

**VALORIFICAREA REZIDUURILOR DIN VINIFICATIE CA ADITIVI
ALIMENTARI SI ANTIOXIDANTI IN INDUSTRIE**

**DEZVOLTARE LA NIVEL DE LABORATOR A UNUI PRODUS REGENERATOR
DERMO-EPIDERMIC, PRIN VALORIFICAREA UNEI ASOCIERI INOVATIVE
INTRE COMPLEXE ACTIVE DIN DESEURI SI EXTRACTE VEGETALE**

Director proiect : CS I, Prof. Univ. Dr. Natalia Rosoiu



Membru titular al Academiei Oamenilor de Știință din Romania

RAPORT INTERMEDIAR iulie 2019

CSIII. Dr. Laura Olariu - Membru Asociat AOSR



REZUMATUL PROIECTULUI

Proiectul stiintific **„Dezvoltare la nivel de laborator a unui produs regenerativ dermo-epidermic, prin valorificarea unei asocieri inovative intre complexe active din deseuri si extracte vegetale”** este o continuare a proiectului: **„Valorificarea reziduurilor din vinificatie ca aditivi alimentari si antioxidanti in industrie”**, cu scopul de a concretiza cercetarile efectuate in studii aplicative si tehnologice. Se vizeaza dezvoltarea la nivel de laborator a unui produs / produse originale de uz topic, cu adresabilitate in regenerarea pielii. Activitatile ce converg la realizarea acestui obiectiv se refera la selectia componentelor vegetale in concordanta cu sinergismul si complementaritatea actiunii biologice fata de extractul din reziduuri de vinificatie, caracterizarea analitica a compusilor activi, conditionarea unor variante de gel/ crema/ unguent si alegerea tipului de formulare optim, evaluarea compatibilitatii cu pielea umana si a efectului de produs. Realizarea acestui proiect deschide perspectiva concreta a transferului de cunostinte si tehnologie catre un nivel superior de maturitate si de exploatare, cu valorificarea deseurilor de planta si in mod special a celor rezultate din procesul de vinificatie in produs de uz topic eficient in perturbari ale statusului pielii cu larga incidenta (imbatranire, vindecare rani, etc). Proiectul are, de asemenea, in vedere diseminarea rezultatelor la nivel national si international prin comunicari si publicatii stiintifice.

CUPRINS

INTRODUCERE

**CAPITOLUL I: EXTRACTE VEGETALE CU POTENTIAL ANTIOXIDANT;
COMPLEMENTARITATE STRUCTURA – ACTIVITATE BIOLOGICA PENTRU
COMPUSI NATURALI CU APLICATII TERAPEUTICE LA NIVEL CUTANAT**

**CAPITOLUL II: SCREENING ANALITIC PENTRU IDENTIFICAREA DE
COMPONENTE ACTIVE DIN EXTRACTE VEGETALE DE CASTAN,
GALBENELE SI DESEURI DE STRUGURI**

**CAPITOLUL III: ASOCIERI DE EXTRACTE VEGETALE IN CONCORDANTA CU
ACTIVITATEA ANTIOXIDANTA SI REGENERATOARE SINERGICA
DEMONSTRATA „IN VITRO”**

**III.1. Teste de citocompatibilitate cu celule epidermice si dermice pentru combinatii de
principii active vegetale**

III.2. Evaluarea activitatii antioxidante in sistem acelular

III.3. Evaluarea activitatii antioxidante in sistem dermo-epidermic

III.3.1.Efect antioxidant intrinsec prin stimularea glutationului intracelular

**III.3.2.Efect antioxidant extrinsec prin modularea intracelulara a balantei
oxidative in sisemul radicali liberi oxigenati- enzime oxidative: catalaza si
superoxid-dismutaza**

CONCLUZII

INTRODUCERE

Proiectul stiintific **„Dezvoltare la nivel de laborator a unui produs regenerator dermo-epidermic, prin valorificarea unei asocieri inovative intre complexe active din deseuri si extracte vegetale”** este o continuare a proiectului: **„Valorificarea reziduurilor din vinificatie ca aditivi alimentari si antioxidanti in industrie”**, cu scopul de a concretiza cercetarile efectuate in studii aplicative si tehnologice.

Fundamentarea stiintifica a mecanismelor implicate in regenerarea pielii si patologii dermatologice conexe cu componenta pro-inflamatorie si hiperproliferativa a stat la baza evidentierii unor efecte singulare si sinergice ale unor componente vegetale din extractul din reziduuri de vinificatie (TES) si extractul de trifoi rosu (ET). In completarea acestora, ne propunem studiul altor doua extracte vegetale, de galbenele si castan, si a asocierii acestora cu extractul din deseuri de struguri, pentru a realiza o mai mare complexitate structurala si in consecinta un potential de activitate biologica amplificat in terapii dermatologice de larga incidenta.

Astfel, in aceasta etapa se va realiza caracterizarea analitica a compusilor activi urmata de un screening antioxidant multivalent, la nivel acelular si celular, pentru extractele de galbenele, castan si deseuri de struguri, singulare si in proportii bine stabilite. Se vor utiliza sisteme experimentale de studiu ale conditiilor pro-inflamatorii asociate unor manifestari patologice distincte: forbol miristat acetat (PMA) – generator de stress oxidativ „in situ” si LPS, un lipopolizaharid bacterian ce mimeaza inflamatia asociata invaziei microbiene.

Se va defini astfel sinergismul si complementaritatea actiunii biologice fata de extractul din reziduuri de vinificatie, ceea ce, impreuna cu rezultatele din etapele anterioare ale proiectului si cu teste ulterioare privind turn-overul celular si proteic dermo-epidermic, vor orienta formularea unui produs de uz topic cu efect regenerator cutanat, cu efecte conexe in perturbari pro-inflamatorii (rani, arsuri, dermatite, micoze, etc) si hiperproliferative cutanate (melanom).

CAPITOLUL I: EXTRACTE VEGETALE CU POTENTIAL ANTIOXIDANT; COMPLEMENTARITATE STRUCTURA – ACTIVITATE BIOLOGICA PENTRU COMPUSI NATURALI CU APLICATII TERAPEUTICE LA NIVEL CUTANAT

Plantele sintetizeaza compusi organici clasificati in metaboliti primari si secundari. *Metabolitii primari* au un rol esential in fotosinteza, respiratie, crestere si dezvoltare. Exemplificam: fitosterolii, lipidele acilate, nucleotidele, aminoacizii, acizii organici. Metabolitii secundari se pot acumula doar in anumite specii, avand rol strict determinat in anumite functii, cum ar fi: protectia plantei fata de infectiile microbiene, atragerea polenizatorilor, protectia UV, fixarea azotului. Acestia reprezinta noi surse naturale pentru obtinerea de medicamente, antibiotice, insecticide, ierbicide. Metabolitii secundari se clasifica in trei mari grupe, in functie de biosinteza lor:

- compusi fenolici- flavonoidici si non-flavonoidici;
- compusi triterpenoidici
- alcaloizi cu azot sau cu sulf

Se pot mentiona urmatoarele clase de substante cu impact la nivelul fiziologiei umane, utilizate in medicina traditionala, cu efecte certe demonstrate prin tehnici performante de screening celular: **compusii fenolici**: flavonoide: flavone, izoflavone, proantociani; si non-flavonoidici: acizi polifenolici, stilbeni, chalcone; **saponine**: steroidice si triterpenice cu agliconii corespunzatori; **poliacetilene**; **pigmenti** – carotenoidici, clorofilieni, etc. [1].

COMPUSI FENOLICI

Compusii fenolici au cel putin un inel aromatic cu una sau mai multe grupari hidroxil atasate. Sunt compusi larg raspanditi in lumea vegetala, fiind descrise peste 8 000 de structuri fenolice. Structura compusilor fenolici poate fi simpla, de la compusi cu masa moleculara mica, cu un singur inel aromatic, pana la taninuri complexe, polimerice. Compusii fenolici pot fi clasificati dupa numarul si aranjamentul atomilor de carbon, gasindu-se de obicei conjugati cu zaharuri sau acizi organici. Astfel, se poate face o subclasificare in substante flavonoidice si non-flavonoidice.

Flavonoide - pigmenti fenolici care contin in molecula lor un heterociclu piranic sau furanic condensat cu un inel benzenic cu grupari hidroxilice, ceea ce determina caracterul fenolic al acestor pigmenti. Pigmentii flavonoidici sunt glicozide fenolice, solubile in apa. Flavonoidele sunt implicate in diverse procese celulare: protectia UV, pigmentarea, stimularea fixarii azotului si rezistenta la boli si posedă un spectru vast de activitate

farmaceutică, fiind considerate agenți antioxidanți, antialergeni, vasodilatatori, anticancerigeni etc. Astfel, studii de laborator epidemiologice și clinice [2] realizate în scopul determinării gradului de fotoprotecție al pielii față de radiațiile solare UV au evidențiat efectul chemopreventiv al polifenolilor din plante [3]. O largă varietate de polifenoli au fost studiați pentru a se evidenția efectul lor fotoprotector și anume: polifenoli din ceaiul verde, proantocianii din vita de vie, resveratrolul, silimarina și genisteina în inflamațiile induse de radiațiile UV, stresul oxidativ și dezorganizarea ADN-ului. Studii realizate pentru evidențierea mecanismelor la nivel celular în care sunt implicate flavonoidele, [4] au arătat efectele acestora în: inhibiția activării pro-carcinogenilor, inhibiția proliferării tumorale, moartea selectivă prin apoptoză, inhibiția metastazelor și a angiogenezei, activarea răspunsului imun față de celulele canceroase, modularea cascadei proceselor inflamatorii și rezistenței la medicamente.

Flavanii (cromanii) sunt pigmenți care derivă de la flavan (2-fenil-benzopiran, croman). Ei au în moleculă un inel benzopiranic. La vița de vie se găsesc atât sub formă de monomeri (semințe și pielea boabelor) și dimeri (în pulpa boabelor) cât și sub formă de oligomeri [5]. Au tendință de polimerizare și formează catechine care intră în constituția taninurilor catechinice. Majoritatea reprezentanților sunt de culoare galbenă sau sunt incolore, nu au miros, se dizolvă puțin în apă.

Flavonele sunt pigmenți galbeni care derivă de la 2-fenil-benzopironă (2-fenilcromonă) și respectiv de la 3-fenil-benzopironă (3-fenil-cromenă). În natură, flavonele și izoflavonele se găsesc, de obicei, sub formă de glicozide. Se cunosc peste o sută de flavone care se găsesc în flori, fructe, frunze, în lemn și scoarța copacilor. Dintre flavonele mai răspândite, fac parte apigenina, luteolina și quercetina. Flavonele prezintă în ultraviolet două sau trei benzi de absorbție caracteristice. Ele protejează în organism oxidarea vitaminei C și a adrenalinei. Absorb radiațiile ultraviolete și protejează citoplasma și clorofila de aceste radiații. Se găsesc în cantitate mai mare în plantele tropicale și în cele din regiuni montane și alpine. Flavonoidele au o largă utilizare la nivel topic datorită următoarelor efecte: prevenirea oxidării lipidelor, stimularea proliferării fibroblastilor, reducerea diminuării colagenului, și inhibiția 5α -reductazei. De exemplu, din *Sophora Japonica* s-a extras bioflavonoidul rutin cu efecte de reglare a permeabilității și de atenuare a fragilității capilarelor. De asemenea, rutinul previne distrugerea vitaminei C din organism, prin oxidare, repară țesutul conjunctiv și capilarele, oferă o barieră de protecție față de infecții.

Izoflavonele sau compuşii estrogen-like- au un efect asemănător cu al estrogenilor endogeni. Conform unor cercetări recente [6] estrogenii steroidici endogeni protejează

dezvoltarea, diferentierea și supraviețuirea celulelor. Numeroase studii clinice estimează siguranța și eficacitatea extractelor obținute din trifoi roșu pentru tratamentul simptomelor menopauzei, hiperlipidemie, osteoporoză și cancer de prostată. Izoflavonele inhibă creșterea anumitor linii celulare tumorale [7] inclusiv a adenocarcinomului de prostată. Genisteina a fost studiată ca având efect protector față de stresul oxidativ al radiației ultraviolete, atât în studii *in vitro* dar și *in vivo*, după administrare în dietă [8]. Beneficiile ce pot deriva prin aplicarea topică a compozițiilor cosmetice sunt superioare celor ce se pot obține prin ingestia sistemică a acestor substanțe active datorită biodisponibilității și a posibilității de asociere cu alte componente naturale cum sunt fosfolipidele, sitosterolii și saponinele pentru anumite efecte (antioxidante, diferentiere celulară). Absența efectelor secundare nedorite recomandă izoflavonele în aplicații topice pentru prevenirea îmbătrânirii pielii, apariției celulitei, pierderea părului.

Taninurile vegetale sunt substanțe polifenolice (derivați ai 3-hidroxi-flavanului sau poliesteri ai acidului galic) solubile în apă, cu gust astringent, care se combină cu alcaloizii și cu proteinele, formând combinații impermeabile și imputrescibile. Frunzele soiurilor de viță de vie pentru vin roșu sunt foarte bogate în taninuri din grupul catechinelor. Compoziția taninurilor în frunze depinde de faza de dezvoltare a plantei dar și de localizarea lor la nivelul acesteia. Toamna, catechina și galocatechina pot fi găsite în frunze [9]. În organismul vegetal, taninurile joacă un rol biochimic important. De asemenea, taninurile acționează ca: inhibitori ai peroxidării lipidelor, captatori de radicali liberi, inhibitori ai formării de ion superoxid. Din punct de vedere fiziologic, taninurile sunt considerate factori de apărare ai plantelor împotriva infecțiilor bacteriene și virale, antioxidanți, transportori de hidrogen. Unii autori consideră taninurile substanțe de rezervă pentru organismele vegetale întrucât dispar din semințe în perioada încolțirii.

Antocianii și antocianidinele sunt compuși flavonici. Antocianii sunt pigmenți care derivă de la 2-fenilbenzopirenă (2-fenil-cromenă). Se găsesc în natură de obicei sub formă de glicozide. Legați de o moleculă glucidică, antocianii se găsesc în toate angiospermele la nivelul rădăcinilor, tulpinilor, bulbilor, frunzelor, florilor, fructelor dar pot să apară și la gimnosperme, ferigi, briofite. Antocianii, care conțin doar nucleul fenilbenzopiranic, se numesc antocianidine sau antocianide. La vița de vie, antocianii se găsesc sub formă de pigmenți roșii, în pielea strugurilor (în puține cazuri și în miezul acestora), sub formă de heterozide colorate în roșu (la valori scăzute ale pH-ului) sau albastru (la valori ridicate ale pH-ului) și sunt reprezentați în cea mai mare parte de malvidină, dar se observă și prezența

delfinidinei, peonidinei și petunidinei. În strugurii roșii și negri, cantitatea de antocianidine este cuprinsă între 0,7-1,1 mg/100g.

