
PHD THESIS SUMMARY

Design and evaluation of new topical systems for wound treatment and skin regeneration

PhD Student: **Diana Antonia SAFTA (DRÎMBĂREAN)**

PhD Supervisor: **Prof. Dr. Mirela Liliana MOLDOVAN**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	3
STATE OF THE ART	7
1. Insights into wound healing process.....	9
1.1. Overview of the wound healing mechanisms	9
1.2. Strategies for managing various wound types	10
2. Natural bioactives in wound healing – benefits and challenges	12
2.1. Antioxidant effect.....	12
2.2. Antimicrobial effect	13
2.3. Anti-inflammatory effect	13
2.4. Wound healing effect	14
2.5. Challenges in the use of natural bioactives in wound care	14
3. Advanced topical systems for wound care	16
3.1. Film-dressings.....	16
3.2. Nanostructured lipid carriers (NLCs).....	20
4. Quality by Design (QbD) approach and Design of Experiments (DoE) method.....	28
4.1. QbD and DoE – general aspects	28
4.2. Optimization of HEs preparation within the QbD framework.....	29
4.3. Optimization of film-dressings and NLCs formulations within the QbD framework.....	30
PERSONAL CONTRIBUTION	32
5. Aim and objectives	33
6. General methodology	34
6.1. QbD approach in the development and optimization of HEs, CHE-loaded film- dressings and CHE-loaded NLCs.....	34
6.2. Statistical analysis and data representation	35
7. First study. Optimization of HEs' preparation from <i>Sambucus nigra</i> L., <i>Epilobium</i> <i>hirsutum</i> L., and <i>Lythrum salicaria</i> L. and evaluation of their biological properties for wound care	36
7.1. Introduction	36
7.2. Objectives	37
7.3. Material and method	38
7.4. Results and Discussions.....	45
7.6. Conclusions.....	67
8. Second study. Optimization of CHE-loaded film-dressings for wound care—a Quality by Design approach	68
8.1. Objectives	68
8.2. Material and method	68
8.3. Results and discussions	74
8.4. Conclusions.....	102
9. Third study. Optimization of CHE-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for wound care—a QbD by Design approach	104

9.1. Objectives.....	104
9.2. Materials and method.....	104
9.3. Results and discussions.....	109
9.4. Conclusions	130
10. General conclusions.....	131
11. The originality and the innovations of the thesis.....	133
REFERENCES	135

Keywords: wound healing, herbal extracts, film-dressings, nanostructured lipid carriers, Quality by Design, Design of Experiments

INTRODUCTION

The increasing prevalence of acute and chronic wounds demands the development of modern therapeutic solutions, as conventional treatments present limitations. In this context, herbval extracts have gained growing interest for wound treatment. However, their topical applicability is limited by the instability of active compounds and reduced bioavailability. An innovative approach can enable efficient valorization of these natural resources by incorporating them into modern topical systems such as film dressings and lipid-based nanosystems. These delivery platforms can protect active compounds, allow controlled release, and improve therapeutic efficacy, while ensuring patient comfort throughout treatment. Although the scientific literature supports the potential of these strategies, the low number of commercial products highlights the ongoing need for research in this field. Taking this into consideration, the research conducted in this PhD thesis aimed to optimize and evaluate the biological effects of herbval extracts for wound treatment and their incorporation into two optimized topical systems: film-dressings and nanostructured lipid carriers (NLCs). The development and optimization of both the preparation of herbal extracts and the formulation of the two topical systems were achieved by applying the Quality by Design (QbD) approach and Design of Experiments (DoE) tool. This systematic approach led to formulations with optimized characteristics and promising potential for wound care applications.

STATE OF THE ART

Herbal extracts have been traditionally used in the treatment of skin conditions due to their multiple effects, such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and wound healing activities. Recent research confirms the therapeutic potential of plant extracts and aims to enhance their efficacy by incorporating them into modern topical systems [1,2] Among these, film-dressings containing herbal extracts represent a

simple, accessible, and cost-effective solution for managing various types of wounds and are considered highly promising [3,4]. Film-dressings are transparent and flexible topical systems that efficiently conform to the wound surface, providing good contact with the wound and increased patient comfort. Being semi-permeable, they protect the wound from bacteria while allowing the passage of water vapors and oxygen, maintaining an ideal moist environment for healing [5]. Additionally, natural bioactive compounds can be incorporated into lipid-based nanosystems, which can improve both their stability and bioavailability, while also providing prolonged release of the encapsulated active compounds [6,7]. The new generation of lipid nanoparticles, NLCs, present high stability and increased encapsulation efficiency of active compounds [8]. By applying the QbD approach and the DoE method, efficient and reproducible finished products are obtained, allowing systematic optimization of composition and process parameters, while also contributing to the understanding of factors influencing the product quality [9]. Thus, for film-dressings loaded with herbal extracts, most optimization studies published in the literature varied the concentrations of film-forming polymers and plasticizers, evaluating their influence on the degree of hydration, mechanical properties, and adhesiveness [3,10–12]. For NLCs loaded with herbal extracts, mainly the effects of lipid type, solid: liquid lipids ratio, and surfactant concentration on particle size, polydispersity index, and encapsulation efficiency have been studied [13–16].

PERSONAL CONTRIBUTIONS

Study 1: Optimization of HEs' preparation from *Sambucus nigra* L., *Epilobium hirsutum* L., and *Lythrum salicaria* L. and evaluation of their biological properties for wound care

Aim / Objectives: The general aim of this study was to optimize and evaluate the potential to be used in wound care of *Sambucus nigra* flowers and the aerial parts of *Epilobium hirsutum* and *Lythrum salicaria* through a comprehensive phytochemical and biological analysis of their optimized HEs (OHEs). The extraction of bioactive compounds was optimized using the QbD approach, analyzing two extraction methods (Ultra-Turrax-assisted extraction – UTE and ultrasound-assisted extraction – USE), different extraction times (3, 5, and 10 minutes), and various ethanol concentrations in the hydroethanolic extraction solvent (30%, 50%, 70%), with the aim of maximizing total polyphenol content (TPC) and total flavonoid content (TFC). The optimized extracts were characterized by LC-MS/MS and evaluated for antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, and wound healing activity.

Materials and Methods: The experimental design and analysis of formulation factor influences on extraction were conducted using Modde 13.1 software (Sartorius Stedim, Göttingen, Germany). UTE was performed using an Ultra-Turrax homogenizer (model T

18, IKA Labortechnik, Staufen, Germany) equipped with the W 45MA fixture at 4000 rpm. USE was carried out in an ultrasonic bath (Sonorex Super RK 100 H, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany) TPC was quantified using the Folin-Ciocalteu assay, following a previously validated method [17,18]. TFC was determined using a quercetin-based colorimetric method following a previously validated method [17,19]. Phytochemical profiles (identification and quantification of phytosterols, tocopherols, and procyanidins) were analyzed by five distinct previously validated analytical methods using LC-MS/MS (Agilent 1100 Series HPLC system, Agilent, Santa Clara, CA, USA, coupled with an Ion Trap mass spectrometer, Agilent 1100 SL Ion Trap VL, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Chromatographic data acquisition and interpretation were performed using DataAnalysis (v5.3) and ChemStation (vB01.03) software from Agilent [17]. Antioxidant activity was assessed using colorimetric assays according to a previously described method (DPPH, FRAP, TEAC assays) [17]. Antibacterial properties were evaluated against the following microbial strains: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* MSSA ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 700699, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Qualitative antibacterial activity was determined using the disc diffusion method [20,21]. The Alamar Blue assay [22] was used to assess cell viability on HaCaT and BJ cell lines, while the MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was applied on RAW264.7 cells [23]. Antioxidant potential in cell cultures was evaluated using the DCFH-DA assay [24] Anti-inflammatory activity was evaluated by measuring IL-6 and IL-8 levels in BJ cells using ELISA kits (Invitrogen, Thermo Scientific, USA). Nitric oxide production was determined in RAW264.7 cells using a previously described method [25]. The scratch assay was used to investigate the *in vitro* wound healing potential on HaCaT and BJ cells using a Zeiss Axio Observer Z1 microscope (Zeiss, Jena, Germany) equipped with an AxioCam Icc Rev.4 CCD camera (1.4 megapixels, Zeiss), with image processing performed using ZEN 2.3 lite software. The images were subsequently analyzed with ImageJ 1.54d software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), and the cell migration rate and wound closure percentage were calculated [26].

