sugerează existența unei rețele tridimensionale stabile datorată unor interacțiuni. La temperatura fiziologică, valorile celor doi moduli dinamici scad ceea ce sugerează că proba este mai moale, mai catifelată și se aplică mai ușor pe piele.

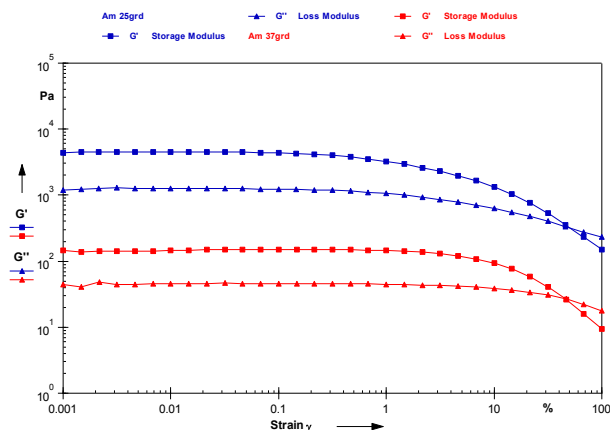
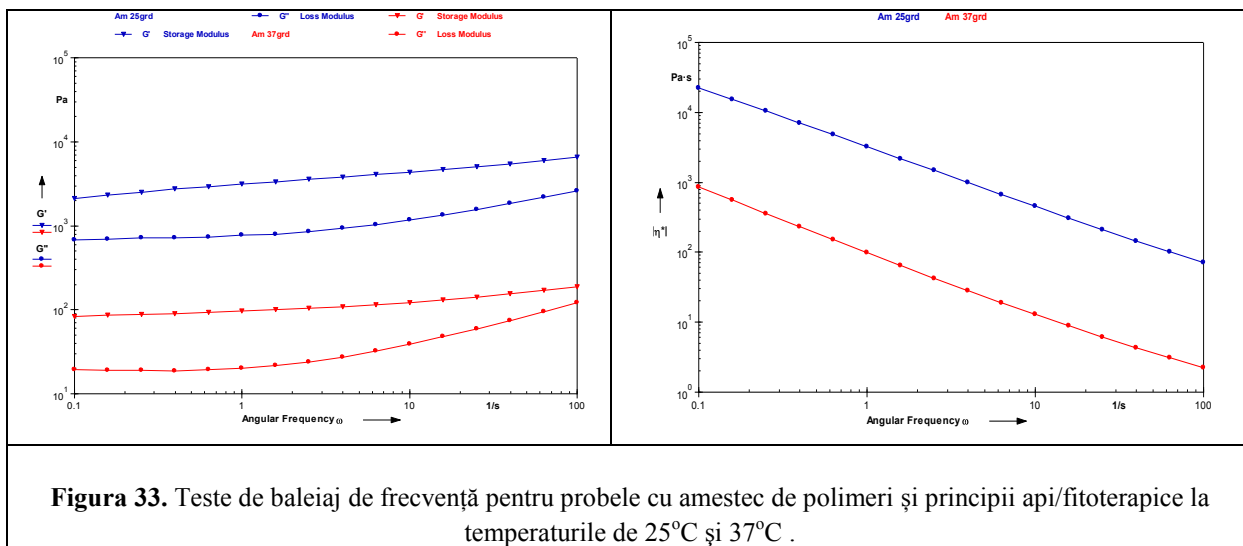
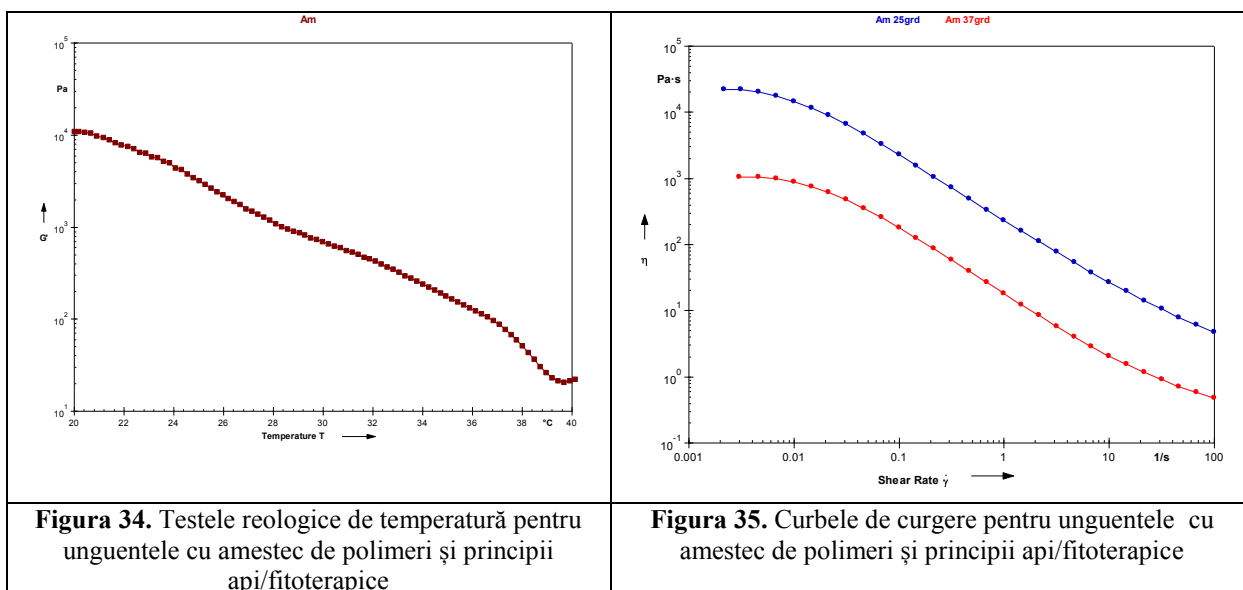


Figura 32 Teste de baleiaj de amplitudine pentru probele cu amestec de polimeri și principii api/fitoterapice la temperatura de 25°C și 37°C .



Stabilitatea structurală și gradul de fluidizare ale unguentelor la temperatura fiziologică au fost evidențiate cu ajutorul testelor reologice de temperatură care s-au realizat la frecvență și amplitudine constante (Figura 26). În cazul curbelor de curgere, valorile mari ale vâscozității la forfecare zero calculate cu modelul Carreau-Yasuda din curbele de curgere (Figura 27) evidențiază stabilitatea structurală a probelor analizate. Se mai constată, de asemenea, după cum era de așteptat, că valorile modulilor pentru aceste formulări se plasează între cele ale unguentelor doar cu extracte fito- și apiterapice și cele caracteristice formulărilor pe bază doar de polimeri naturali.

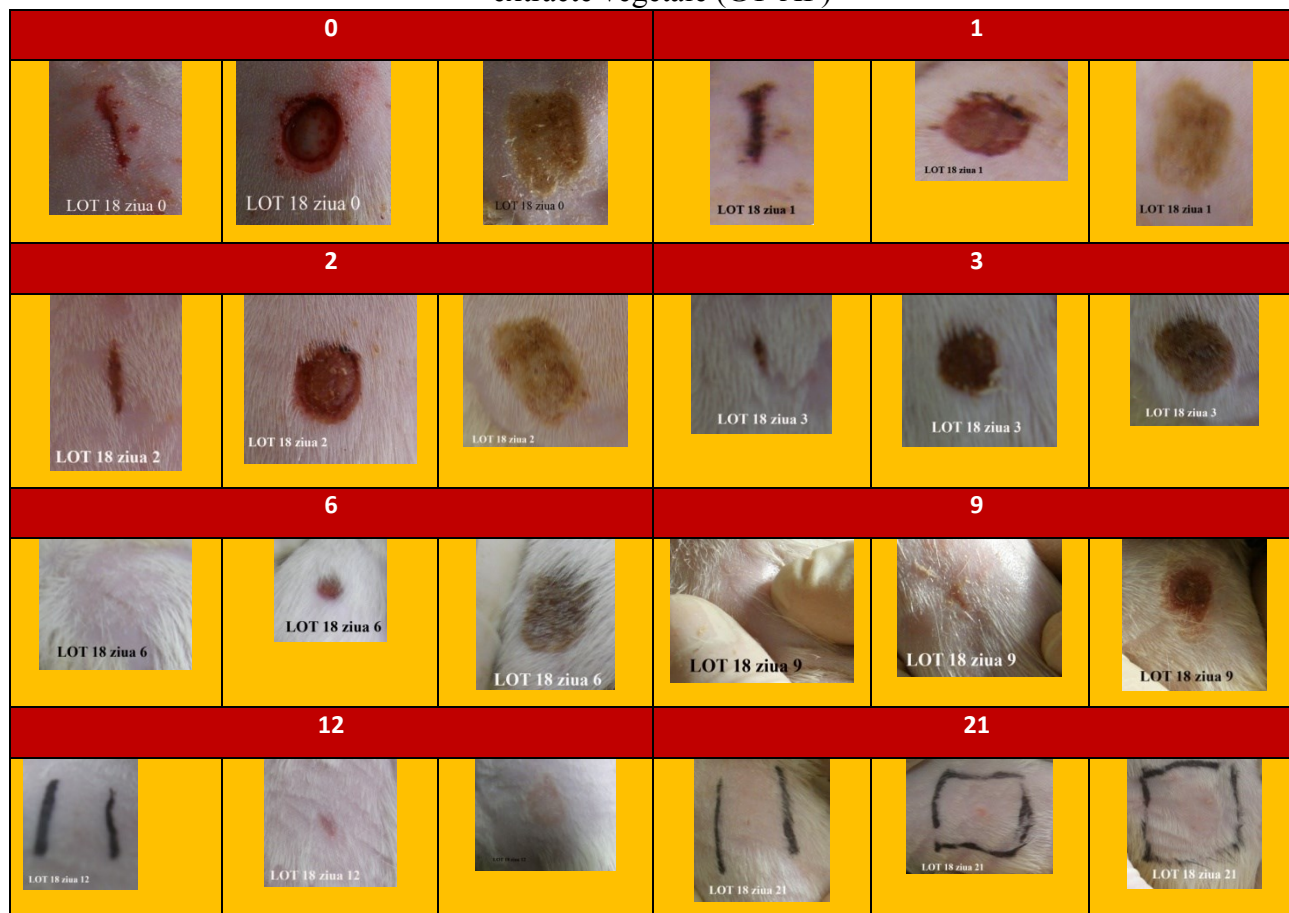


9.2. Rezultatele clinice și macroscopice

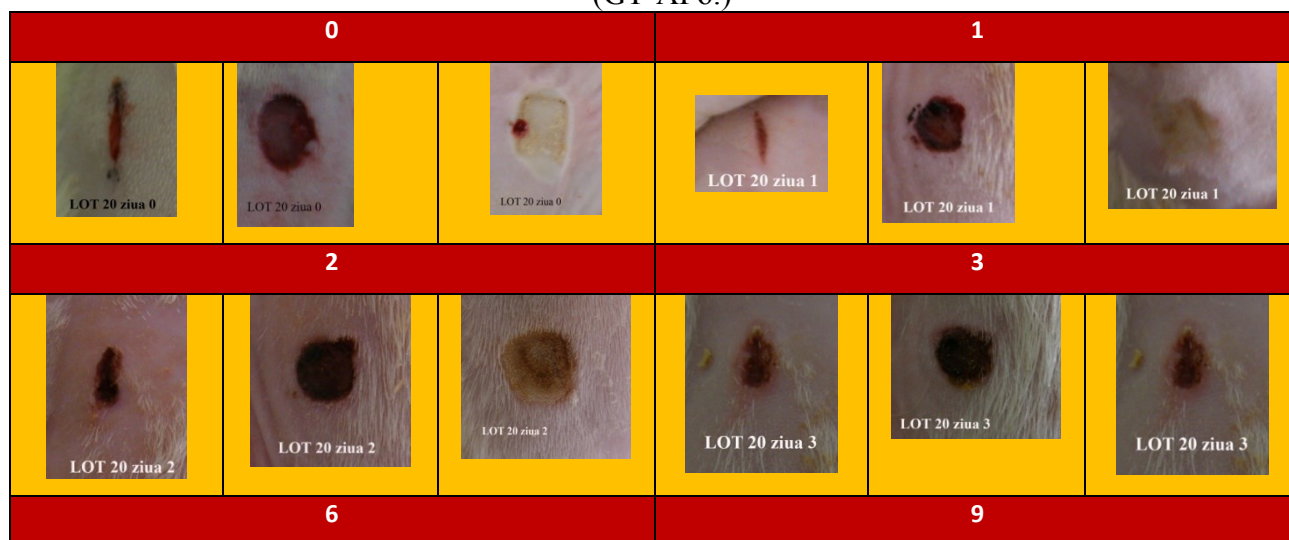
Evaluarea leziunilor tratate cu formulările complexe realizate (amestec de extracte și polimeri) s-a făcut din punct de vedere macroscopic, anatomo-patologic și histologic. Tabelele

45-48 prezintă imagini care permit evaluarea macroscopică a diferitelor tipuri de leziuni induse, după diferite durate ale tratamentului.

Tabel 45. Evaluarea macroscopică a leziunilor tratate cu unguent pe bază de produse apicole și extracte vegetale (GT-AP)

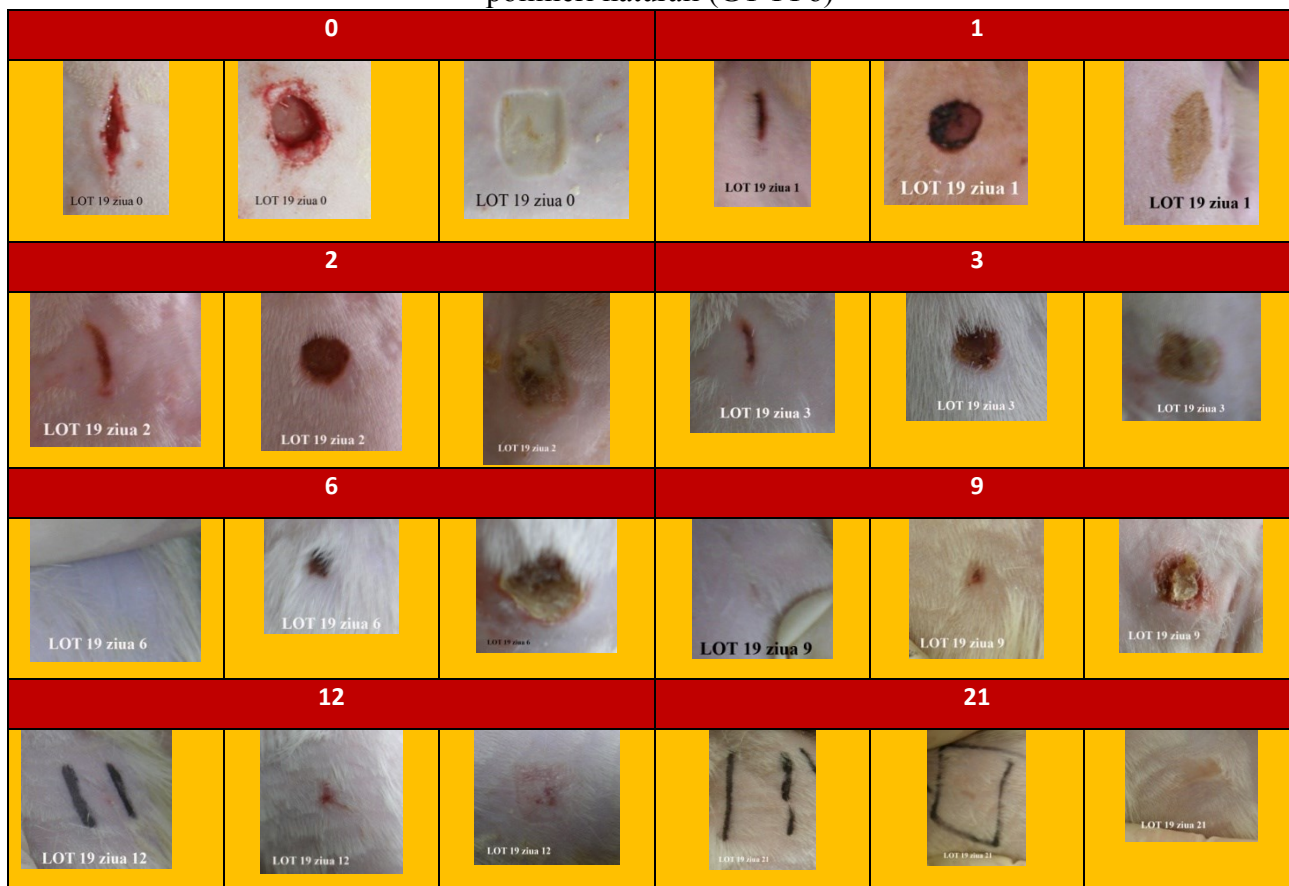


Tabel 46. Evaluarea macroscopică a leziunilor tratate cu unguent pe bază de apiterapice-polimeri (GT-APo.)