Proantocianii si proantocianidinele sunt compusi flavonoidici incolori care formeaza cu acizii minerali antocianidine. Primele proantocianidine au fost extrase din struguri negri necopti, struguri albi copti si din frunzele tinere de *Vitis vinifera*. S-a stabilit ca proantocianii au actiune anti-radicali liberi de 20 ori mai activa decat vitamina E si de 50 de ori mai mare decat vitamina C. Proantocianii actioneaza sinergic cu vitamina C imbunatatind absorbtia acesteia. Astfel, proantocianidinele pot fi utilizate pentru efectele de protejare a capilarelor [10], protectia pielii si ca inhibitori de elastaza [11]. De asemenea, proantocianii prezinta o incredibila abilitate de a mentine structura colagenului. Aceasta se realizeaza prin doua mecanisme: unul prin care protejeaza antitripsina-1 substanta ce actioneaza asupra enzimelor ce determina scaderea colagenului, elastinei si acidului hialuronic, deci actiune directa. Al doilea mecanism presupune neutralizarea peroxidarii lipidice a membranelor celulare prin radicalii liberi.

Compusi non- flavonoidici-Stilbenii. Stilbenii sunt substanțe chimice ce fac parte din grupa fenolilor ne flavonoici. **Resveratrolul**, reprezentant al stilbenilor, este o fitoalexina produsa de plante ca răspuns la infecții cu fungi, la concentrații mari de ioni ai metalelor grele, la razele ultraviolete sau la leziuni fizice. Această substanță prezinta o cu acțiune puternică antitumorală si antioxidantă. Resveratrolul a fost izolat pentru prima dată în anul 1940, dar atenția necesară din partea cercetătorilor a venit abia după anul 1992 când prezența lui în vin a explicat calitățile cardio-protective ale vinului. Resveratrolii (3,5,4 "-trihidroxistilben) sunt fitoalexine polifenolice produse cu ajutorul enzimei stilben-sintetaza, biosintetizati de vița de vie pentru a se apăra în infecțiile cu *Botrytis cinerea*. Se prezintă sub forma a doi izomeri geometrici: cis și trans.

Saponine. Saponinele sunt larg raspandite in lumea vegetala, trei din patru specii contin saponine; in plantele cultivate predomina componentele triterpenice, de tip acid oleanolic, in timp ce saponinele steroidice spirostanolice, tip digitogenina, sunt de obicei gasite in ierburi sau in plantele medicinale. Impartirea in saponine neutre si acide se datoreaza prezentei gruparii carboxilice in unele saponine triterpenice sau a acizilor uronici care participa ca rest glucidic la constructia unui numar mic de saponine triterpenice [12]. Marea complexitate a structurii saponinelor deriva din variabilitatea structurii agliconului, natura lantului glucidic precum si pozitia atasamentului la aglicon. Experimentele ce au demonstrat proprietatile farmacologice, imunologice si fiziologice ale saponinelor au determinat cresterea interesului pentru aceste clase de metaboliti [12]. Experimente de eficacitate a tratamentului

insuficientei venoase cu diferite saponine si sapogenine separate din *Hippocastanum semen* si *Hedera helix* au fost realizate in vitro prin inhibitia enzimelor specifice. Astfel, doar sapogeninele din *Hedera helix*- hederagenina si acidul oleanolic- au prezentat valori comparabile a inhibitei non-competitive a hialuronidazei, dependenta de concentratie. Acelasi comportament l-au avut si fata de elastaza. Constituentii din *Aesculus hippocastanum* au inhibat doar hialuronidaza, cel mai important efect avandu-l saponina escina. Genina escinolul a fost mai putin activ [13]. Un studiu realizat [14] in urma separarii a 10 glicozide triterpenice-calendulozide- dintre care 5 compusi noi- si a 5 glicozide flavonoidice izolate din florile de galbenele asupra activitatii farmacologice a acestora a evidentiat capacitatea anti-inflamatorie marcanta a tuturor compusilor- cu exceptia unuia singur si efectul citotoxic foarte puternic a doua glicozide triterpenice pe diferite linii celulare de cancer uman: colon, leucemie, melanom. Semintele și coaja *A. hippocastanum* au fost utilizate pe scară largă în medicina tradițională europeană încă din secolul al XVI-lea. În prezent, extractele de castan (HCE), escina, o saponina pura și esculina, o cumarină glucozidata, sunt încă utilizate pe scară largă în practica clinică, în principal pentru tratamentul insuficienței venoase cronice periferice (CVI). Datorită efectului asupra permeabilității capilare, HCE și escina au găsit o aplicație în domeniul cosmetic. În plus, esculina este raportată ca avand activitate microvasculocinetică și este indicată pentru tratamentul neatractivității, cum ar fi celulita și pierderea părului. Mai recent, proantocianidina A2, un dimer catehic izolat din coaja, a arătat un efect protector interesant împotriva daunelor provocate de UV, în principal datorită proprietăților sale foarte puternice antioxidante. Extractul de *A. hippocastanum* a fost utilizate pe scară largă pentru tratamentul insuficienței venoase cronice. În special, semințele sunt utilizate pentru tratamentul hemoroizilor, ulcerele locale și cancerului. Componenta activa din semințe, β -escin (aescin), este cunoscuta pentru activitatea anti-carcinogenă [13].

Calendula officinalis L. (gălbenele) este nativa din tarile Mediteraneene. Ingredientele active ale florii de calendula sunt saponinele triterpenice (glicozide ale acidului oleanolic), alcoolii triterpenici (a-, p-amirini, faradiol) și flavonoide (quercetin și izoramnetin). Efectele antiinflamatorii ale florilor de galbenele sunt legate la conținutul de flavonoide și derivați triterpenici [15]. Datorită compoziției și valorii lor economice distincte, cultivarea de gălbenele (*C. officinalis*) continuă să crească. Proprietățile terapeutice ale gălbenelelor sunt atribuite gamei variate de substanțe biologice active pe care le conțin [15]. Datorită proprietăților antiinflamatorii, vindecătoare și antiseptice, extractele de *C. officinalis* sunt aplicate extern pentru tratarea ulcerățiilor cutanate, a eczemelor și a conjunctivitelor și pentru a ameliora durerea cauzată de ulcerul și inflamația stomacului. Galbenelele sunt renumite

pentru proprietățile sale antispastice, aperiente, colagogice, diaforetice și vulnerabile. Compușii fenolici (flavonoide și acizi fenolici) și saponinele sunt ambele abundente în galbenele. *C. officinalis* conține, de asemenea, carotenoizi și alcooli triterpenici, atât în formă liberă, cât și în formă esterificată [16] precum și acizi grași polinesaturați, cum ar fi acidul calendenic, care s-a dovedit că au proprietăți inflamatorii in vitro. Galbenelele sunt, de asemenea, caracterizate prin prezența unor policarbohidrați, care sunt solubili în apă și joacă un rol în lipirea tisulară și controlul permeabilității celulare. Alte substanțe identificate în extractele *C. officinalis* sunt proteinele și aminoacizii, hidrocarburile saturate, vitamina C și substanțele minerale [16].

CAPITOLUL II: SCREENING ANALITIC PENTRU IDENTIFICAREA DE COMPONENTE ACTIVE DIN EXTRACTE VEGETALE DE CASTAN, GALBENELE SI DESEURI DE STRUGURI

DETERMINAREA CONTINUTULUI IN FLAVONOIDE EXPRIMAT IN HIDROPEROXIDAZA

1. PRINCIPIUL METODEI

Evaluarea continutului in flavone a extractelor vegetale se realizeaza prin metoda spectrofotometrica ce are la baza reactia agliconului moleculei de hiperozida cu clorura de aluminiu.

2. REACTIVI SI MATERIALE

2.1. REACTIVI

- Solutie hexametilentetramina 5 g/L: se dizolva 0,125 g hexametilentetramina R in apa purificata si se aduce la semn in balon cotat de 25ml cu apa purificata.
- Solutie de acid clorhidric R1, (solutie 250 g/L): se dilueaza 70 g acid clorhidric R la 100 ml cu apa
- Solvent A : Solutie de acid acetic glacial 5% in alcool metilic: 5 ml acid acetic glacial se dilueaza la 100 ml cu alcool metilic R.
- Solutie de clorura de aluminiu 10 % in solvent A: se dizolva 1 g clorura de aluminiu R in solvent A si se aduce la semn in balon cotat de 10ml cu acelasi solvent.
- Acetat de etil (R)
- Acetona (R)
- Sulfat de sodiu anhidru (R)

2.2. MATERIALE

- micropipeta 100-1000 μ l;
- sticlaria clasa A;
- hartie de filtru banda albastra.

3. APARATURA

- Spectrofotometru UV-VIS Lambda 25, PerkinElmer ;
- Balanta analitica electronica, precizie 0,1 mg/ 0,01 mg ;
- Cronometru .

4. DESCRIEREA MODULUI DE LUCRU

Solutia stoc 1: Intr-un balon cu fund plat de 100 ml, se introduc aproximativ 2,0 g extract, 1 ml solutie hexametilentetramina R, 7 ml solutie acid clorhidric R1 si 20 ml acetona R. Amestecul rezultat se refluxeaza timp de 60 minute. Lichidul obtinut se transfera cantitativ intr-un balon cotat de 100 ml si se aduce la semn cu acetona R, prin spalari repetate ale balonului cu fund plat.

Solutia stoc 2: 20 ml din solutia stoc 1, se introduc intr-o palnie de separare, se adauga 20 ml apa purificata si 15 ml acetat de etil R. Stratul de acetat de etil este cel superior. Stratul inferior se transfera intr-o alta palnie si se extrage de inca 2 ori cu cate 15 ml acetat de etil R. Straturile cu acetat de etil reunite se spala de 2 ori cu cate 50 ml apa purificata si se filtreaza prin sulfat de sodiu anhidru R, intr-un balon cotat de 50 ml si se aduce la semn cu acetat de etil R.

Solutia test : Se iau 10 ml din solutia stoc 2, se adauga 1 ml solutie clorura de aluminiu in solventul A si se aduc la balon cotat de 25 ml cu solvent A.

Solutia martor : Se dilueaza 10 ml din solutia stoc 2, la balon cotat de 25 ml cu solvent A.

Dupa 30 minute, se masoara absorbanta solutiei test la lungimea de unda 425 nm fata de solutia martor.

Formula de calcul

$$\text{Continut in flavone, \%} = \frac{A \times 1,25}{m}$$

A= absorbanta probei la lungimea de unda 425 nm

m = masa probei luata in lucru (in g)

1,25 = factor de corectie

5. REZULTATE

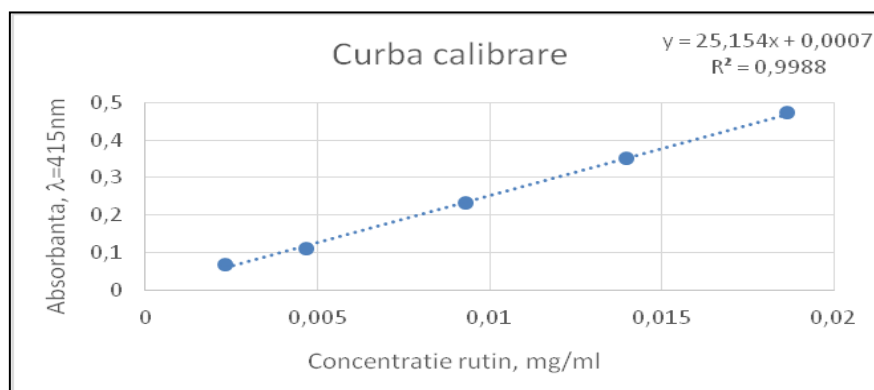


Fig. 1. Curba de calibrare cu solutie de rutin

Extract fluid in propilen glicol	Abs	Concentratie in reactie		Continut total flavonoide raportate la cantitatea de rutin	
				mg/ml extract	gr/100 gr extract
Castan	0,146	0,006	0,119	1,190	0,119
TES	0,1629	0,006	0,133	1,332	0,133
Galbenele	0,287	0,011	0,235	2,353	0,235

DETERMINAREA CONTINUTULUI DE POLIFENOLI TOTALI EXPRESATI IN ACID CAFEIC

1. PRINCIPIUL METODEI

Analiza continutului in polifenoli totali se determina prin metoda spectrofotometrica, bazata pe proprietatea acestor compusi de a reduce fosfowolframatul de sodiu in mediu alcalin, la oxizi de wolfram de culoare albastra. Intensitatea acestor coloratii se determina la lungimea de unda de 660 nm. Concentratia de polifenoli totali se determina pe baza unor curbe de calibrare cu standard extern de acid cafeic.

2. REACTIVI SI MATERIALE

2.1. REACTIVI

- Acid fosfowolframic – solutie (R): 10 g wolfram de sodiu (R), 8 mL acid fosforic (R) si 75 mL apa purificata se refluxeaza timp de 3 ore; dupa racire se completeaza la 100 mL cu apa purificata; Solutia se poate folosi timp de 30 zile daca este pastrata la 2-8°C.
- Solutie de carbonat de sodiu 10%
- Solutie de referinta de acid cafeic 0,01%: 0,01g acid cafeic (s.r.) se dizolva in 20 mL apa purificata, se ultrasoneaza pana la solubilizarea completa a substantei si se completeaza la 100 mL cu acelasi solvent. Solutia se prepara inainte de intrebuintare.

2.2. MATERIALE

- sticlaria de laborator clasa A
- micropipete 20-200µl, 100-1000µl

3. APARATURA

- Spectrofotometru UV-VIS Specord 250 Plus
- Balanta analitica electronica: precizie 0,1 mg/ 0,01 mg
- Cuib de incalzire
- Cronometru
- Baie de ultrasonare

4. DESCRIEREA MODULUI DE LUCRU

Prepararea solutiilor standard: Din solutia standard stoc de acid cafeic 0,01% se dilueaza in baloane cotate de 5,0 ml cu apa purificata, obtinandu-se solutii standard de acid cafeic cu concentratiile: 30 µg/ml; 60 µg/ml si 90 µg/ml.

Analiza solutiilor standard - Curba de calibrare:

- se amesteca 0,5 ml din fiecare solutie standard de acid cafeic cu 0,5 ml acid fosfowolframic solutie (R) in baloane cotate de 10 ml si se completeaza la semn cu solutie Na₂CO₃ 10%.
- se masoara absorbanta la 660 nm dupa exact 1 minut de la adaugarea solutiei de carbonat de sodiu fata de martor pentru solutia standard;
- *martor pentru solutia standard:* 0,5 ml acid fosfowolframic solutie (R) se dilueaza cu apa purificata intr-un balon cotat de 10 ml.
- se reprezinta grafic absorbanta in functie de concentratie (μg/ml) cu ecuatia de tip liniar
$$y = ax + b.$$

Prepararea solutiei test:

- intr-un balon cotat de 25 ml se introduce cca 1,0 g de extract fluid (conditionat in propilenglicol) si se completeaza la semn cu apa purificata.
- solutia se poate folosi timp de 24 de ore daca este pastrata la 2-8°C.