Results: For all the HEs, the use of UTE led to higher TPC and TFC values compared to USE. The *Lythrum salicaria* OHE showed the highest antioxidant activity, followed by the *Epilobium hirsutum* OHE. The *Lythrum salicaria* OHE exhibited an inhibitory effect comparable to gentamicin against *Staphylococcus aureus* MSSA and MRSA strains. The *Sambucus nigra* OHE significantly inhibited IL-6 secretion in LPS-stimulated BJ. The *Lythrum salicaria* OHE significantly reduced IL-6 levels. *Epilobium hirsutum* and *Lythrum salicaria* OHEs significantly decreased IL-8 levels. *Sambucus nigra* and *Epilobium hirsutum* OHEs reduced nitric oxide levels secreted by LPS-stimulated RAW264.7 cells, an effect comparable to dexamethasone. The most effective wound healing activity in HaCaT and BJ was observed for the *Epilobium hirsutum* OHE; a significant effect was also observed for the *Sambucus nigra* OHE on HaCaT.

Conclusions: These OHEs demonstrated high potential for application at various stages of the wound healing process, due to their anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, and wound healing effects. The complementary and synergistic properties observed support the prospect of incorporating these OHE into future topical formulations intended for wound care as a complex herbal extract (CHE) composed in equal parts of the three OHEs.

Study 2: Optimization of CHE-loaded film-dressings for wound care - a QbD approach

Aim / Objectives: The purpose of this study was to optimize a film dressing containing the complex herbal extract (CHE) developed in Study 1, using the QbD concept and the DoE method. The influence of the type and concentration of film-forming agents (xanthan gum, acacia gum, sodium carboxymethylcellulose) and plasticizers (glycerol, 1,3-propanediol, xylitol) on the critical characteristics of the CHE-containing film dressing was evaluated. Optimization aimed to obtain film dressings with CHE that have a high degree of hydration, adequate mechanical strength, flexibility, and high adhesive properties, to ensure product efficacy and patient comfort throughout treatment. The optimized formulation was analyzed for pH, water vapor transmission rate (WVTR), water contact angle (WCA), and morphology by scanning electron microscopy (SEM) to demonstrate its potential for use in wound treatment. Furthermore, the release profile of CHE incorporated in the optimized formulation was assessed to observe its potential for sustained release over 8 hours. Physical stability studies were conducted over 12 months to demonstrate the durability of the optimized formulation. The optimized CHE-loaded film-dressing was compared both to a control film-dressing (without CHE), to show that CHE does not alter the film-dressing properties, and to a commercially available film-dressing, to confirm its potential for topical use in wound treatment.

Materials and Methods: The CHE-loaded film-dressings were fabricated using the solvent casting technique [3,10]. The thickness of each film was assessed using a digital micrometer (Mitutoyo, Tokyo, Japan) [10,27]. The swelling degree was determined using ISO 175:2010 recommendations [28,29] [3]. The mechanical and adhesive properties of the CHE-loaded film-dressings was assessed using the CT3 Texture Analyzer (Brookfield Engineering Laboratories, Middleborough, MA, USA), equipped with a TA-FSF fixture and a cylindrical probe featuring a rounded end (0.8 cm diameter, 6 cm length) for puncture test [3], with the TA-AACC36 probe and a gelatin gel as substrate for evaluation of adhesive properties [30], and with the TA-DGF fixture to evaluate the elasticity and tensile strength tensile properties [31]. Software-ul Texture Pro CT V1.9 (Brookfield Engineering Laboratories, Middleborough, MA, SUA) a fost utilizat pentru înregistrarea valorilor parametrilor. To evaluate the flexibility of the films, the folding endurance was tested [10,32]. The pH values of the gel before pouring and of the film-dressing were determined using a pH-meter with an electrode for semisolid samples (Hanna Instruments, Romania) [33]. The WVTR was determined

according to ASTM E96 standard using water method [34] and a previously published method [10]. The WCA was measured using a video contact angle measurement system (OCA 25, Dataphysics, Filderstadt, Germany) and was calculated via the software DpiMAX (Dataphysics, Filderstadt, Germany)[10]. The SEM analysis was used to evaluate the morphology of the film-dressing with SEM Hitachi SU8230 (Hitachi High-Tech Corporation, Tokyo, Japan), at 30 kV and 11.6 mm working distance, with magnifications ranging from 40 to 50000x [10]. The release profile of TPC from the optimized CHE-loaded film-dressing was investigated using an automated Phoenix diffusion cell system (Teledyne Hanson, Chatsworth, CA, USA). The receptor compartment was filled with a hydroalcoholic medium consisting of ethanol and water in a 25:75 (v/v) ratio, kept under constant magnetic stirring at 400 rpm and a controlled temperature of 32 ± 0.5 °C. Aliquots of 500 μ L were withdrawn from the receptor compartment at predetermined time intervals (15, 30, 45 minutes, 1 hour, then hourly up to 8 hours), using an autosampler. Each collected volume was immediately replaced with an equal volume of fresh receptor medium. The cumulative release of TPC was calculated and plotted as a function of time [10,35]. The polyphenols released from CHE-loaded film-dressing was quantified using the Folin–Ciocâlțeu assay previously applied for CHE optimization.

Results: The optimized formulation contained 5% polyvinyl alcohol, 0.25% xanthan gum, 10% glycerol, 20% CHE, and distilled water. The optimized formulation exhibited adequate thickness, mechanical properties, and adhesiveness comparable to values reported in the literature. It demonstrated sustained release of polyphenols from the incorporated CHE over 8 hours, suggesting high potential for wound care applications. Additionally, the optimized formulation showed appropriate pH, WVTR, and WCA suitable for wound treatment, as well as physical stability over 12 months, demonstrating its practical utility. SEM analysis confirmed a uniform and homogeneous surface, indicating good integrity of the optimized formula. The characteristics of the optimized formulation and the blank formulation were similar, indicating that the incorporation of CHE did not affect film formation. Furthermore, the properties of the optimized formulation were comparable to those of a commercially available film-dressing, validating its practical applicability.

Conclusions: The optimized CHE-loaded film-dressing demonstrated excellent properties suitable for wound care, with a high potential for therapeutic efficacy.

Study 3: Optimization of CHE-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for wound care - a QbD approach

Aim / Objectives: The aim of this study was to optimize the formulation of NLCs containing CHE developed in Study 1, using the QbD approach and DoE methodology. The investigation focused on the influence of the type and concentration of solid lipids (palmitic acid, cetyl alcohol) and liquid lipids (caprylic/capric triglycerides, isopropyl

myristate), the concentration of Tween® 80 as the main surfactant, and the effect of adding a co-surfactant (Span® 85) on critical formulation parameters: particle size (PS), polydispersity index (PDI), zeta potential (ZP), encapsulation efficiency (EE), and occlusivity factor (OF). For the optimized formulation, pH, viscosity, and texture analysis were determined to support its suitability for wound treatment. The morphology of the optimized formulation was examined by electron microscopy to confirm the formation of NLCs and the homogeneity of the NLCs dispersion. Additionally, the release profile of CHE incorporated in the optimized formulation was evaluated to assess its potential for sustained release over 72 hours. The optimized formula was compared to a control NLCs formulation (without CHE) to observe the effect of CHE on the NLCs properties. Furthermore, a comparison with a commercially available wound care product was performed to validate the applicability of the optimized CHE-loaded NLCs for wound care.

