



**UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI**

**Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția
Mediului "Cristofor Simionescu"**



**Studiul unor fitoextracte din flora autohtonă cu potențial
terapeutic și aplicabilitate în cosmetica active**

Rezumat Teza Doctorat

Conducător științific

Prof.Univ.Dr.Habil.Ing. Daniela ȘUTEU

Doctorand

Claudia BULAI (căsătorită MAXIM)

**Iași
-2026-**

Formularul PO.CSUD.01 E4R1-F2

**STUDIUL UNOR FITOEXTRACTE DIN FLORA
AUTOHTONĂ CU POTENȚIAL TERAPEUTIC ȘI
APLICABILITATE ÎN COSMETICA ACTIVĂ**

Claudia BULAI (căsătorită MAXIM)

domeniul Inginerie Chimică

Președinte comisie doctorat:

Prenume Nume

Conducător de doctorat:

Prof.Univ.Dr.Habil.Ing.Daniela ȘUTEU

Referenți oficiali:

Prenume Nume

Comisia de îndrumare:

Prof.Univ.Dr.Habil.Ing.Daniela Șuteu
Prof. Univ.Dr.Habil.Ing. Lacrămioara Rusu
Conf.Dr.Ing. Corina Cernătescu
Șef lucrări Dr.Ing. Ana Simona Barna

CUPRINS

INTRODUCERE	6
Partea I. STUDIUL DE LITERATURĂ	8
Capitolul I.1. PLANTELE - SURSA DE COMPUȘI BIOLOGIC ACTIVI	8
Capitolul I.2.	
CONSIDERAȚII STRUCTURALE ȘI FUNCȚIONALE ALE PIELII, RELEVANTE PENTRU FORMULAREA ȘI LIVRAREA EMULSIILOR (DERMATO)COSMETICE.....	9
Capitolul I.3. Metode de obținere a extractelor vegetale	10
I.3.1. Pregătirea materialului vegetal.....	10
I.3.2. Metode de extracție a compușilor bioactivi din plante.....	11
I.3.3. Alegerea solventului pentru extracția compușilor bioactivi vegetali.....	11
Capitolul I.4. Aspecte teoretice privind formularea produselor (dermato)cosmetice cu ingrediente de origine naturală	13
I.4.1.2 Formularea emulsiilor (dermato)cosmetice cu ingrediente de origine naturală.....	13
PARTEA II	
CONTRIBUȚII PERSONALE LA STUDIUL UNOR FITOEXTRACTE DIN FLORA AUTOHTONĂ CU POTENȚIAL TERAPEUTIC ȘI APLICABILITATE ÎN COSMETICA ACTIVĂ	15
Capitolul II.1.OBIECTIVE	15
Capitolul II.2. MATERIALE ȘI METODE UTILIZATE ÎN STUDIUL EXPERIMENTAL	15
II.2.1 Materiale utilizate.....	15
II.2.1.4. Peptidele cosmetice	16
II.2.1.4.4. Peptide selectate pentru studiu experimental: N-Prolyl Palmitoyl Tripeptide-56 Acetate.....	16
II.2.1.5. Backuchiol, substanță bioactivă izolată din materii prime vegetale.....	16
II.2.2. Metode de extracție utilizate în dezvoltarea studiilor experimentale.....	16
II.2.2.2.1. Justificarea alegerii solvenților de extracție.....	17
II.2.2.1.1.1 Etanolul.....	17
II.2.2.1.1.2. Propanediolul.....	17
II.2.2.1.1.3. Solvenți NADES.....	17
II.2.2.2.2. Metodele de extracție aplicate în studiul experimental.....	18
II.2.2.2.6. Evaluarea eficienței metodelor de extracție.....	18
II.2.3. Metode de caracterizare aplicate în studiul experimental.....	18
II.2.3.4. Determinarea conținutului total de polifenoli	19
II.2.3.5. Determinarea conținutului total de flavonoide.....	19
Capitolul II.3. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA EXTRACTELOR VEGETALE DIN <i>Acmella oleracea</i>	19
II.3.1. Extracția solid-lichid a compușilor activi din <i>Acmella oleracea</i>	19
II.3.2. Obținerea de extracte vegetale cu solvenți hidroalcoolici.....	19
II.3.2.2. Randamentul de extracție.....	20
II.3.2.3. Caracterizarea cantitativă a extractelor hidroalcoolice de <i>Acmella oleracea</i>	20
II.3.2.3.1. Determinarea conținutului total de polifenoli	20
II.3.2.3.2. Determinarea conținutului total de flavonoide	21
II.3.2.3.3. Concluzii privind cantitățile de polifenoli și flavonoide din extractele hidroalcoolice de <i>Acmella oleracea</i>	21
II.3.2.4. Evaluarea activității antioxidante a extractelor hidroalcoolice de <i>Acmella oleracea</i>	21
II.3.3. Extracte în 1,3-propanediol.....	21
II.3.3.1. Caracterizarea cantitativă a extractelor hidroglicolice.....	21
II.3.3.1.1. Determinarea conținutului total de polifenoli în extractele hidroglicolice	22
II.3.3.1.2. Determinarea conținutului total de flavonoide în extractele hidroglicolice	22
II.3.3.1.3. Concluzii referitoare la conținutul total de polifenoli și flavonoide în extractele hidroglicolice	23
II.3.4. Obținerea de extracte vegetale cu solvenți pe bază de sisteme eutectice naturale (NADES).....	23
II.3.4.1. Caracterizarea fizico-chimică a sistemului NADES studiat înainte și după extracție	23
II.3.4.2. Caracterizarea cantitativă a extractelor în sisteme NADES.....	24
II.3.4.2.1. Determinarea conținutului total de polifenoli a extractelor în NADES.....	24