Analiza solutiei test:

- se amesteca 5,0 ml din solutia test astfel obtinuta cu 5,0 ml reactiv acid fosfowolframic solutie (R), se agita si se filtreaza pe filtru cotat banda albastra.
- se dilueaza 1,0 ml din solutia test filtrata cu solutie de Na₂CO₃ 20% intr-un balon cotat de 10 ml.
- se masoara absorbanta solutiei test la 660 nm dupa 1 minut fata de martor pentru solutia test.
- *martor pentru solutia test:* 1,0 ml din solutia test filtrata se dilueaza cu apa purificata intr-un balon cotat de 10 ml.

FORMULA DE CALCUL

Continutul in polifenoli totali din proba, exprimat in acid cafeic, se calculeaza cu ajutorul formulei:

$$\text{Continut in polifenoli totali, \%} = \frac{C_x}{m} \times 25 \times 10^{-6} \times 100 = \frac{C_x}{m} \times 25 \times 10^{-4}$$

C_x – concentratia compusului calculata din curba de calibrare, μg/ml

m – cantitatea de produs luata in lucru, g

25 – factor de dilutie

5. REZULTATE

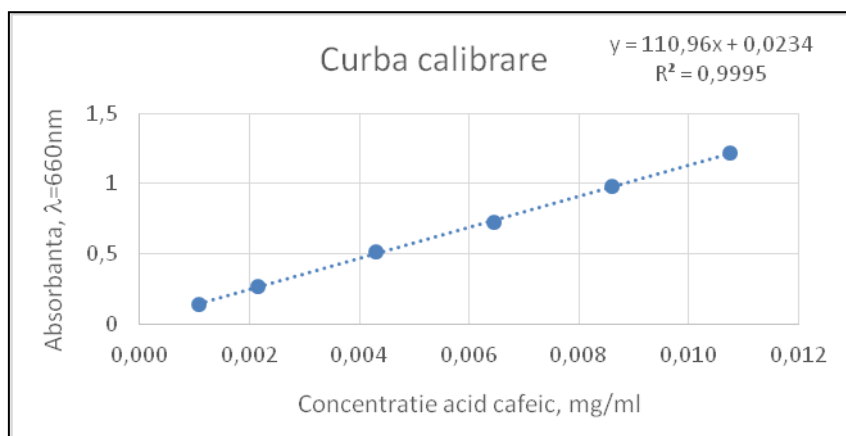


Fig. 2. Curba de calibrare cu acid cafeic

Extract fluid in propilen glicol	Abs	Concentratie in reactie		Continut total fenoli raportati la cantitatea de acid cafeic	
				mg/ml extract	gr/100 gr extract
Castan	0,7028	0,006	0,288	2,878	0,29
TES	1,0804	0,010	0,453	4,535	0,45
Galbenele	1,2686	0,011	0,527	5,274	0,53

**CAPITOLUL III: ASOCIERI DE EXTRACTE VEGETALE IN CONCORDANTA
CU ACTIVITATEA ANTIOXIDANTA SI REGENERATOARE SINERGICA
DEMONSTRATA *IN VITRO***

Extractul de tescovina (TES) este asociat cu alte doua extracte vegetale standardizate obtinute prin procedee tehnologice proprii, respectiv extract de *Calendula officinalis* (galbenele - Gb) si *Aesculus hippocastanum* (castan - Cs). Combinatiile celor trei extracte vegetale testate s-au realizat astfel:

A1_TES:Gb = 1:9	Extractul apos de tescovina (100mg/ml) asociat cu extractul de galbenele conditionat in propilen glicol in proportie de 1:9	A2_TES:Cs = 1:9	Extractul apos de tescovina (100mg/ml) asociat cu extractul de castan conditionat in propilen glicol in proportie de 1:9
B1_TES:Gb = 1:1	Extractul apos de tescovina (100mg/ml) asociat cu extractul de galbenele conditionat in propilen glicol in proportie de 1:1	B2_TES:Cs = 1:1	Extractul apos de tescovina (100mg/ml) asociat cu extractul de castan conditionat in propilen glicol in proportie de 1:1
C1_TES:Gb = 9:1	Extractul apos de tescovina (100mg/ml) asociat cu extractul de galbenele conditionat in propilen glicol in proportie de 9:1	C2_TES:Cs = 9:1	Extractul apos de tescovina (100mg/ml) asociat cu extractul de castan conditionat in propilen glicol in proportie de 9:1

Potentialul citotoxic si activitatea biologica in sistem celular au fost evaluate prin testarea principiilor active pe doua linii celulare standardizate: fibroblasti umani normali (HS27) si keratinocite umane normale imortalizate (HaCaT).

Fibroblast (linia celulara normala HS27) –cultivate in monostrat in mediu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham, cod: D8437, Sigma-Aldrich) suplimentat cu 10% ser fetal bovin (cod: F7524, Sigma-Aldrich) si utilizate in modelele experimentale intre pasajele 20-40.

Keratinocit (HaCaT) – celule cultivate in mediu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (cod: 30-2002, ATCC®) suplimentat cu 10% ser fetal bovin si utilizate in experimente la pasajele 40-50.

III.1. Teste de citocompatibilitate cu celule epidermice si dermice pentru combinatii de principii active vegetale

Evaluarea efectului citotoxic al combinatiilor de extracte se realizeaza prin stabilirea corelatiei dintre scaderea viabilitatii celulare monitorizata prin activitatea esterazelor intracelulare (marcare cu sarea de tetrazoliu MTS) si cresterea activitatii enzimatice a lactat dehidrogenazei in mediul de cultura datorata permeabilizarii membrane celulare (testul LDH).

Eliberarea lactat-dehidrogenazei în mediu celular, marker de citotoxicitate: Lactat dehidrogenaza (LDH) este o enzimă citosolică prezentă în toate celulele, care în condiții fiziologice normale ale membranei plasmatice rămâne în citoplasmă. Eliberarea LDH în supernatantul culturii celulare se măsoară printr-un test în care au loc două reacții enzimatice cuplate, catalizate de LDH și diaforaza, ce determina conversia unei sari de tetrazolium într-un compus roșu de formazan.

Reducerea MTS, marker al viabilitatii celulare: Tratarea celulelor cu MTS, o sare de tetrazolium 3(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-H-tetrazoliu permite evaluarea metabolismului oxidativ si a raspunsului unei populatii celulare la factori externi ce pot avea un efect pozitiv sau negativ asupra vietii celulelor in cultura. Din acest motiv testul MTS este folosit in studiile de viabilitate și proliferare celulară. Conversia MTS în formazanul solubil în apă are loc sub acțiunea enzimelor (dehidrogenaze) ce se găsesc în celulele metabolic active. Cantitatea de formazan produsă, măsurată ca absorbanță la 490 nm, e direct proporțională cu numărul de celule vii din cultura.

Astfel, prin corelarea testului MTS cu cel de eliberare a LDH se poate cuantifica corect efectul unui compus/ produs asupra viabilitatii celulare.

Pentru evaluarea citotoxicității extractelor vegetale luate în studiu, au fost utilizate kiturile CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) pentru determinarea activității metabolice (tehnica MTS) și CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay de la Promega pentru eliberarea lactat dehidrogenazei (LDH) în mediul extracelular.

a. Rezultate și discuții:

Celulele au fost luate la aderat 24h (7000 celule/godeu) și tratate timp de 48h cu substanța de testat, conform protocolului de lucru pentru trusa de reactivi specifici (MTS/LDH). Toate concentrațiile de principii active au fost testate în triplicat. Din valoarea medie a absorbantelor înregistrate pentru fiecare triplicat este scăzută media absorbantei blank-ului (mediu de cultură simplu, fără celule), ca ulterior valorile obținute să fie raportate la controlul celular (celule netratate cu substanța de interes) prelucrat în mod similar probelor, obținându-se astfel efectul compusului de testat asupra viabilității celulare (rezultatele testului MTS) și respectiv, citotoxicitatea acestuia (rezultatele testului LDH) în funcție de concentrațiile folosite.

Efectul principiilor active asupra liniei celulare HaCaT după 48h de tratament, este reprezentat în graficele de mai jos:

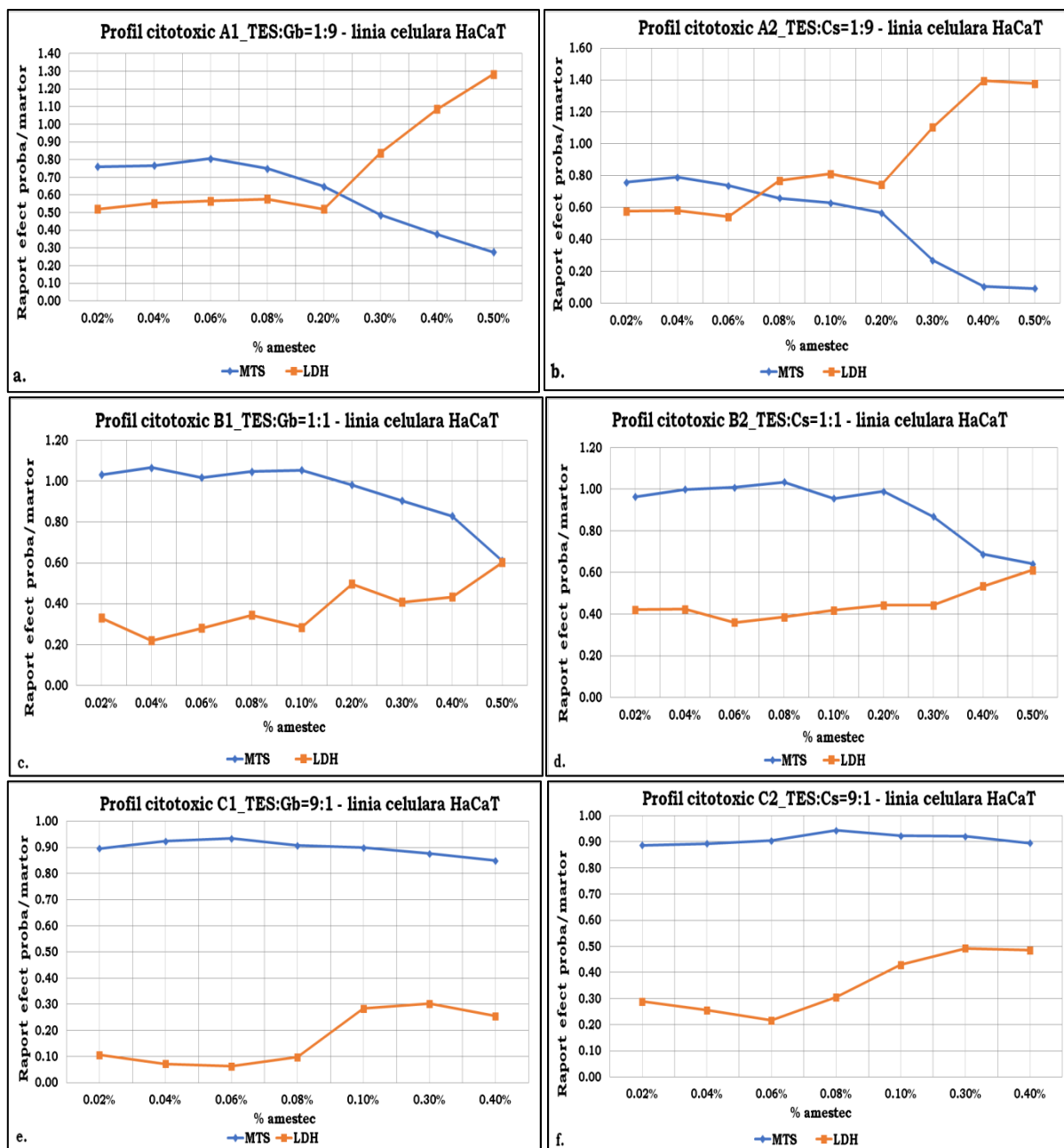


Fig. 3: Efectul combinatiilor de extract TES cu extract de galbenele (Gb) si castan (Cs) asupra keratinocitelor umane: (a.) A1_TES:Gb=1:9; (b.) A2_TES:Cs=1:9; (c.) B1_TES:Gb=1:1; (d.) B2_TES:Cs=1:1; (e.) C1_TES:Gb=9:1; (f.) C2_TES:Cs=9:1

Pe domeniul de doze 0.02% - 0.2%, amestecul A1 nu a manifestat efect citotoxic, in timp ce pentru amestecul A2, pragul de citotoxicitate este de 0.06%. Cresterea eliberarii de LDH in mediul de crestere si scaderea viabilitatii celulare se manifesta pentru amestecurile B1 si B2 incepand cu concentratia de 0.5%. Amestecurile C1 si C2 nu prezinta toxicitate pe intervalul de doze aplicate.