Materials and Methods: CHE-loaded NLCs were prepared using a hot-melt homogenization method followed by sonication [36,37]. PS, PDI, ZP were determined using a Zetasizer NanoZS analyzer (Malvern Instruments Co., Malvern, UK) after dilution with distilled water 1:100 (v/v) [38]. The EE was determined by measuring the TPC through a colorimetric assay as used for the optimization of HEs preparation. NLCs dispersions were diluted with methanol 1:10 (v/v) and maintained in an ultrasound bath (Elma™ Elmasonic Select, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Germany) for 10 min to disrupt their structure and release the entrapped CHE [38]. The OF of the NLCs was assessed by spreading of 500 μ L NLCs on qualitative filter paper and used to cover a vessel containing distilled water. Then, the system was incubated in a laboratory oven (Venticell®, MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg, Germany) at 32 ± 2 °C for 24 hours, and water loss through evaporation was measured by weighing the sample and OF was calculated [39]. The pH values were determined at 22 ± 0.5 °C, using a pH-meter previously calibrated, with an electrode for semisolids samples (Hanna Instruments, Cluj-Napoca, Romania) [9]. The viscosity of the NLCs was measured using a CAP 2000+ viscometer (Brookfield Engineering Laboratories, Middleborough, MA, USA) at 20 ± 0.5 °C, using spindle 08, with a hold time of 10 seconds and an analysis time of 20 seconds, at a speed of 5 rpm. Texture analysis was assessed using the CT3 Texture Analyzer at 22 ± 0.5 °C with TA-DEC probe and TA-BT-KIT fixture and the results were recorded on a load vs. time graph. The texture parameters were calculated by using Texture ProCTSoftware. For STEM, the samples were deposited on 400-mesh carbon-coated copper grids (20–30 nm thickness, Science Services GmbH, München, Germany) and then blotted dry, left to air-dry, then were imaged in scanning and transmission modes in the electron microscopes (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan): Hitachi SU8230 scanning electron microscope (SEM) at 30 kV, 10 μ A; and Hitachi HD2700 scanning transmission electron microscope (STEM) at 200 kV, 10 μ A. Images were taken at magnifications ranging from 1000x - 500.000 x in scanning and/or transmission mode. For *in vitro* CHE release from the CHE-loaded NLCs, a 1 mL of sample

was added into the dialysis device Spectra/Por® Float-A-Lyzer® G2, having cellulose ester membranes with molecular weight cut-off (MWCO) of 50 kDa, no. G235058, 5 mL (Repligen, Boston, Massachusetts, USA), according to an adapted method from the literature [40], which was inserted into a dissolution medium of 15 mL distilled water, maintained at of $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and stirred at 200 rpm. The released amount of the TPC from the CHE-loaded NLCs was determined at specific intervals of time (30 min, 1 h and then hourly for 8 h and at 24, 48 and 72 h) by collecting 500 μl of medium. The amount of CHE released was determined by quantification of TPC and the cumulative release (%) was calculated and graphically represented against time.

Results: The optimized formula contained 5% cetyl alcohol, 5% caprylic/capric triglycerides, 5% Tween® 80, 1% Span® 85, 20% CHE, and distilled water. The optimized formulation exhibited PS suitable for dermal efficacy, homogeneity demonstrated by a low PDI, and potential stability suggested by a negative ZP. Furthermore, efficient encapsulation of CHE and a high OF of the optimized formula may contribute to enhanced therapeutic efficacy. STEM confirmed the formation of NLCs with smooth spherical surfaces and uniform PS distribution, without visible signs of aggregation or phase separation. The pH values, viscosity, and texture profile of the optimized formulation were appropriate for wound treatment and comparable to a commercially available wound care fluid, highlighting its potential for practical application. The optimized formulation showed sustained release of polyphenols from the incorporated CHE for up to 72 hours, favoring the maintenance of long-term therapeutic effects in wound treatment.

Conclusions: The formulation of CHE-loaded NLCs was successfully optimized, exhibiting excellent properties tailored for wound care use, with high potential for therapeutic efficacy.

GENERAL CONCLUSIONS

This PhD thesis focused on the development of topical systems for wound treatment that harness the therapeutic potential of plant extracts from Romania's spontaneous flora. To optimize the extraction of active compounds as well as the development of topical systems, the QbD approach and the DoE method were applied.

The first study optimized the extraction of polyphenols and flavonoids from *Sambucus nigra* flowers and aerial parts of *Epilobium hirsutum* and *Lythrum salicaria*, evaluating their phytochemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, and wound healing properties. The results demonstrated complementary and synergistic effects of the OHEs, supporting their combination into a CHE, which was subsequently incorporated into two novel topical systems: film-dressings and NLCs.

The second study developed and optimized the formulation of a film-dressing containing the CHE obtained in the first study. This CHE-loaded film-dressing exhibited excellent physical properties, ensuring high flexibility and swelling degree, mechanical

strength, sustained release of polyphenols from the CHE over 8 hours, and physical stability for 12 months—all essential for supporting wound healing and patient comfort. Moreover, its properties were comparable to those of a commercially available film dressing, demonstrating good applicability.

The third study developed and optimized NLCs containing the CHE from the first study. These NLCs showed appropriate physical properties, sufficient encapsulation of the CHE, a high OF, and sustained release of polyphenols from the incorporated CHE for up to 72 hours, which may lead to increased therapeutic efficiency. Additionally, their rheological and texture properties were adequate and similar to those of a commercially available wound care fluid, demonstrating practical application potential.

Thus, all these results open promising perspectives that combine the scientifically demonstrated benefits of traditional natural bioactive compounds with modern topical systems.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE PHD THESIS

The originality of this doctoral thesis lies in the development of a CHE with an optimized content of bioactive compounds essential for the wound healing process, obtained by combining three OHEs. This CHE was subsequently incorporated into novel optimized topical systems, namely film-dressings and NLCs. A key aspect of this research was the application of the QbD approach in both the optimization of the preparation of the three herbal extracts and the formulation of both topical systems. Through the implementation of DoE, the influences of process and formulation parameters on the characteristics of the final products were identified, deepening the understanding of the development of the extracts and these topical systems. Furthermore, this thesis brings valuable contributions that advance research in this field.

Firstly, this study was the first to report the use of the UTE method for extracting bioactive compounds from *Sambucus nigra* flowers and the aerial parts of *Lythrum salicaria*. Additionally, it reported the first evaluation of the anti-inflammatory activity of *Sambucus nigra* and *Lythrum salicaria* extracts on BJ. Moreover, the effects of *Lythrum salicaria* and *Epilobium hirsutum* extracts on HaCaT and RAW 264.7 cell lines were reported for the first time, and it was the first research to investigate the wound healing effect of *Epilobium hirsutum* extract through an *in vitro* scratch assay.

This CHE was incorporated for the first time into modern topical systems such as film dressings and NLCs. Most of the formulation factors selected for the development of these topical systems containing CHE were studied for the first time within a QbD concept. Additionally, for the optimization of NLCs with CHE, OF was used for the first time as a response factor within DoE. There are also no previously published studies

using cetearyl alcohol for the preparation of NLCs. Moreover, this research is the first to apply texture analysis for the characterization of NLC dispersions.

The results obtained in this doctoral research provide valuable information on the use of herbal extracts in wound care and support the development of herbal extract-loaded film-dressings and NLCs as modern topical systems with promising therapeutic potential.

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Design-ul și evaluarea unor noi sisteme topice pentru tratamentul rănilor și regenerarea pielii

Doctorand: **Diana Antonia SAFTA (DRÎMBĂREAN)**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Mirela Liliana
MOLDOVAN**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE	3
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	7
1. Perspective asupra procesului de vindecare a rănilor	9
1.1. Prezentare generală a mecanismelor de cicatrizare	9
1.2. Strategii pentru gestionarea diferitelor tipuri de răni.....	10
2. Compuși bioactivi naturali în vindecarea rănilor – beneficii și provocări.....	12
2.1. Efectul antioxidant.....	12
2.2. Efectul antimicrobian	13
2.3. Efectul antiinflamator	13
2.4. Efectul de regenerare a pielii	14
2.5. Provocări în utilizarea compușilor bioactivi naturali în îngrijirea rănilor	14
3. Sisteme topice avansate pentru îngrijirea rănilor	16
3.1. Pansamente de tip film	16
3.2. Sisteme lipidice nanostructurate (NLCs).....	20
4. Conceptul de Calitate prin Design (QbD) și metoda planurilor experimentale (DoE).....	28
4.1. QbD și DoE – aspecte generale	28
4.2. Optimizarea obținerii extractelor vegetale în cadrul conceptului QbD	29
4.3. Optimizarea formulării pansamentelor de tip film și a NLCs în cadrul conceptului QbD	30
CONTRIBUȚII PERSONALE	32
5. Scop și obiective.....	33
6. Metodologie generală	34
6.1. Aplicarea conceptului QbD în dezvoltarea și optimizarea extractelor vegetale, a pansamentelor de tip film cu extracte vegetale și a NLCs cu extracte vegetale ..	34
6.2. Analiza statistică și reprezentarea datelor	35
7. Studiul 1. Optimizarea obținerii extractelor vegetale din <i>Sambucus nigra</i> L., <i>Epilobium hirsutum</i> L., și <i>Lythrum salicaria</i> L. și evaluarea proprietăților lor biologice în îngrijirea rănilor	36
7.1. Introducere	36
7.2. Obiective.....	37
7.3. Materiale și metodă.....	38
7.4. Rezultate și discuții	45
7.6. Concluzii	67
8. Studiul 2. Optimizarea unor pansamente de tip film cu extractul complex (CHE) pentru îngrijirea rănilor – o abordare QbD	68