II.3.4.2.2. Determinarea conținutului total de flavonoide din extractele în NADES.....	25
II.3.5. Evaluarea comparativă a celor mai eficiente extracte obținute din <i>Acmella oleracea</i> (alcoolice, glicolice și NADES).....	26
II.3.5.2. Evaluarea activității antioxidante.....	26
II.3.6. Caracterizarea prin HPLC a extractelor de <i>Acmella oleracea</i>	26
II.3.7. Evaluarea conținutului de ioni metalici din proba inițială de planta.....	27
Capitolul II.4. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA EXTRACTELOR VEGETALE DIN <i>Daucus carota</i> subsp. <i>carota</i>	28
II.4.2. Extracția solid-lichid a compușilor activi din <i>Daucus carota</i> subsp. <i>carota</i>	28
II.4.2.1. Extracția hidroalcoolică (etanol/apă).....	28
II.4.2.1.1. Randamentul de extracție.....	28
II.4.2.2. Caracterizarea cantitativă a extractelor hidroalcoolice.....	28
II.4.2.1.1 Determinarea conținutului total de polifenoli în extractele hidroalcoolice.....	28
II.4.2.1.2. Determinarea conținutului de flavonoide în extractele hidroalcoolice	29
II.4.2.2. Extracția hidro-glicolică (propanediol/apă).....	29
II.4.2.2.1 Determinarea conținutului total de polifenoli în extractele hidro-glicolice	29
II.4.2.2.2. Determinarea conținutului total de flavonoide în extractele hidro-glicolice	30
II.4.2.2.3. Concluzii privind determinarea cantității de polifenoli și flavonoide din extractele hidro-glicolice	30
II.4.2.3. Extracția în sisteme eutectice naturale (NADES).....	30
II.4.2.3.1. Determinarea conținutului total de polifenoli în extractele în NADES	30
II.4.2.3.2. Determinarea conținutului total de flavonoide a extractelor în NADES.....	31
II.4.2.4. Evaluarea comparativă a celor mai eficiente extracte din <i>Daucus carota</i> subsp. <i>carota</i> (alcoolice, glicolice și NADES).....	32
II.4.3. Caracterizarea fizico-chimică a extractelor din <i>Daucus carota</i> subsp. <i>carota</i>	32
Capitolul II.5.OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA EXTRACTELOR DIN <i>Artemisia annua</i>	33
II.5.1. Considerații generale despre extractul de <i>Artemisia annua</i>	33
II.5.2. Considerații privind extracția solid-lichid a compușilor activi din <i>Artemisia annua</i>	33
II.5.2.1. Obținerea de extracte în solvenți hidroalcoolici.....	33
II.5.2.1.1 Randamentul de extracție.....	33
II.5.2.1.2. Caracterizarea cantitativa a extractelor hidroalcoolice.....	33
II.5.2.1.2.1. Determinarea conținutului total de polifenoli	34
II.5.2.1.2.2. Determinarea conținutului total de flavonoide	34
II.5.2.2. Obținerea de extracte cu solvenți NADES	35
II.5.2.2.1. Determinarea conținutului total de polifenoli din extractele în NADES	35
II.5.2.2.2. Determinarea conținutului total de flavonoide din extractele în NADES	35
II.5.2.2.3. Concluzii privind performanța extracției cu solvenți NADES	36
II.5.2.2.4. Modelarea și optimizarea procesului de extracție cu solvenți NADES.....	36
II.5.2.3. Evaluarea comparativă a celor mai eficiente extracte din <i>Artemisia annua</i> (alcoolice și NADES).....	37
II.5.3. Evaluarea activității antioxidante a celor mai performante extracte din <i>Artemisia annua</i>	37
Capitolul II.6. SISTEM EMULSIONANT CU INGREDIENTE DE ORIGINE NATURALĂ PENTRU LIVRAREA COMPLEXULUI N-PROLYL PALMITOYL TRIPEPTIDE-56 ACETATE – BAKUCHIOL, DESTINAT COMBATERII STRESULUI OXIDATIV AL PIELII	38
II.6.2. Evaluarea potențialului biologic al asocierii substanțelor active utilizate.....	38
II.6.3. Dezvoltarea vehiculului de livrare.....	38
II.6.4. Testarea stabilității emulsiilor preparate.....	39
II.6.6. Studiul de difuzie in vitro pentru emulsiile obținute.....	40
Capitolul II.7. INTEGRAREA EXTRACTELOR VEGETALE CA INGREDIENTE ACTIVE ÎN SISTEME DE LIVRARE DERMATOCOSMETICĂ	41
II.7.3. Formularea emulsiilor.....	41
II.7.3.2. Protocol tehnologic de formulare a emulsiilor de tip ulei-în-apă (O/W).....	42
II.7.4. Caracterizarea emulsiilor cu extracte vegetale incorporate.....	42
II.7.4.1. Caracterizarea emulsiilor cu extract de <i>Acmella oleracea</i>	42
II.7.4.2. Caracterizarea emulsiilor cu extract de <i>Daucus carota</i> subsp. <i>Carota</i>	44
II.7.4.3. Caracterizarea emulsiilor cu extract de <i>Artemisia annua</i>	45
II.7.5. Evaluarea microbiologică a emulsiilor formulate cu extracte vegetale.....	47
II.7.6. Evaluarea activității antioxidante a emulsiilor.....	47

II.7.7. Testarea permeabilității cutanate in vitro utilizând celula Franz.....	48
II.7.7.2. Determinarea permeabilității formulărilor cu extracte de <i>Acmella oleracea</i>	48
II.7.7.3. Determinarea permeabilității formulărilor cu extracte de <i>Daucus carota</i> subsp. <i>carota</i>	48
II.7.7.4. Determinarea permeabilității pentru formulările cu extracte de <i>Artemisia annua</i>	48
II.7.7.5. Concluzii privind testarea permeabilității emulsiilor cu extracte vegetale cu celula Franz...	49
II.7.9. Evaluarea citotoxicității și viabilității celulare a formulărilor cu extracte vegetale de <i>Acmella oleracea</i> și <i>Artemisia annua</i>	49
II.7.9.2. Evaluarea morfologiei celulare.....	50
Capitolul II.8. TRANSPUNEREA REZULTATELOR CERCETĂRILOR SUB FORMĂ DE PRODUS PE PIAȚA ECONOMICĂ.....	51
II.8.2. Introducerea pe piața din Uniunea Europeană a produselor (dermato)cosmetice	51
II.8.4. Translația cercetării în produse (dermato)cosmetice finite.....	52
Capitolul II.9. CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE.....	53
II.9.7. Concluzii Finale.....	53
II.9.8. Perspective.....	54
Bibliografie (selectie).....	55
Index de abrevieri.....	61

Nota: Rezumatul tezei de doctorat cuprinde, într-o formă sintetică, introducerea, materialele și metodele de cercetare, o parte dintre rezultatele originale obținute, concluziile generale, precum și bibliografia selectivă. La redactarea acestuia au fost menținute aceleași notații și aceeași numerotare a capitolelor, paragrafelor, figurilor și tabelor ca în textul integral al tezei.

INTRODUCERE

Dincolo de dimensiunea estetică, îngrijirea pielii s-a conturat progresiv ca un demers funcțional, orientat către susținerea echilibrului cutanat și a capacității pielii de a răspunde factorilor de stres exogeni și endogeni. Această schimbare de perspectivă a determinat o transformare discretă, dar semnificativă, a produsului cosmetic, care, deși rămâne încadrat în limitele sale reglementare, este tot mai frecvent conceput ca un sistem complex de livrare a unor ingrediente biologice active, selectate și integrate pe baza unor criterii de eficacitate demonstrată.

Din această perspectivă, prezenta teză nu a urmărit doar evaluarea unor extracte vegetale sau optimizarea unor formulări cosmetice, ci construirea unei viziuni integrate asupra modului în care substanțele biologice active pot fi valorificate coerent în produse destinate aplicării cutanate. Demersul a fost orientat către înțelegerea relației dintre metoda de extracție, natura solventului, profilul fitochimic rezultat și comportamentul activelor în sisteme de livrare, cu scopul de a depăși abordările fragmentare frecvent întâlnite. În acest context, extractul vegetal nu mai este abordat ca o entitate izolată, ci ca parte a unui ansamblu funcțional, în care valoarea sa biologică este inseparabilă de modul de obținere și de sistemul de formulare în care este integrat.

Elementul distinctiv al prezentei cercetări constă în abordarea extractelor vegetale ca ingrediente active funcționale, a căror performanță este analizată sistematic în relație cu metoda de extracție, natura solventului și sistemul de formulare, într-un demers integrativ rar tratat unitar în literatura de specialitate.