Efectul principiilor active asupra liniei celulare HS27 dupa 48h de tratament, este reprezentat in graficele de mai jos:

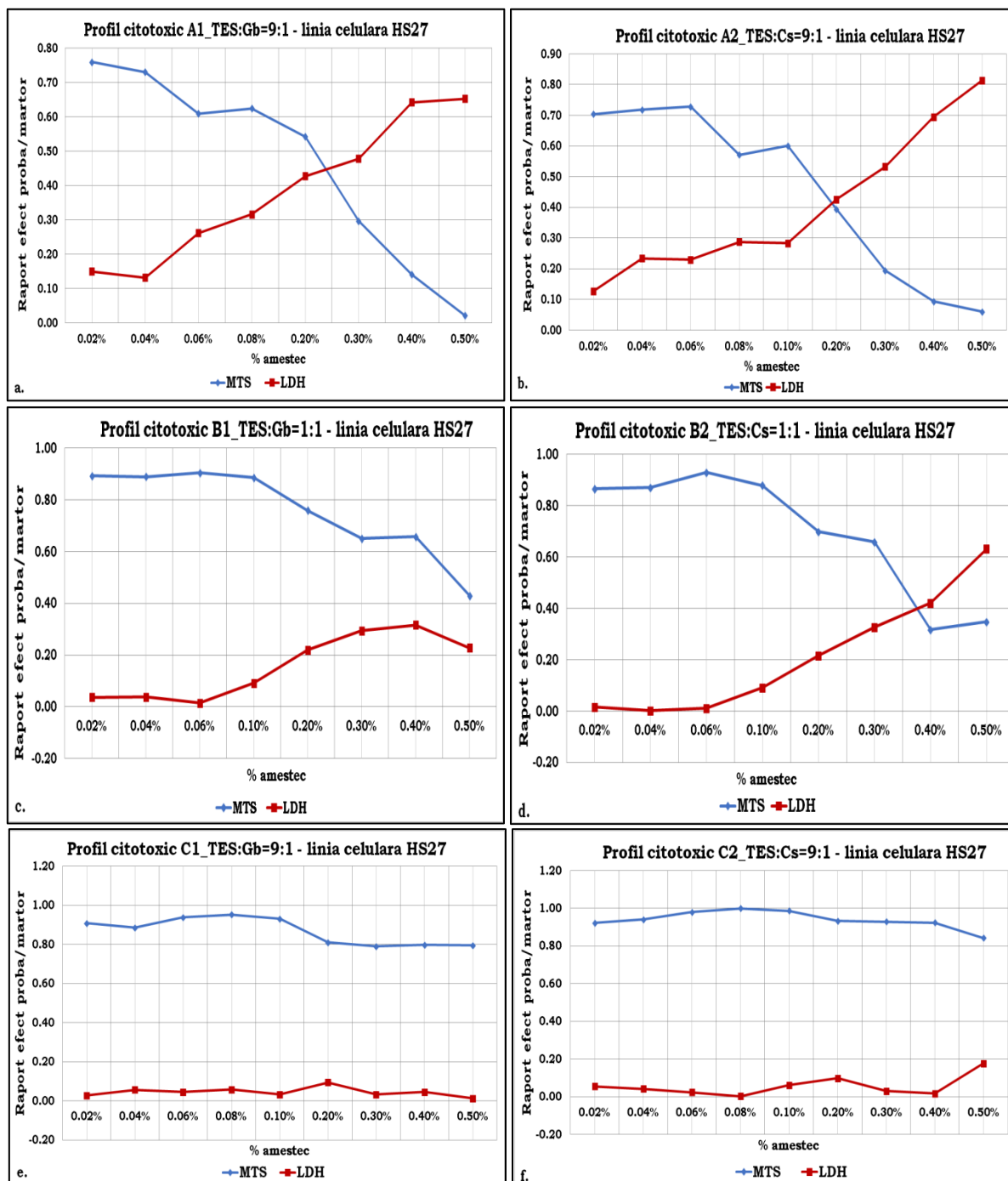


Fig. 4: Efectul combinatiilor de extract TES cu extract de galbenele (Gb) si castan (Cs) asupra metabolismului celular si a eliberarii de LDH: (a.) A1_TES:Gb=1:9; (b.) A2_TES:Cs=1:9; (c.) B1_TES:Gb=1:1; (d.) B2_TES:Cs=1:1; (e.) C1_TES:Gb=9:1; (f.) C2_TES:Cs=9:1

In cazul celulelor tratate cu A1 si A2, pragul de citotoxicitate este de 0.2%, doza la care cantitatea de lactat dehidrogenaza eliberata in mediu creste, odata cu scaderea activitatii metabolice (reducerea MTS). Amestecul B2 nu prezinta citotoxicitate pe intervalul 0.02%-0.4%, in timp ce pentru celelalte trei amestecuri testate nu se observa citotoxicitate pe intervalul de doze aplicate.

Tabel nr. 1. Limitele de citotoxicitate pentru biocomplexele studiate pe liniile celulare dermo-epidermice:

Linia celulara Extract testat	HaCaT	HS27
doza amestec extracte (%)		
A1_TES:Gb=1:9	0.2%	0.2%
B1_TES:Gb=1:1	0.5%	Nu este toxic
C1_TES:Gb=9:1	Nu este toxic	Nu este toxic
A2_TES:Cs=1:9	0.06%	0.2%
B2_TES:Cs=1:1	0.5%	0.4%
C2_TES:Cs=9:1	Nu este toxic	Nu este toxic

III.2. Evaluarea activitatii antioxidante in sistem acellular

Actiunea antioxidanta/ antiradicalica in sistem acellular, s-a determinat printr-o metoda spectrofotometrica ce monitorizeaza reducerea radicalului DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

a. Descrierea metodei

Analiza capacității de captare a radicalilor liberi DPPH, este un test de decolorare care, masoara capacitatea antioxidanților de a reacționa în mod direct cu radicalii DPPH (scavenger) prin monitorizarea spectrofotometrica a absorbției sale la 517 nm. Radicalul DPPH este un radical liber stabil organic centrat pe azot cu o culoare purpurie închisa atunci când este redus la forma nonradicala de catre antioxidanți devine incolor.

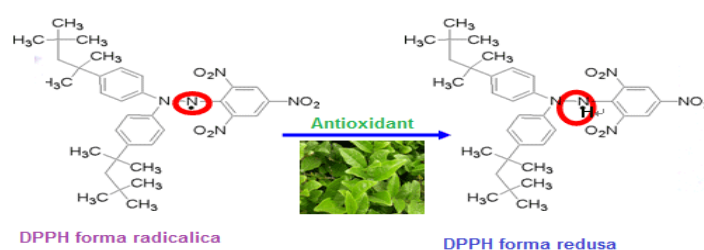


Fig. 5: Reducerea radicalului DPPH in prezenta unor compusi cu activitate antiradicalica

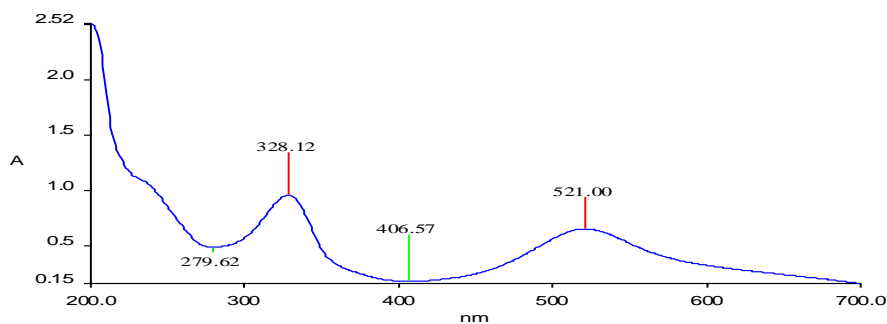


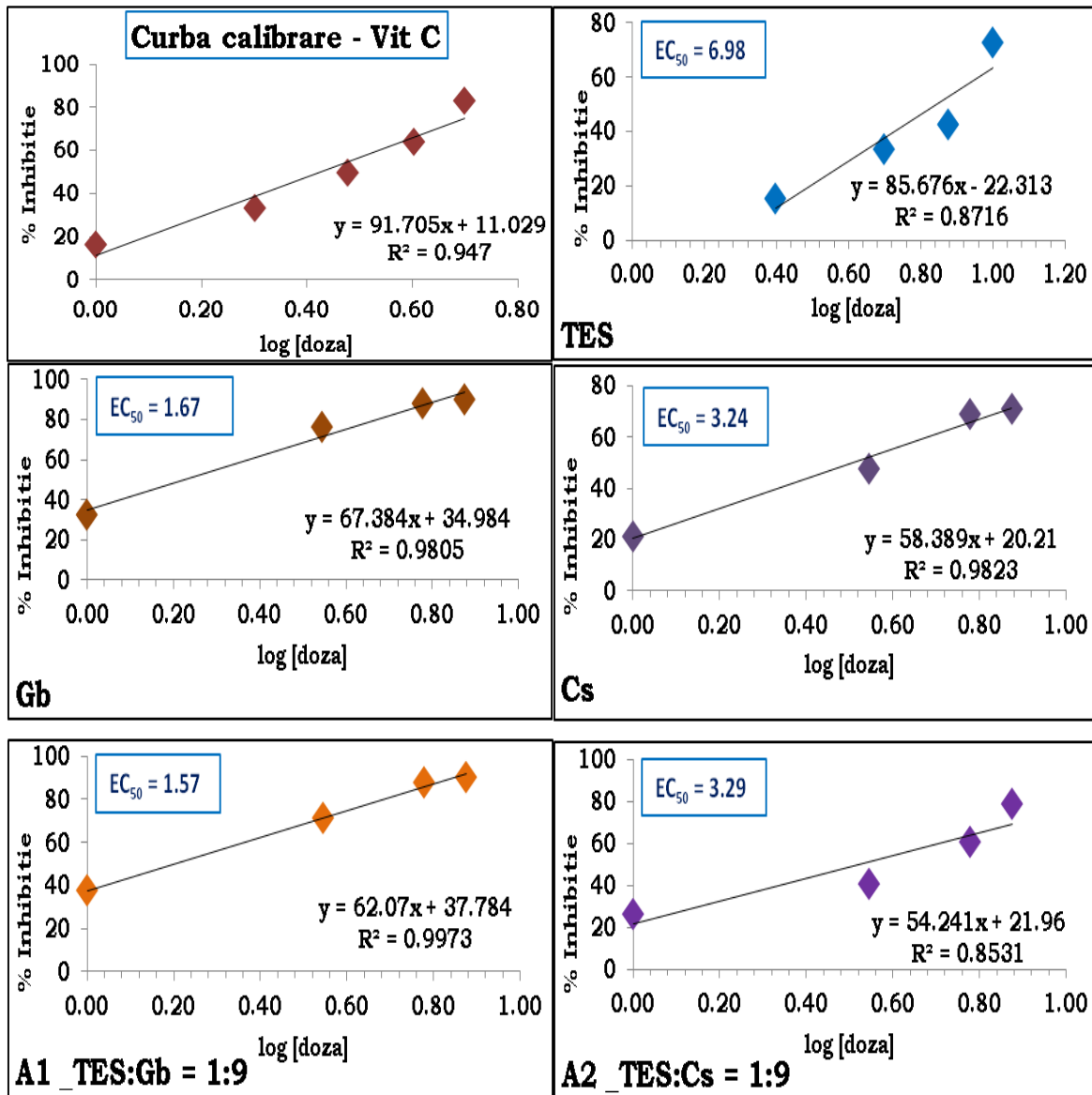
Fig. 6: Spectrul UV-Vis a unei solutii alcoolice de DPPH

Abilitatea compusilor de a capta radicalul DPPH* este determinata de proprietatea lor de a ceda electroni sau hidrogen, adica de marimea potentialului de oxido-reducere al antioxidantilor studiat. Activitatea antiradicalica (AAR) a fost definita ca fiind cantitatea de antioxidant necesara pentru scaderea concentratiei initiale de DPPH* cu 50% si reprezinta concentratia eficienta, EC₅₀.

b. Rezultate si discutii:

S-au testat atat extractele ca atare cat si combinatiile lor. S-au preparat amestecurile de extracte astfel: o solutie apoasa de TES (100mg/ml), extractele Gb si Cs au fost diluate in raport 1:3 in PG si apoi s-au preparat amestecurile in raport 1:9 (A), 1:1 (B) si 9:1 (C). S-a folosit drept control o solutie de 1 mg/ml Vit C in apa. Pentru fiecare probă se realizează câte un martor format din metanol, apă distilată și amestecul de interes.

Rezultatele sunt prezentate in graficele de mai jos ca % de inhibiție in functie de Log din doza aplicata, calculandu-se astfel si concentratia eficienta, EC_{50} :



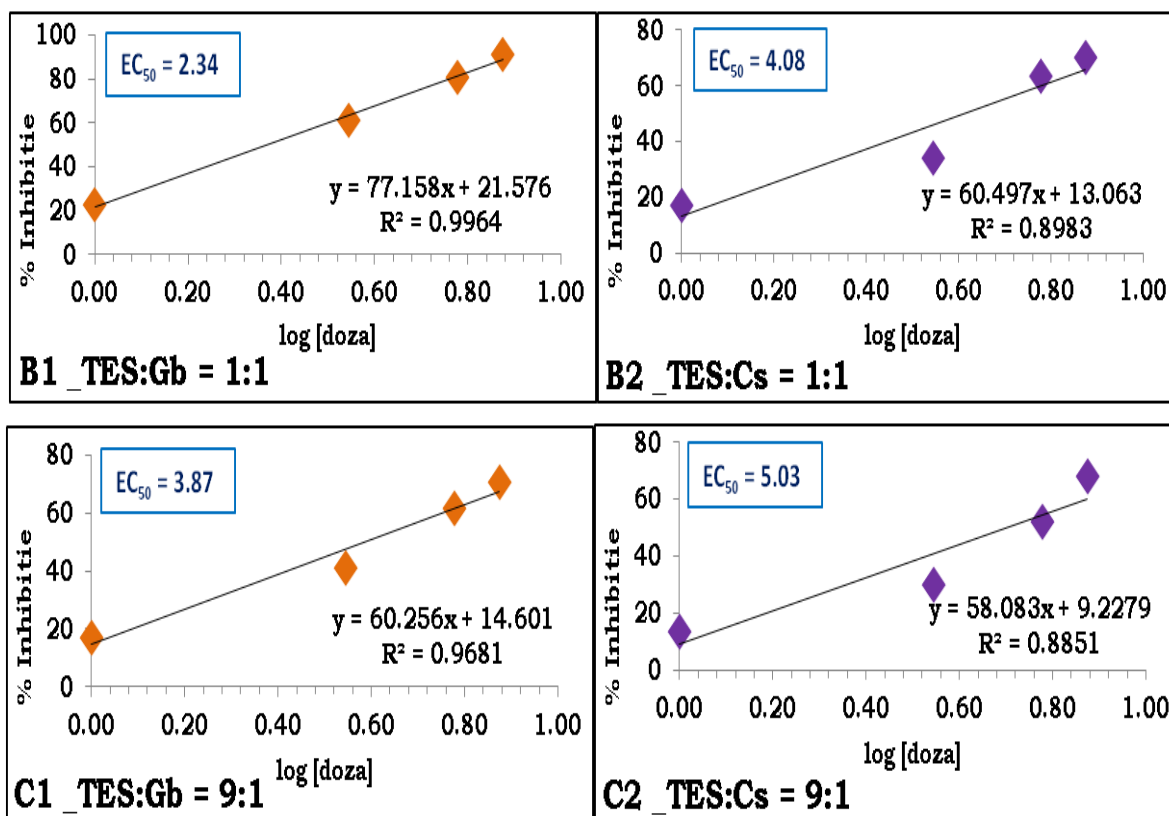


Fig. 7. Reducerea radicalului DPPH in prezenta principiilor active testate ca atare si a combinatiilor lor.

Tabel nr. 2. Evaluarea efectului antiradicalic al principiilor active testate

Proba	TES	Gb	Cs	A1_TES:Gb (1:9)	B1_TES:Gb (1:1)	C1_TES:Gb (9:1)	A2_TES:Cs (1:9)	B2_TES:Cs (1:1)	C2_TES:Cs (9:1)
EC_{50} (μ l)	6.98	1.67	3.24	1.57	2.34	3.87	3.29	4.08	5.03

Efectul antiradicalic cel mai pronuntat se remarca pentru combinatiile **A1_TES:Gb (1:9)** si **B1_TES:Gb (1:1)**, demonstrand un potential oxido-reducator semnificativ.