8.1. Obiective	68
8.2. Materiale și metode	68
8.3. Rezultate și discuții.....	74
8.4. Concluzii.....	102
9. Studiul 3. Optimizarea unor sisteme lipidice nanostructurate (NLCs) cu extractul complex (CHE) pentru îngrijirea rănilor – o abordare QbD	104
9.1. Obiective	104
9.2. Materiale și metode	104
9.3. Rezultate și discuții.....	109
9.4. Concluzii.....	130
10. Concluzii generale.....	131
11. Originalitatea și contribuțiile inovative ale cercetării doctorale	133
REFERINȚE.....	135

Cuvinte cheie: cicatrizare, extracte vegetale, pansamente de tip film, nanostructuri lipidice, Calitate prin Design, planuri experimentale

LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. Safta, D.A.; Bogdan, C.; Moldovan, M.L. Vesicular Nanocarriers for Phytocompounds in Wound Care: Preparation and Characterization. *Pharmaceutics* 2022, *14*, 991. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14050991> (articol de tip review inclus în capitolele 1 și 2).
2. Safta, D.A.; Bogdan, C.; Moldovan, M.L. SLNs and NLCs for Skin Applications: Enhancing the Bioavailability of Natural Bioactives. *Pharmaceutics* 2024, *16*, 1270. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16101270> (articol de tip review inclus în capitolul 3.2).
3. Safta, D.A.; Vlase, A.-M.; Pop, A.; Cherfan, J.; Carpa, R.; Iurian, S.; Bogdan, C.; Vlase, L.; Moldovan, M.-L. Optimized *Sambucus nigra* L., *Epilobium hirsutum* L., and *Lythrum salicaria* L. Extracts: Biological Effects Supporting Their Potential in Wound Care. *Antioxidants* 2025, *14*, 521. <https://doi.org/10.3390/antiox14050521> (studiu inclus în capitolul 7 – studiul 1).
4. Safta, D.A.; Bogdan, C.; Iurian, S.; Moldovan, M.-L. Optimization of Film-Dressings Containing Herbal Extracts for Wound Care—A Quality by Design Approach. *Gels* 2025, *11*, 322. <https://doi.org/10.3390/gels11050322> (studiu inclus în capitolul 8 – studiul 2).

INTRODUCERE

Prevalența în creștere a rănilor acute și cronice impune dezvoltarea unor soluții terapeutice moderne, în condițiile în care tratamentele clasice prezintă limitări. În acest context, extractele vegetale prezintă un interes tot mai crescut pentru tratamentul rănilor. Aplicabilitatea lor pentru uz topic este limitată de instabilitatea compușilor activi și de biodisponibilitatea redusă. Printr-o abordare inovatoare se poate obține o valorificare eficientă a acestor resurse naturale, realizată prin încorporarea lor în sisteme topice moderne, precum pansamentele de tip film și nanosistemele lipidice. Acestea pot conferi protecție compușilor activi, eliberare controlată și o eficiență terapeutică îmbunătățită, asigurând totodată confortul pacientului pe parcursul tratamentului. Deși literatura de specialitate susține potențialul acestor strategii, numărul redus de produse comerciale confirmă nevoia continuă de cercetare în acest domeniu. În acest context, cercetările desfășurate în cadrul acestei teze de doctorat au avut ca scop optimizarea și evaluarea efectelor biologice ale unor extracte vegetale pentru utilizare în tratamentul rănilor și încorporarea lor în două sisteme topice optimizate, respectiv pansamente de tip film și sisteme lipidice nanostructurate (NLCs). Dezvoltarea și optimizarea atât a obținerii extractelor vegetale, cât și a formulării celor două sisteme topice s-a realizat prin aplicarea conceptului de Calitate prin Design (QbD) și utilizarea metodei planurilor experimentale (DoE). Această abordare sistematică a condus la obținerea unor produse cu caracteristici optimizate și promițătoare pentru utilizare în tratamentul rănilor.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Extractele vegetale sunt utilizate în medicina tradițională în tratarea afecțiunilor cutanate, datorită efectelor lor multiple, precum acțiunea antioxidantă, antiinflamatoare, antimicrobiană și cicatrizantă. Cercetările recente confirmă potențialul terapeutic al extractelor vegetale și urmăresc îmbunătățirea eficacității lor prin încorporarea în sisteme topice moderne [1,2]. Dintre acestea, pansamentele de tip film în care s-au încorporat extracte vegetale reprezintă o soluție simplă, accesibilă și rentabilă pentru îngrijirea diverselor tipuri de răni, fiind considerate foarte promițătoare [3,4,41]. Pansamentele de tip film sunt sisteme topice transparente, flexibile și elastice, care se pliază eficient pe suprafața lezată, oferind contact bun cu rana și un confort sporit pacientului. Fiind semipermeabile, protejează rana de bacterii, dar permit trecerea vaporilor de apă și oxigen, menținând un mediu umed ideal pentru cicatrizare [5]. De asemenea, compușii bioactivi naturali pot fi încorporați în nanoparticule lipidice, ceea ce poate îmbunătăți atât stabilitatea, cât și biodisponibilitatea lor [42]. În plus, acestea pot asigura o eliberare prelungită a compușilor activi încapsulați [6,7]. Noua generație de nanoparticule lipidice, NLCs, sunt

mai stabile și au o eficiență crescută de încapsulare a principiilor active [8]. Prin aplicarea conceptului QbD și a metodei DoE se obțin produse finite eficiente și reproductibile, permițând optimizarea sistematică a compoziției și a parametrilor de proces și contribuind în același timp la înțelegerea factorilor care influențează calitatea produselor obținute [9]. Astfel, în cazul pansamentelor de tip film cu extracte vegetale, în majoritatea studiilor de optimizare publicate în literatură s-au variat concentrațiile de polimeri formatori de film și agenți plastifianți și s-a evaluat influența acestora asupra gradului de umectare, a proprietăților mecanice și adezive [3,10–12]. Pentru NLCs cu extracte vegetale au fost studiate în principal efectele tipului de lipide, raportului lipide solide:lipide lichide și concentrației de tensioactiv asupra dimensiunii particulelor, indicelui de polidispersie și eficienței de încapsulare [13–16].

CONTRIBUȚII PERSONALE

Studiul 1: Optimizarea obținerii extractelor vegetale din *Sambucus nigra* L., *Epilobium hirsutum* L., și *Lythrum salicaria* L. și evaluarea proprietăților lor biologice în îngrijirea rănilor

Scop / Obiective: Scopul principal al acestui studiu a fost optimizarea și evaluarea potențialului de utilizare în îngrijirea rănilor a extractelor din flori de *Sambucus nigra* L. și din părți aeriene din *Epilobium hirsutum* L. și *Lythrum salicaria* L. Extracția compușilor bioactivi s-a realizat utilizând abordarea QbD și metoda DoE, analizând două metode de extracție (extracție asistată de Ultra-Turrax – UTE, respectiv extracție asistată de ultrasunete - USE), timpuri de extracție diferiți (3, 5, 10 minute) și concentrații diferite de etanol în solventul hidroetanolic de extracție (30, 50, 70 %). S-au observat influențele acestor factori asupra conținutului total de polifenoli (TPC) și flavonoide (TFC) din extractele obținute, cu scopul de a maximiza acești parametri. Extractele optimizate (OHEs) au fost caracterizate din punct de vedere al profilului fitochimic prin LC-MS/MS și evaluate *in vitro* pentru activitate antioxidantă, antibacteriană, antiinflamatoare și cicatrizantă.