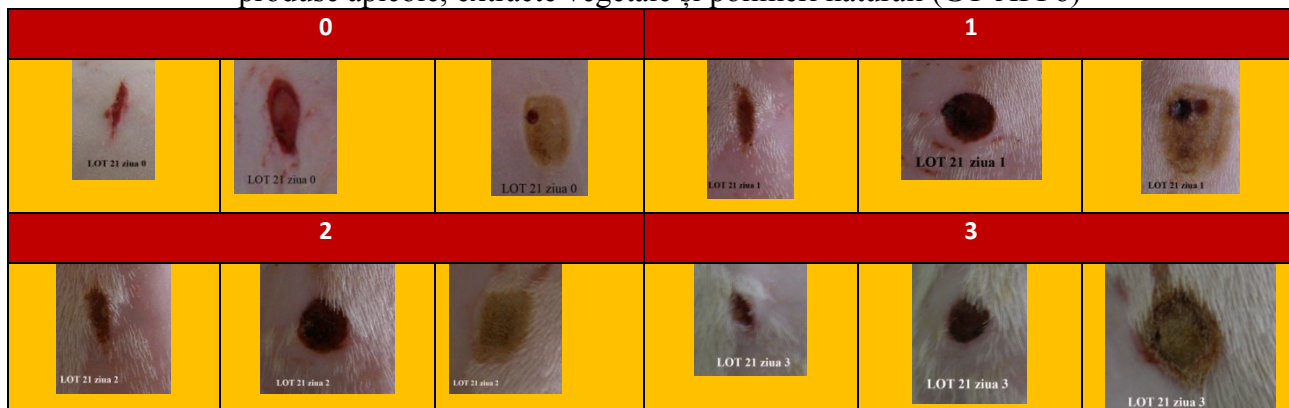


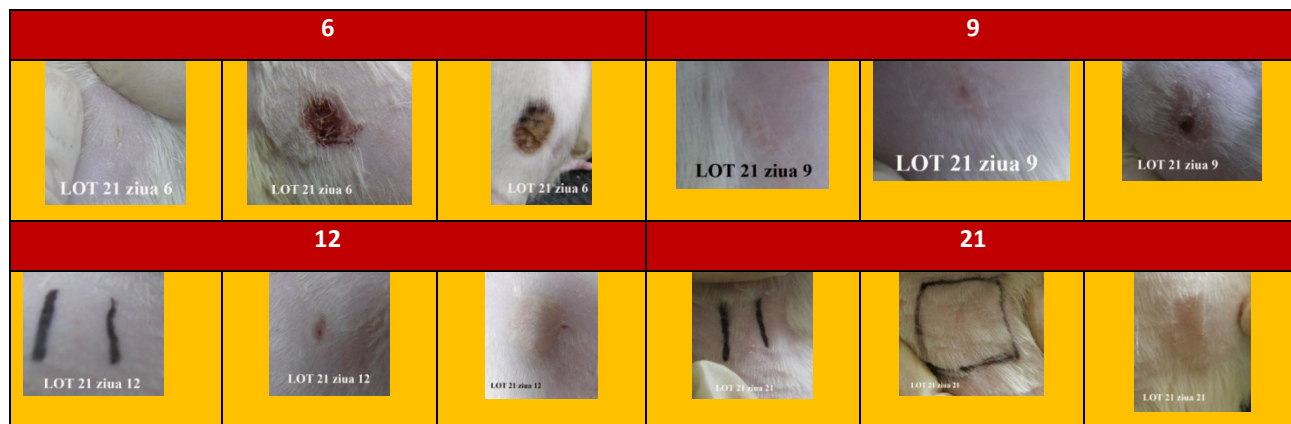


Tabel 47. Evaluarea macroscopică a leziunilor tratate cu unguent pe bază de extracte vegetale și polimeri naturali (GT-PPo)



Tabel 48. Evaluarea macroscopică a leziunilor epidermice pentru grupul cu unguent pe bază de produse apicole, extracte vegetale și polimeri naturali (GT-APPo)





Noile unguentele de testare, care conțin produse apicole, extracte vegetale și polimeri naturali și-au dovedit eficacitatea. Vindecarea completă a avut loc după șase zile de tratament, în cazul modelului experimental de tip incizie, iar după nouă zile în cazul modelelor de excizie și în leziunea produsă de arsura termică (tabelele 45-48). În prima zi de tratament în cazul utilizării unguentelor de testare, conținând produse apiterapice, extracte vegetale și polimeri naturali s-a observat efectul asupra hemostazei. Mecanismul hemostazei induse de către collagen face obiectul a numeroase studii științifice din domeniul medical. Plachetele aderă într-o primă fază la suprafața gelului colagenic. În a doua fază, acestea se desorb și se implică într-un proces de agregare, iar în a treia fază, se activează reacția trombinei asupra fibrinogenului, care se finalizează cu apariția trombusului plachetar (Antiszko *et al.*, 1995).

Chitosanul, utilizat în unguentele de testare prezintă, așa cum este citat și în literatura de specialitate, proprietăți hemostatice (Huang și Fu, 2010; Dai *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Busilacchi *et al.*, 2013), promovând agregarea eritocitară. Activarea cascadei de coagulare este un factor important în leziunile acute, profunde, când sângerarea excesivă poate pune viața în pericol (Paul și Sharma, 2004). Aceste proprietăți au dus la utilizarea chitosanului în unguentele pentru îmbunătățirea procesului de vindecare a rănilor sau mai exact, a accelerării vindecării rănilor (Murakami *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2012; Baxter *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

9.3. Rata de contracție a răni

Nu sunt schimbări importante în ceea ce privește contracția răni în primele trei zile de tratament, acestea fiind zile în care au avut loc procesele inflamatorii (Tabel 49).

Proliferarea celulară începe după 3 zile, iar reducerea semnificativă a ariei răni ($p < 0,001$) a fost obținută la 6 și 9 zile după tratament. S-a observat că tratamentul cu unguentul pe bază de produse apicole, extracte vegetale și polimeri naturali, prezintă cele mai bune efecte, acesta înregistrând cea mai bună rată de contracție a leziunilor din ziua a 6-a a experimentului. În

ziua a 9-a de tratament, rezultatele sunt în mod evident pozitive, pentru grupul cu unguent pe bază de produse apicole, extracte vegetale și polimeri naturali. În ziua a 12-a de tratament, procesul de reepitelizare a fost finalizat pentru modelul de excizie a rănii pentru loturile tratate cu unguente de testare. Aceasta perioadă a fost înregistrată pentru toate unguentele testate. (tabele 49, 50).

Abrevierile utilizate în tabel au următoarele semnificații: lot control negativ (GN); lot bază unguent (GBU), lot tratat cu un unguent pe bază de *produse apiterapice-extract plante* (GT-AP); lot tratat cu un unguent pe bază de extracte de plante – polimeri naturali (GT-PPo); lot tratat cu un unguent pe bază de produse apiterapice – polimeri naturali (GT-APo); lot tratat cu un unguent de testare pe bază de produse apiterapice-fitoterapice-polimeri naturali (GT-APPo).

Tabel 49. Aria leziunii de tip excizie pentru loturile tratate cu unguente pe bază de amestecuri apiterapice, fitoterapice și polimerice

LOTURI		ARIA RÂNII (mm ²)		
		ZIUA 0	ZIUA 6	ZIUA 9
1	Lot bază unguent	64 (8x8)	45,5 (6,5x7)	40,8 (6x6,8)
2	Lot netratat	64 (8x8)	61,6 (7,7x8)	56,25 (7,5x7,5)
3	Lot GT-AP	64 (8x8)	7,5 (2,5x3)	1,56 (1.2x1.3)
4	Lot GT-PPo	64 (8x8)	19,5 (3x3.5)	2 (3x3)
5	Lot GT-APo	64 (8x8)	9 (3x3)	1,5 (1x1,5)
6	Lot GT-APPo	64 (8x8)	5 (2x2,5)	1 (1x1)

Efectele sinergice în ceea ce privește vindecarea leziunii de tip excizie se pot observa în prezentul studiu, pentru lotul GT-APPo care în ziua a 9-a de tratament prezintă o arie a leziunii de numai 1x1 mm. Loturile tratate cu unguente în care au fost incluse produsele apicole, se află pe primele trei locuri în ierarhia vindecării, acestea aducând un aport important asupra vindecării rănii (Tabel 50).

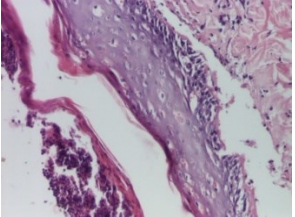
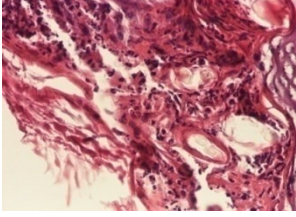
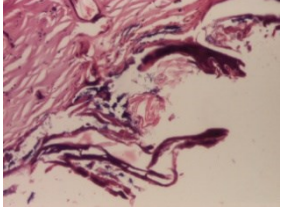
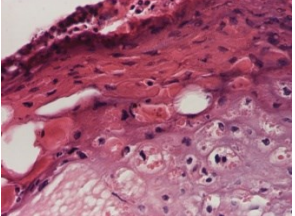
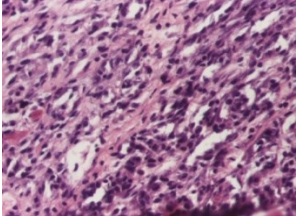
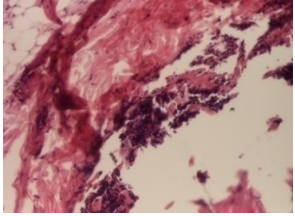
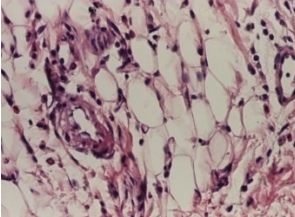
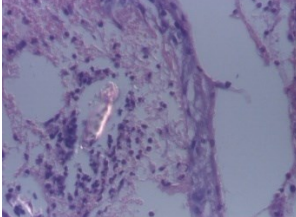
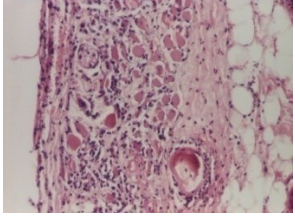
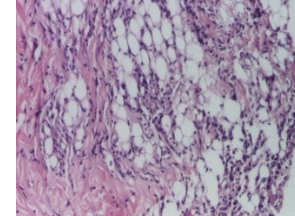
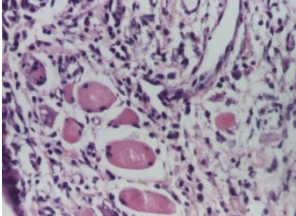
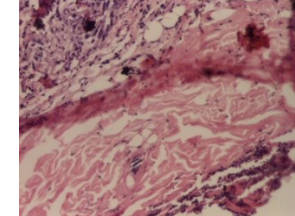
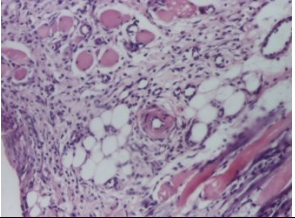
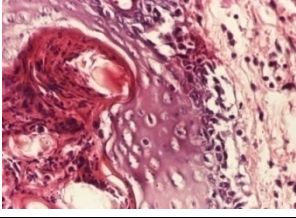
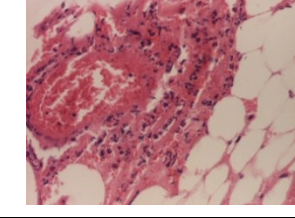
Tabel 50. Con tracția rănii de tip excizie tratată cu unguente pe bază de apiterapice, fitoterapice și polimeri naturali

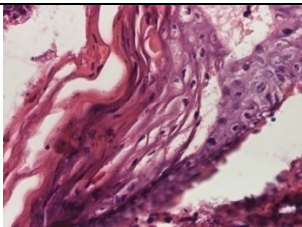
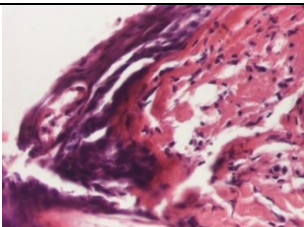
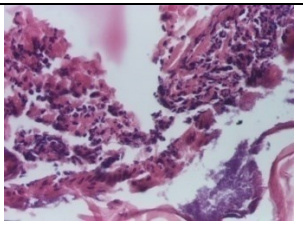
Loturi experimentale	WCR (%) (media ± deviația standard)	
	Ziua 6	Ziua 9
Lot martor	5,78 ± 1,86	14,85 ± 2,95
Lot baza unguent	26,74 ± 2,13*	33,79 ± 2,21*
Lot GT-AP	89,33±0,60	97,82±0,13
Lot GT- PPo	84,06±0,47	96,61±0,30
Lot GT-APo	86,25±0,31	97,50±0,09
Lot 21 GT-APPo	91,35±0,83	98,17±0,15

9.4. Rezultate de anatomie patologică.

La fel ca în cazurile precedent discutate, au fost selectate ca fiind semnificative din punct de vedere al rezultatelor histopatologice cele obținute după ziua 3 (Tabel 53) și 21 (Tabel 55) de tratament.