III.3. Evaluarea activitatii antioxidante in sistem dermo-epidermic

Evaluarea stresului oxidativ intracelular s-a realizat prin metode de analiza de citometrie in flux avand drept scop monitorizarea speciilor reactive de oxigen (peroxid de hidrogen și anion superoxid– marcarea cu DCFH-DA, respectiv HE) și determinarea glutatationului intracelular.

Determinarea impactului antioxidant al extractelor s-a realizat si prin determinarea activității enzimatică a doua enzime oxidative de faza I, implicate i transformarea `1, respectiv catalaza (reacție de descompunere a apei oxigenate în apă și O₂) și superoxid dismutaza (monitorizarea inhibiției procesului de reducere a citocromului c de către radicalul superoxid)

III.3.1.Efect antioxidant intrinsec prin stimularea glutatationului intracelular

a. Descrierea metodei:

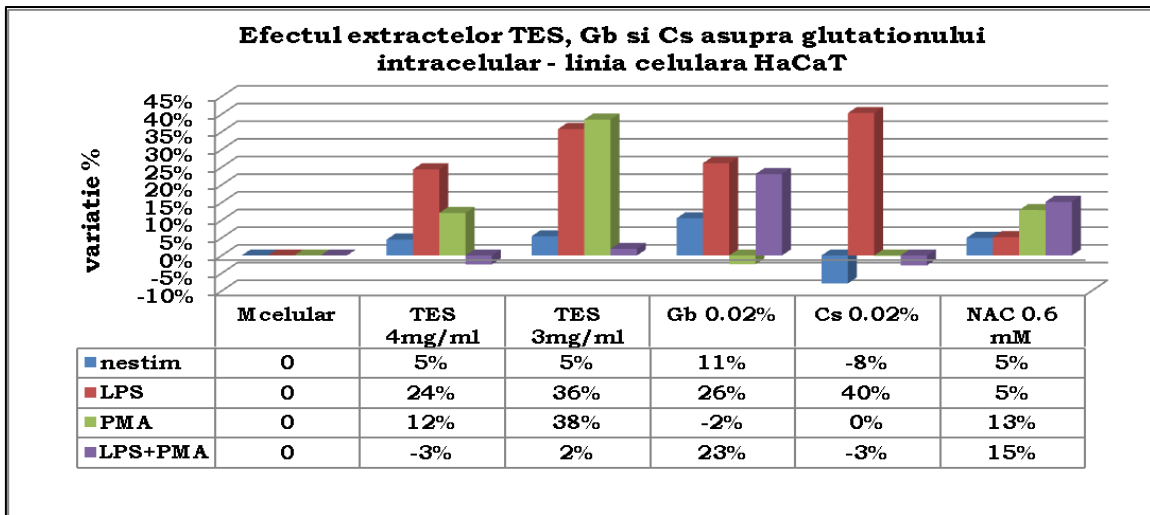
Glutathionul (GSH) este o sulfhidril tripeptida (*glu-cys-gly*) prezenta in concentratii milimolare in majoritatea celulelor eucariote. Este un agent reductor intracelular implicat in multiple procese celulare, protejand celula de speciile de radicali liberi, peroxid de hidrogen si peroxizi organici, reactii catalizate de glutatation – S-transferaza si glutatation peroxidaza. Glutathionul are un dublu rol: in **procesele de detoxifiere** prin legare la metale grele, solventi, pesticide si transformarea lor in substante excretabile si **ca antioxidant** prin mentinerea gruparilor –SH din proteine in forma redusa.

Detectia lui este importanta in estimarea statusului celular antioxidant intrinsec. Determinarea glutatationului intracelular se va face prin marcarea cu anticorpi fluorescenti (ex. **anticorp ABCAM anti-glutathion; anticorp secundar** - Alexa-Fluor 488 conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) si analiza prin citometrie in flux. Emisia fluorescenta se compara cu cea a **controlului izotipic Mouse monoclonal IgG2a (AB10191- ABCAM.)**

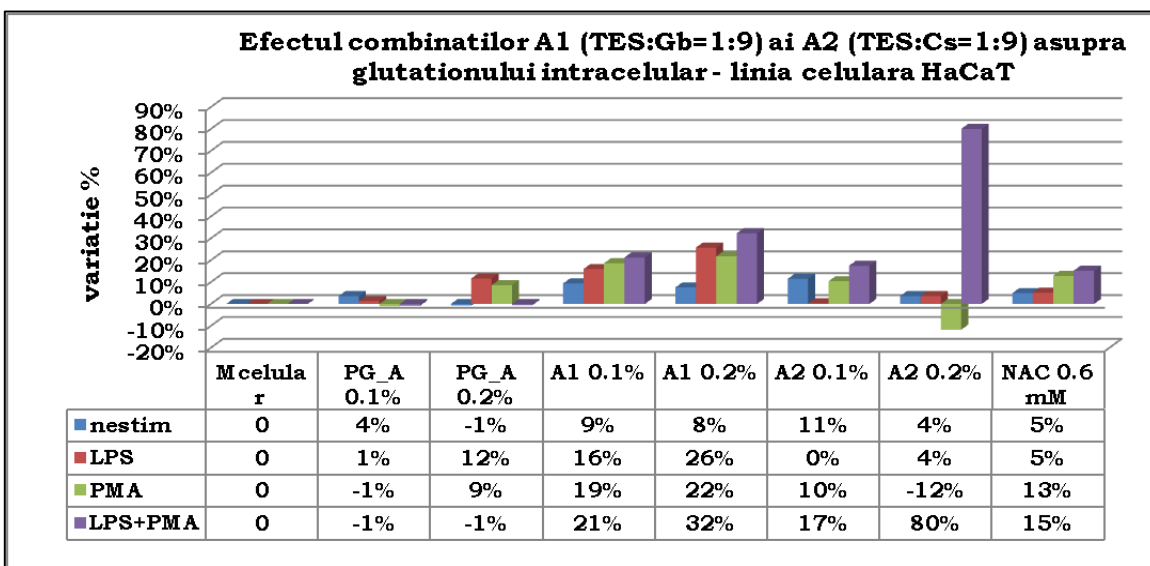
b. Rezultate si discutii:

Stimularea sistemului antioxidant intrinsec in vederea inducerii protectiei celulare la agresiunea pro-oxidanta s-a studiat pe ambele tipuri de celule dermo-epidermice, in conditii de stimulare pro-inflamatorie asociate invaziei bacteriene (LPS) si stimulare oxidativa asociata inflamatiei (PMA). Rezultatele sunt prezentate in graficele de mai jos ca variatie procentuala fata de martorul corespunzator.

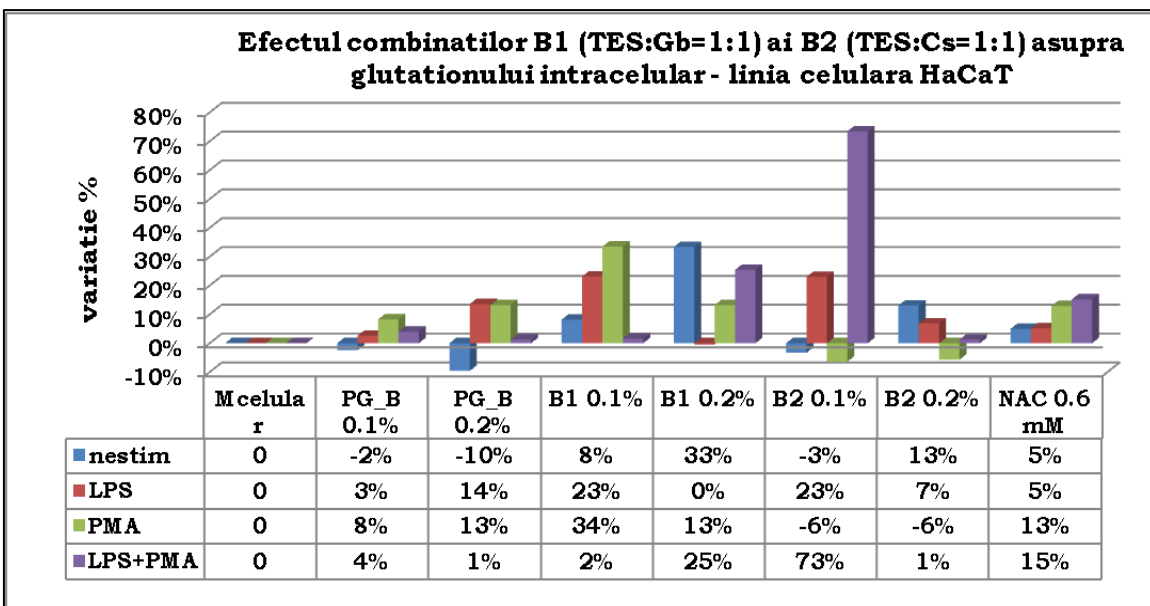
Efectul principiilor active asupra glutatationului intracelular la nivelul keratinocitelor umane (linia celulara HaCaT):



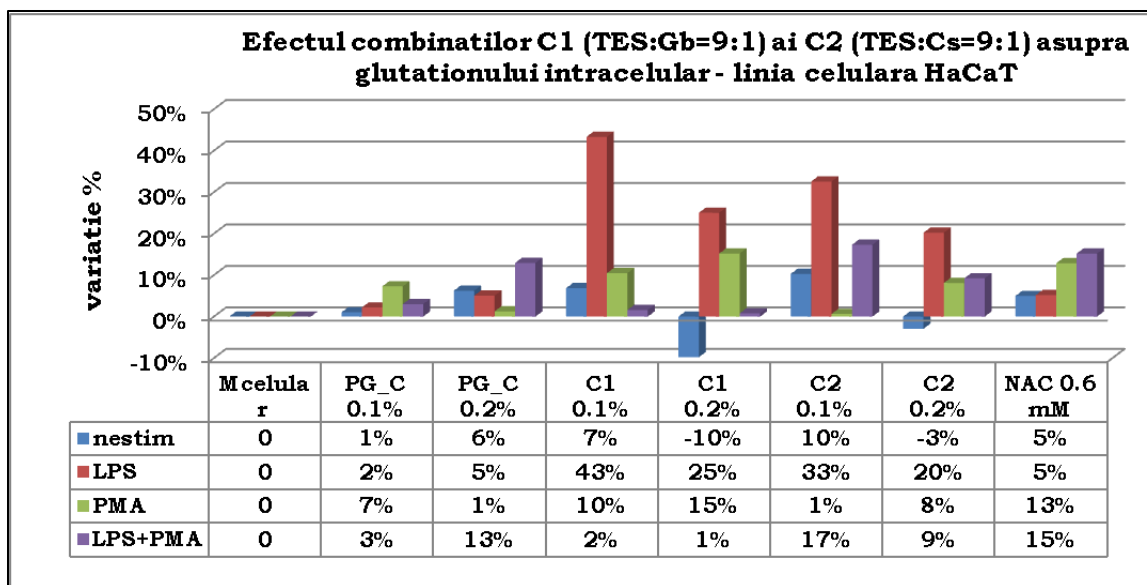
a.



b.



c.

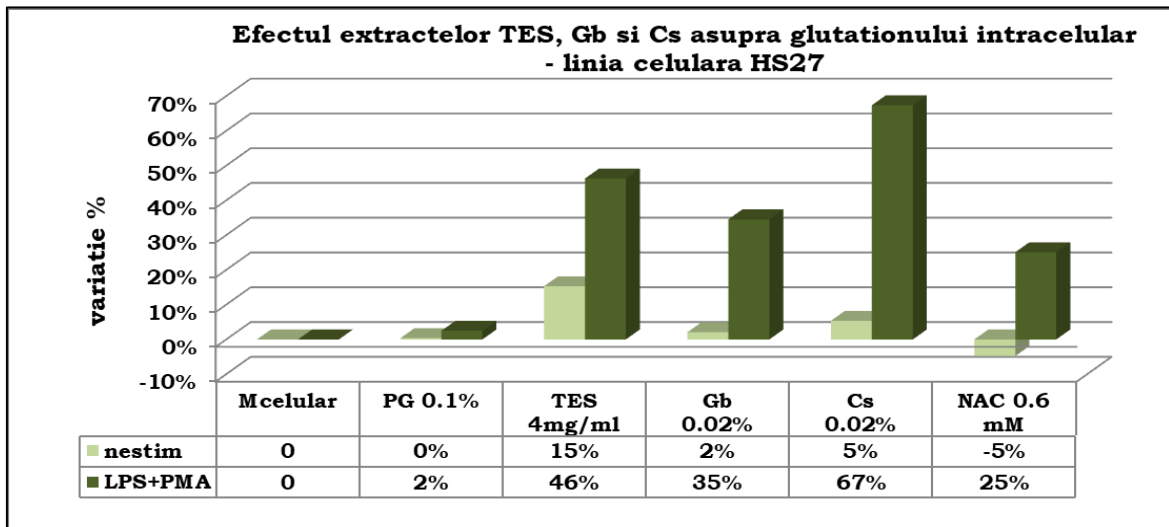


d.