Material și metode: Pentru dezvoltarea DoE și analiza influențelor factorilor de formulare asupra extracției s-a utilizat software-ul Modde Modde 13.1 (Sartorius Stedim, Göttingen, Germania). UTE a fost realizată utilizând un homogenizator Ultra-Turrax (model T 18, IKA Labor Technik, Staufen, Germania) cu accesoriul W 45MA, la 4000 rpm. USE a fost efectuată într-o baie de ultrasunete (Sonorex Super RK 100 H, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germania). TPC a fost cuantificat utilizând metoda Folin-Ciocalteu, iar TFC a fost determinat printr-o metodă colorimetrică bazată pe quercetină, conform unor metode validate anterior [17,18]. Profilurile fitochimice (identificarea și cuantificarea fitosterolilor, tocoferolilor, procianidinelor) au fost analizate prin cinci metode analitice validate în prealabil, utilizând LC-MS/MS (sistem HPLC Agilent 1100 Series, Agilent, Santa Clara, CA, SUA, cuplat cu un spectrometru de

masă tip Ion Trap Agilent 1100 SL (LC/MSD Ion Trap VL, Agilent, Santa Clara, CA, SUA). Achiziția și interpretarea datelor cromatografice au fost realizate utilizând software-urile DataAnalysis (v5.3) și ChemStation (vB01.03) de la Agilent [17]. Activitatea antioxidantă a fost evaluată utilizând teste colorimetrice (teste DPPH, FRAP, TEAC) [17]. Proprietățile antibacteriene au fost evaluate utilizând următoarele tulpini microbiene: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* MSSA ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 700699 și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 prin metoda difuzimetrică [20,21]. Testul Alamar Blue [22] a fost utilizat pentru evaluarea viabilității celulare pe liniile celulare HaCaT și BJ, în timp ce testul MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazoliu bromid) a fost aplicat pentru celulele RAW264.7 [23]. Potențialul antioxidant în culturi celulare a fost evaluat utilizând testul DCFH-DA pe HaCaT și BJ [24]. Activitatea antiinflamatoare a fost evaluată prin măsurarea nivelurilor IL-6 și IL-8 din BJ, utilizând kituri ELISA (Invitrogen, Thermo Scientific, SUA). Măsurarea producției de oxid nitric a fost determinată în celulele RAW264.7 [25]. Efectul cicatrizant *in vitro* a fost testat prin "scratch assay" pe HaCaT și BJ cu un microscop Zeiss Axio Observer Z1 (Zeiss, Jena, Germania) echipat cu o cameră CCD AxioCam Icc Rev.4 (1.4 megapixeli, Zeiss) și procesate cu software-ul ZEN 2.3 lite. Imaginile au fost ulterior analizate utilizând software-ul ImageJ 1.54d (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SUA), și s-au calculat rata de migrare celulară și procentul de închidere a rănii [26].

Rezultate: Pentru toate cele trei extracte, utilizarea metodei UTE a condus la valori mai ridicate ale TPC și TFC comparativ cu USE. *Lythrum salicaria* OHE a prezentat cea mai mare activitate antioxidantă, urmat de *Epilobium hirsutum* OHE. *Lythrum salicaria* OHE a avut un efect inhibitor comparabil cu gentamicina împotriva tulpinilor de *Staphylococcus aureus* MSSA și MRSA. *Sambucus nigra* OHE a inhibat semnificativ secreția de IL-6 în BJ stimulate cu lipopolizaharidă bacteriană (LPS), iar *Lythrum salicaria* OHE a redus nivelul de IL-6. *Epilobium hirsutum* și *Lythrum salicaria* OHEs au redus nivelurile de IL-8. *Sambucus nigra* și *Epilobium hirsutum* OHEs au scăzut nivelul de oxid nitric secretat de RAW 264.7 stimulate cu LPS, efect comparabil cu cel al dexametazonei. Cea mai eficientă activitate cicatrizantă în HaCaT și BJ, a fost observată pentru *Epilobium hirsutum* OHE, un efect semnificativ a fost observat și pentru *Sambucus nigra* OHE pe linia celulară HaCaT.

Concluzii: Datorită activităților antiinflamatoare, antibacteriene, antioxidante și cicatrizante demonstrate, OHEs prezintă un potențial terapeutic important în susținerea diferitelor etape ale procesului de vindecare a rănilor. Complementaritatea și posibilele efecte sinergice susțin utilizarea lor sub formă de amestec în proporții egale, pentru obținerea unui extract complex (CHE), care va fi ulterior încorporat în două sisteme topice moderne: pansamente de tip film și NLCs, destinate tratamentului rănilor.

Studiul 2. Optimizarea unor pansamente de tip film cu extractul complex (CHE) pentru îngrijirea rănilor – o abordare QbD

Scop / Obiective: Scopul acestui studiu a fost optimizarea unui pansament de tip film conținând CHE dezvoltat în studiul 1, utilizând conceptul QbD și metoda DoE. S-au evaluat influența tipului și a concentrației agenților formatori de film (guma xantan, guma acacia, carboximetilceluloză sodică) și respectiv a plastifiantilor (glicerol, 1,3-propanediol, xilitol) asupra caracteristicilor critice ale pansamentului de tip film cu CHE. Optimizarea s-a realizat având ca obiectiv obținerea unor pansamente de tip film cu CHE cu grad de umectare ridicat, rezistență mecanică adecvată, flexibilitate și proprietăți adezive ridicate, pentru a asigura eficiența produsului și confortul pacientului pe parcursul tratamentului. Formula optimizată s-a analizat din punct de vedere al pH-ului, a ratei de transmisie a vaporilor de apă (WVTR), a unghiului de contact al apei (WCA), a morfologiei prin microscopie electronică de scanare (SEM) pentru a demonstra potențialul acesteia de utilizare în tratamentul rănilor. De asemenea, s-a urmărit evaluarea profilului de cedare al CHE încorporat în formula optimizată, pentru a observa potențialul său de eliberare susținută pentru 8 ore. S-au realizat studii de stabilitate fizică pentru 12 luni pentru a demonstra durabilitatea formulei optimizate. S-a comparat formula optimizată atât cu un film martor (fără CHE), pentru a arăta că CHE nu alterează proprietățile pansamentului de tip film, cât și cu un pansament comercial, pentru a-i confirma potențialul de utilizare topică în tratamentul rănilor.

Material și metode Pentru prepararea pansamentelor de tip film cu CHE s-a utilizat tehnica de turnare și uscare a gelului [3]. Grosimea filmului obținut a fost determinată cu un micrometru digital (Mitutoyo, Tokyo, Japonia) [3]. Gradul de umectare a filmului a fost determinat conform recomandărilor standardului ISO 175:2010 [28,29] și a fost calculat conform unei metode descrise anterior [3]. Proprietățile mecanice și adezive ale filmului au fost evaluate folosind analizorul de textură CT3 (Brookfield Engineering Laboratories, Middleborough, MA, SUA), echipat cu dispozitivul TA-FSF și o sondă cilindrică cu capăt rotunjit (diametru 0,8 cm, lungime 6 cm) pentru testul de perforare [3], cu dispozitivul TA-DGF pentru a evalua elasticitatea și comportamentul la tracțiune [31], respectiv cu dispozitivul TA-AACC36 pentru proprietățile adezive folosind un gel de gelatină ca substrat [30,43]. Pentru înregistrarea valorilor parametrilor a fost utilizat software-ul Texture Pro CT V1.9 (Brookfield Engineering Laboratories, Middleborough, MA, SUA). Flexibilitatea a fost testată și prin determinarea rezistenței la pliere repetată [44]. Valorile pH-ului gelului înainte de turnare și uscare, respectiv ale pansamentului de tip film obținut, au fost determinate utilizând un pH-metru cu electrod pentru probe semisolide (Hanna Instruments, România) [33]. WVTR a fost determinată conform standardului ASTM E96 [10,34]. WCA a fost măsurat folosind un sistem video de măsurare a unghiului de contact (OCA 25, Dataphysics, Filderstadt, Germania), fiind calculat cu ajutorul software-ului DpiMAX (Dataphysics, Filderstadt, Germania) [10]. SEM a fost utilizată pentru a evalua morfologia formulei optimizate, utilizând un

microscop electronic Hitachi SU8230 (Hitachi High-Tech Corporation, Tokyo, Japonia), la o tensiune de 30 kV și o distanță de lucru de 11,6 mm, cu mărimi între 40 și 50.000x [10]. Profilul de eliberare al TPC din formula optimizată a fost investigat utilizând un sistem automatizat cu celule de difuzie Franz (sistem Phoenix, Teledyne Hanson, Chatsworth, CA, SUA), în mediu hidroalcoolic format din etanol și apă 25:75 (v/v), la 400 rpm și la $32 \pm 0,5$ °C. La intervale de timp prestabilite (15, 30, 45 minute, 1 oră, apoi din oră în oră până la 8 ore), au fost prelevați 500 μ L, iar fiecare volum extras a fost înlocuit cu un volum egal de mediu proaspăt. Eliberarea cumulativă a TPC a fost calculată și reprezentată grafic în funcție de timp [10,35], iar cantitatea de TPC eliberată a fost determinată utilizând testul Folin-Ciocalteu aplicat anterior pentru optimizarea CHE.