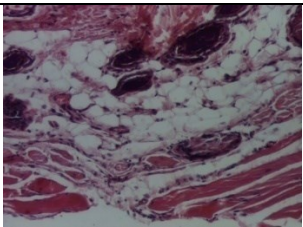
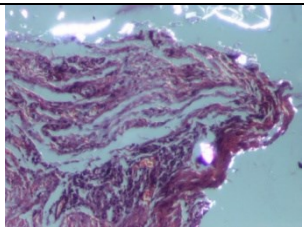
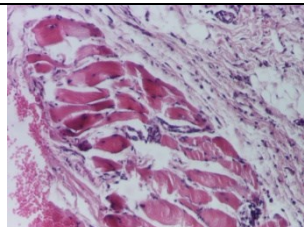
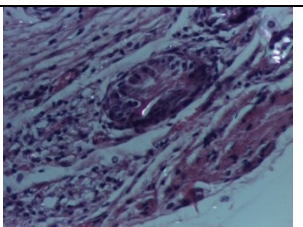
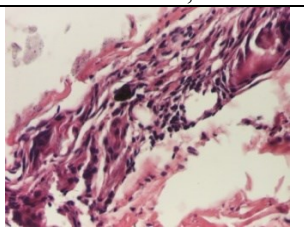
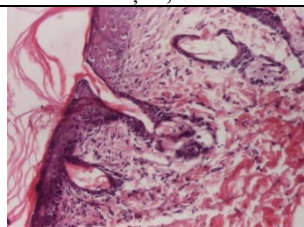
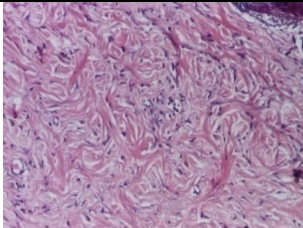
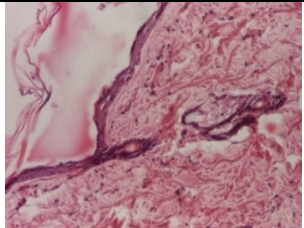
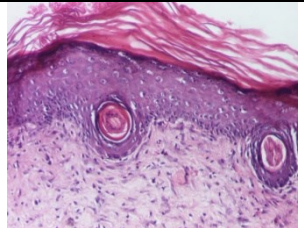
Tabelul 53. Rezultate histologice în a 3-a zi de testare a unguentelor pe bază de amestecuri apiterapice, fitoterapice și polimeri naturali

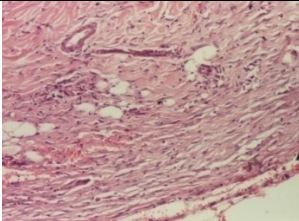
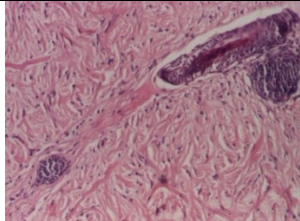
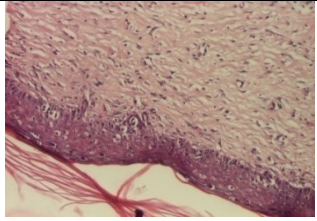
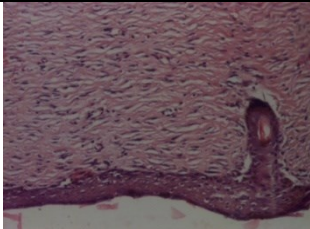
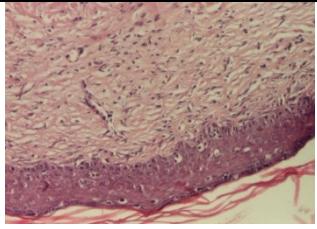
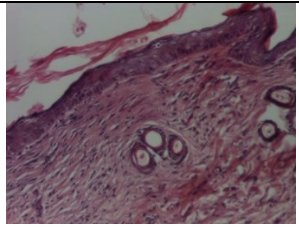
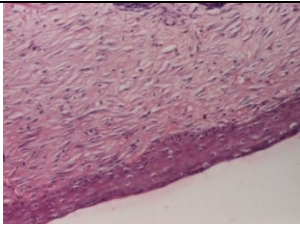
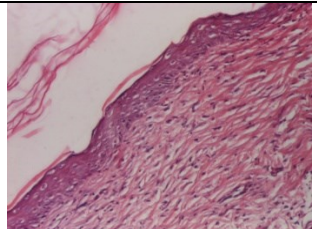
Loturi	Modele experimentale		
	Incizie	Excizie	Arsură termică
GCN			
	Abces în stratul cornos, acantoză epiderm, HEx100	Ulceratie, HEx200	Abces în stratul cornos, HEx100
GBU			
	Degenerescență vacuolară, spongioză, HEx200	Infiltrat inflamator hipodermic, HEx200	Abces în stratul cornos, HEx100
GT-AP			
	Hipoderm cu infiltrat inflamator, HEx200	Infiltrat inflamator limfocitar, HEx200	Fibroză ce încadrează fibrele musculare striate, HEx100
GT-PPo			
	Important infiltrat inflamator dermo-hipodermic, HEx100	Infiltrat inflamator, HEx200	Abces în stratul cornos, HEx100
GT-APo			
	Infiltrat inflamator, HEx100	Abces cornos, vacuolizare, HEx200	Congestie și hemoragie, HEx200

GT-APPo			
	Important infiltrat inflamator, HEx 200	Infiltrat inflamator, HEx200	Infiltrat inflamator, HEx200

În **ziua 21** pentru loturile tratate cu unguentele de testare se observă în toate cele trei tipuri de leziuni cutanate, colagenizare dermică pentru loturile GT-PPo și GT-APPo, observată deasemenea și pentru lotul GT-APo în leziunile de tip incizie și excizie. Pentru lotul GT-AP se observă o colagenizare dermică importantă în leziunea de tip incizie și arsură termică, iar pentru excizie, pe lângă această colagenizare, se observă și prezența unui discret edem dermic. Pentru lotul GT-APo, în excizie este observată colagenizare dermică dar cu evidențierea de folicul pilos cu atrofierea glandelor sebacee (Tabel 55).

Tabelul 55. Rezultate histologice în ziua 21 de testare a unguentelor pe bază de amestecuri apiterapice, fitoterapice și polimeri naturali

Loturi	Modele experimentale		
	Incizie	Excizie	Arsură termică
GCN			
	Infiltrat inflamator, HEx 100	Ulceratie, important infiltrat inflamator, HEx100	Infiltrat inflamator interstițial, HEx100
GBU			
	Reacție de corp străin la keratină, HEx200	Important infiltrat inflamator, HEx200	Congestie și edem, HEx100
GT-AP			
	Colagenizare importantă a dermului, HEx100	Colagenizare dermică, ușor edem al dermului, HEx100	Colagenizare importantă a dermului, HEx100

GT-PPo			
	Colagenizare dermică, HEx100	Colagenizare dermică, HEx 100	Colagenizare dermică, HEx100
GT-APo			
	Colagenizare dermică, HEx100	Colagenizare dermică, HEx100	Colagenizare dermică, HEx 100
GT-APPo			
	Colagenizare dermică, HEx100	Colagenizare dermică, HEx100	Colagenizare dermică, HEx100

Pentru loturile martor în leziunea de tip incizie se evidențiază infiltrat inflamator, acesta interesând hipodermul și stratul muscular (GCN), iar pentru GBU, se remarcă și prezența fibrozei în hipoderm, pe lângă aceasta evidențiându-se și reacție gigantocelulară de corp străin. În leziunea de tip excizie, se remarcă pentru ambele loturi un important infiltrat inflamator, iar pentru GCN și prezența aspectelor de ulceratie. Pentru leziunea de tip arsură se evidențiază infiltrat inflamator ce interesează și planul muscular (GCN), congestie și edem (GBU) (tabel 55).

Se poate remarca că unguentele de testare au contribuit la normalizarea histoarhitecturii țesutului cutanat, ceea ce confirmă studiile deja publicate. Studiile au arătat faptul că chitosanul stimulează proliferarea celulară și histoarhitectura tisulară (Jayakumar *et al.*, 2011) și datorită capacității de a îmbunătăți faza de remodelare a matricei extracelulare, poate fi încorporat în formulări pentru tratarea rănilor (Leonida *et al.*, 2011). După injurie, aplicarea de pansamente pe bază de polimeri naturali a fost propusă pentru a stimula mediul celular original și al matricei extracelulare (Sell *et al.*, 2010). Un studiu sugerează faptul că chitosanul și nanoparticulele sale facilitează matricea extracelulară în faza remodelării vindecării leziunii (Leonida *et al.*, 2011). Factorul principal în accelerarea procesului de vindecare a leziunii poate fi atribuit prezenței N-acetil-d-glucosaminei (Choi *et al.*, 2001).

Utilizarea glucozei la nivelul pielii, apreciată prin moleculele de glucoză marcate radioactiv, este de 0,2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de piele umană (derm și epiderm), valoare comparabilă cu a țesutului muscular activ *in vitro* (Freinkel, 2001). Peste jumătate din glucoza utilizată în piele are loc la nivelul epidermului. Utilizarea glucozei în epiderm este mai crescută în stratul bazal decât în celelalte straturi, fiind în funcție de activitatea metabolică din fiecare strat (Alec, 2006). De asemenea utilizarea lăptișorului de matcă pentru obținerea unguentelor de testare se bazează pe acțiunea estrogenilor asupra pielii: menținerea troficității prin creșterea grosimii pielii, creșterea vascularizației, creșterea cantității și calității collagenului, acțiunea de reglare a ciclului foliculilor piloși și a glandelor sebacee (Cowley *et al.*, 1997).

În general, un pansament eficient al leziunilor menține un mediu umed al patului răni, fără a risca deshidratarea sau acumularea de exudat; permeabilitatea suficientă pentru gaze și procesele reparatorii care necesită oxigen; un nivel ridicat al capacității de absorbție al fluidului pentru a elimina exudatele excesive care conțin nutrienți pentru bacteriile de la nivelul răni; o bună barieră împotriva pătrunderii microorganismelor care pot cauza infecții; activitate antibacteriană pentru a suprima dezvoltarea bacteriilor sub pansament; absența oricăror efecte citotoxice, ceea ce unguentele testate în prezentul studiu au dovedit cu succes.

CAPITOLUL 10

OBȚINEREA, CARACTERIZAREA ȘI TESTAREA UNOR HIDROGELURI PE BAZA DE POLIMERI NATURALI CA SUPORT PENTRU INCLUDEREA DE PRINCIPII FITO- SI APITERAPICE CU APLICATII LA NIVELUL ȚESUTULUI CUTANAT

Hidrogelurile sunt materiale cu structură tridimensională, care atunci când sunt obținute din biopolimeri pot fi utilizate ca suporturi pentru includerea de diverse principii biologice active cu potențial în tratarea a numeroase afecțiuni, inclusiv leziuni ale pielii. Numeroși polimeri de origine naturală (polizaharide, proteine) pot fi utilizați în scopul realizării de hidrogeluri cu caracteristici de reținere a apei și principiilor biologice active foarte diverse, reglabile prin jocul parametrilor reacției de sinteză a lor. În studiul nostru am optat pentru doi polimeri – chitosanul și gelatina -, amândoi biocompatibili. Chitosanul este binecunoscut pentru activitatea sa biologică; gelatina, derivat al collagenului din care se obține prin reacții bine controlate de hidroliză, preia, desigur, și calitățile precursorului din care provine, inclusiv cele biologice. Ambii polimeri prezintă grupări funcționale reactive în condiții moderate, astfel încât prin alegerea judicioasă a agentului de reticulare pot genera ușor structuri tridimensionale. Reticulanții folosiți la obținerea hidrogelurilor, prin formarea de legături covalente cu polimerii utilizați, sunt adeseori toxici, necesitând purificare avansată. Colectivul condus de prof. Popa a elaborat o metodă de reticulare capabilă să reducă în mare măsură cantitatea de reactant covalent, diminuând riscurile de toxicitate a hidrogelurilor obținute. Pornind de la ideea că unii polimeri posedă grupe funcționale ionice, a fost elaborată o tehnică de reticulare a acestora utilizând anioni polifuncționali (sulfat, tripolifosfat). Întrucât, însă, stabilitatea mecanică a gelurilor astfel obținute nu este foarte ridicată, s-a optat pentru utilizarea în paralel cu reticulantul ionic, a unor cantități reduse de reticulant covalent (aldehidă glutarică) care are efect ranforsant asupra structurii.

Procedeul, purtând numele de dublă reticulare a fost folosit pentru obținerea hidrogelurilor utilizate în prezenta lucrare pentru includerea de extracte fito- și apiterapice.

10.1. Caracterizarea hidrogelurilor

În general, reacția de reticulare covalentă a celor doi polimeri are loc la grupele aminice libere datorită reactivității mari a acestori grupe funcționale cu respectarea grupelor de hidroxil, fiind favorizată și de mediul acid în care se desfășoară.

10.1.1. Analiza structurală prin spectroscopie FTIR

Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) a confirmat faptul că are loc reticularea covalentă dintre grupele funcționale amino ale celor doi polimeri și grupele carbonil ale glutaradehidei. Grupele aminice nou formate absorb într-o regiune destinată unor altor grupe funcționale prezente în ambii polimeri, de aceea a fost realizată o deconvoluție a spectrului în regiunea $1500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$. Banda de absorbție specific pentru amine a fost găsită la 1668 cm^{-1} (Socrates, 2004). Banda de absorbție la 1709 cm^{-1} este atribuită grupărilor $\text{C}=\text{O}$, sugerând că nu toate moleculele de agent de reticulare participă în reacția cu aceste grupări carbonil. Reticularea ionică a ionilor de amoniu din cei doi polimeri a fost confirmată prin banda de absorbție atribuită SO_4^{-2} ($\sim 617\text{ cm}^{-1}$). În hidrogel au fost incluse principii active provenite din extractele fito- și apiterapice. Informațiile furnizate de datele spectrale IR au permis formularea unei structuri schematic prezentată în Figura 36; în ochiurile rețelei este figurat schematic produsul activ.

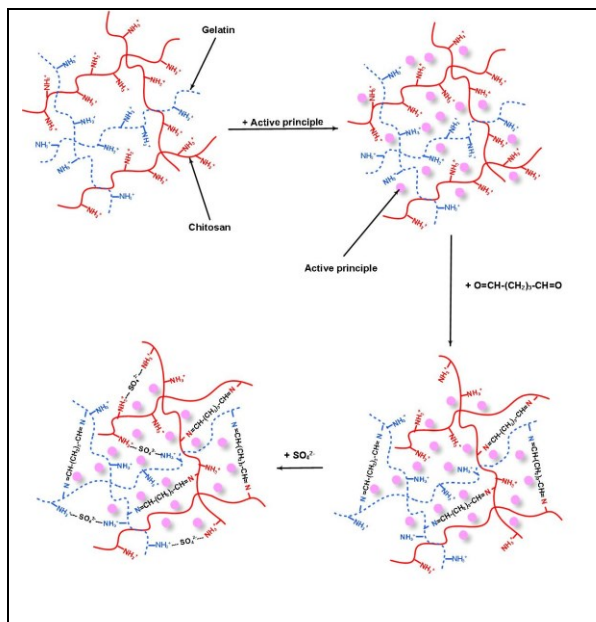


Figura 36. Structura schematică a sistemului hidrogel polimeric-principiu activ

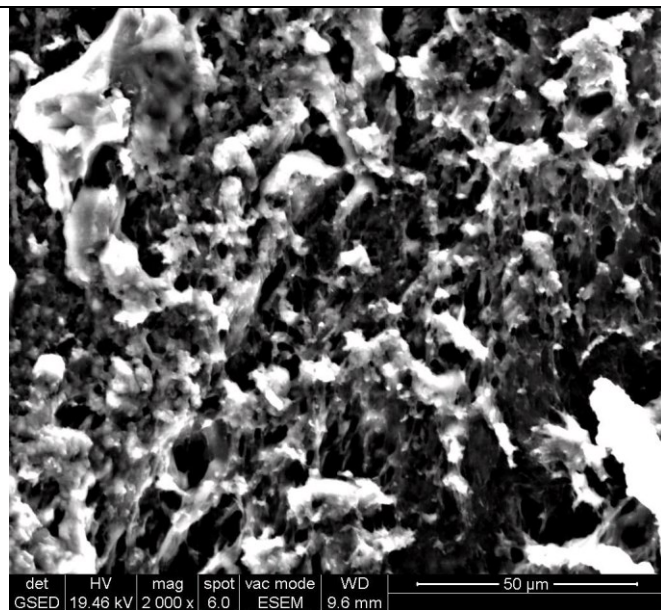


Figura 37. Morfologia hidrogelului evidențiată prin microscopie electronică de baleiaj

10.1.2. Morfologia hidrogelului

Morfologia hidrogelului a fost evidențiată prin microscopia electronică de baleiaj (Figura 37). Suprafața hidrogelului prezintă o structură omogenă și poroasă, porii fiind formați de distanțele dintre fibrilelor din structura hidrogelului.