Cercetarea prezentată în această teză răspunde unei nevoi concrete din domeniul dermatocosmeticii actuale: aceea de a corela potențialul biologic al extractelor vegetale cu performanța lor reală în formulări finite. Deși numeroase plante sunt recunoscute pentru conținutul lor în compuși bioactivi, modul în care aceștia sunt extrași, stabiliți și integrați în produse cosmetice determină în mod decisiv exprimarea efectului biologic la nivel cutanat. Abordarea propusă urmărește depășirea acestei discontinuități prin tratarea extractelor ca ingrediente active, a căror eficiență este condiționată de întregul lanț tehnologic, de la sursa vegetală până la sistemul de livrare.

În acest cadru conceptual, teza de față abordează: **studiul unor fitoextracte din flora autohtonă cu potențial terapeutic și aplicabilitate în cosmetica activă**. Interesul crescut pentru ingrediente naturale a readus în atenție plantele ca sursă valoroasă de compuși bioactivi, însă numeroase specii autohtone rămân insuficient investigate din perspectiva aplicabilității lor dermato-cosmetice.

Pornind de la această realitate, teza și-a propus să exploreze în mod sistematic trei specii vegetale autohtone cu potențial promițător, *Acmella oleracea*, *Artemisia annua* și *Daucus carota* subsp. *carota* (morcov sălbatic), analizându-le profilul fitochimic și posibilitățile de integrare în formulări cosmetice active.

Pentru a evalua în mod unitar potențialul dermato-cosmetic al celor trei specii, teza a combinat metode convenționale și neconvenționale de extracție utilizând exclusiv solvenți compatibili cu utilizarea topică. Obiectivul a fost obținerea unor extracte „ready to use”, ușor integrabile în matricea cosmetică. Extractele au fost ulterior evaluate din punct de vedere fitochimic (conținut total de polifenoli, flavonoide, randament), funcțional (activitate antioxidantă), microbiologic, citotoxic și formulativ, iar ulterior au fost integrate în prototipuri de emulsii dermatocosmetice dezvoltate în cadrul tezei.

Obiectivul general al tezei propune evaluarea integrată a unor fitoextracte obținute din *Acmella oleracea*, *Daucus carota* subsp. *carota* și *Artemisia annua*, în vederea includerii lor în emulsii dermato-cosmetice. Acest obiectiv a fost implementat printr-un demers care a inclus obținerea și caracterizarea extractelor, formularea unor prototipuri emulsionate de livrare și investigarea proprietăților funcționale esențiale pentru utilizarea lor în dermato-cosmetice: stabilitate, activitate antioxidantă, siguranță microbiologică, permeație cutanată și citotoxicitate.

Structura tezei reflectă aceste direcții de cercetare, fiind organizată în două părți principale. *Prima parte a tezei* este dedicată studiului de literatură și oferă cadrul teoretic necesar înțelegerii tematicii cercetării.

În **Capitolul I.1** sunt prezentate plantele ca surse de compuși biologic activi, cu accent pe diversitatea metaboliților secundari, rolul lor fiziologic în plantă și relevanța dermatologică a unor metaboliți. **Capitolul I.2** descrie structurile pielii și mecanismele prin care acestea interacționează cu ingredientele active prezente în produsele dermato-cosmetice, subliniind factorii anatomici și funcționali care influențează absorbția și eficacitatea compușilor vegetali. **Capitolul I.3** analizează principalele metode de obținere și caracterizare a extractelor vegetale, incluzând atât tehnici convenționale, cât și metode moderne orientate către procese sustenabile și solvenți compatibili dermatologic. Ultima secțiune a studiului de literatură, **Capitolul I.4**, este dedicat preparatelor dermato-cosmetice din surse vegetale, fiind discutate principiile de formulare, criteriile de stabilitate și provocările asociate integrării extractelor în emulsii destinate aplicațiilor cutanate.

Partea a doua a tezei este dedicată contribuțiilor personale și reunește rezultatele experimentale obținute pe parcursul cercetării. **Capitolul II.1** este capitolul introductiv în care sunt prezentate succint obiectivul general și obiectivele specifice, pentru a fundamenta clar direcția și coerența demersului științific. În continuare, **Capitolul II.2** privind materialele și metodele detaliază instrumentele, echipamentele, condițiile experimentale, procedurile analitice și tehnicile utilizate în obținerea, caracterizarea și integrarea extractelor vegetale în emulsiile dermatocosmetice. Partea experimentală propriu-zisă începe cu **Capitolul II.3**, obținerea și caracterizarea extractelor din *Acmella oleracea*, prezentând particularitățile fiecărui tip de extract în funcție de solventul și metoda de extracție utilizată. Aceeași abordare este aplicată în capitolele ulterioare dedicate extractelor din *Daucus carota* subsp. *carota* în **Capitolul II.4** și *Artemisia annua*, în **Capitolul II.5**, fiecare specie fiind analizată din perspectiva randamentelor de extracție, profilului fitochimic și activității antioxidante. Ulterior, în **Capitolul II.6** teza continuă cu un capitol dedicat formulării, caracterizării și optimizării sistemelor emulsionate destinate livrării unui complex cosmetic format din N-Prolyl Palmitoyl Tripeptide-56 Acetate și bakuchiol, vizând strategiile de reducere a stresului oxidativ la nivel cutanat. În **Capitolul II.7** sunt prezentate procesele de integrare a extractelor vegetale obținute ca ingrediente active în emulsii, împreună cu evaluarea lor *in vitro*, respectiv teste de stabilitate, activitate antioxidantă, siguranță microbiologică, viabilitate celulară și permeație cutanată cu celula Franz. Partea finală a acestei secțiuni, **Capitolul II.8**, urmărește transpunerea rezultatelor cercetării sub forma unui produs cu potențial de valorificare pe piața economică, evidențiind modul în care extractele vegetale și prototipurile emulsionate dezvoltate pot conduce la formulări viabile din punct de vedere comercial. Teza se încheie cu **Capitolul II.9**, un capitol dedicat concluziilor generale și perspectivelor de cercetare, în care sunt sintetizate principalele rezultate și sunt conturate direcțiile posibile de continuare a studiului.

Partea finală este reprezentată de anexa cu lista activităților de diseminare a rezultatelor obținute pe parcursul studiului doctoral.

Rezultatele finale au fost diseminate prin: **11 articole** publicate în reviste cotate ISI dintre care **7** în calitate de prim autor, **1** publicat în revistă indexată BDI și **15** lucrări prezentate la manifestări științifice naționale și internaționale, sub formă de postere sau comunicări orale.

Partea I

STUDIUL DE LITERATURĂ

Capitolul I.1

Plantele, sursa de compuși biologic activi

Încă de la începuturile civilizației, plantele au jucat un rol esențial în viața omului, fiind utilizate în mod extensiv în alimentație, pentru a trata diverse boli sau afecțiuni, pentru a întreține starea de sănătate și frumusețe. Legătura între natură și sănătatea umană este baza filozofică a majorității sistemelor tradiționale de vindecare din întreaga lume (Payyappallimana, 2010). În diverse culturi și epoci, cunoștințele empirice privind proprietățile terapeutice, nutritive și cosmetice ale plantelor au fost transmise și îmbunătățite de-a lungul generațiilor prin vraci, vindecatori sau practicieni profesioniști ce au lăsat omenirii lucrări cum sunt *De Materia Medica* a lui Dioscorides, și *Hippocratic Corpus* a lui Hippocrates (Upton, 2022).