Rezultate: Formula optimizată a conținut 5 % alcool polivinilic, 0,25 % gumă xantan, 10 % glicerol, 20 % extract complex și apă distilată. Formula optimizată a prezentat o grosime adecvată, proprietăți mecanice și adezivitate corespunzătoare, comparabile cu valori raportate în literatură. Formula optimizată a demonstrat o eliberare susținută a polifenolilor din CHE conținut pe parcursul a 8 ore, sugerând potențialul ridicat de utilizare în îngrijirea rănilor. De asemenea, formula optimizată a prezentat un pH adecvat, WVTR și WCA corespunzătoare pentru utilizare în tratamentul rănilor, precum și stabilitate fizică pe 12 luni, demonstrând utilitatea acesteia. SEM a confirmat o suprafață uniformă și omogenă, indicând o bună integritate a formulei optimizate. Caracteristicile formulei optimizate și ale formulei martor au fost similare, indicând că încorporarea CHE nu a afectat formarea filmului. În plus, caracteristicile formulei optimizate au fost comparabile cu cele ale unui pansament de tip film disponibil comercial, validând aplicabilitatea practică a acestuia.

Concluzii: S-a optimizat formularea unui pansament de tip film cu CHE cu proprietăți excelente, adaptate pentru utilizarea în îngrijirea rănilor, cu un potențial ridicat de eficiență terapeutică.

Studiul 3. Optimizarea unor sisteme lipidice nanostructurate (NLCs) cu CHE pentru îngrijirea rănilor – o abordare QbD

Scop / Obiective: Scopul acestui studiu a fost optimizarea formulării unor NLCs conținând CHE dezvoltat în studiul 1, utilizând conceptul QbD și metoda DoE. S-a dorit investigarea influenței tipului și concentrației de lipide solide (acid palmitic, alcool cetearilic) și lichide (trigliceride caprilice/caprice, miristat de iopropil), a concentrației de Tween® 80 ca tensioactiv principal și efectul adăugării de co-tensioactiv (Span® 85) asupra parametrilor critici ai formulării (dimensiunea particulelor - PS, indice de polidispersie - PDI, potențial zeta - ZP, eficiența încapsulării - EE și factorul de ocluzivitate -OF). Pe formula optimizată s-a urmărit determinarea pH-ului, vâscozității și analizei de textură, pentru a susține utilitatea acesteia pentru utilizare în tratamentul rănilor. S-a efectuat analiza morfologiei formulării optimizate prin microscopie electronică pentru confirmarea formării NLCs și omogenității dispersiei de NLCs. De

asemenea, s-a evaluat profilul de cedare al CHE încorporat în formula optimizată, pentru a observa potențialul său de eliberare susținută pentru 72 ore. Formula optimizată s-a comparat cu NLCs martor (fără CHE), pentru a observa efectul CHE asupra proprietăților NLCs. De asemenea, s-a realizat compararea cu un produs comercial pentru îngrijirea rănilor pentru a valida aplicabilitatea formulei optimizate de NLCs cu CHE în tratamentul rănilor.

Material și metode: NLCs cu CHE au fost preparate utilizând metoda de omogenizare la cald urmată de sonicare pentru reducerea PS [36,37]. PS, PDI, ZP au fost determinate folosind Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Co., Malvern, UK), după diluarea dispersiei cu apă distilată în raport 1:100 (v/v) [38]. EE a fost determinată prin cuantificarea TPC, utilizând testul colorimetric aplicat și în optimizarea extractelor vegetale. NLCs cu CHE au fost diluate cu metanol 1:10 (v/v) și menținute timp de 10 minute într-o baie ultrasonică (Elma™ Elmasonic Select, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Germania) pentru a le destructura și a elibera CHE încapsulat [38]. OF a fost evaluat prin aplicarea a 500 μL de dispersie NLC pe hârtie de filtru calitativă, utilizată pentru a acoperi un vas care conținea apă distilată. Ulterior, sistemul a fost incubat într-un etuvă de laborator (Venticell®, MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg, Germania) la 32 ± 2 °C timp de 24 de ore, iar pierderea de apă prin evaporare a fost determinată prin cântărire, iar OF a fost apoi calculat [39]. Valorile pH-ului au fost determinate la $22 \pm 0,5$ °C, folosind un pH-metru dotat cu un electrod pentru probe semisolide (Hanna Instruments, Cluj-Napoca, România) [9]. Vâscozitatea a fost măsurată cu ajutorul unui viscosimetru CAP 2000+ (Brookfield Engineering Laboratories, Middleborough, MA, SUA) la $20 \pm 0,5$ °C, folosind axul 08, la 5 rpm, cu un timp de așteptare de 10 secunde și un timp de analiză de 20 secunde. Analiza de textură a fost efectuată cu analizorul CT3 Texture Analyzer la $22 \pm 0,5$ °C, cu sonda TA-DEC și dispozitivul TA-BT-KIT, iar parametrii de textură au fost calculați cu ajutorul software-ului Texture ProCT 1.9. Pentru microscopia electronică probele au fost depuse pe rețele de cupru acoperite cu carbon (400 mesh, grosime 20–30 nm, Science Services GmbH, München, Germania), uscate la aer și analizate în microscopiele electronice Hitachi (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japonia): SU8230 (microscopie electronică de scanare - SEM) la 30 kV, 10 μA și HD2700 (microscopie electronică de transmisie în modul de scanare - STEM) la 200 kV, 10 μA. Imaginile au fost obținute prin mărimi cuprinse între 1000x și 500.000x, în mod scanare și/sau transmisie. Studiul de cedare *in vitro* al TPC din CHE din NLCs a fost realizat utilizând dispozitive de dializă Spectra/Por® Float-A-Lyzer® G2 cu membrană de esteri de celuloză (MWCO 50 kDa, nr. G235058, 5 mL, Repligen, Boston, Massachusetts, SUA), conform unei metode adaptate din literatura de specialitate [40]. Un volum de 1 mL din probă a fost introdus în dispozitivul de dializă, apoi acesta a fost plasat în 15 mL de apă distilată, la $32 \pm 0,5$ °C și 200 rpm. Concentrația totală de polifenoli cedată a fost determinată la 30 min, 1 h, apoi din oră în oră până la 8 h și ulterior la 24, 48 și 72 h, prin colectarea a 500 μL din

mediu. Conținutul de CHE eliberat a fost determinat prin cuantificarea TPC, iar eliberarea cumulativă (%) a fost calculată și reprezentată grafic în funcție de timp.

Rezultate: Formula optimizată a conținut 5 % alcool cetearilic, 5 % trigliceride caprilice/caprice, 5 % Tween® 80, 1 % Span® 85, 20 % CHE și apă distilată. Formula optimizată a prezentat PS potrivită pentru efect la nivelul dermului, omogenitate demonstrată de un PDI scăzut și potențială stabilitate sugerată prin ZP negativ. În plus, încapsularea eficientă a CHE și OF ridicat ale formulei optimizate pot conduce la o eficiență terapeutică crescută. STEM a confirmat formarea NLCs cu suprafețe sferice, netede și distribuție uniformă a PS, fără semne vizibile de agregare sau separare de fază. Valorile pH-ului, vâscozității și profilul de textură ale formulei optimizate au fost adecvate pentru utilizarea în tratamentul rănilor și similare unui fluid pentru îngrijirea rănilor disponibil comercial, evidențiind potențialul acesteia de utilizare practică. Formula optimizată a prezentat o eliberare susținută a polifenolilor din CHE încorporat până la 72 de ore, aspect favorabil pentru menținerea efectelor terapeutice pe termen lung în tratamentul rănilor.