10.3. Evaluarea vindecării leziunilor utilizând hidrogeluri polimerice.

Utilizarea sistemului hidrogel-principiu activ se face prin aplicarea directă a acestuia pe leziunea indusă. Evaluarea capacității de vindecare s-a făcut prin metodele utilizate în cazurile

anterioare pentru unguente. Fiind în contact direct cu rana, fluxul de fluide provenind din aceasta pătrunde în structura poroasă a materialului de unde preia principiile active readucându-le în zona afectată.

10.2.1. Rata de contracție a leziunii

Contracția răni este una din cele mai puternice forțe mecanice din corpul uman, mecanismele biologice exacte ale acestui proces fiind încă un subiect controversat. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 57. Reducerea semnificativă a ariei leziunii a fost înregistrată în ziua 7 de tratament. În a 10-a zi de tratament, procesul de reepitelizare a fost complet pentru lotul tratat cu film obținut din hidrogel-propolis 20%-extracte vegetale. Leziunea a fost închisă 100% în a 10-a zi de tratament cu hidrogel-propolis 20 %-extract vegetal, comparativ cu lotul netratat care a avut nevoie de 21 de zile pentru vindecare.

Tabel 57. Rata de contracție a leziunii pentru loturile tratate cu hidrogeluri pe bază de polimeri naturali conținând incluse principii apiterapice și fitoterapice

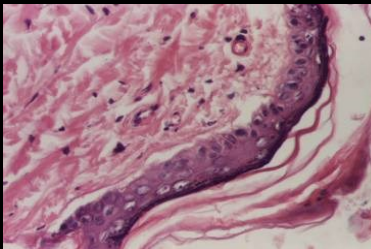
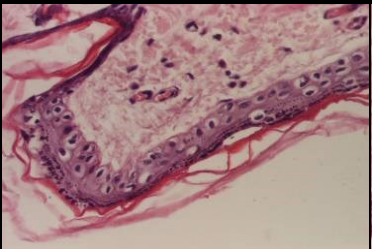
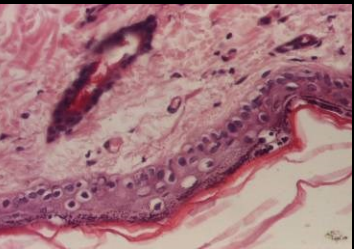
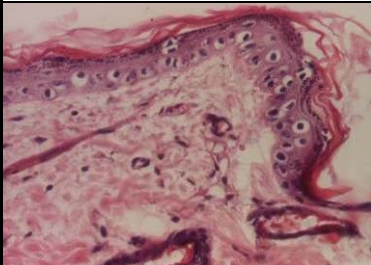
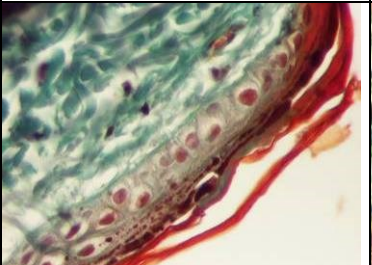
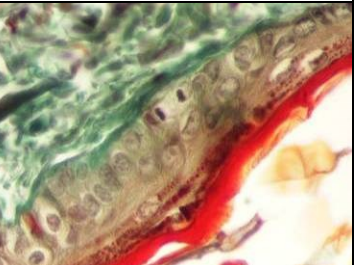
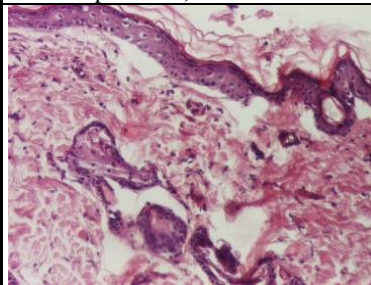
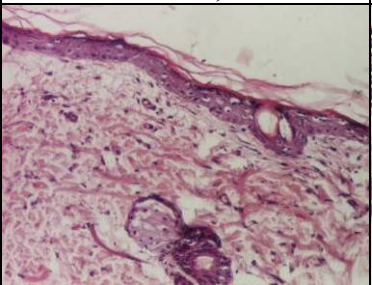
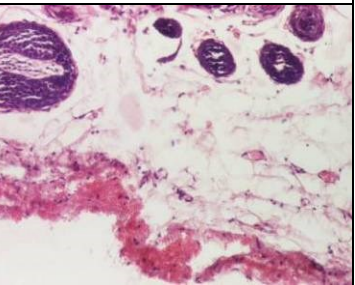
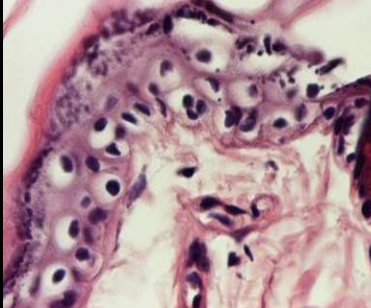
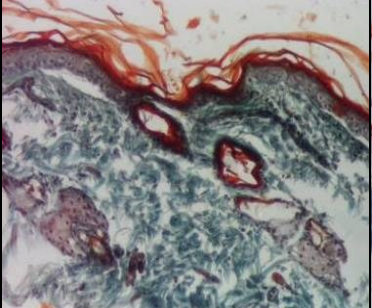
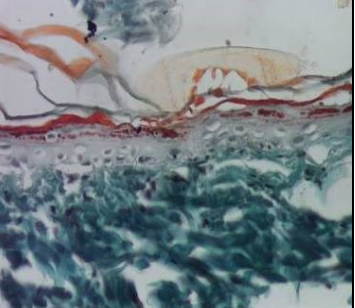
Loturi experimentale	Tratament	WCR_ziua 7
Lot F1	Sistem chitosan-gelatină	40.00±0.93
Lot F2	Sistem chitosan-gelatină -10 % propolis	73.06±1.36
Lot F3	Sistem chitosan-gelatină -20 % propolis	84.05±0.47
Lot F4	Sistem chitosan-gelatină -20 % propolis-extract vegetal	89.33±0.60
Lot Propolis	Propolis	69.37±0.62
Lot control negativ	Netratat	5.78±1.79

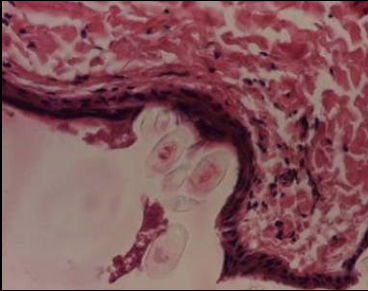
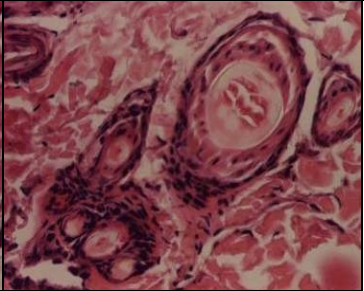
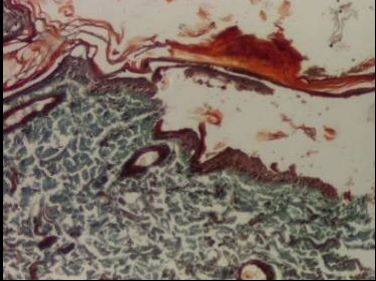
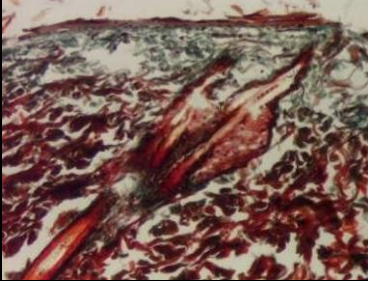
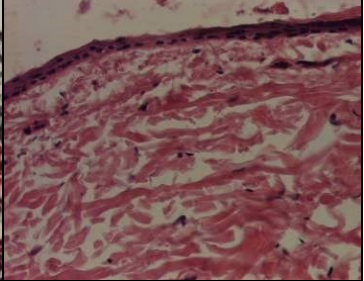
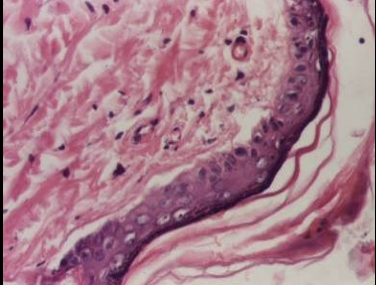
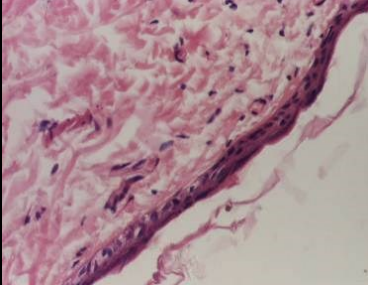
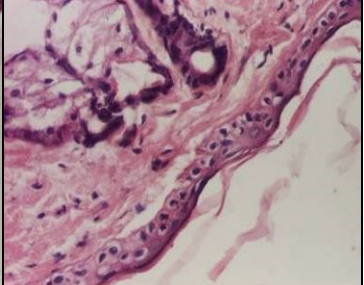
*p = 0.0001, în comparație cu lotul control negativ (netratat)

10.2.2. Rezultate de anatomie patologică

Congestia vasculară minimă sau moderată este prezentă și detaliată în (Tabelul 58). Vasele capilare mici și mijlocii prezintă pereți integri și de calibru ușor mărit. Fragmentele musculare atașate fragmentelor cutanate nu prezintă modificări. Anexele cutanate: foliculii piloși denși, în medie 2-3 foliculi/câmp de 40x (pentru loturile tratate cu hidrogel 3 și propolis) sau 4-5 foliculi/câmp de 40x (pentru loturile tratate cu hidrogel 1, hidrogel 2) prezintă zonal hiperplazia glandelor sebacee.

Tabel 58. Rezultate de analiză histologică pentru loturile tratate cu hidrogeluri pe bază de polimeri și principii apiterapice și fitoterapice

Lot	microscopie	microscopie	microscopie
Lot martor			
	Capilare și elemente inflamatorii în derm, HEx200.	Capilare congestive și elemente inflamatorii în derm, HEx200.	Edem în dermul superficial. HEx200.
Lot aplicație film 1 (F1)			
	Discret edem în dermul superficial, HEx200.	Epiderm regenerat, membrana bazală accentuată, Sz x400.	Membrana bazală îngroșată, HEx200.
Lot aplicație film 2 (F2)			
	Detaliu, vase mici în derm superficial, edem al dermului, HEx200.	Detaliu, vase mici în derm superficial, edem al dermului, glande sebacee detaliu. Epiderm regenerat, HEx100.	Detaliu epiderm integru HEx100.
Lot aplicație film 3 (F3)			
	Edem dermic, degenerescență vacuolară în epiderm, HEx400.	Detaliu, epiderm integru, fire de păr și glande sebacee, Sz x100.	Detaliu, epiderm rectiliniu, accentuarea membranei bazale, Sz x200.

			
	Detaliu, epiderm rectiliniu, regenerat, edem al dermului, orizontalizarea fibrelor de collagen, HEx200.	Detaliu, epiderm regenerat, HEx200.	Detaliu, fire de păr transversal, HEx200.
Lot testare film 4 (F4)			
	Detaliu, epiderm integru și derm cu edem, Sz x100.	Detaliu, fir de păr longitudinal cu enexe. Epiderm regenerat integru, Sz x100.	Detaliu, epiderm rectiliniu, fibre de collagen ușor orizontalizate, HEx200.
Lot testare propolis			
	capilare și elemente inflamatorii în derm, HEx200.	epiderm regenerat recent, rectiliniu, derm cu edem, HEx200.	glande sebacee, epiderm regenerat, HEx200.

10.3 Discuții

Efectele favorabile asupra vitezei de contracție a răni comparativ cu alte studii citate în literatură, putem să le atribuim eliberării treptate a substanțelor cu efect terapeutic din propolis, lucru ce face ca acestea să acționeze un timp mai îndelungat la nivelul leziunii și să penetreze rana mai bine decât utilizarea unguentelor unde substanța este eliberată rapid. În plus, chiar materialul polimeric natural exercită efecte terapeutice asupra leziunii cutanate.

Chitosanul sub formă de hidrogel produce hemostază, oprind complet sângerarea și accelerând efectul vindecării răni (Loke *et al.*, 2000). Moleculele de chitosan induc o migrare a celulelor inflamatorii și fibroblaștilor, stimulând producerea de citokine și vindecarea răni. Mai mult, Ueno și colaboratorii (1999) au arătat că vindecarea răni la câini cu ajutorul chitosanului stimulează nu numai migrarea și proliferarea fibroblaștilor, ci și producția de collagen de tip III.

De asemenea, includerea agenților antimicrobieni în materialele polimerice pentru vindecarea rănilor este o strategie experimentală testată, care s-a dovedit eficientă (Pranoto *et al.*, 2005). Noi am inclus, ca element de noutate, agenți antimicrobieni naturali, reprezentați de extractul hidroalcoolic de propolis, extract hidroalcoolic de sunătoare și ceapă.