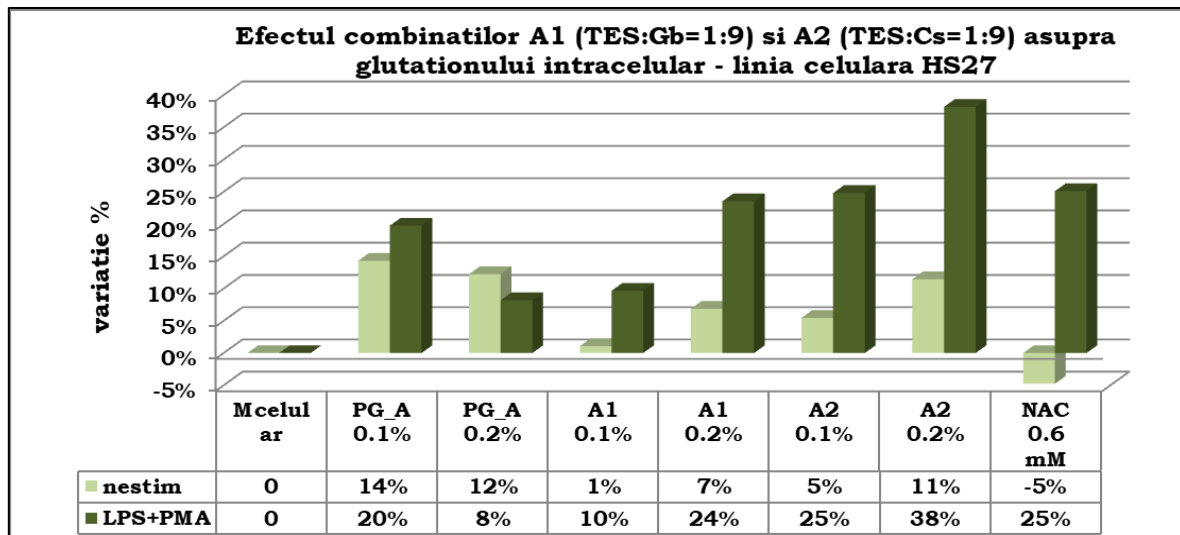
Fig. 8: Variatia glutatationului intracelular indusa de principiile active testate individual sau asociate la nivelul liniei celulare HaCaT

Se observa o stimulare a glutatationului intracelular la nivelul keratinocitelor tratate cu extractul TES 3mg/ml (atat in conditii bazale cat si in celulele stimulate oxidativ (PMA) si/sau bacterian (LPS)). Extractul de galbenele (Gb) manifesta actiune stimulatorie asupra glutatationului in celulele stimulate cu LPS dar si in cele in care avem stimulare oxidativa asociata atacului bacterian (LPS+PMA). Extractul de castan (Cs) actioneaza asupra glutatationului doar in cazul stimulării cu LPS. Dintre amestecurile de principii active studiate, un efect semnificativ in sensul stimulării glutatationului intracelular in keratinocitele tratate cu toate tipurile de stimuli, se remarca A1(TES:Gb=1:9), B1(TES:Gb=1:1), C1 (TES:Gb=9:1) si C2 (TES:Cs=9:1). Amestecurile A2 ((TES:Cs=1:9) si B2 (TES:Cs=1:1) stimuleaza glutatationul doar in urma stimulării cu LPS+PMA, fiind eficiente in combaterea stressului oxidativ intrinsec produs de inflamatia asociata infectiilor bacteriene.

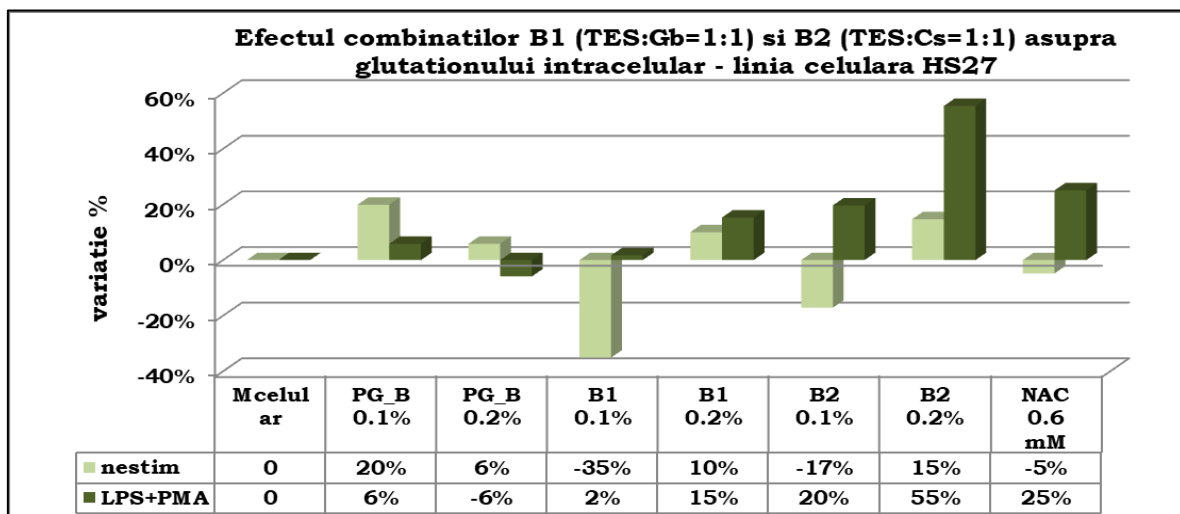
Efectul principiilor active asupra glutatationului intracelular la nivelul fibroblastilor umani (linia celulara HS27):



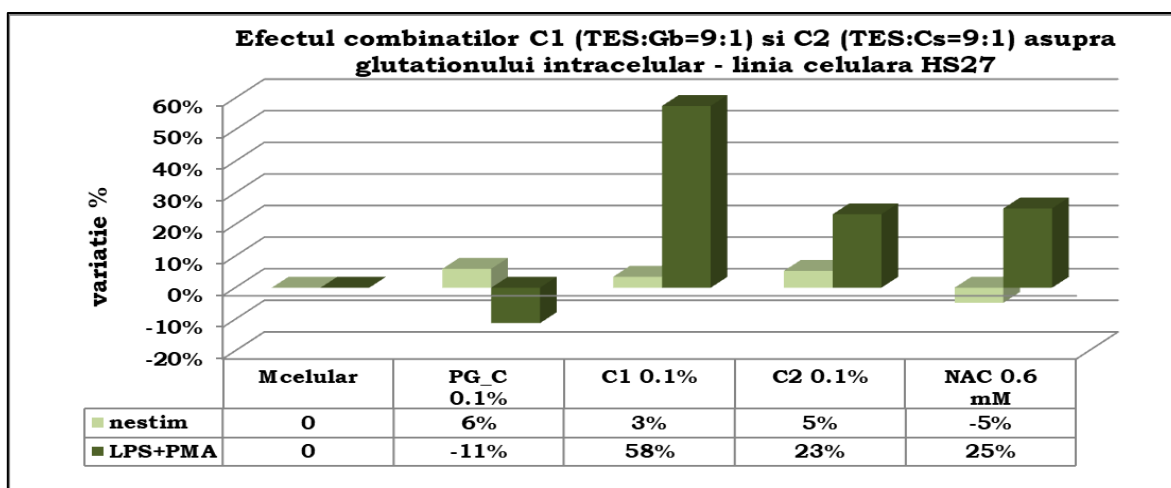
a.



b.



c.



d.

Fig. 9. Variatia glutatiunii intracelulare indusa de principiile active testate individual sau asociate la nivelul liniei celulare HS27

Fibroblastii dermici au fost tratati cu substantele de interes atat in conditii normale cat si cu stimulare oxidativa asociata invaziei microbiene, respectiv PMA+LPS. Se remarca un efect potentator al glutatiunii intracelulare in cazul celulelor stimulate si tratate cu extract de castan (\nearrow 67%), extract TES (\nearrow 46%), A2 (\nearrow 38%), B2 (\nearrow 55%) si C1(\nearrow 58%), manifestand astfel un efect puternic antioxidant intrinsec.

III.3.2.Efect antioxidant extrinsec prin modularea intracelulara a balantei oxidative in sistemul radicali liberi oxigenati- enzime oxidative: catalaza si superoxid-dismutaza

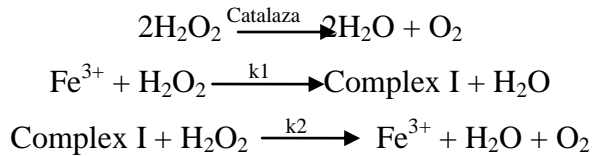
➤ Determinarea activitatii enzimatice a catalazei:

Descrierea metodei:

Catalaza este o enzima heminica tetramerica alcatuita din 4 subunitati identice aranjate tetraedric, fiecare avand 60000 g/mol ce contine 4 grupe feriprotoporfirinice per molecula, masa moleculara a sa fiind de aproximativ 240000Da.

Catalaza exercita o actiune duala: pe de o parte catalizeaza descompunerea H_2O_2 cu formare de H_2O si O_2 (activitate catalazica), iar pe de alta parte favorizeaza oxidarea donrilor de hidrogen (metanol, etanol, acid formic, fenoli) cu consumarea unui mol de peroxid (activitate peroxidazica).

Reactia predominanta depinde de concentratia donrilor de H si de viteza de producere a H_2O_2 in sistem.



In ambele cazuri, se formeaza Complexul I catalaza activa-H₂O₂. Descompunerea H₂O₂, in care o alta molecula de H₂O₂ serveste ca donator de H pentru complexul I, prezinta o viteza de reactie foarte mare, in timp ce reactiile peroxidative sunt relativ lente.

Descompunerea apei oxigenate este o reactie de ordinul I, a carei viteza este intotdeauna proportionala cu concentratia de peroxid. Ca urmare, pentru a evita o scadere rapida a vitezei initiale de reactie, determinarile sunt efectuate la concentratii de H₂O₂ relativ scazute (aproximativ 0.01 mol/l).

Descompunerea H₂O₂ urmeaza initial (circa 0-30s) o reactie de ordinul intai, concentratiile de H₂O₂ situandu-se in domeniul 0.01-0.05mol/l. Constanta de viteza (k) pentru reactia globala este data de:

$$k = \frac{1}{\Delta t} * \ln \frac{[S_1]}{[S_2]} = \frac{2.3}{\Delta t} \log \frac{[S_1]}{[S_2]} \quad \text{s}^{-1}$$

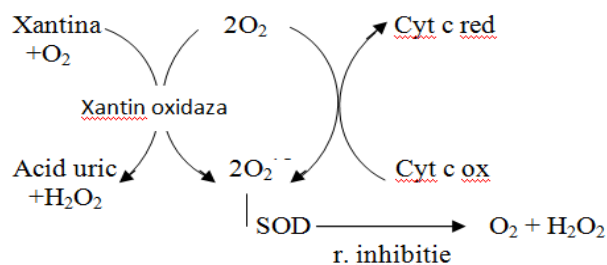
unde Δt = t₂-t₁ reprezinta intervalul de timp masurat; [S₁] si [S₂] reprezinta concentratiile de H₂O₂ la timpul t₁ respectiv t₂. Constanta k poate fi utilizata ca o masura directa a concentratiei de catalaza. In studiile cu preparate enzimice purificate, activitatea specifica (k₁') este obtinuta prin impartirea lui k cu concentratia molară a catalazei [E].

$$k_1' = k/[E] \quad \text{l} * \text{mol}^{-1} * \text{s}^{-1}$$

➤ Determinarea activitatii enzimatice a superoxid dizmutazei

Descrierea metodei:

Pentru evaluarea activitatii enzimatice a SOD s-a utilizat o metoda indirecta prin cuplarea reactiei de descompunere a anionului superoxid in prezenta SOD cu reactia de reducere a cytocromului c de catre radicalul superoxid (produs enzymatic in reactia dintre xantina si O₂).



O unitate enzimatica va scadea viteza de reducere a cytocromului c cu 50% intr-un sistem cuplat xantina/ xantin-oxidaza.

Rezultate si discutii:

Activitatea enzimatica a principalelor enzime antioxidante: catalaza si superoxid-dismutaza a fost evaluata din lizate celulare de keratinocit uman normal, cultivate astfel: aderare 24h, tratare 48h in conditii normale de dezvoltare (nivel bazal al peroxidului de hidrogen, in prezenta si absenta compusilor investigati), cat si in cadrul unui model de stimulare oxidativa nespecifica indusa de tratarea cu LPS si PMA (24h pretratare cu extract + 24h stimulare).

Rezultatele sunt prezentate in graficele de mai jos, ca procente de variatie a absorbantelor corespunzatoare activitatii enzimatice a probelor tratate fata de martorul celular netratat.

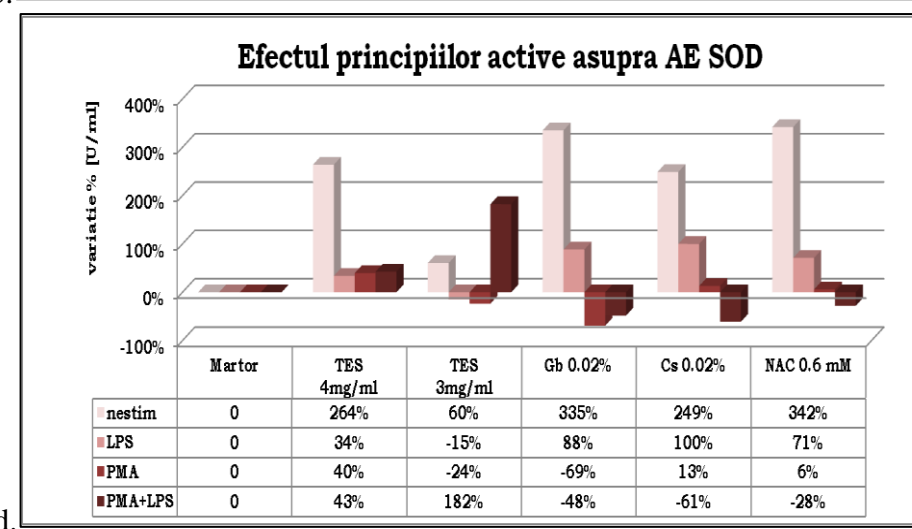
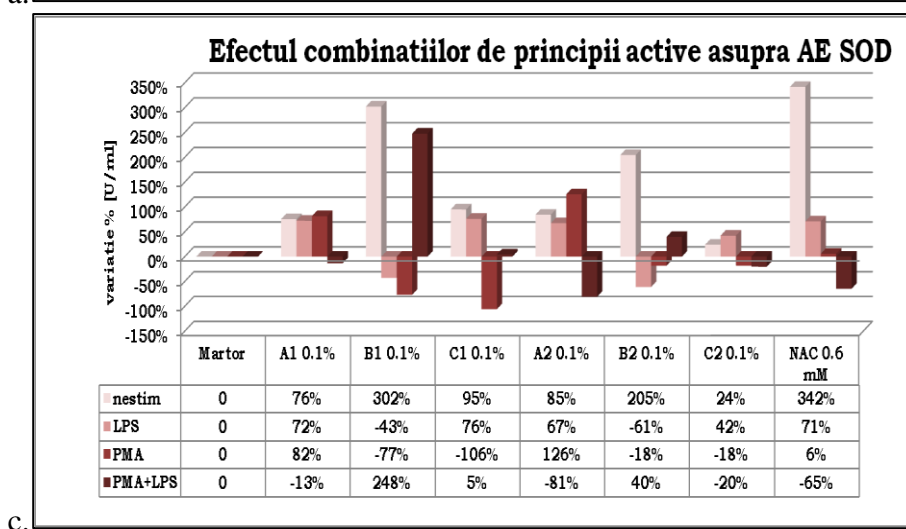
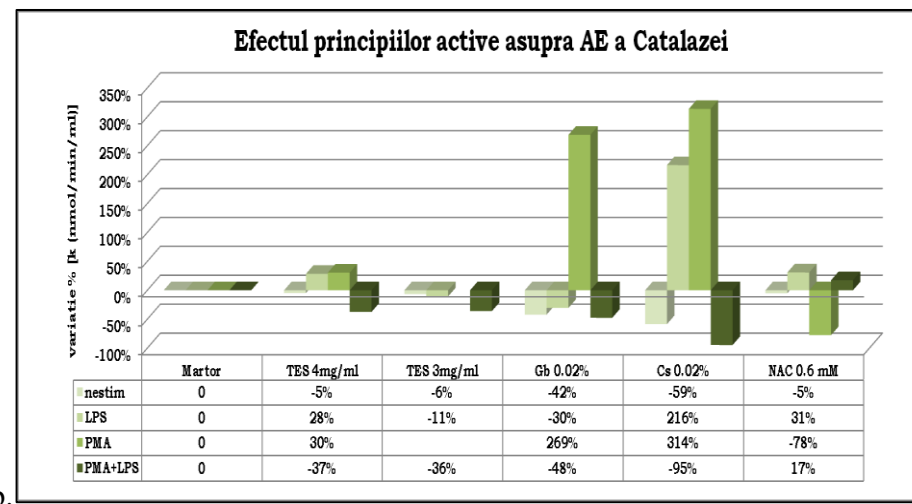
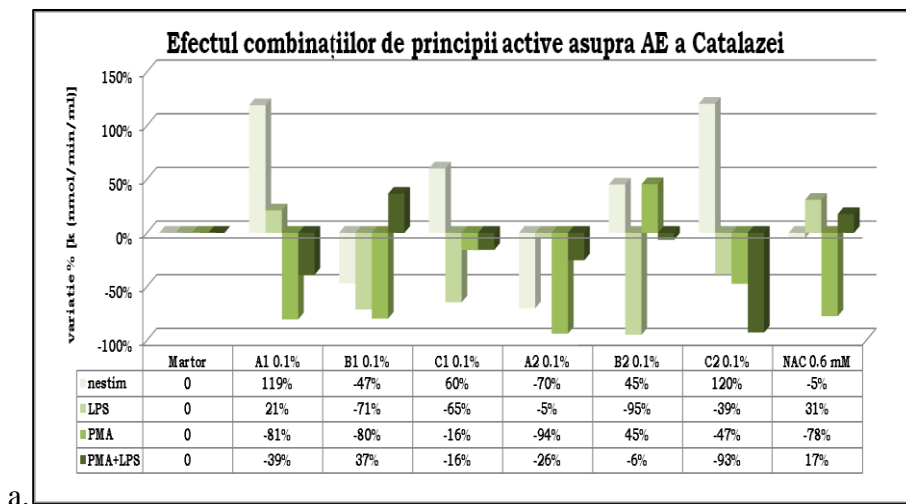