„Esența tuturor ființelor este Pământul. Esența Pământului este Apa. Esența Apei sunt Plantele. Iar esența Plantelor este Ființa Umană.” („*The essence of all beings is Earth. The essence of Earth is Water. The essence of Water is Plants. The essence of Plants is the Human Being.*”) (*Chandogya Upanishad*, sec. VI î.Hr.). Acest citat din *Chandogya Upanishad*, una dintre cele mai vechi scrieri filosofice ale Indiei antice, surprinde într-o formulare simplă și profundă legătura fundamentală dintre natură, plante și ființa umană. Deși elaborat cu peste două milenii înaintea apariției științelor moderne, mesajul rămâne surprinzător de actual: plantele constituie o verigă esențială în menținerea vieții și a sănătății, iar substanțele pe care le sintetizează se armonizează firesc cu procesele biologice ale organismului uman, fapt reflectat tot mai clar în literatura științifică actuală. Relevanța acestei idei este cu atât mai mare în contextul actual, marcat de tranziția de la utilizarea predominantă a compușilor sintetici către o redescoperire a resurselor naturale. Pe măsură ce sunt puse în evidență limitele anumitor ingrediente de sinteză utilizate în produsele (dermato)cosmetice, interesul științific și tehnologic se îndreaptă tot mai clar către extractele vegetale, apreciate pentru profilul favorabil de tolerabilitate cutanată și pentru faptul că oferă un model de sustenabilitate mai apropiat de logica biologică a organismului uman.

Practicile dermatologice și cosmetice cu ingrediente provenite din surse botanice și minerale care au deschis calea revoluției actuale a ingredientelor naturale în produsele (dermato)cosmetice, sunt relatate pe larg în scrieri egiptene, mesopotamiene, grecești și romane, precum și în medicina tradițională chineză și medicina ayurvedică (McMullen și Dell’Acqua, 2023). Datând încă din anul 5000 î.Hr., scrierile egiptene consemnează rutina de îngrijire destul de complexă a vremii: scăldatul făcea parte din viața de zi cu zi; se preparau unguente din grăsimi animale parfumate cu extracte din plante aromate, creme demachiante din grăsimi animală amestecată cu pudră de var; se colorau buzele cu ocră-roșu dizolvat în apă; se parfuma corpul cu extracte din smirnă, cimbru, mușetel, rozmarin (Chaudhri, 2009); se pictau mâinile cu henna (Pérez-Arantegui, 2021); se conturau ochii și sprancenele cu un preparat cosmetic numit kohl, obținut din mai multe minerale, minereu de malachit și sulfură de plumb.

Primul capitol al tezei este dedicat analizei literaturii de specialitate privind utilizarea plantelor ca surse de compuși bioactivi în sănătatea umană în general și ca sursă de ingrediente active în produsele cosmetice și dermato-cosmetice. Capitolul oferă cadrul teoretic necesar pentru înțelegerea rolului ingredientelor active de origine vegetală în formulările moderne, în contextul interesului crescut pentru soluții naturale cu eficacitate biologică demonstrată.

Sunt prezentate plantele ca sisteme biologice complexe, capabile să furnizeze o varietate largă de substanțe active, prin intermediul metaboliților primari și secundari. În acest sens, sunt descrise principalele clase de metaboliți primari implicați în susținerea funcțiilor fiziologice ale pielii, precum și metaboliții secundari cu relevanță majoră în dermatocosmetică, incluzând polifenolii, flavonoidele,

terpenoidele, alcaloizii și acizii fenolici. Este evidențiat rolul acestora ca surse de compuși bioactivi cu potențial terapeutic și dermato-cosmetic ridicat.

Pe baza datelor raportate în literatura de specialitate, capitolul analizează principalele mecanisme de acțiune ale compușilor bioactivi de origine vegetală în produsele dermato(cosmetice). Sunt discutate efectul antioxidant, efectul anti-aging structural, efectul antitirozinază, efectul protector împotriva radiațiilor UV, efectul de menținere a hidratării și a funcției de barieră a pielii, precum și efectul antibacterian, mecanisme corelate cu prevenirea și ameliorarea diverselor dezechilibre cutanate (Kusumawati și Indrayanto, 2013; Riaz și colab., 2020; Sutkowska și colab., 2021; Turcov și colab., 2022).

Analiza critică a literaturii evidențiază faptul că plantele reprezintă o sursă vastă și insuficient valorificată de compuși bioactivi, cu aplicații multiple în dermato-cosmetică. Diversitatea chimică a acestora, asociată cu varietatea mecanismelor de acțiune raportate, susține interesul pentru explorarea sistematică a potențialului terapeutic și cosmetic al resurselor vegetale. Capitolul subliniază necesitatea aprofundării cercetărilor privind identificarea de noi plante și noi compuși bioactivi, precum și clarificarea relației dintre structura chimică a acestora și efectele biologice observate.

Capitolul I.2

Considerații structurale și funcționale ale pielii relevante pentru formularea și livrarea emulsiilor (dermato)cosmetice

Cosmeceuticele (dermatocosmeticele), un termen introdus de Albert Kligman în 1984, reprezintă o categorie de produse situate la interfața dintre cosmetică și dermatologie, formulate cu ingrediente biologice active capabile să exercite efecte benefice ce depășesc simpla funcție estetică. Prin proprietățile lor antiinflamatoare, antioxidante, depigmentante sau de stimulare a sintezei de collagen, aceste formulări pot modula funcții biologice ale pielii, fiind susținute de un fundament științific solid (KadamVaishali și colab., 2013; Naser, 2020).

Înțelegerea modului în care compușii bioactivi din plante interacționează cu pielea este strâns legată de înțelegerea structurii și funcțiilor pielii, deoarece eficacitatea oricărui ingredient activ depinde de capacitatea sa de a traversa bariera cutanată și de a acționa la nivelul straturilor țintă. Dintre acestea, stratul cornos reprezintă cea mai importantă barieră fiziologică, un „filtru” natural extrem de selectiv, care limitează pătrunderea moleculelor hidrosolubile și stabilește dacă un ingredient cu potențial terapeutic poate ajunge sau nu la locul de acțiune (Schafer și colab., 2023).

De aceea, în această teză, prin descrierea structurilor pielii nu am urmarit o prezentare clinică exhaustivă, ci una funcțională, orientată spre mecanismele relevante pentru formularea și livrarea compușilor bioactivi de origine vegetală. În acest context, relația dintre proprietățile fizico-chimice ale extractelor botanice, polifenoli, carotenoizi, alcaloizi și alte categorii de metaboliți, și comportamentul lor în contact cu epidermul devine esențială pentru înțelegerea eficacității dermatocosmeticele. Acestea sunt concepute pentru a penetra bariera cutanată și a acționa la nivelul diferitelor straturi ale pielii, inclusiv epidermul și dermul, pentru a oferi beneficii terapeutice (Baldi și colab., 2023).