Este confirmată, de asemenea, eficiența unguentului de propolis pentru tratamentul arsurilor țesutului cutanat și pentru promovarea debridării leziunii și a producerii fibrelor de colagen. Producerea colagenului este un fapt confirmat și prezenta cercetare, în care s-a testat eficiența unor materiale noi, reprezentate de hidrogeluri din polimer natural și extracte naturale, respectiv propolis în două concentrații și un hidrogel propolis-extract hidroalcoolic vegetal obținut din amestecul a 7 plante, asupra leziunilor de tip excizie circulară. Rezultatele hidrogelului în care a fost încorporată o cantitate mai mare de propolis s-au dovedit a fi superioare din punct de vedere clinic și, de asemenea, din punct de vedere al colagenizării, știut fiind că un dezechilibru în sinteza colagenului sau absența acestuia poate compromite rezultatul final (Coelho *et al.*, 2002). Într-un studiu asupra animalelor de laborator, utilizarea unguentului de propolis a condus la vindecarea mai rapidă a leziunilor decât tratamentul convențional cu argint sulfadiazină (Gregory *et al.*, 2008). De asemenea, a fost raportată posibilitatea tratării leziunilor de tip arsură cu propolis în studiile clinice (Fearnley, 2001). Interesant este faptul că, în cazul includerii propolisului în hidrogelurile de polimer, s-a obținut o colagenizare favorabilă procesului de regenerare și cicatrizare, spre deosebire de utilizarea simplă a propolisului, acest lucru putând fi explicat prin eliberarea treptată a substanțelor terapeutice ale propolisului din rețeaua hidrogelului polimeric. De altfel, în studiile noastre anterioare am găsit că utilizarea propolisului asupra eritemului cutanat induce o activitate de hipercolagenizare (Andrițoiu *et al.*, 2012, Andrițoiu și Popa, 2014), în timp ce utilizarea propolisului în leziuni deschise cu pierdere de substanță nu induce o astfel de activitate. Aceste observații ne conduc către ideea că propolisul acționează diferit asupra stimulării procesului de colagenizare, dependent de tipul leziunii. Astfel, propolisul stimulează procesul de colagenizare marcantă în leziunile fără pierderea soluției de continuitate și o colagenizare normală, în sensul procesului de vindecare, atunci când propolisul este utilizat asupra leziunilor cu pierderea soluției de continuitate sau pierdere de substanță, așa cum este cazul prezentului studiu.

Ceea ce aduce în plus studiul nostru este formularea hidrogelului prin încorporarea propolisului în el, cu obținerea unor rezultate bune din punct de vedere al contracției rănii și al timpului de vindecare. Un al doilea element de noutate constă în încorporarea propolisului într-un hidrogel polimeric și testarea acestuia asupra leziunilor realizate prin excizie chirurgicală.

Rezultatele bune le putem atribui atât noului material alcătuit dintr-un polimer natural, eliberării treptate și constatărea principiilor active din propolis, cât și caracteristicilor specifice ale produsului apicol utilizat care provine dintr-o zonă subcarpatică nepoluată.

În ceea ce privește contracția răni, rezultatele studiului nostru arată că includerea extractului de propolis în materialul polimeric (loturile F2 și F3) determină o mai bună contracție a răni comparativ cu hidrogelul din chitosan-gelatină. De asemenea, evaluând cele două hidrogeluri în care s-a încorporat propolis, se observă că cel ce are o mai mare cantitate de propolis determină o contracție mai accentuată față de cel ce are în compoziție doar 10% propolis, fapt explicat prin creșterea capacității de colagenizare a propolisului direct proporțional cu concentrația acestuia la nivelul leziunii, cu stimularea forțelor tensoare la nivel dermic, ceea ce conduce la închiderea leziunii mai rapid. Includerea extractului vegetal pare să acționeze sinergic, suportiv în activitatea propolisului.

În ceea ce privește numărul de limfocite în teritoriul prelevat pentru examenul anatomopatologic, în câmp microscopic cu obiectiv de 40, se observă faptul că preparatele obținute de la loturile tratate cu hidrogelurile F1 și F2 prezintă cel mai mare număr de limfocite, în corelație direct proporțională cu vasele de regenerare (angiogeneza) la nivelul situsului lezional, ceea ce demonstrează refacerea structurii arhitecturale a țesutului cutanat. Preparatele obținute de la loturile tratate cu propolis, respectiv hidrogelul cu chitosan-gelatină-propolis 20% determină prezența unui număr egal de limfocite, mai mic decât pentru loturile tratate cu hidrogelurile cu chitosan-gelatină, respectiv chitosan-gelatină-propolis 10%, acest fapt arătând că, probabil, propolisul în cantitate mai mare eliberat la locul înjuriei determină o activitate inflamatorie mai scăzută (hidrogel 3).

De asemenea, se remarcă o cantitate crescută a fibroblastelor pentru lotul martor, lot la care cicatricea rezultată este mai pregnantă decât la celelalte loturi tratate cu hidrogeluri. La lotul hidrogel 1, hidrogel 3 și propolis s-a observat microscopic un număr aproximativ similar de fibroblaste. S-a ridicat întrebarea de ce numărul de fibroblaste este diferit pentru loturile aflate în studiu. Știut este faptul că, după faza inflamatorie caracterizată prin migrarea secvențială a leucocitelor la nivelul plăgii, urmează faza fibroblastică. În timpul acestei faze se sintetizează fibrele proteice de colagen, când rezistența și integritatea plăgii sunt asigurate nu numai de cantitatea sintetizată, ci și de legăturile încrucișate dintre fibre și depunerile de colagen și alte proteine ale matricei extracelulare. Faza fibroblastică este caracterizată prin deplasarea macrofagelor la nivelul leziunii, urmată de atragerea fibroblastelor care repară ulterior leziunea prin producerea matricei de țesut conjunctiv (Cohen și Diegelman, 1992). Evaluarea numărului

de fibroblaste, cu numărul crescut de fibroblaste găsit la lotul martor, ne conduce cu gândul că lotul martor se află într-o perioadă de vindecare în urma loturilor tratate. Bazat pe acest raționament, putem spune că loturile tratate cu hidrogel care are în compoziție o mai mare cantitate de propolis sau tratate cu propolis ca atare, se găsesc într-o perioadă de vindecare mai avansată.

Având în vedere că traumatismele și arsurile sunt responsabile pentru incapacitatea de muncă mai mulți ani decât în cancer, boli cardiovasculare sau accidente vasculare la un loc (Warden și Heimbach, 2005), rezultă de aici importanța cercetărilor efectuate, îngrijirea leziunilor cutanate fiind realmente una dintre preocupările de prim ordin ale cercetării și practicii clinice. Mai mult, rezultatele pozitive obținute din punct de vedere clinic și microscopic, în profunzimile structurale ale arhitecturii țesutului cutanat, cu refacerea celulară, alături de rezultatele contracției plăgilor, recomandă utilizarea hidrogelurilor obținute în tratamentul leziunilor cu pierdere de substanță. S-a observat că cele 4 hidrogeluri preparate, pe lângă buna aderență la suprafața leziunii, exercită și un efect hemostatic, efect observat în prima zi a producerii leziunii.

Un alt element de noutate este adus de obținerea unui hidrogel cu aplicație dermică, preparat prin încorporarea unui amestec de extracte hidroalcoolice din 7 produse vegetale (*Plantaginis folium*, *Hippophaë fructus*, *Allii cepae bulbus*, *Calendulae flos*, *Bardanae folium*, *Hyperici herba*, *Millefolii herba*), în combinație cu tinctura de propolis 20%, în baza de chitosan-gelatină. Am utilizat extractele hidroalcoolice și nu extractele uleioase din 2 motive: datorită gradului mare de solubilitate a uleiurilor esențiale și a compușilor fenolici în apă și alcool și datorită necesității includerii acestor extracte în hidrogeluri. Este posibil ca utilizarea pentru obținerea acestui hidrogel a extractului hidroalcolic de propolis în cantitate de 20% și a extractului vegetal fitoterapic într-o proporție similară, prin aportul crescut de principii active, sinergice, cu eliberare treptată să asigure procesul reparator eficient.

Deși nu face obiectul prezentului studiu, care dorește să evalueze eficiența unor hidrogeluri pe bază de chitosan-gelatină, propolis și extracte vegetale, remarcăm efectul pe care acestea îl au asupra foliculului pilos. Observăm că în cazul utilizării tincturii de propolis sau a hidrogelului cu tinctură de propolis 20%, foliculii piloși sunt, în medie, de 2-3 pe câmp în obiectiv de 40. Este de remarcat că, în cazul utilizării hidrogelului 1 (hidrogel chitosan-gelatină) și a hidrogelului 2 (hidrogel chitosan-gelatină-propolis 10%) sunt observați 4-5 foliculi pe câmp în obiectiv de 40. Interesant este de discutat și corelat această informație cu alte rezultate

obținute de noi asupra cercetărilor efectelor produselor apiterapice asupra dermului (Andrițoiu *et al.*, 2011a, Andrițoiu *et al.*, 2011b; Andrițoiu *et al.*, 2012).

CAPITOLUL 11

OBȚINEREA, CARACTERIZAREA ȘI TESTAREA UNOR FILME DE TIP COMPLEX INTERPOLIMERIC CA SUPORT PENTRU INCLUDEREA DE PRICIPII FITO- SI APITERAPICE CU APLICAȚII LA NIVELUL ȚESUTULUI CUTANAT

Un alt tip de suport polimeric sintetizat cu scopul de a-l utiliza pentru includerea principiilor fito- și apiterapice l-a constituit filmele de tip complex interpolimeric. Ele au fost obținute din două amestecuri de polimeri naturali : gelan-carboximetil celuloză, complexate final cu chitosan, respectiv gelen-carageenan, complexate final cu chitosan. Principiul obținerii lor este simplu: au mai fost obținute două tipuri de filme simple, pe bază de Gel, respectiv Ch – necomplexate, pornind de la 30 ml soluție polimeri, cu concentrația de 1%. Soluția a fost supusă evaporării lente timp de 2 zile, după care filmul a putut fi desprins cu ușurință din vasul Petri și s-a păstrat pentru analiza ulterioare.

Se obține mai întâi filmul pe bază de polizaharide anionice, care apoi este imersat în soluția de polizaharid cationic – chitosanul. Prin interacția ionilor de semn contrar de pe catena celor două categorii de polizaharide se obține final un material, tot sub formă de film, de tip complex interpolimeric.

Dintre cele două categorii de filme polimerice sintetizate, cel pe bază de gelan-carageenan complexat cu chitosan nu a prezentat stabilitate mecanică satisfăcătoare, dezintegrându-se în etapa de încărcare cu extractele fito- și apiterapice. În consecință, cercetările ulterioare au fost realizate doar pe filmul din amestec de gelan și carboximetil celuloză complexat ulterior cu chitosan.

După încărcarea filmelor cu principiile biologic active din extracte (extracte fito- și apiterapice) s-a procedat la evaluare cinetică de eliberare a acestora *in vitro*. Încărcarea filmelor cu principii active (extracte fito- și apiterapice) se face din faza de obținere a filmului pe bază de polizaharide anionice. Au fost utilizate pentru încărcare două tipuri de soluții conținând principii active, și anume: tinctură de propolis (soluție alcoolică – etanol) de propolis conținând mai multe principii active, din care majoritar este acidul p-cumaric, a cărui concentrație inițială determinată prin HPLC este de 1.516,119 μg/ml; extract de brusture, soluție alcoolică (etanol) conținând dominant acid clorogenic ca principiu activ, în concentrație de 339,06 μg/ml (determinată prin HPLC). Și în acest caz, anterior utilizării, extractul a fost concentrat prin evaporare lentă a alcoolului la o temperatură moderată (30°C) până la reducerea volumului la ¼ din cel inițial. În aceste condiții, concentrația acidului clorogenic în extract a devenit 1.356,24 μg/ml.

11.1. Studiul cinetic al eliberării unor principii active din filmele de tip complex polielectrolitic pe bază de gelan-carboximetil celuloză și chitosan.

După cum s-a precizat în capitolele anterioare, tinctura de propolis conține o multitudine de principii biologice active, cu rol terapeutic în tratarea mai multor afecțiuni printre care și cele ale dermei. În compoziția sa, acidul *p*-cumaric (APC) apare în cea mai mare proporție, analiza prin HPLC a tincturii de propolis utilizată în experimentele noastre confirmând acest lucru. Structura APC – derivat *p*-hidroxilic al acidului cinamic - ilustrată în Figura 29.

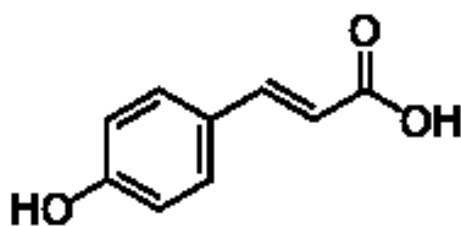


Figura 39. Structura chimică a acidului *p*-cumaric **Figura 40.** Structura chimică a acidului clorogenic.

Fiind un compus din categoria fenolilor, APC posedă proprietăți antioxidante reducând astfel riscul de apariție a cancerului la stomac (Ferguson *et al.*, 2005) prin reducerea formării de nitrozamine carcinogene (Kikugawa *et al.*, 1983). Totodata, APC din mierea de albine și-a demonstrat *in vitro* activitatea sa anti-inflamatorie.

Extractul de brusture conține, de asemenea, numeroși compuși cu acțiune biologică importantă, unul dintre aceștia, care se regăsește în cantități importante, fiind acidul clorogenic – ACG. ACG este un compus chimic natural, din clasa derivaților fenolici - respectiv esterul acidului cafeic -, structura sa fiind prezentată în Figura 30.

ACG este un important intermediar biosintetic, având și importantă acțiune antioxidantă și antiinflamatorie.

În cercetările noastre am realizat două formulări sub formă de filme polimerice de tip complex polielectrolitic pe bază de polizaharide ionice, în care am inclus tinctura de propolis, respectiv extractul de brusture, urmărind capacitatea acestor sisteme de a elibera APC, respectiv ACG *in vitro* în condiții care simulează aplicarea dermică a acestora.

11.1.1. Cinetica eliberării in vitro a acidului p-cumaric.

După cum s-a precizat în protocolul privind obținerea filmelor de tip complex polielectrolitic încărcate cu tinctură de propolis, la componentele inițiale polimerice ale filmului s-au adăugat 2 ml tinctura de propolis concentrată (6064,76 $\mu\text{g/ml}$ APC), astfel încât cantitatea totală de APC introdusă, și care se regăsește final în masa filmului a fost de 12.129,52 μg APC

Suprafața filmului de polimer încărcat cu APC obținut după 2 zile de evaporare lentă a apei și urmelor de alcool etilic, cu aspect absolut omogen, este de 78,5 cm^2 . Pentru studiul eliberării s-a decupat din acest film (din zona centrală, presupusă a fi cea mai omogenă) un pătrat cu latura de 1 cm, deci cu suprafața de 1 cm^2 , care s-a plasat apoi pe membrana biologică (piele de găină special tratată), între cele două compartimente ale celulei Franz.

Cantitatea de APC din filmul analizat :

78,5 cm^2 12.129,5 μg APC

1,0 cm^2 **154,5 μg APC**

Cantitatea totală de APC ce se poate elibera este, deci, de **154,5 μg .**

Volumul total al rezervorului colector (inferior) al celulei Franz este de **4,723 cm^3 .**

La intervale de timp diferite au fost prelevate volume de 25 μl soluție conținând APC eliberat, trecut prin membrană. Acest volum a fost diluat la 3 ml (cu apă distilată) și soluția rezultată a fost analizată din punct de vedere al valorii absorbantei, la lungimea de undă de 327 nm Absorbanța determinată a permis stabilirea concentrației APC din cei 3 ml, pe baza curbei de etalonare prezentată la capitolul 5 dedicat materialelor și metodelor.

Pe baza ecuației curbei de etalonare, cunoscând absorbanta s-a calculat valoarea concentrației soluției de APC analizată ($\mu\text{g/ml}$). Amplificând cu 3, s-a stabilit cantitatea de APC din volumul de soluție rezultat din cei 25 μl de soluție prelevată din rezervorul colector al celulei Franz, diluată la 3 ml. Deoarece volumul total al rezervorului colector al celulei este de 4,723 ml, prin amplificarea valorii rezultată anterior cu 189 (raportul dintre 4,723/0,025) a rezultat cantitatea totală de APC eliberată, care a traversat membrana biologică și s-a acumulat în rezervorul celulei Franz. Rezultatele obținute sunt sumarizate în Tabelul 60.