Concluzii: S-a optimizat formularea unor NLCs cu CHE cu proprietăți excelente, adaptate pentru utilizarea în îngrijirea rănilor, cu un potențial ridicat de eficiență terapeutică.

CONCLUZII GENERALE

Această teză de doctorat s-a concentrat pe dezvoltarea unor sisteme topice pentru tratamentul rănilor, care să valorifice potențialul terapeutic al unor extracte vegetale din flora spontană a României. Pentru optimizarea extracției principiilor active, cât și pentru dezvoltarea sistemelor topice s-a aplicat conceptul QbD și metoda DoE.

Primul studiu a optimizat extracția polifenolilor și flavonoidelor din florile de *Sambucus nigra* și din părțile aeriene ale *Epilobium hirsutum* și *Lythrum salicaria*, evaluând profilul fitochimic și proprietățile antioxidante, antiinflamatoare și de stimulare a vindecării rănilor. Rezultatele au demonstrat efecte complementare și sinergice ale OHEs, care susțin ideea combinării lor într-un CHE care ulterior a fost încorporat în noi sisteme topice.

Al doilea studiu a dezvoltat și optimizat formularea unui pansament de tip film cu CHE obținut în primul studiu. Acesta a prezentat caracteristici fizice excelente, asigurând atât flexibilitate și umectare ridicate, cât și rezistență mecanică, eliberare susținută a polifenolilor din CHE pe parcursul a 8 ore, precum și stabilitate fizică pe 12 luni, toate esențiale pentru susținerea vindecării rănilor și confortul pacientului. Mai mult, proprietățile lui fost comparabile cu cele ale unui pansament de tip film disponibil comercial, demonstrând o bună aplicabilitate a acestuia.

Al treilea studiu a dezvoltat și optimizat formularea unor NLCs cu CHE obținut în studiul 1. Acestea au prezentat proprietăți fizice adecvate, încapsulare suficientă a CHE, OF ridicat și eliberarea susținută a polifenolilor din CHE încorporat până la 72 de ore, care pot conduce la o eficiență terapeutică crescută. În plus, proprietățile lor reologice

și de textură au fost adecvate și asemănătoare unui fluid pentru îngrijirea rănilor disponibil comercial, demonstrând potențialul de aplicabilitate practică. Astfel, toate aceste rezultate deschid perspective promițătoare ce combină beneficiile demonstrate științific ale compușilor bioactivi naturali tradiționali cu sisteme topice moderne.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE CERCETĂRII DOCTORALE

Originalitatea acestei teze de doctorat constă în obținerea unui extract vegetal complex (CHE), cu un conținut optimizat de compuși bioactivi esențiali pentru procesul de vindecare a rănilor, obținut prin combinarea a trei extracte vegetale optimizate. Acest CHE a fost ulterior încorporat în noi sisteme topice optimizate, respectiv pansamente de tip film și NLCs. Un aspect esențial al acestei cercetări a fost aplicarea metodei QbD atât în optimizarea obținerii a trei extracte vegetale, cât și în formularea ambelor sisteme topice. Prin implementarea DoE, s-au identificat influențe ale parametrilor de extracție și formulare asupra caracteristicilor produselor finale, care aprofundează înțelegerea dezvoltării extractelor și acestor sisteme topice. În plus, această teză aduce contribuții valoroase care determină avansarea cercetării în acest domeniu.

În primul rând, acest studiu a fost prima raportare a utilizării metodei UTE pentru extracția compușilor bioactivi din florile de *Sambucus nigra* și părțile aeriene de *Lythrum salicaria*, din cadrul primului studiu. De asemenea, în acest studiu s-a publicat prima evaluare a activității antiinflamatoare a extractelor de *Sambucus nigra* și *Lythrum salicaria* pe BJ. În plus, s-au raportat pentru prima dată efectele extractelor din *Lythrum salicaria* și *Epilobium hirsutum* asupra HaCaT și RAW 264.7, și a fost prima cercetare care a investigat efectul extractului de *Epilobium hirsutum* prin testul *in vitro* de cicatrizare.

Acest CHE a fost inclus pentru prima dată în sisteme topice moderne, precum pansamente de tip film și NLCs. Majoritatea factorilor de formulare aleși pentru dezvoltarea acestor sisteme topice cu CHE au fost studiați pentru prima dată în cadrul unui concept QbD. În plus, pentru optimizarea NLCs cu CHE, OF a fost folosit pentru prima dată ca factor de răspuns în cadrul DoE. De asemenea, nu există studii publicate anterior care să utilizeze alcoolul cetearilic pentru prepararea NLCs. Totodată, această cercetare este prima care a aplicat analiza de textură pentru caracterizarea dispersiei de NLCs.

Rezultatele obținute în urma cercetării doctorale aduc informații valoroase despre utilizarea extractelor vegetale în îngrijirea rănilor și susțin dezvoltarea pansamentelor de tip film și a NLCs ca sisteme topice moderne, cu potențial terapeutic promițător.

REFERINȚE

1. Rahman HS, Othman HH, Hammadi NI, Yeap SK, Amin KM, Samad NA, et al. Novel Drug Delivery Systems for Loading of Natural Plant Extracts and Their Biomedical Applications. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:2439–83.
2. Ghiulai R, Roșca OJ, Antal DS, Mioc M, Mioc A, Racoviceanu R, et al. Tetracyclic and Pentacyclic Triterpenes with High Therapeutic Efficiency in Wound Healing Approaches. *Molecules*. 2020;25(23).
3. Colobatiu L, Gavan A, Mocan A, Bogdan C, Mirel S, Tomuta I. Development of bioactive compounds-loaded chitosan films by using a QbD approach – A novel and potential wound dressing material. *React Funct Polym*. 2019;138:46–54.
4. Colobatiu L, Gavan A, Potarniche AV, Rus V, Diaconeasa Z, Mocan A, et al. Evaluation of bioactive compounds-loaded chitosan films as a novel and potential diabetic wound dressing material. *React Funct Polym*. 2019;145:46–54.
5. Schoukens G. Bioactive dressings to promote wound healing. In: S. Rajendran, editor. *Advanced Textiles for Wound Care*. Second Edition. Woodhead publishing, Elsevier; 2019. p. 135–67.
6. Ahmad A, Abuzinadah MF, Alkreathy HM, Banaganapalli B, Mujeeb M. Ursolic acid rich *Ocimum sanctum* L leaf extract loaded nanostructured lipid carriers ameliorate adjuvant induced arthritis in rats by inhibition of COX-1, COX-2, TNF- α and IL-1: Pharmacological and docking studies. *PLoS One*. 2018;13(3):1–21.
7. Patel P, Garala K, Singh S, Prajapati BG, Chittasupho C. Lipid-Based Nanoparticles in Delivering Bioactive Compounds for Improving Therapeutic Efficacy. *Pharmaceutics* 2024, 17(3):329
8. Viegas C, Patrício AB, Prata JM, Nadhman A, Chintamaneni PK, Fonte P. Solid Lipid Nanoparticles vs. Nanostructured Lipid Carriers: A comparative review. *Pharmaceutics*. 2023;15(1593):1–34.
9. Bogdan C, Safta DA, Iurian S, Petrușcă DR, Moldovan ML. QbD Approach in Cosmetic Cleansers Research: The Development of a Moisturizing Cleansing Foam Focusing on Thickener, Surfactants, and Polyols Content. *Gels*. 2024;10(8):1–19.
10. Savencu I, Iurian S, Bogdan C, Spînu N, Suciuc M, Pop A, et al. Design, optimization and pharmaceutical characterization of wound healing film dressings with chloramphenicol and ibuprofen. *Drug Dev Ind Pharm*. 2024;50(5):446–59.
11. Singh B, Sharma S, Dhiman A. Acacia gum polysaccharide based hydrogel wound dressings: Synthesis, characterization, drug delivery and biomedical properties. *Carbohydr Polym*. 2017;165:294–303.
12. Graça A, Rufino I, Martins AM, Raposo S, Ribeiro HM, Marto J. Prevention of skin lesions caused by the use of protective face masks by an innovative gelatin-based hydrogel patch: Design and in vitro studies. *Int J Pharm*. 2023;638(122941).
13. Folle C, Marqués AM, Díaz-Garrido N, Carvajal-Vidal P, Sánchez López E, Suñer-Carbó J, et al. Gel-Dispersed Nanostructured Lipid Carriers Loading Thymol Designed for Dermal Pathologies. *Int J Nanomedicine*. 2024;19:1225–48.
14. Iriverenti P, Gupta Nv. Topical delivery of curcumin and caffeine mixture-loaded nanostructured lipid carriers for effective treatment of psoriasis. *Pharmacogn Mag*. 2020;16(68):206.
15. Uner B, Ozdemir S, Tas C, Uner M, Ozsoy Y. Loteprednol-Loaded Nanoformulations for Corneal Delivery by Quality-by-Design Concepts:

- Optimization, Characterization, and Anti-inflammatory Activity. *AAPS PharmSciTech*. 2023;24(4):1–15.
16. Matarazzo AP, Rios CA, Gerônimo G, Ondei R, de Paula E, Breitzkreitz MC. Development of a Versatile Nanostructured Lipid Carrier (NLC) Using Design of Experiments (DoE)—Part II: Incorporation and Stability of Butamben with Different Surfactants. *Pharmaceutics* 2024, Vol 16, Page 863. 2024;16(7).
 17. Vlase AM, Toiu A, Tomuță I, Vlase L, Muntean D, Casian T, et al. Epilobium Species: From Optimization of the Extraction Process to Evaluation of Biological Properties. *Antioxidants*. 2023 Jan 1;12(1).
 18. Csepregi K, Neugart S, Schreiner M, Hideg É. Comparative evaluation of total antioxidant capacities of plant polyphenols. *Molecules*. 2016 Feb 1;21(2).
 19. Pinacho R, Caverro RY, Astiasarán I, Ansorena D, Calvo MI. Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity. *J Funct Foods*. 2015;19:49–62.
 20. Carpa R, Dragan-Bularda M, Muntean V. *Microbiologie Generala—Lucrari Practice*. Cluj-Napoca, Romania: Presa Universitara Clujeana; 2014.
 21. Ungurean C, Carpa R, Campean R, Maior MC, Olah NK. Phytochemical and microbial analyses of *Berberis* sp. extracts. *Rom Biotechnol Lett*. 2020 Oct 18;25(6):2132–9.
 22. Pop A, Fizes I, Vlase L, Rusu ME, Cherfan J, Babota M, et al. Enhanced Recovery of Phenolic and Tocopherolic Compounds from Walnut (*Juglans Regia* L.) Male Flowers Based on Process Optimization of Ultrasonic Assisted-Extraction: Phytochemical Profile and Biological Activities. 2021;
 23. Riss, T.L.; Moravec, R.A.; Niles, A.L. *Cell Viability Assays*. 2013. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/?report=reader>
 24. Rusu ME, Fizeșan I, Pop A, Gheldiu AM, Mocan A, Crișan G, et al. Enhanced recovery of antioxidant compounds from hazelnut (*Corylus avellana* L.) involucre based on extraction optimization: Phytochemical profile and biological activities. *Antioxidants*. 2019;8(10).
 25. Ji Hye Hwang Jun Nan Ma Jong Hun Park Hyo Won Jung Yong-Ki Park. Anti-inflammatory and antioxidant effects of MOK, a polyherbal extract, on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Int J Mol Med*. 2018;43(1):26–36.
 26. Alejandra Suarez-Arnedo, Felipe Torres Figueroa, Camila Clavijo, Pablo Arbeláez, Juan C. Cruz, Carolina Muñoz-Camargo. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS One*. 2020;15(7).
 27. Nehal Siddiqui, Garima Garg, Pramod Kumar Sharma. A Short Review on “A Novel Approach in Oral Fast Dissolving Drug Delivery System and Their Patents.” *Adv Biol Res (Rennes)*. 2011;5(6):291–303.
 28. ISO 175:2010 - Plastics — Methods of test for the determination of the effects of immersion in liquid chemicals [Internet]. [cited 2025 Jan 27]. Available from: <https://www.iso.org/standard/55483.html>
 29. Schmid M, Pröls S, Kainz DM, Hammann F, Stäbler A. Impact of Hydrolyzed Whey Protein on the Molecular Interactions and Cross-Linking Density in Whey Protein Isolate-Based Films. *Int J Polym Sci*. 2016;2016:1–9.
 30. Momoh FU, Boateng JS, Richardson SCW, Chowdhry BZ, Mitchell JC. Development and functional characterization of alginate dressing as potential protein delivery system for wound healing. *Int J Biol Macromol*. 2015;81:137–50.
 31. Baranauskaitė J, Ockun MA, Uner B, Gungor B, Duman G, Tas C, et al. Development and In vitro characterization of pullulan fast dissolving films loaded with Panax ginseng extract, antioxidant properties and cytotoxic efficiency on lung and breast cancer cell lines. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2022;76(103701):1–10.

32. Karki S, Kim H, Na SJ, Shin D, Jo K, Lee J. Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian J Pharm Sci.* 2016 Oct 1;11(5):559–74.
33. Pechová V, Gajdziok J, Muselík J, Vetchý D. Development of Orodispersible Films Containing Benzylamine Hydrochloride Using a Modified Solvent Casting Method. *AAPS PharmSciTech.* 2018;19(6):2509–18.
34. ASTM E96: Water Vapor Testing Explained - ANSI Blog [Internet]. [cited 2025 Jan 27]. Available from: <https://blog.ansi.org/explaining-water-vapor-testing-astm-e96/#gref>
35. Baccarin T, Lemos-Senna E. Potential Application of Nanoemulsions for Skin Delivery of Pomegranate Peel Polyphenols. *AAPS PharmSciTech.* 2017;18(8):3307–14.
36. Soni K, Rizwanullah M, Kohli K. Development and optimization of sulfuraphane-loaded nanostructured lipid carriers by the Box-Behnken design for improved oral efficacy against cancer: in vitro, ex vivo and in vivo assessments. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46:15–31.
37. Pucek-Kaczmarek A. Influence of Process Design on the Preparation of Solid Lipid Nanoparticles by an Ultrasonic-Nanoemulsification Method. *Processes.* 2021;9(8):1–11.
38. Ielciu I, Niculae M, Pall E, Barbălată C, Tomuță I, Olah NK, et al. Antiproliferative and Antimicrobial Effects of *Rosmarinus officinalis* L. Loaded Liposomes. *Molecules.* 2022;27(13):1–19.
39. Okonogi S, Rianganapatee P. Physicochemical characterization of lycopene-loaded nanostructured lipid carrier formulations for topical administration. *Int J Pharm.* 2015;478(2):726–35.
40. Lombardo SM, Günday Türeli N, Koch M, Schneider M, Türeli AE. Reliable release testing for nanoparticles with the NanoDis System, an innovative sample and separate technique. *Int J Pharm.* 2021;609(121215).
41. Mirhaj M, Labbaf S, Tavakoli M, Seifalian A. An Overview on the Recent Advances in the Treatment of Infected Wounds: Antibacterial Wound Dressings. *Macromol Biosci.* 2022 Jul 1;22(7).
42. Qadir A, Jahan S, Aqil M, Warsi MH, Alhakamy NA, Alfaleh MA, et al. Phytochemical-based nano-pharmacotherapeutics for management of burn wound healing. *Gels.* 2021 Dec 1;7(209):1–19.
43. Brookfield Ametek I and SCD. CT3 Texture Analyzer Operating Instructions Manual . <https://www.brookfieldengineering.com/-/media/ametekbrookfield/manuals/texture/ct3%20manual%20m08-372-f1116.pdf>. p. 1–64.
44. Antonoaea P, Todoran N, Rédei E, Ciurba A, Bogdan C, Moldovan M, et al. Evaluation of Mechanical Properties of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Matrix Type Transdermal Therapeutic Systems. *Acta Med Marisiensis.* 2017 Jun 27;63(2):56–61.