Astfel, analiza structurii pielii oferă cadrul conceptual necesar pentru a interpreta în mod integrat performanța ingredientelor active și impactul formulării asupra barierei cutanate. În acest sens, secțiunea următoare prezintă, într-o manieră sintetică și orientată spre aplicații practice, principalele straturi ale pielii și mecanismele prin care acestea interacționează cu produsele dermatocosmetice, constituind fundamentul pentru evaluarea extractelor vegetale și a sistemelor formulate în cadrul acestei teze.

Înțelegerea structurii pielii și a mecanismelor sale de funcționare reprezintă fundamentul oricărei abordări moderne în domeniul dermatocosmetic. Pielea, prin arhitectura stratificată și funcția complexă de barieră exercitată în special de stratul cornos, determină nu doar modul în care ingredientele active pot fi livrate, ci și eficacitatea finală a acestora. Integrarea teoriilor contemporane privind

îmbătrânirea cutanată evidențiază dimensiunea multifactorială a proceselor care determină degradarea structurală și funcțională a pielii. În acest context, utilizarea ingredientelor bioactive din plante devine cu atât mai relevantă, întrucât multe dintre acestea acționează simultan asupra mai multor mecanisme biologice: protecția antioxidantă, modularea inflamației, îmbunătățirea funcției de barieră și stimularea regenerării matricei extracelulare. Cunoașterea interacțiunii dintre piele și compușii activi, coroborată cu înțelegerea mecanismelor de îmbătrânire, constituie baza conceptuală necesară pentru dezvoltarea unor formulări dermatocosmetice eficiente și sigure. Această perspectivă va ghida, în partea a doua a acestei teze dedicată contribuțiilor personale, selectarea ingredientelor, alegerea strategiilor de formulare și evaluarea performanțelor extractelor vegetale investigate în cadrul acestei teze.

Capitolul I.3.

Metode de obținere a extractelor vegetale

Reorientarea oamenilor spre folosirea produselor (dermato)cosmetice naturale, a direcționat cercetarea către descoperirea de noi compuși bioactivi cu valoare dermatocosmetică. Plantele sunt principala sursă pentru dezvoltarea acestor produse. În ciuda a secole de cercetare, doar un număr foarte limitat din cele 369.000-376.000 de specii plante au fost investigate fitochimic până acum (Atanasov și colab., 2015).

Selectarea plantelor pentru investigare a fost ghidată de utilizările tradiționale, ceea ce a dus la descoperirea de mii de compuși cu o bioactivitate foarte puternică (Newman și Cragg, 2020). Astfel că bioprospecția și cartografierea metabolomică a noi plante neexplorate sau explorate insuficient este o direcție de cercetare emergentă și extrem de actuală.

Metabolomica, în sensul cel mai larg, implică o analiză completă a tuturor compușilor cunoscuți sau necunoscuți dintr-o proba biologică, în acest context, dintr-un extract vegetal, respectiv analiza pe scară largă a metaboliților prezenți în extract (Sumner și colab., 2003; Griffiths și colab., 2007). Analiza metabolomică a unei plante implică trei etape majore: pregătirea probelor, obținerea datelor și analiza acestora. Aceasta poate fi ținută, când compușii sunt cunoscuți și doar se optimizează probele și metodologiile sau netinută, când se investighează toți compușii dintr-o probă. Fluxul de lucru începe cu colectarea materialului vegetal, urmată de prelucrarea în vederea extracției, extracția propriu zisă, supunerea extractului vegetal tehnicilor de analiză cromatografică și spectroscopică (Salam și colab., 2019).

I. 3.1. Pregătirea materialului vegetal

Etapa inițială pentru extracția și caracterizarea compușilor bioactivi este *pregătirea materialului vegetal* (Figura I.3.1) în scopuri experimentale și vizează mai multe etape:

1. autentificarea corectă a speciei botanice,
2. colectarea plantei și uscare adecvată,
3. mărunțire/măcinare,
4. depozitare pentru extracția ulterioară.

Calitatea și cantitatea compușilor bioactivi din materialul vegetal sunt influențate semnificativ de diverși factori de mediu, cum ar fi condițiile de recoltare, clima, compoziția solului, expunerea la lumină, altitudinea, momentul recoltării, etc. Aceștia afectează în mare măsură compoziția chimică și bioactivitatea plantelor (Iordănescu și colab., 2012; Pietrzak și Nowak, 2021; De Rossi și colab., 2023).

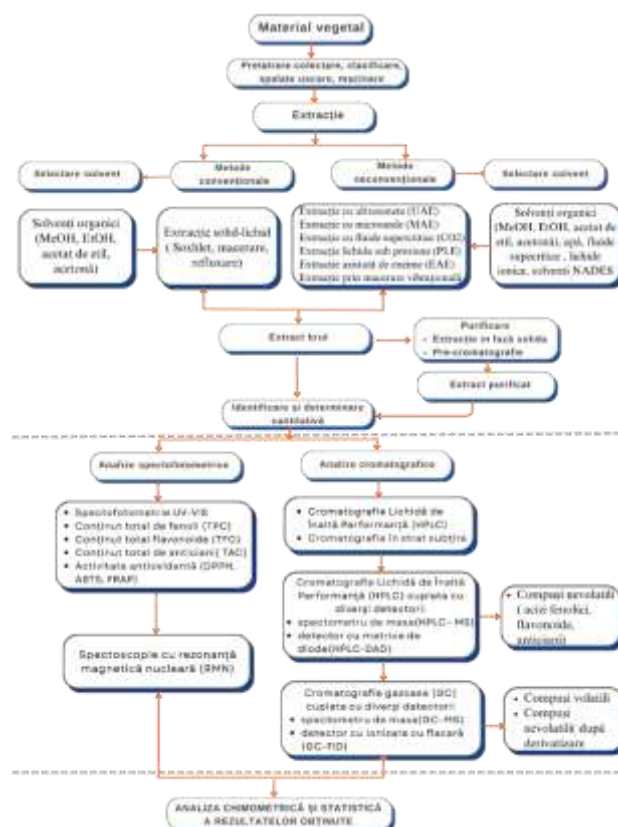


Figura I.3.1. Protocol analitic general pentru extracția și caracterizarea compușilor bioactivi din surse vegetale (Ivanović și colab., 2020)

I.3.2. Metode de extracție a compușilor bioactivi din plante

Pașul inițial și cea mai importantă parte în studiul oricărui extract vegetal este *extracția*, impactul acesteia asupra rezultatului fiind hotărâtor. Produsele naturale sunt foarte diverse și au în compoziție metaboliți primari și secundari extrem de diferiți și de asemenea, prezintă proprietăți fizico-chimice distincte, ceea ce presupune alegerea unui sistem de extracție adecvat care să funcționeze cu performanțe superioare pentru extracția compușilor bioactivi.