Experimentul a încetat după 36 ore, când s-a ajuns practic la eliberarea totală a APC din film (154,5 μg). Reprezentarea grafică a curbei de eliberare este redată în Figura 41.

Tabelul 60. Rezultatele experimentale privind eliberarea APC încapsulat din tinctura de propolis în filme de tip complex polielectrolitic

Durata (h)	Absorbanța	Concentrația APC în cei 3 ml analizați, c_{APC} ($\mu\text{g/ml}$)	Cantitatea de APC din cei 3 ml analizați (provenind din cei 25 μl prelevați), m_{APC} (μg)	m_{APC} total eliberat din film (în cei 4,723 ml) (μg)
1	0,002	0,0068	0,0204	4,536
2	0,005	0,0169	0,0507	9,583
3	0,026	0,0880	0,264	49,896
4	0,030	0,1015	0,3045	57,55
5	0,036	0,1218	0,3654	69,061
6	0,045	0,1523	0,4569	83,3541
7	0,056	0,1895	0,5685	107,447
8	0,061	0,2064	0,6912	130,637
9	0,070	0,2369	0,7107	134,322
24	0,077	0,2606	0,7818	147,760
36	0,0807	0,2734	0,8201	154,01

Analizând alura curbei de eliberare se poate constata prezența a trei segmente. Primul dintre acestea, până la durata de 2 ore, indică o acumulare lentă a APC în rezervorul colector al dispozitivului Franz. Efectul este datorat, probabil, faptului că penetrarea membranei biologice de către apa din rezervorul inferior al celulei către filmul încărcat cu APC, precum și invers, când fluidul încărcat cu APC revine în rezervorul inferior, este necesară a perioadă mai îndelungată de timp.

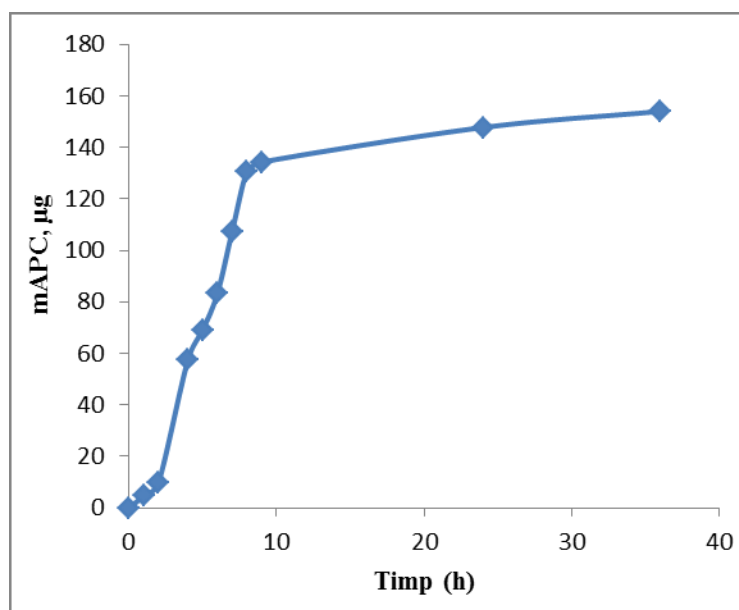


Figura 41. Curba cinetică de eliberare in vitro a APC din filmele de tip complex interpolimeric.

După ce membrana a fost traversată în cele două sensuri de primele volume de fluid, se instalează un regim staționar, difuzia medicamentului în ambele sensuri realizându-se cu aceeași viteză, evident mai ridicată decât în stadiile inițiale. Este interesant faptul că pe acest segment al curbei de eliberare se instalează, practic, o cinetică de ordin "zero", ideală pentru sistemele cu eliberare controlată la care se dorește instaurarea unei viteze constante a procesului. După 9 ore, când ACP s-a eliberat în proporție de 87% procesul de eliberare, devine mai lent și evoluează din nou conform unei cinetici de ordin "zero" până la eliberarea practic totală a ACP încapsulat.

Se impune remarcat, în concluzie, faptul că eliberarea ACP din formularea realizată, în condiții care simulează procesul *in vivo* durează peste 36 ore, ceea ce sugerează că sisteme de acest tip, aplicate pe locul leziunii cutanate, pot elibera cel puțin o zi și jumătate principiul activ, fără a necesita aplicare mai frecventă, deci conceptul care a stat la baza acestei cercetări se confirmă.

11.1.2. Cinetica eliberării in vitro a acidului acidului clorogenic

În protocolul privind obținerea filmelor de tip complex polielectrolitic încărcate cu extract de brusture, s-a precizat că la componentele inițiale polimerice ale filmului s-au adăugat 2 ml extract de brusture concentrat (1.356,24 μg/ml ACG), astfel încât cantitatea totală de ACG introdusă, și care se regăsește final în masa filmului a fost de 2.712.48 μg ACG.

Urmând același raționament ca în cazul ACP, rezultă că în filmul cu suprafața de 1 cm² analizat, se găsește o cantitate de 34,64 μg ACG.

Studiul procesului de eliberare s-a făcut conform aceluiași protocol experimental ca în cazul ACP, rezultatele obținute fiind sumarizat în Tabelul 61.

Curba de eliberare construită pe baza acestor rezultate este ilustrată în Figura 42 ?

Analizând curba cinetică de eliberare, se poate observa o alură asemănătoare celei obținute în cazul ACP. Primul segment al curbei are însă o pantă mult mai mare, fiind practic continuat de segmentul de până la 9 ore.

Se poate afirma că procesul de eliberare a ACG pe o durată de 9 ore decurge practic după o cinetică bine controlată, de ordin "zero", fiind eliberat un procent de 46,5% din compusul imobilizat în film.

Tabelul 61. Rezultatele experimentale privind eliberarea ACG încapsulat din extractul de brusture în filme de tip complex polielectrolitic

Durata (h)	Absorbanța	Concentrația ACG în cei 3 ml analizați, c_{APC} ($\mu\text{g/ml}$)	Cantitatea de ACG din cei 3 ml analizați (provenind din cei 25 μl prelevați), m_{ACG} (μg)	m_{ACG} total eliberat din film (în cei 4,723 ml) (μg)
1	0,002	0,0023	0,006818	1,2886
2	0,003	0,0034	0,0102	1,9330
3	0,005	0,00568	0,0170	3,2216
4	0,007	0,0079	0,0239	4,510
5	0,011	0,0125	0,0375	7,0875
6	0,014	0,0159	0,0477	9,0205
7	0,019	0,0216	0,0648	12,2420
8	0,021	0,0239	0,0716	13,5307
9	0,025	0,0284	0,0852	16,108
24	0,033	0,0375	0,1125	21,2625
36	0,040	0,04545	0,1364	25,7727
48	0,046	0,0523	0,1568	29,6386

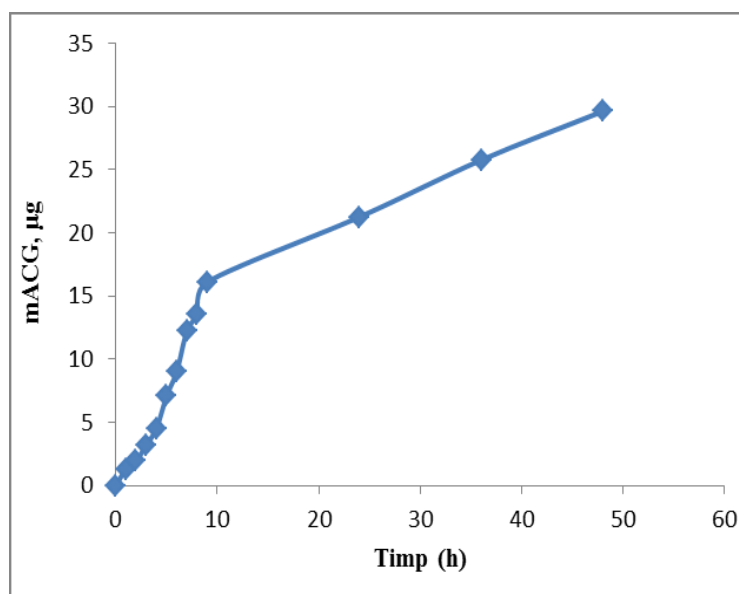


Fig. 42. Curba cinetică de eliberare in vitro a ACG din filmele de tip complex interpolimeric.

Procesul continuă tot cu viteză constantă, dar mai redusă de această dată, până la durată de 48 ore când a fost întrerupt, datorită degradării accentuate a membranei biologice. Eficiența de eliberare a ACG după 48 ore este de 85,5%.

Explicația eliberării cu eficiență mai coborâtă a ACG comparativ cu APC, este legată, probabil, de solubilitatea mai coborâtă a primului în apă bidistilată, dată fiind molecula sa mai mare și prezența celor doi radicali hidrocarbonați, determinând o hidrofobicitate mai ridicată. Însă dimensiunea mai mare a moleculei de ACG poate determina o difuzie mai lentă a compusului prin rețeaua densă a filmului de hidrogel.

Se poate însă afirma că și în cazul ACG putem vorbi de un proces de eliberare a principiului activ susținut, cu o cinetică bine controlată, și cu certitudine în condiții *in vivo* procesul poate continua peste durata de 48 ore, până la eliberarea totală a ACG.

Acizii hidroxicinamici (cafeic, ferulic și p-cumaric) prezintă activități biologice și farmacologice, care includ activitatea antioxidantă. Acidul p-cumaric (4-hidroxicinnamic acid) (3-[4-hidroxiphenil]-2-propenoic acid) este derivat din aminoacizi aromatici și servește ca precursor pentru biosinteza multor metaboliți secundari, cum ar fi polifenoli, flavonoide (Santos *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 2015). Acidul p-cumaric este un derivat hidroxil al acidului cinamic și poate fi găsit într-o mare varietate de alimente, cum ar fi alune, boabe de orz, fasole *bleumarin*, roșii, morcovi, usturoi și miere. De asemenea, este prezent în vin și oțet în cantități semnificative (Mao *et al.*, 2013; Quinde-Axtell *et al.*, 2006). Este unul dintre compușii fenolici care se consumă zilnic de către majoritatea populației la nivel mondial, prin aportul lor dietetic de rutină. Cercetările demonstrează că acidul p-cumaric și derivații săi posedă un spectru larg de activități biologice, cum ar fi: antioxidante și antumorale (Peng *et al.*, 2015), efect antimelanogenic (Song *et al.*, 2011), protector dermic UVB (Seok și Boo, 2014).

Acidul clorogenic (acid 3-O-cafeoilquinic) este compus din acidul chinic și acid cafeic (Qi *et al.*, 2011). Acidul clorogenic (GCA) este un antioxidant polifenolic distribuit pe scară largă în fructe precum mere, pere, fructe de pădure, prune și legume, cum ar fi cartofi dulci, salata verde, spanac, boabe de cafea, ceai (Zhenga și Clifford, 2008).

Inhibă recrutarea de neutrofile, astfel că poate fi util pentru tratamentul proceselor inflamatorii care prezintă infiltrat inflamator celular și edem (Venkatesha *et al.*, 2011) inhibă afluxul de leucocite (Zhang *et al.*, 2010), fiind un potențial compus analgezic antiinflamator (El-Medany *et al.*, 2013).

Similar cu alți compuși fenolici, acidul clorogenic protejează plantele împotriva diverșilor agenți stresori din mediu. Acidul clorogenic are numeroase izoforme (Farah *et al.*, 2008). Prezintă activitate farmacologică: antimicrobiană (Qi *et al.*, 2011), antiinflamatoare (Shin *et al.*, 2015), antioxidantă (Nallamuthu *et al.*, 2015), radioprotectivă (Cinkilic *et al.*, 2013).

CONCLUZII GENERALE

CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE PE CARE LE DESCHIDE STUDIUL

Concluzii privind testarea unguentelor pe bază de produse apiterapice

1. Unguentul apiterapic pe bază de propolis, miere, lăptișor de matcă și apilarnil, prezintă efect cicatrizant și reepitelizant asupra leziunilor cu pierderea soluției de continuitate (model experimental de tip incizie), asupra leziunilor cutanate cu pierdere de substanță (modelului experimental de tip excizie cutanată) și a leziunilor termice de tip arsură (model experimental de tip arsură).
2. Evaluarea macroscopică a leziunilor epidermice pentru lotul tratat cu unguent *total apiterapice* (care a presupus înglobarea celor 4 produse apicole, respectiv propolis, miere, apilarnil și lăptișor de matcă), a demonstrat eficacitatea tratamentului cu noul unguent care conține produse apicole. Vindecarea completă a avut loc după șase zile de tratament, în cazul modelului experimental de tip incizie, cu reușirea vizualizării liniei fine de cicatrizare numai detectând în prealabil zona cicatrizată de prelevare bioptică. Debridarea crustei s-a produs în cazul modelelor experimentale de tip excizie și arsura termică, după 9 zile de tratament, cu vindecarea completă la 12 zile de tratament, timpul necesar pentru reepitelizare a țesutului cutanat fiind mult mai scurt decât în alte studii.
3. Leziunile cutanate cu pierdere de substanță, pentru loturile tratate cu unguentele pe bază de produse apicole, au evoluat cu o cicatrice matură, suplă, pliabilă. Lotul netratat a prezentat o cicatrice rigidă, hipertrofică. De asemenea, vascularizația, prin procesul de angiogeneză pus în evidență de examenul anatomo-patologic, a fost reluată, rezultatul final funcțional și, de asemenea, și estetic fiind satisfăcător.
4. Preparatele apiterapice prezintă bune rezultate cicatrizante important, susținute clinic și histologic, asupra leziunilor cutanate de tip incizie (fără fir de sutură), excizie cutanată și a leziunilor termice de tip arsură și, care în plus prezintă un timp de vindecare redus, sunt cele care s-au bazat pe încorporarea în baza de unguent a mierii și a propolisului.
5. Preparatul utilizat, asigură prezența sinergică a principiilor apiterapice cu efect cicatrizant și regenerator celular și tisular; conțin principii active cu proprietăți bactericide, antimicrobiene, antifungice, antiinflamatoare; conțin principii active cu efect antioxidant; conțin compuși cu acțiune tonifiantă, biostimulatoare și care asigură elasticitatea și flexibilitatea țesutului cutanat.
6. Utilizarea apilarnilului asupra leziunilor dermice reprezintă un alt nou și valoros element de originalitate, în literatura de specialitate, internațională, nefiind raportată vreo lucrare în acest

sens. Rezultatele obținute în cadrul prezentului studiu, în ceea ce privește contracția răni, a epitelizării și a colagenizării normale a țesutului cutanat sunt considerabile.

7. Unguentul pe bază de propolis prezintă cel mai bun rezultat în ceea ce privește contracția răni în ziua a 9-a a experimentului, iar în ziua a 12-a a experimentului cel mai bun rezultat în ceea ce privește aria de epitelizare a leziunii de tip excizie.
8. Din punct de vedere reologic, unguentele apiterapice formulate au demonstrat o bună capacitate de etalare la nivelul pielii dar și o bună stabilitate structurală.