Fig. 10. Evaluarea activitatii enzimice a catalazei (a. si b.) si a superoxid dismutazei (c. si d.) pe linia celulara HaCaT

Principiile active studiate individual sau in combinatii intervin asupra activității enzimelor oxidative prin mentinerea echilibrului redox celular, astfel contracarând atacul radicalilor liberi, atât prin eliminarea anionilor superoxid sub acțiunea SOD cât și a apei oxigenate catalizate de CAT. Astfel, extractele de galbenele si castan au o activitate mult mai pregnantă in activarea SOD si CAT decat extractul de struguri, TES, cu consecinte benefice in transformarea radicalilor liberi oxigenati nocivi. De asemenea, combinatiile **B1_TES:Gb (1:1)**, **B2_TES:Cs (1:1)** si **A2_TES:Cs (1:9)** activeaza SOD similar cu antioxidantul cunoscut, N-Acetil-Cysteina. In plus, **B2_TES:Cs (1:1)** catalizeaza transformarea descompunerea H_2O_2 , avand rol oxido-reducator multiplu la nivel enzimatic.

➤ **Evaluarea stresului oxidativ intracelular prin citometrie in flux prin identificarea simultana a radicalilor oxigenati intracelulari (anion superoxid si apa oxigenata)**

Descrierea metodei: DCFH-DA este încorporat în regiunea lipidica hidrofobă unde enzimele hidrolitice clivează restul diacetat, lăsând molecula nefluorescentă DCFH (dichlorofluoresceina) să pătrundă în citoplasmă datorită polarității. În condițiile activării celulare, apa oxigenată și peroxidazele intracelulare oxidează molecula la DCF – compus fluorescent ce emite la 530nm (FITC-A). Hidroxiethidina (HE) permeabil prin membrana celulară, formând după oxidarea de către anionii superoxid bromura de etidiu care se leagă de acizii nucleici și emite la 620nm (PE-A).

Rezultatele sunt achiziționate cu citometrul în flux FACS CantoII și analizate cu softul Diva 6. Cantitatea de apă oxigenată, respectiv anionul superoxid intracelular corespund variației mediilor canalelor de fluorescență în cele 2 coordonate: FITC – A mean – pentru apa oxigenată și PE-A mean – pentru anionul superoxid (Fig. de mai jos).

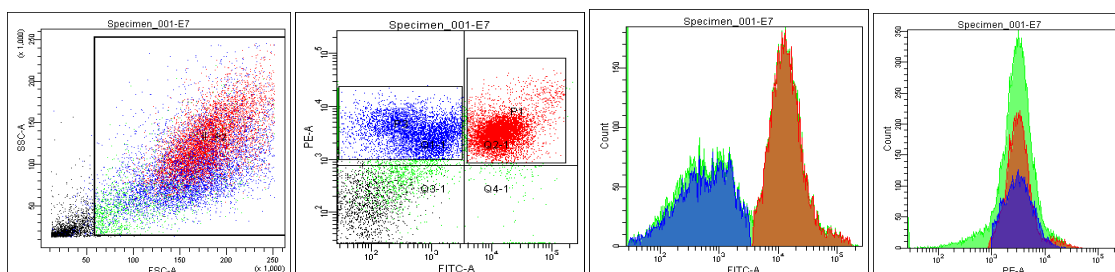


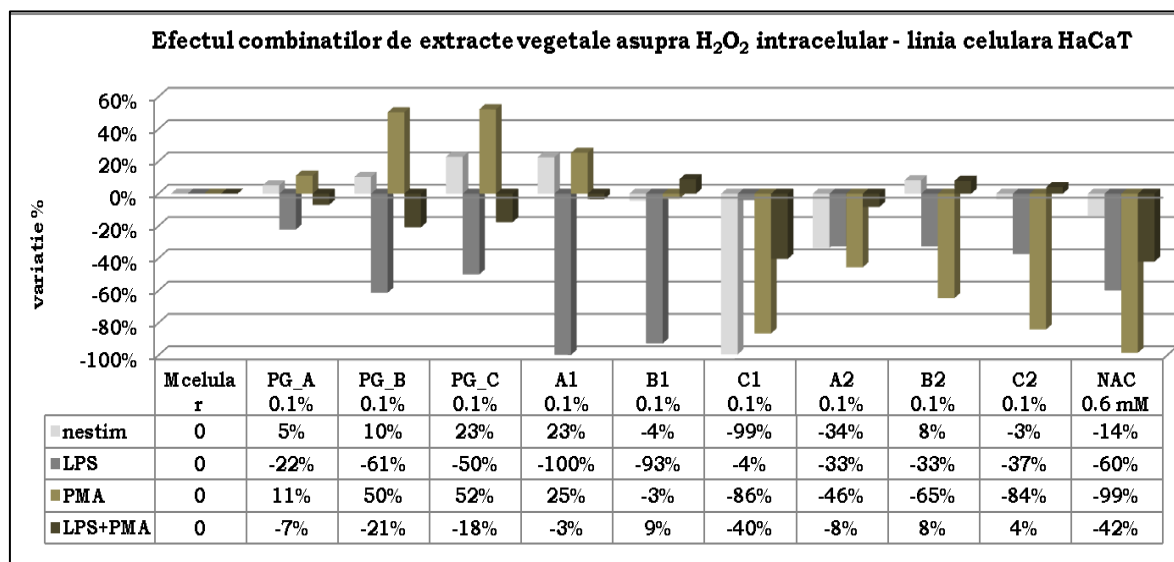
Fig. 11. Evidențierea, în coordonate FSC /SSC a populației celulare normale, apoi a subpopulațiilor respondente la activarea celulară a apei oxigenate (FITC –A), respectiv a anionului superoxid (PE-A)

Rezultate si discutii:

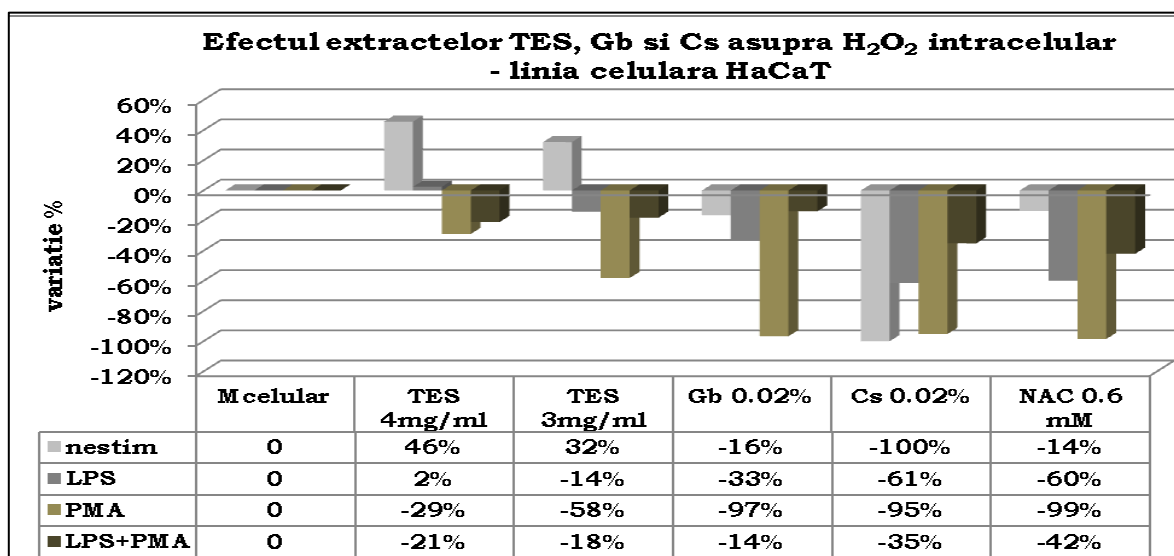
Evaluarea radicalilor oxigenati s-a realizat din lizate celulare de keratinocit uman normal si fibroblast uman normal, cultivate astfel: aderare 24h, tratare 48h in conditii normale de dezvoltare (nivel bazal al peroxidului de hidrogen, in prezenta si absenta compusilor investigati), cat si in cadrul unui model de inflamatie nespecifica indusa de tratarea cu LPS si PMA (24h pretratare cu extract + 24h stimulare).

Rezultatele sunt prezentate in graficele de mai jos, ca procente de variatie a absorbantelor corespunzatoare activitatii enzimatice a probelor tratate fata de martorul celular netratat.

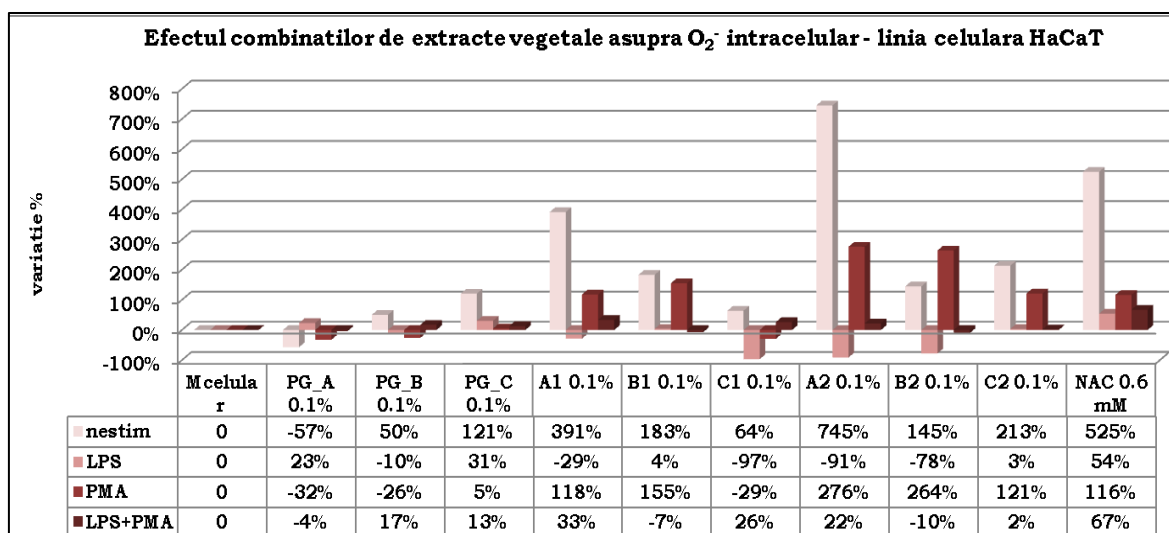
Efectul principiilor active asupra stresului oxidativ intracelular la nivelul keratinocitelor umane (linia celulara HaCaT):



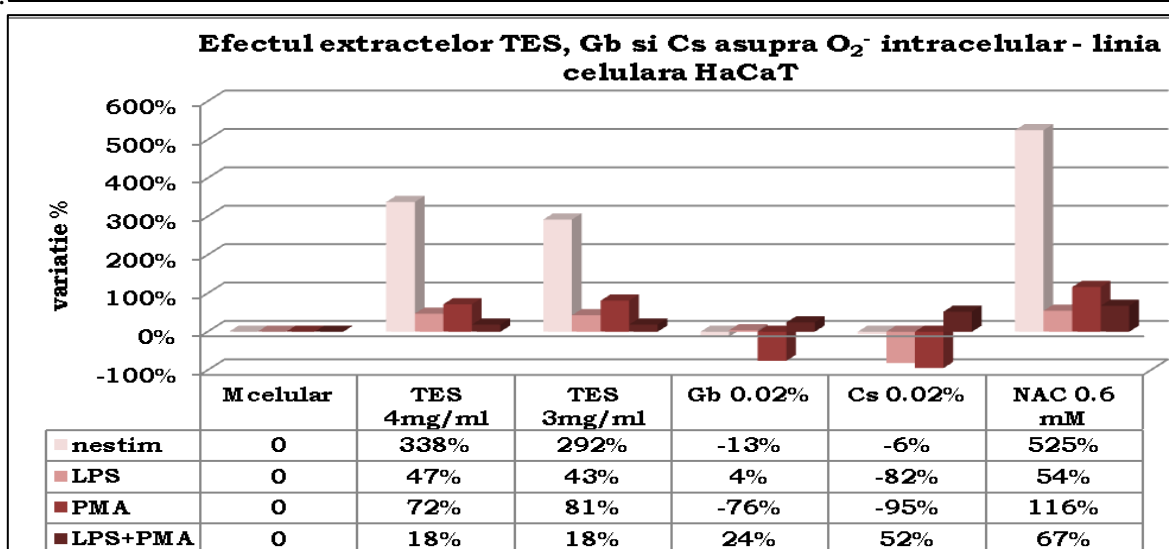
a.



b.



c.