Metodele de extracție lichid-solid pot fi clasificate în două categorii (Tabelul I.3.1.): metode tradiționale sau „convenționale” și metode inovatoare sau „verzi”. Deși toate aceste metode urmează aceleași patru etape esențiale, respectiv: pătrunderea solventului în materialul solid, dizolvarea compușilor țintă în solvent, difuzia acestora prin matricea solidă vegetală și colectarea lichidului rezultat, ele diferă semnificativ în ceea ce privește eficiența, consumul de resurse și energie, timpul necesar și impactul asupra mediului (Mosic și colab., 2021).

Selectarea metodelor de extracție joacă un rol crucial în obținerea compușilor bioactivi din plante, influențând atât eficiența, cât și calitatea extractului final (Gupta și colab., 2012; Chuo și colab., 2022) și de aceea în alegerea lor se ține cont de o serie de factori cum ar fi: natura compusului țintă, selectivitatea, rentabilitatea și scalabilitatea metodei (Ghenabzia și colab., 2023).

I.3.3. Alegerea solventului pentru extracția compușilor bioactivi vegetali

Alegerea solventului este un element esențial în desfășurarea unui proces de extracție lichid – solid, de acesta depinzând performanța globală a metodei selectate.

Alegerea extractantului depinde de tipul de plantă, partea de plantă supusă extracției, natura compușilor bioactivi și disponibilitatea solventului, dar și de caracteristicile metodei de extracție vizate. Alegerea solventului este critică, deoarece acesta trebuie să pătrundă prin membrana celulară a plantelor,

să solubilizeze compușii țintă și să-i transfere prin membranele celulare către solvent (Saravanabavan și colab., 2020). În selectarea solventului trebuie luate în considerare și o serie de aspecte legate de acesta cum ar fi: selectivitatea, care să-i permită extragerea constituentului activ și să lase materialul inert, să fie netoxic și neinflamabil, să fie ieftin, să nu reacționeze cu speciile chimice extrase, să poată fi recuperat rapid și separat din extract, să aibă o vâscozitate scăzută pentru o pătrundere ușoară prin membrana celulară vegetală și să prezinte o temperatură de fierbere cât mai scăzută pentru a preveni degradarea prin căldură (Ellof, 1998; Das și colab., 2010; Pandey și Tripathi, 2014).

Alegerea solventului influențează în mod semnificativ extracția compușilor fenolici, a flavonoidelor și a altor substanțe fitochimice (Humadi și colab., 2009; Bosković și colab., 2022). Solvenții polari, cum ar fi etanolul, conduc în general la un conținut fenolic mai mare și o activitate antioxidantă mai ridicată (Nawaz și colab., 2020 ; Humulescu, 2021). De asemenea, solvenții polari sunt folosiți pentru compușii hidrofilici și solvenți nepolari pentru cei lipofili (Jibhate și colab., 2023).

În general, solvenții polari precum apa, metanolul și etanolul sunt utilizați în extracția compușilor polari, în timp ce solvenții nepolari, cum ar fi hexanul și diclorometanul, sunt utilizați în extracția compușilor nepolari (Abubakar și Haque, 2020).

Noile cercetări subliniază utilizarea în creștere a solvenților “verzi” pentru extragerea compușilor bioactivi din plante, abordând preocupările de mediu asociate cu solvenții organici convenționali.

Lichidele ionice (IL) s-au arătat, de asemenea, promițătoare, crescând randamentele compușilor bioactivi cu 20-35% (Lim și colab., 2022).

Alți solvenți “verzi” folosiți în extracția cu solvent sunt reprezentați de uleiurile vegetale, fluidele supercritice și lichide al căror volum este extins de un gaz sub presiune (gas expanded liquids) (Yara-Varón și colab., 2017; Hashemi și colab., 2022). Acești solvenți sunt adesea combinați cu tehnici de extracție inovatoare, cum ar fi extracția cu fluide asistate cu microunde, extracția cu ultrasunete sau extracția cu fluide supercritice (Soquetta și colab., 2018 ; Ivanović și colab., 2020).

Solvenții eutectici naturali (NADES) (Tabelul I.3.2) au apărut ca alternativă durabilă și verde la solvenții organici convenționali pentru extragerea compușilor bioactivi din plante utilizați ulterior în industria cosmetică și farmaceutică (González-Laredo și colab., 2023; Bragagnolo și colab., 2024; Maxim și colab., 2024c; Villa și colab., 2024). NADES se formează prin combinarea donatorilor și acceptorilor de legături de hidrogen, rezultând solvenți biodegradabili cu toxicitate scăzută și cu eficiență ridicată de extracție (Zuo și colab., 2023; Hikmawanti și colab., 2021). Acești solvenți au demonstrat performanțe de extracție îmbunătățite în comparație cu solvenții tradiționali, contribuind la îmbunătățirea stabilității, bioactivității și biodisponibilității compușilor extrași (Petkov și colab. 2022; Sharma și colab., 2023; Maxim și colab., 2024c). NADES au demonstrat capacități superioare de extracție pentru acizii fenolici, flavonoide și alți compuși bioactivi, fiind candidați potențiali pentru aplicații cosmetice (Ivković și colab., 2024; Maxim și colab., 2024c). Acești solvenți pot fi preparați cu ușurință din surse naturale, regenerabile, fiind atractivi în combinație cu procesele de extracție „verzi” și durabile (González-Laredo și colab., 2023). NADES au fost combinate cu succes cu tehnici de extracție inovatoare, cum ar fi extracțiile asistate cu microunde și extracțiile cu ultrasunete, rezultând o eficiență sporită de extracție. (Ivanović și colab., 2020; Socas-Rodríguez și colab., 2021; Maxim și colab., 2024c). Utilizarea lor în formulări cosmetice și farmaceutice oferă oportunități pentru dezvoltarea de produse noi, ecologice, cu solubilitate, stabilitate și biodisponibilitate îmbunătățite a ingredientelor active (Hikmawanti și colab., 2021; Cannavacciuolo și colab., 2022; Villa și colab., 2024).

Capitolul I.4.

Aspecte teoretice privind formularea dermatocosmetică cu ingrediente de origine naturală

În contextul utilizării extractelor vegetale ca ingrediente active în obținerea de (dermato)cosmetice, alegerea sistemului de formulare devine la fel de importantă ca selecția compușilor bioactivi. Emulsiile cosmetice reprezintă cel mai versatil și eficient vehicul pentru integrarea atât a extractelor hidrofile (de exemplu, extractele în NADES sau hidroalcoolice), cât și a celor lipofile (uleiuri, CO₂, fracții nepolare). Acestea permit solubilizarea, stabilizarea și livrarea direcționată a metaboliților secundari, optimizând penetrarea acestora prin stratul cornos. În acest context, descrierea tipurilor de emulsii, a mecanismelor lor de formare și a rolului fiecărei clase de ingrediente devine esențială pentru formularea produselor dermatocosmetice eficiente și compatibile cu extractele vegetale studiate în această lucrare.

Emulsiile cosmetice sunt evidențiate ca sisteme de formulare versatile și eficiente, capabile să integreze atât extracte hidrofile, cât și lipofile, asigurând solubilizarea, protecția și distribuția controlată a compușilor bioactivi (Pensé-Lhéritier, 2014).