Concluzii privind testarea unguentelor pe bază de produse fitoterapice

9. Unguentul fitoterapic care a inclus extractul total de plante (*Plantaginis folium*, *Hippophaë fructus*, *Allii cepae bulbus*, *Calendulae flos*, *Bardanae folium*, *Hyperici herba*, *Millefolii herba*) a avut efect cicatrizant și reepitelizant asupra leziunilor de tip incizie, excizie și arsură termică.
10. Leziunile cutanate cu pierdere de substanță au evoluat cu o cicatrice matură, suplă, pliabilă. Lotul netratat a prezentat o cicatrice rigidă, hipertrofică. De asemenea, vascularizația, prin procesul de angiogeneză pus în evidență de examenul anatomo-patologic, a fost reluată, rezultatul final funcțional și, de asemenea, și estetic fiind satisfăcător.
11. În leziunile de tip incizie și excizie, pentru lotul tratat cu bază de unguent, ce a presupus amestecul de lanolină și vaselină farmaceutică în părți egale, se constată numeroase celule gigante de corp străin (la resturile de keratină rezultate în urma ulcerăției ulcerăției). În excizie, în plus se remarcă prezența de limfocite și congestie vasculară
12. Un efect favorabil, similar cu unguentul total fitoterapic a prezentat și unguentul pe bază de brusture (*Arctium lappa*), atât în ceea ce privește contracția răni cât și a rezultatelor histologice favorabile.
13. De asemenea lotul tratat cu unguent pe bază de gălbenele prezintă efecte favorabile, mai evidente începând cu ziua a șasea de tratament, acesta situându-se pe locul al treilea în ceea ce privește procesul de vindecare.
14. Un lucru de semnalat, mai ales pentru preparatele cosmetice este faptul că lotul tratat cu unguentul pe bază de brusture (*Arctium lappa*), cu certe efecte terapeutice în ceea ce privește vindecarea leziunilor pielii, a prezentat rădirea firelor de păr, ceea ce-l poate face util în cremele de corp ce au ca efect stoparea creșterii firelor de păr nedorite.
15. Din punct de vedere reologic, unguentele fitoterapice formulate au demonstrat o bună capacitate de etalare la nivelul pielii dar și o bună stabilitate structurală.

16. Ceea ce aduce nou acest studiu este utilizarea în premieră a extractului hidroalcoolic și uleios de brusture și de coada șoricelului, utilizate asupra leziunilor cutanate. Un alt element de originalitate este utilizarea sinergică a efectului unor extracte vegetale.

Concluzii privind testarea unguentelor pe bază de polimeri naturali

17. Unguentul polimeric pe bază de collagen a avut efect cicatrizant și reepitelizant asupra următoarelor tipuri de leziuni: de tip incizie – cu pierderea soluției de continuitate, leziuni cu pierdere de substanță – excizie și leziunilor termice de tip arsură.
18. Includerea chitosanului într-o bază de unguent s-a dovedit eficientă în tratarea leziunilor, acesta manifestând efecte de regenerare normală a țesutului cutanat, prin stoparea efectelor de degenerescență vacuolară, exocitoză și paracheratoză. De asemenea prezintă efect antiinflamator și rezultate favorabile asupra collagenizării și maturizării țesutului de granulație.
19. Unguentul polimeric a avut efect cicatrizant și reepitelizant asupra următoarelor tipuri de leziuni: de tip incizie – cu pierderea soluției de continuitate, leziuni cu pierdere de substanță – excizie și leziunilor termice de tip arsură.
20. Unguentul polimeric formulat a prezentat ca acțiune farmacologică, efect cicatrizant pentru leziuni de tip incizie, leziuni cu pierdere tegumentară și arsuri termice, formarea unui film protector; hemostază asupra țesuturilor vii, răni, plăgi, proliferare celulară prin proprietatea de a genera un țesut nou.
21. Din punct de vedere reologic, unguentele polimerice au demonstrat o mai bună bună stabilitate structurală, decât cele pe bază de produse apiterapice și fitoterapice.

Concluzii privind testarea unguentelor pe bază de principii apiterapice, fitoterapice și polimeri

22. Unguentul de testare pe bază de produse apiterapice, fitoterapice și polimeri naturali a obținut rezultate foarte bune în ceea ce privește contracția rănii încă din ziua a 6-a de tratament.
23. Pentru toate unguentele de testare, ce conțin compuși cu efect terapeutic, la ziua a 9-a contracția rănii era finalizată.
24. Cele mai bune rezultate atât în ceea ce privește contracția cât și aria de cicatrizare au fost obținute de unguentul ce a presupus includerea produselor apicole, extractelor vegetale și a polimerilor naturali.
25. În ziua a 9-a, pentru incizie și în ziua a 12-a pentru excizie și arsură termică, procesul de reepitelizare a fost terminat, cu etalarea unui epiteliu nou format, fără urme de cicatrice pentru toate tipurile de leziuni.

26. Din punct de vedere reologic unguentele care au inclus toate cele trei componentele au demonstrat o bună etalare la nivelul pielii și ceea ce este de remarcă este faptul că se menține buna stabilitate determinată de polimerii naturali incluși.

Concluzii privind reologia unguentelor

27. Succesul formulării unui produs pe piață depinde de performanțele utilizării acestuia. O formulare corectă a ingredientelor permite produsului să curgă ușor din recipient (pragul de tensiune τ_0), care să nu permită sedimentarea particulelor solide în timpul depozitării, să aibă o stabilitate bună (vâscozitatea la forfecare zero) și o bună capacitate de etalare (comportament pseudoplastic). Aceste caracteristici determină formarea unui film uniform pe suprafața pielii cu aplicații în medicină și în eliberarea controlată de medicamente. Pe baza informațiilor obținute din testele reologice efectuate se poate realiza monitorizarea calității și se poate prezice comportamentul produsului.

Concluzii privind testarea unor hidrogeluri polimerice încărcate cu extracte fito- și apiterapice

28. Cele patru filme, din material polimeric, polimer-propolis în două procente diferite și polimer-propolis-extracte vegetale au avut efect favorabil asupra procesului de contracție, cicatrizare și reepitelizare, obținându-se rezultate foarte bune asupra procesului de colagenizare în cazul filmelor în care s-a încorporat propolis, rezultate bune pentru filmele din polimer natural în ceea ce privește lipsa edemului. Toate cele patru filme au dovedit o bună toleranță cutanată.
29. Ceea ce este cel mai important este faptul că leziunile cutanate cu pierdere de substanță au evoluat cu o cicatrice matură, suplă, pliabilă. Lotul netratat a prezentat o cicatrice rigidă, hipertrofică. De asemenea, vascularizația, prin procesul de angiogeneză pusă în evidență de examenul anatomo-patologic, a fost reluată, rezultatul final funcțional și, de asemenea, și estetic fiind satisfăcător.
30. Pansamentele utilizate sub formă de filme, în cazul leziunilor obținute prin excizie cutanată au produs hemostază, au absorbit exudatul și au facilitat refacerea epidermului. Filmele utilizate au înlocuit funcția țesutului excizat, protejând rana de pierderile de proteine și de fluide și prevenind invazia bacteriană.

Concluzii privind testarea unor filme polimerice de tip complex polielectrolitic încărcate cu extracte fito- și apiterapice

31. Rezultatele obținute confirmă ipoteza de plecare, respectiv faptul că încărcarea de principii active din extracte de tipul tincturii de propolis, respectiv extractului de brusture, și prin extrapolare și din alte extracte alcoolice din produse naturale, în filme polimerice pe bază de

polizaharide – recunoscute ca fiind biocompatibile și fără a genera produși toxici prin biodegradare -, poate constitui o alternativă viabilă la obținerea de sisteme de eliberare controlată/susținută de principii active cu aplicații în tratarea afecțiunilor dermice.

32. Filmele polimerice obținute și testate asupra leziunilor cutanate au manifestat un efect bun asupra cicatrizării și a formării unui nou epiteliu aflat în curs de maturizare. Notabil filmul 1, care presupune existența principiilor apiterapice determină o bună colagenizare.
33. Noile unguentele utilizate au demonstrat un cert efect biologic evaluat atât clinic cât și din punct de vedere histologic, însă noile materiale de tip hidrogel și filme polimerice au demonstrat o mai bună eficiență, eficiență care este determinată de eliberarea controlată a principiilor active.

Perspective pe care le deschide teza de doctorat

1. Obținerea și testarea unor noi filme

O primă variantă ar consta în reticularea covalentă a amestecului de chitosan și collagen cu aldehidă glutarică (20% din grupele aminice), urmată de cea ionică cu sulfat de sodiu sau tripolifosfat de sodiu.

A doua variantă ar consta în coreticularea covalentă a amestecului de chitosan, collagen și albumină, în prezența unui activator de reacție (carbodiimida). Similar se vor obține filmele încărcate cu principii active-care se vor introduce de la început în soluția de polimeri supusă reticulării.

2. Obținerea de noi particule—suport pentru încapsularea de principii fito- și apiterapice

Obținerea de particule de gelan, respectiv de complex polielectrolitic gelan-chitosan printr-un proces de extrudare a soluțiilor de polimeri într-o baie de coagulare ce conține diferiți policaioni (Ca^{2+} , Mg^{2+}) care vor produce reticularea ionică.

3. Includerea extractelor vegetale și a produselor apicole în particulele optime din punct de vedere al caracteristicilor fizice și morfologice. Se pot aplica două tehnici de includere a extractelor apifitoterapice în particulele polimerice. *Prima metodă* se referă la includerea lor direct în procesul de obținere a particulelor. *A doua metodă* ar putea consta în obținerea prealabilă a particulelor, după care acestea se încarcă cu principiile active prin difuzie, forța motrice fiind determinată de gradientul de concentrație

4. Testarea *in vivo* a noilor sisteme polimer-principii fito/apiterapice pe animale de experiență

Bibliografie selectivă

- Akkol EK, Süntar I, Keles H, Yeşilada E. The potential role of female flowers inflorescence of *Typha domingensis* Pers. in wound management. *J Ethnopharmacol* 2011; 133: 1027-1032.
- Al-Waili N, Saloom K. Effects of topical honey on post-operative wound infections due to gram positive and gram negative bacteria following caesarean sections and hysterectomies. *Eur J Med Res* 1999; 26: 126-130.
- Andrițoiu CV, Popa M. New natural biocompatible materials with application in wound-healing. Saarbrücken (Germany): *Lambert Academic Publishing*, 2014.
- Andrițoiu CV, Prisăcaru AI, Andriescu C, Popa IM. Evaluation of the efficacy of some bee products upon the chemically induced cutaneous erythema in wistar rats. *Ann. RSCB* 2012b; XVII(1): 258-264.
- Andrițoiu CV, Prisăcaru AI, Negrilă A, Popa IM, Hurdud N. *Unguent cicatrizant apiterapic. Efecte cicatrizante și reepitelizante ale unguentului pe bază de compuși apiterapici*. Compendiul Conferinței Internaționale de Terapii Complementare și Alternative, Arad: *Ed. Tiparnița*, 2011a; 21-34.
- Andrițoiu CV, Prisăcaru AI, Negrilă A, Popa IM, Hurdud N. Unguent cicatrizant polimeric. Efecte cicatrizante și reepitelizante ale unguentului pe bază de polimeri naturali – principii apiterapice. Compendiul Conferinței Internaționale de Terapii Complementare și Alternative, Arad: *Ed. Tiparnița*, 2011b; 34-42.
- Antiszko M, Braczko M, Grzybowski J, Jethon J. A comparative examination of the hemostatic properties of xenogenic collagen biomaterials. *Polim. Med.* 1995; 25(3-4): 37-45.
- Baumann L, Vujevich J, Halern M, Martin LK *et al.* Open-label pilot study of alitretinoin gel 0,1% in the treatment of photoaging. *Cutis* 2005; 76: 69-73.
- Baxter RM, Dai T, Kimball J, Wang E, Hamblin MR, Wiesmann WP, McCarthy SJ, Baker SM. Chitosan dressing promotes healing in third degree burns in mice: gene expression analysis shows biphasic effects for rapid tissue regeneration and decreased fibrotic signaling. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2013; 101: 340-348.
- Busilacchi A, Gigante A, Mattioli-Belmonte M, Manzotti S, Muzzarelli RAA. Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers* 2013; 98(1): 665-676.
- Choi YS, Lee SB, Hong SR, Lee YM, Song KW, Park MH. Studies on gelatin-based sponges. Part III: a comparative study of cross-linked gelatin/alginate, gelatin/hyaluronate and chitosan/hyaluronate sponges and their application as a wound dressing in full-thickness skin defect of rat. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2001; 12: 67-73.
- Cinkilic N, Cetintas SK, Zorlu T *et al.* Radioprotection by two phenolic compounds: chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes in vitro. *Food Chem Toxicol* 2013; 53: 359-363.
- Coelho MCOC, Carrazoni PG, Monteiro VLC, Melo FAD *et al.* Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea (Biopolymer produced from cane sugar for skin healing). *Acta Cir Bras* 2002; 17: 11-13.
- Cohen IK, Diegelmann RE, Lindblad WJ. Wound healing. Biomechanical and clinical aspects. Philadelphia: *WB Saunders*, 1992.
- Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG. Estrogen receptor α and β from heterodimers on DNA. *J Steroid Biochem* 1997; 272: 19858-19862.
- Csupor D, Blazso G, Balogh A, Hohmann J. The traditional Hungarian medicinal plant *Centaurea sadleriana* Janka accelerates wound healing in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2010; 127: 193-195.
- Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9: 857-879.
- Efstratiou E, Hussain AI, Nigam PS, Moore JE, Ayub MA, Rao JR. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 2012; 18: 173-176.
- El-Medany AM, Bassiouni YA, Khattab MM, Mahesar AA. Chlorogenic acid as potential anti-inflammatory analgesic agent. *Clinical Therapeutics* 2013; 35: 98.
- Faria RL, Cardoso LM, Akisue G, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AO, Santos Júnior PV. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis*, *Camellia sinensis* and chlorhexidine against the adherence of microorganisms to sutures after extraction of unerupted third molars. *J. Appl. Oral Sci.* 2011; 19(5): 476-482.
- Fearnley J. Bee propolis: natural healing from the hive. Using propolis to treat disease. London: Souvenir Press, 2001.
- Ferguson LR, Shuo-tun Z, Harris PJ. Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29. *Molecular Nutrition & Food Research* 2005; 49 (6): 585-693.
- Freinkel RK. Carbohydrate metabolism of epidermis. In: Biology of the skin. Freinkel RK, Woodley D (eds.). London: Parthenon Publishing Group, 2001; 452-454.
- Gilchrest BA. Treatment of photodamage with topical tretinoin: an overview. *J Amer Acad Dermatol* 1997; 36: S27-S36.