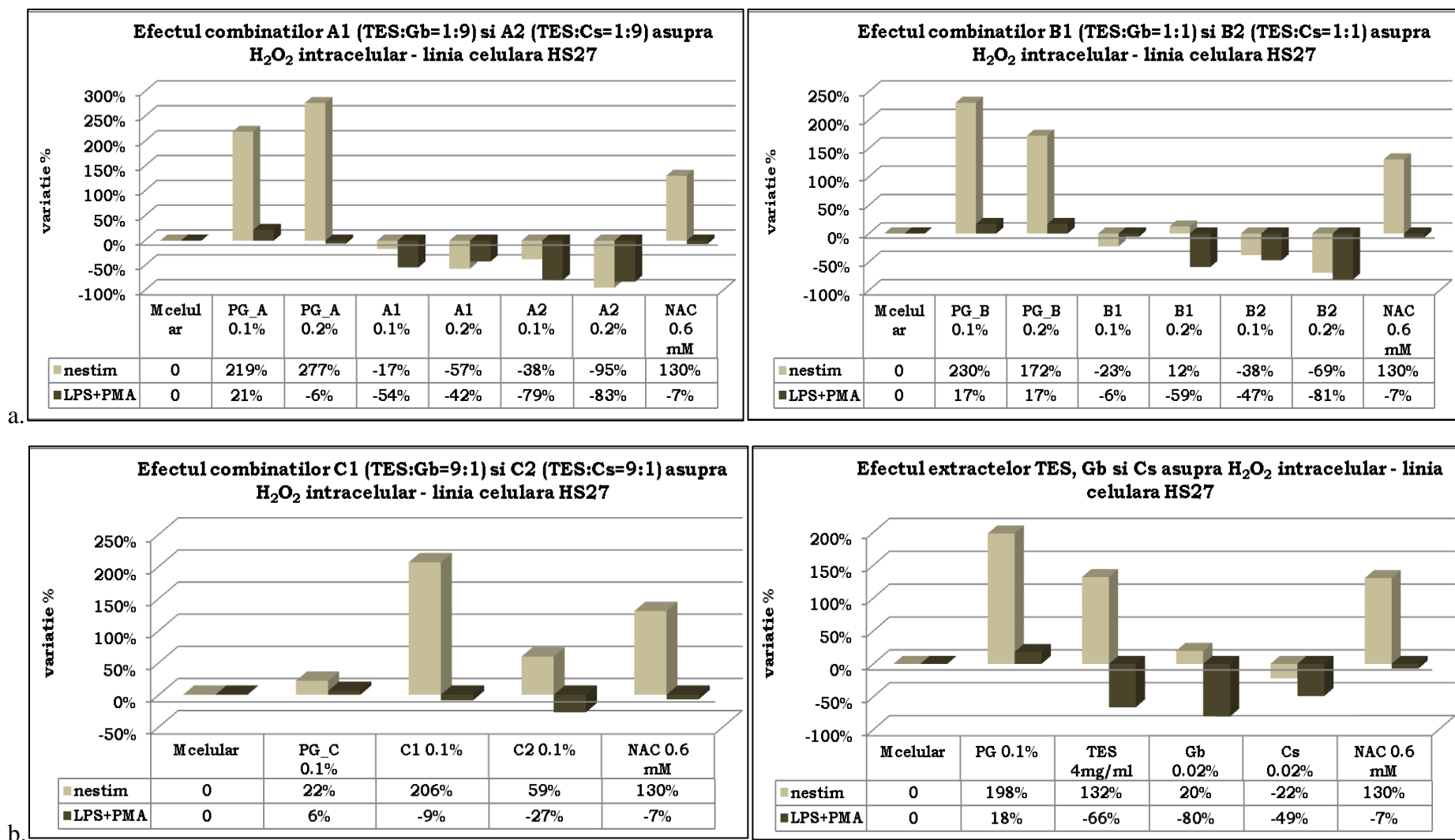


d.

Fig. 12. Evidentierea efectului extractelor vegetale studiate individual sau asociate asupra apei oxigenate (a. si b.) si a anionului superoxid (c. si d.) generate intracelular – linia celulara HaCaT

Extractele vegetale studiate individual, respectiv TES, Gb si Cs, reduc peroxidul de hidrogen generat intracelular la nivelul keratinocitelor, atat in conditii normale cat si in prezenta stimulilor LPS, PMA, LPS+PMA, in timp ce anionul superoxid este redus in toate conditiile de stimulare doar in prezenta extractului Cs. In cazul celulelor stimulate cu LPS, doar amestecurile A1, C1, A2 si B2 au efect reducator asupra apei oxigenate si superoxidului intracelulari, in timp ce in urma stimulării cu PMA se remarca o reducere a apei oxigenate cu acumulare de anion superoxid in prezenta amestecurilor A2, B2 si C2.

Efectul principiilor active asupra stresului oxidativ intracelular la nivelul fibroblastilor dermici (linia celulara HS27):



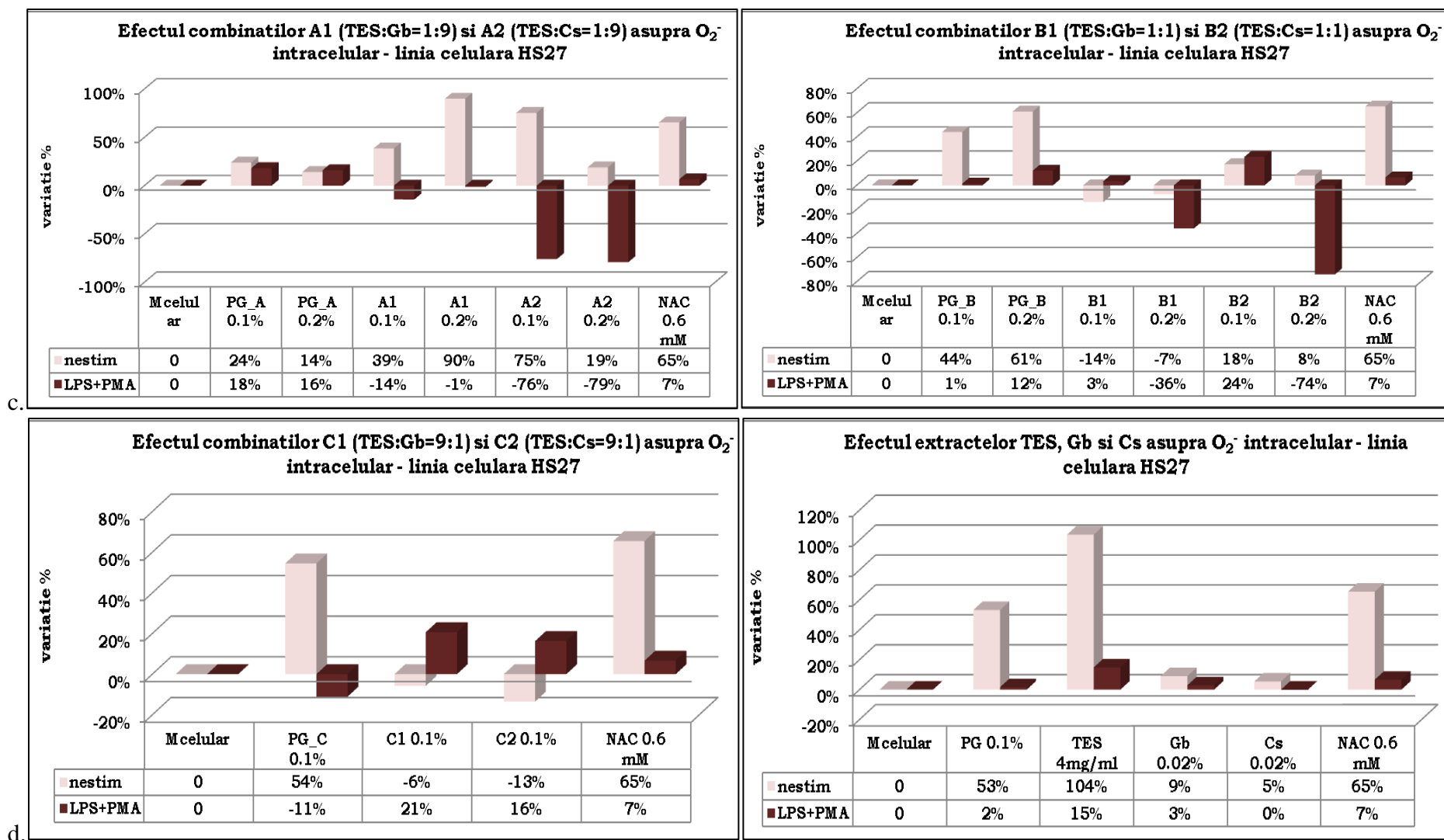


Fig. 12. Evidentierea efectului extractelor vegetale studiate individual sau asociate asupra apei oxigenate (a. si b.) si a anionului superoxid (c. si d.) generate intracelular – linia celulara HS27

Compusii antioxidanti din cele trei extracte vegetale studiate intervin in mecanismele de reglare redox intracelulare la nivel dermic (fibroblast uman normal, respectiv stimulat pro-oxidativ si pro-inflamator cu polizaharid bacterian) dupa cum urmeaza:

- Extractul de castan, galbenele si cel de deseuri de struguri reduc in special apa oxigenata, fara impact major la nivel de anion superoxid
- Combinatiile A2, mai mult decat A1 si B2 mai mult decat B1 au efect concertat atat asupra apei oxigenate, cat si a anionului superoxid intracelular, in timp ce combinatia C2 actioneaza preponderent asupra peroxidului de hidrogen.

CONCLUZII

Mecanismele antioxidante investigate au conturat prin complexitatea lor modalitati de potentare sinergica a efectelor antiradicalic si antioxidant evidentiata pentru extractele de galbenele (Gb), castan (Cs) si deseuri de struguri (TES). Acestea sunt explicitate de compozitia in principii active (flavonoide, polifenoli) determinata in etapa de caracterizare analitica, precum si de relatia structura / activitate biologica riguros documentata si demonstrata prin studiile la nivel acelar si celular.

Cele trei conditii de stimulare pro-inflamatorie si pro-oxidativa aplicate in modelele experimentale realizate pe doua linii celulare standardizate si relevante dermo-epidermic (HaCaT si HS27), directioneaza aplicabilitatea la nivel topic a urmatoarelor combinatii:

- **A1_TES:Gb (1:9) si B1_TES:Gb (1:1)** – efect antiradicalic si potential de oxidoreducere semnificativ
- **A2_TES:Cs (1:9) si B2_TES:Cs (1:1)** – stimuleaza sistemul antioxidant intrinsec prin glutationul intracelular, in special in conditiile unui atac bacterian si a inflamatiei „in situ” asociate
- **A2_TES:Cs (1:9) si B2_TES:Cs (1:1)** – activeaza intracelular enzimele de aparare antioxidanta, catalaza si superoxid-dismutaza, si ca o consecinta, reduc ambele tipuri de radicali liberi oxigenati.
- **C1_TES:Gb (9:1)** – stimuleaza protectia antioxidanta intrinseca si extrinseca prin activarea glutationului intracelular si reducerea radicalilor liberi oxigenati.

Pe baza profilului antioxidant multiplu evidenciat, rezultatele obtinute se complementarizeaza cu cele anterioare privind asocierea extractului de struguri cu extractul fitoestrogenic de trifoi rosu cu adresabilitate in disfunctii hiperproliferative cutanate.

Studii ulterioare vor defini potentialul de regenerare dermo-epidermica al acestor asocieri (galbenele- TES, respectiv castan – TES) prin teste privind homeostazia matricei proteice si a turn-overului celular si vor transfera cunostintele obtinute in formularea de produs de uz topic.

Rezultatele din aceasta etapa a proiectului vor fi disseminate prin lucrarea: “Oxidative stress - trigger of cutaneous degenerative processes; modulation with active principles from *Aesculus hippocastanum*, *Calendula officinalis* and *Vitis vinifera*” la CONFERINȚA NAȚIONALĂ ȘTIINȚIFICĂ DE TOAMNĂ a AOSR, 20 - 21 septembrie 2019, Brașov

BIBLIOGRAFIE:

1. Croazier A., Clifford M.N., "Plant secondary metabolites, occurrence, structure and role in the human diet" Blackwell Publishing, 2006
2. Nichols JA, Katiyar SK ,Arch.Dermatol.Res.2010 Mar;30(2);71-83.
3. Shore R.E., Radiation-induced skin cancer in humans. *Med.Pediatr.Oncol.*, (2001) 36: 549-554.
4. Kale A., "Phytotherapy Research" Vol.22, 2008
5. Dawid-Pač R., Medicinal plants used in treatment of inflammatory skin Diseases, *Postep Derm Alergol*; (2013) 3: 170–177
6. Ross JA, Kasum CM.) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* (2002) 22, 19–34.
7. Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., Katan M.B., Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* (1993)20, 21–9.
8. Robert M., Bissonauth V., Ross G., Rouabhia M., Harmful effects of UVA on the structure and barrier function of engineered human cutaneous tissues. *Int.J.Radiat.Biol.*, (1999) 75: 317-26.
9. King A, Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J Am Diet Assoc* (1999) 99, 213–8.
10. Anafas'ev I.B., Dorozhko A.I., Brodskii A.V., Koytyuk V.A., Potapovitch A.I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* (1989) 38, 1763–9.
11. Brit D.F., Hendrich S., Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther* (2001) 90, 157–77.
12. Neukiron H, D'Ambrosio M, Dovia J, Guerriero A. Simultaneous Quantitative Determination of Eight Triterpenoid Monoesters from Flowers of 10 Varieties of *C. officinalis* L. and Characterisation of A New Triterpenoid Monoester. *Phytochem Anal.* (2004);15:30
13. Sagdicoglu A. G., Yilmaz S., Coruh N., Antioxidant Capacity and Cytotoxicity of *Aesculus hippocastanum* on Breast Cancer MCF-7 Cells, *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 20, No. 3, (2012), 692-698
14. Muley B.P., Khadabadi S.S., Banarase N.B., Phytochemical Constituents and

Pharmacological Activities of *C. officinalis* Linn (Asteraceae) Trop J Pharm Res. (2009);8:455–465.

15. Alnuqaydan A.M., Lenehan C.E., Hughes R.R., Sanderson B.J., Extracts from *Calendula officinalis* Offer in Vitro Protection Against H₂O₂ Induced Oxidative Stress Cell Killing of Human Skin Cells, *Phytother. Res.* (2014)
16. Formica J.V., Regelson W. Review of the quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* (1995)12, 1061–80.