1.4.1.2 Formularea emulsiilor (dermato)cosmetice cu ingrediente de origine naturală

Creșterea reticenței consumatorilor față de prezența substanțelor chimice în produsele de uz cotidian, coroborată cu cerințele tot mai exigente ale acestora pentru produse sigure, cu ingrediente naturale, a determinat domeniul vast a formulării (dermato)cosmetice să reevalueze strategiile de alegere a ingredientelor și să exploreze alternative și noi metodologii de formulare, pentru a răspunde acestor cerințe tot mai complexe.

Tendențele în formulările (dermato)cosmetice se concentrează pe dezvoltarea de produse hipoalergenice, cu ingrediente naturale, durabile și multifuncționale (Bom și colab., 2019). Distincția dintre un ingredient natural și unul derivat natural este adesea ambiguă. Percepția asupra acestei diferențe poate varia semnificativ între chimiști, profesioniști în marketing, experți în reglementare și consumatori. În industria cosmetică și a produselor de îngrijire personală, aceste perspective divergente contribuie la confuzie. Situația este complicată și se rezumă mai mult de utilizarea unor termeni precum „verde,” „organic,” „certificat organic” sau „regenerabil,” care, în multe cazuri, nu beneficiază de definiții clare sau recunoaștere formală din partea autorităților de reglementare (Dayan și Kromidas, 2011). În acest context, Standardul ISO 16128, al cărui ultimă parte a fost publicată în 2017, oferă o definiție precisă a termenilor „origine naturală” și „natural” referitor la ingredientele cosmetice. Acest standard stabilește ghiduri tehnice și criterii pentru definirea ingredientelor și produselor naturale și organice. Conform acestuia, proveniența naturală a unui ingredient utilizat în produsele (dermato)cosmetice este determinată exclusiv în raport cu sursa sa și cu procesul de producție aplicat (Figura I.4.1.) (Géa și colab., 2024). Așadar, provocarea în formularea produselor naturale este înlocuirea ingredientele de sinteză petrochimică din formule, fără a compromite performanța și eficacitatea. Prin urmare, selecția ingredientelor pentru un produs dermatocosmetic pe bază de ingrediente de origine naturală se face ținând cont de impactul acestora asupra mediului, de siguranța lor pentru sănătatea umană, dar și de eficacitatea lor în formularea produsului (Géa și colab., 2024).

La modul general, o emulsie cosmetică este compusă din 3 categorii principale de ingrediente: ingredientele active ale formulei care pot constitui un procent de 1-10% din formulă, excipienții, care formează baza emulsiei și aditivii, care sunt adăugați în procent redus, de regula sub 1% (Figura I. 4.2.) (Rähse, 2020).

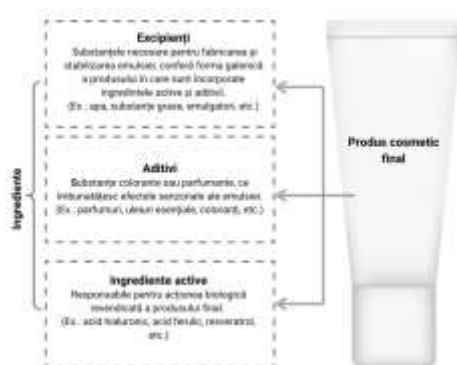


Figura I.4.2. Compoziția generală a unei emulsii cosmetice (Rähse, 2020)

Emulsia poate fi privită ca un ansamblu funcțional în care excipienții construiesc structura de bază a produsului și permit vehicularea uniformă a substanțelor active, aditivii asigură stabilitatea, siguranța și păstrarea caracteristicilor formulei în timp, iar ingredientele active conferă produsului efectul biologic dorit asupra pielii, eficacitatea acestora fiind strâns dependentă de modul în care sunt integrate și susținute de întregul sistem al formulării (Rähse și Dicoi, 2009).

Procesul propriu zis de emulsionare (Figura I.4.3.) începe cu dozarea atentă a ingredientelor conform raportului de masă specific din rețetă.

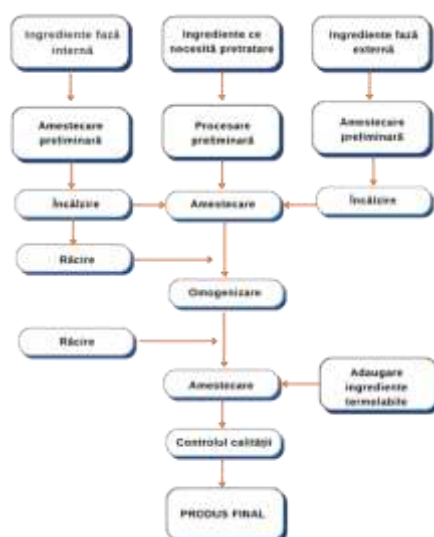


Figura I.4.3. Schema generală de preparare a unei emulsii (dermato)cosmetice prin tehnica emulsionării cu încălzirea materiilor prime (Sikora, 2019).

PARTEA II

CONTRIBUȚII PERSONALE STUDIUL UNOR FITOEXTRACTE DIN FLORA AUTOHTONĂ CU POTENȚIAL TERAPEUTIC ȘI APLICABILITATE ÎN COSMETICA ACTIVĂ

Capitolul II.1. OBIECTIVE

Teza de doctorat intitulată “*Studiul unor fitoextracte din flora autohtonă cu potențial terapeutic și aplicabilitate în cosmetica activă*” s-a dezvoltat în baza următorului **obiectiv general**:

- Evaluarea integrată a unor fitoextracte obținute din *Acmella oleracea*, *Daucus carota* subsp. *carota* și *Artemisia annua*, în vederea valorificării lor în produse de cosmetică activă, prin: obținerea și caracterizarea extractelor, formularea de emulsii prototip și investigarea proprietăților lor funcționale relevante pentru cosmetica activă cu accent pe stabilitate, activitate antioxidantă, siguranță microbiologică și permeație cutanată.

Pentru a transpune obiectivul general într-un demers experimental/practic coerent, au fost definite următoarele obiective specifice, care detaliază etapele cercetării și parametrii analizați.

Obiectivele specifice:

- Caracterizarea botanică și fitochimică a speciilor *Acmella oleracea*, *Daucus carota* subsp. *carota* și *Artemisia annua*, în vederea fundamentării potențialului lor dermatocosmetic.
- Stabilirea și optimizarea metodelor de extracție utilizând solvenți compatibili cu aplicațiile (dermato)cosmetice (alcoolici, glicolici și NADES), pentru fiecare dintre speciile vegetale studiate.
- Determinarea randamentului de extracție și evaluarea conținutului total de polifenoli și flavonoide ale extractelor obținute.
- Evaluarea activității antioxidante a extractelor prin metode standardizate.
- Formularea unor emulsii prototip conținând două ingrediente active cosmetice complementare și caracterizarea stabilității și activității lor antioxidante.
- Integrarea extractelor vegetale în emulsii O/W și dezvoltarea prototipurilor cosmetice.
- Evaluarea stabilității fizico-chimice a emulsiilor formulate.
- Analiza siguranței microbiologice a prototipurilor obținute.
 - Determinarea capacității antioxidante a emulsiilor care conțin extractele vegetale.
 - Investigarea permeației și retenției cutanate prin metoda celulei Franz și testarea citotoxicității
 - Corelarea datelor obținute (fitochimie–activitate antioxidantă–stabilitate–permeație) în vederea identificării extractelor cu cel mai mare potențial cosmetic.