- Gregory SR, Piccolo N, Piccolo MT, Piccolo MS, Heggers JP. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. *J Altern Complement Med* 2008; 8: 77-83.
- Hafezi F, Rad EH, Naghibzadeh B, Nouhi A, Naghibzadeh G. *Actinidia deliciosa* (kiwifruit), a new drug for enzymatic debridement of acute burn wounds. *Burns* 2010; 36: 352-355.
- Huang S, Fu X. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. *J. Controlled Release* 2010; 142: 149-59.
- Ishihara M, Nakanishi K, Ono K, Sato M *et al.* Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and acceleration in healing process. *Biomaterials* 2002; 23: 833-840.
- Ito T, Yoshida C, Murakami Y. Design of novel sheet-shaped chitosan hydrogel for wound healing: A hybrid biomaterial consisting of both PEG-grafted chitosan and crosslinkable polymeric micelles acting as drug containers. *Materials Science and Engineering* 2013; C33: 3697-3703.
- Jayakumar R, Prabakaran M, Kumar S, Nair SV, Furuie T, Tamura H. Novel chitin and chitosan materials in wound dressing. In: Laskovski AN (Ed.). *Biomedical Engineering, Trends in Materials Science*. In Techpress, 2011; 1-22.
- Kikugawa K, Hakamada T, Hasunuma M, Kurechi T. Reaction of p-hydroxycinnamic acid derivatives with nitrite and its relevance to nitrosamine formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1983; 1(4): 780-78.
- Kumar D, Kumar A, Prakash O. Potential antifertility agents from plants: a comprehensive review. *J. Ethnopharmacol.* 2012; 140, 1-32.
- Leonida MD, Banjade S, Vo T, Anderle G, Haas GJ, Philips N. Nanocomposite materials with antimicrobial activity based on chitosan. *Int. J. Nanobiomat* 2011; 3: 316-334.
- Li X, Nan K, Li L, Zhang Z, Chen H. *In vivo* evaluation of curcumin nanoformulation loaded methoxy poly(ethylene glycol)-graft-chitosan composite film for wound healing application. *Carbohydrate Polymers* 2012; 88: 84-90.
- Loke WK, Lau LK, Lim LY, Khor E, Chow KS. Wound dressing with sustained anti-microbial capability. *J Biomed Mater Res* 2000; 53: 8-17.
- Lukic M, Jaksic I, Krstonosic V, Cekic N, Savic S. A combined approach in characterization of an effective w/o hand cream: the influence of emollient on textural, sensorial and *in vivo* skin performance. *International Journal of Cosmetic Science* 2012; 34(2): 140-149.
- Mao W, Schuler MA, Berenbaum MR. Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013; 110: 8842–8846.
- Murakami K, Aoki H, Nakamura S, Nakamura SI, Takikawa M, Hanzawa M, Kishimoto S, Hattori H, Tanaka Y, Kiyosawa T, Sato Y, Ishihara M. Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. *Biomaterials* 2010; 31: 83.
- Naeini TRM, Shafiei N, Tabandeh MR, Oryan A, Nazifi S. Effects of topical application of *Calendula officinalis* gel on collagen and hydroxyproline content of skin in rats. *Comp Clin Pathol* 2012; 21: 253-257.
- Nallamuthu I, Devi A, Khanum F. Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property, retained antioxidant activity and enhanced bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015; 10 203-211.
- Nand P, Drabu S, Gupta R. *In vitro* antibacterial and antioxidant potential of medicinal plants used in the treatment of acne. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2012; 4(1): 185-190.
- Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, Wakitani S, Iwasa J. Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J. Bone Joint Surg.* 2002; 34: 28-32.
- Okuma CH, Andrade TAM, Caetano GF, Finci LI, Maciel NR, Topan JF, Cefali LC, Polizello ACM, Carlo T, Rogerio AP, Spadaro ACC, Isaac VLB, Frade MC, Rocha-Filho PA. Development of lamellar gel phase emulsion containing marigold oil (*Calendula officinalis*) as a potential modern wound dressing. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015; 71, 62-72.
- Parente LM, Lino, Junior Rde S, Tresvenzol LM, Vinaud MC, de Paula JR *et al.* Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 375671.
- Patil RS, Ghormade V, Deshpande MV. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb Tech* 2000; 26(7): 473-483.
- Paul W, Sharma CP. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs* 2004; 18(1): 18-23.
- Peng W, Wu JG, Jiang YB, Liu YJ, Sun T, Wu N, Wu CJ. Antitumor activity of 4-O-(2"-O-acetyl-6"-O-p-coumaroyl- β -D-glucopyranosyl)-p-coumaric acid against lung cancers via mitochondrial-mediated apoptosis. *Chemico-Biological Interactions* 2015; 233: 8-13.
- Piana GP. Albinele și produsele apicole. În: Produsele stupului, hrană, sănătate, frumusețe. București: Ed. Apimondia 1989, 153-158.

- Pranoto Y, Rakshit SK, Salokhe VM. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT-Food Sci Technol* 2005; 38(8): 859-865.
- Qi W, Zhaob T, Yang WW, Wang GH, Yu H, Zhao HX, Yanga C, Sun LX. Comparative pharmacokinetics of chlorogenic acid after oral administration in rats. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2011; 1(4): 270-274.
- Quinde-Axtell Z, Baik BK. Phenolic compounds of barley grain and their implication in food product discoloration. *J. Agric. Food. Chem.* 2006; 54: 9978-9984.
- Rodriguez A, Kildegaard KR, Li M, Borodina I, Nielsen J. Establishment of a yeast platform strain for production of p-coumaric acid through metabolic engineering of aromatic amino acid biosynthesis. *Metabolic Engineering* 2015; 31: 181-188.
- Santos CNS, Koffas M, Stephanopoulos G. Optimization of a heterologous pathway for the production of flavonoids from glucose. *Metab. Eng.* 2011; 13, 392-400.
- Sell SA, Wolfe PS, Garg K, McCool JM, Rodriguez IA, Bowlin GL. The use of natural polymers in tissue engineering: a focus on electrospun extracellular matrix analogues. *Polym. Adv. Technol.* 2010; 2: 522-553.
- Seok JK, Boo YC. 40 - UVB irradiation of keratinocytes increases the release of stratifin that stimulates matrix metalloproteinase-1 expression in fibroblasts whereas p-coumaric acid counteracts the effect of UVB. *Free Radical Biology and Medicine* 2014; 76, 1, S29.
- Serarslan G, Altuğ E, Kontas T, Atik E, Avcit G. Caffeic acid phenetyl ester accelerates cutaneous wound healing in a rat model and decreases oxidative stress. *Clin Exp Dermatol* 2007; 32: 709-715.
- Shin HS, Satsu H, Bae M *et al.* Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. *Food Chem* 2015; 168:167-175.
- Song K, An SM, Kim M, Koh SK, Boo YC. Comparison of the antimelanogenic effects of p-coumaric acid and its methyl ester and their skin permeabilities. *Journal of Dermatological Science* 2011; 63, 1, 17-22.
- Tanideh N, Tavakoli P, Saghiri MA, Garcia-Godoy F, Amanat D, Tadbir AA *et al.* Healing acceleration in hamsters of oral mucositis induced by 5-fluorouracil with topical *Calendula officinalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013; 115(3): 332-8.
- Thierry B, Merhi Y, Silver J, Tabrizian M. Biodegradable membrane - covered stent from chitosan-based polymers. *J Biomed Mater Res Part A* 2005; 75(3): 556-566.
- Ueno H, Yamada H, Tanaka I, Kaba N *et al.* Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials* 1999; 20: 1407-1414.
- Upadhyay NK, Kumar R, Mandotra SK, Meena RN, Siddiqui MS, Sawhney RC, Gupta A. Safety and healing efficacy of Sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) seed oil on burn wounds in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2009; 47: 1146-1153.
- Venkatesha SH, Berman BM, Moudgil KD. Herbal medicinal products target defined biochemical and molecular mediators of inflammatory autoimmune arthritis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2011; 19, 21-29.
- Wang QZ, Chen XG, Liu N, Wang SX, Liu CS, Meng XH, Liu CG. Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. *Carbohydr Polym* 2006; 65: 194-201.
- Warden G, Heimbach D. *Arsurile*. În: Schwartz (ed.). *Principiile chirurgiei*, vol. 1, ed. a 7-a. București: Ed. Teora, 2005; 227-269.
- Yang C, Zhou Y, Zhang X, Huang X, Wang M, Han Y *et al.* A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel for wound healing. *Carbohydr Polym* 2010; 82: 1297-305.
- Zhang H, Nean SH. *In vitro* degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials* 2001; 22(12): 1653-1658.
- Zhang W, Zhong D, Liu Q, Zhang Y, Li N, Wang Q, Liu Z, Xue W. Effect of chitosan and carboxymethyl chitosan on fibrinogen structure and blood coagulation. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2013; 24: 1549-1563.
- Zhang X, Huang H, Yang T, Ye Y, Shan J, Yin Z, Luo L. Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Injury* 2010; 41: 943-949.
- Zhenga W, Clifford MN. Profiling the chlorogenic acids of sweet potato (*Ipomoea batatas*) from China. *Food Chem* 2008; 106: 147-152.

DISEMINAREA REZULTATELOR ȘTIINȚIFICE OBTINUTE IN CADRUL TEZEI DE DOCTORAT

Lucrări publicate în reviste cu coeficient de impact (ISI)

1. **Călin Vasile Andrițoiu**, Anca Niculina Cadinoiu, Anca Irina Prisăcaru, Doina Mihailă, Marcel Popa, Ionel Marcel Popa, New natural biocompatible materials with applications in wound-healing obtained by an environmentally friendly technology, *Environmental Engineering and Management Journal* 2015, 14 (9):2177-218.
2. Prisăcaru AI, **Andrițoiu Călin Vasile**, Andriescu C, Hăvârneanu EC, Popa M, Sava A, Evaluation of the wound-healing effect of a novel *Hypericum perforatum* ointment in skin injury, *Romanian Journal of Morphology and Embriology*, Rom J Morphol Embryol 2013, 54(4):1053–1059.
3. Drăganescu D, C. Ibănescu, B.I. Tamba, **Călin Vasile Andrițoiu**, G. Dodi, M.I. Popa, Flaxeed lignin wound healing formulation: characterization and *in vivo* therapeutic evaluation, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 72:614-623.

Lucrări publicate în reviste BDI

4. Călin Vasile Andrițoiu, Marilena Bartic, Corina Andriescu, Marcel Ionel Popa, TREATMENT WITH LYOPHILIZED-ALBUMIN ON CUTANEOUS EXCISION LESIONS, *Annals of R.S.C.B.*, vol XIX, Issue 1, 2015, 1-6.
5. Călin Vasile Andrițoiu, Marilena Bartic, Doina Mihailă, Marcel Ionel Popa, CUTANEOUS INCISION WOUNDS TREATED WITH LYOPHILIZED-ALBUMIN OINTMENT, *Annals of R.S.C.B.*, vol XIX, Issue 3, 2015, 41-45.

Lucrări publicate în reviste cu ISSN

6. **Andrițoiu Călin Vasile**, Andrițoiu Vasile, Tincu Camelia E, Spătăreanu Alina, Popa Marcel. Polimeri naturali utilizați în formulările pentru tratamentul leziunilor cutanate, *Jurnal de Medicină Integrativă și Terapii Complementare*, vol I, nr 1, 2015, 87-104.

Cărți publicate

1. Călin V Andrițoiu, Marcel Popa, **NEW NATURAL BIOCOMPATIBLE MATERIALS WITH APPLICATIONS IN WOUND-HEALING**, Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, Germania, 2014.

Participări la manifestări științifice.

Internaționale

1. Conferința Internațională de Terapii Complementare și Alternative – Anatecor, ediția XX, 2016.
2. Ciubotariu Diana, Ghiciuc Cristina Mihaela, Tarțău (Mititelu) Liliana, Andrițoiu Călin Vasile, Lupușoru Cătălina Elena, **Zinc Reduces Morphine Dependence with No Effect on Pain Perception in Rats - Possible Beneficial Role of Zinc Supplementation in Opioid-Users**, poster [EFIC5-0781], 9th Congress of the European Pain Federation, EFIC® (EFIC 2015), Vienna, Austria, September 2-5 (poster – Friday, September the 4th).
3. Conferința Internațională de Terapii Complementare și Alternative – Anatecor, Arad, ediția XIX , 2015.
4. Conferința Internațională de Terapii Complementare și Alternative – Anatecor, Arad, ediția XVIII , 2014.
5. Conferința Internațională de Terapii Complementare și Alternative – Anatecor, Arad, ediția XVI , 2013.

Naționale

6. Andrițoiu Călin Vasile, Cristina Lungu, Propolisul, produs apicol și medicament utilizat din cele mai vechi timpuri, Conferința Deontologia cercetării științifice – Istoric și perspective), Editura „Gr. T. Popa, U.M.F., Iași, 2014, 13-21, ISBN 978-606-544-219-1.
7. Cristina Lungu, Sabina Ioana Cojocar, Călin Vasile Andrițoiu, Surse vegetale de acid α -linolenic cu potențial terapeutic, Deontologia cercetării științifice, Editura „Gr. T. Popa, U.M.F., Iași, 2014, 283-290, ISBN 978-606-544-219-1.

Produse notificate sau în curs de notificare – Institutul de Bioresurse Alimentare

1. Dosar de notificare pentru produsul apiterapic **Centaure I**.
1. Dosar de notificare pentru produsul **Centaure II**.
2. Dosar de notificare pentru produsul apiterapic **Ares**.
3. Dosar de notificare pentru produsul apiterapic **Apiaregenerator**
4. Dosar de notificare pentru produsul api-fitoterapic **Apimontana**
5. Dosar de notificare pentru produsul **Apiary Rezveratrol**.
6. Dosar de notificare pentru produsul **Tinctură de propolis**.
7. Dosar de notificare pentru produsul apicol **Baton de propolis**.
8. Dosar de notificare pentru produsul **Apiciocolată**.

LUCRĂRI ÎN PREGĂTIRE

1. **Andrițoiu Călin Vasile**, Cristina Lungu, Constanța Ibănescu, Marcel Popa, *The effects of plant extracts on skin lesions* (în curs de finalizare).
2. **Andrițoiu Călin Vasile**, Marilena Bartic, Maricel Danu, Marcel Popa, *The effects of bee products on cutaneous lesions of incision, excision and thermal burn* (în curs de finalizare).
3. **Andrițoiu Călin Vasile**, Marilena Bartic, Constanța Ibănescu, Marcel Popa, *The effects of natural polymers in skin lesions* (în curs de finalizare).
4. **Andrițoiu Călin Vasile**, Marilena Bartic, Maricel Danu, Doina Mihăilă, Hăvârneanu Cornel, Marcel Popa, *The synergistic effect of some plant extracts, bee products and natural polymers with applications in wound cutaneous lesions* (în curs de finalizare).
5. **Călin Vasile Andrițoiu**, Andriescu C, Sava A, Popa M, *New dermal biocompatible formulation containing apitherapy, phytoterapy and natural polymer products, Romanian Journal of Morphology and Embriology* (în curs de finalizare).
6. **Călin Vasile Andrițoiu**, Marcel Popa, Lăcrămioara Ochiuz, Doina Mihăilă, Marcel Ionel Popa, *The Therapeutic Effect of Some Dermal Formulation with Bee Products* (în curs de finalizare).

CĂRȚI ÎN PREGĂTIRE

1. Andrițoiu Călin Vasile, Lungu Cristina, Popa Marcel, **NEW NATURAL FITOTERAPEUTIC EXTRACT OF PLANTS WITH APPLICATION IN SKIN LESIONS**, Lambert Academic Publishing, Saarbrucken, Germania.
2. Andrițoiu Călin Vasile, Bartic Marilena, Popa Marcel, **NEW NATURAL APITERAPIC AND POLIMERIC FORMULATIONS WITH APPLICATION IN SKIN LESIONS**, Lambert Academic Publishing, Saarbrucken, Germania.