Capitolul II.2.

Materiale și metode utilizate în studiul experimental

II.2.1 Materiale utilizate

Nevoia de noi surse de substanțe biologice active este determinată de cererea și consumul în creștere continuă de produse (dermato)cosmetice cu componenți de origine naturală (Kowalczyk și colab., 2024). O strategie eficientă pentru identificarea de noi substanțe bioactive este studierea și caracterizarea plantelor și remediilor pe bază de plante utilizate în medicina tradițională din diverse

culturi (Brusotti și colab., 2014). Validarea științifică prin cercetări ulterioare subliniază importanța conservării și explorării cunoștințelor etnobotanice, care pot oferi perspective valoroase pentru dezvoltarea unor produse inovatoare cu aplicații în dezvoltarea de noi produse cosmetice și dermatologice.

În acest context, teza mea de doctorat se concentrează pe trei plante reprezentative, alese pe baza potențialului lor promițător și a utilizării lor tradiționale, precum și a datelor preliminare disponibile. Pentru a stabili planul de cercetare, am demarat un proces de evaluare și identificare a plantelor care conțin compuși bioactivi cu potențial de aplicare în produsele (dermato)cosmetice, realizând un screening preliminar al unui număr semnificativ de specii. Bioprospecția realizată în scopul selectării unor specii de plante din flora spontană și cultivată, destinată acestui studiu, a fost efectuată ținând cont de toate aspectele esențiale: explorarea biodiversității, evaluarea compușilor bioactivi, aplicabilitatea industrială, sustenabilitatea și respectarea eticii bioprospecției. În urma acestui proces de selecție, am identificat ca fiind specii promițătoare: *Acmella Oleracea*, plantă tropicală aclimatizată în România, *Daucus carota subsp. carota* (morcovul sălbatic) și *Artemisia annua*, acestea două din urmă fiind plante sălbatice regasite în flora spontană.

II.2.1.4. Peptidele cosmetice

Peptidele cosmetice reprezintă cele mai active componente ale preparatelor cosmetice moderne. Primele peptide destinate uzului cosmetic au fost dezvoltate în anii 1980, însă nu au atras atenția cercetătorilor până în anii 2000, când a fost lansat Palmitoyl Pentapeptide-4, cu efecte clinice demonstrate în diminuarea ridurilor (Schagen, 2017). Potențialul lor în industria (dermato)cosmetică a generat cercetări intense în domeniul inovării peptidelor, astfel încât, în 2019, lucrarea *European Glossary of Common Ingredient Names for Use in the Labelling of Cosmetics* menționa 848 de ingrediente ce conțineau cuvântul "peptidă" (Ferreira și colab., 2020). Nomenclatorul Internațional al Ingredientelor Cosmetice (INCI) denumește peptidele în funcție de numărul de aminoacizi distincti ce se repetă într-un lanț. Pentru un lanț ce conține între 2 și 9 aminoacizi, se adaugă un prefix care identifică numărul acestora, cum ar fi dipeptida, tripeptida, hexapeptida. Peptidele care depășesc acest număr sunt denumite oligopeptide sau polipeptide și includ peste 1400 de ingrediente ce conțin cuvântul „peptidă” în denumire (Personal Care Products Council, n.d).

II.2.1.4.4. Peptide selectate pentru studiu experimental: N-Prolyl Palmitoyl Tripeptide-56 Acetate

Peptidele semnal, cum este N-Prolyl Palmitoyl Tripeptide-56 Acetate (PP56), sunt molecule bioactive de generație nouă, caracterizate printr-o structură unică ce le permite să interacționeze selectiv cu receptori celulari și să inducă răspunsuri biologice specifice. Având o aplicație largă în domeniul cosmeticii, PP56 a fost aleasă pentru acest studiu datorită potențialului său de a acționa ca agent semnalizator pentru diverse procese de regenerare și întinerire celulară. În studiu, se vor analiza vehicule eficiente de livrare în piele a peptidei selectate și stabilitatea acestora.

II.2.1.5. Bakuchiol, substanță bioactivă izolată din materii prime vegetale

Bakuchiolul este un fenol meroterpenic izolat pentru prima dată în 1966 din semințele de *Psoralea corylifolia*. Planta a fost folosită în medicina tradițională indiană și chineză, pentru a trata afecțiunile pielii și posedă proprietăți antimicrobiene, antiinflamatorii și antioxidante (Zhang și colab., 2016; Alam și colab., 2017). Deși a fost identificat și în alte specii, precum *Ulmus davidiana* (Choi și colab., 2010), *Piper longum* (Ohno și colab., 2010) și *Otobium pubescens* (Krenisky și colab., 1999), concentrațiile obținute sunt nesemnificative. *P. corylifolia* rămâne principala sursă naturală pentru extracția industrială a bakuchiolului, acesta fiind unul dintre compușii majori ai semințelor plantei (Zhang et al., 2016; Alam et al., 2017).

II.2.2. Metode de extracție utilizate în dezvoltarea studiilor experimentale

Un obiectiv central al cercetării în cadrul pregătirii tezei de doctorat a constat în cuantificarea cantității totale de polifenoli și flavonoide precum și investigarea capacității antioxidante a extractelor obținute din *A. oleracea*, cultivată în România, precum și *D. carota subsp. carota* și *A. annua*, recoltate

din flora spontană. Primul pas a fost elaborarea unui protocol de lucru experimental redat în Figura II.2.6.

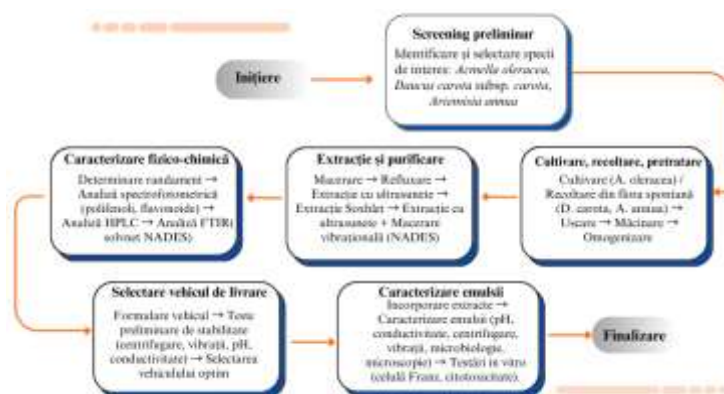


Figura II.2.6. Protocolul de lucru pentru obținerea de extracte vegetale, caracterizarea acestora și încorporare într-un produs finit

II.2.2.2.1. Justificarea alegerii solvenților de extracție

Selecția solventului pentru extracția compușilor de interes din materialul vegetal este un pas crucial, dar nu este suficientă în sine. De aceea am coroborat această cerință cu o condiție care ține de utilizarea ulterioară a acestor extracte: solvenții de extracție trebuie să fie compatibili cu formulările (dermato)cosmetice, unde extractele vor fi integrate ulterior ca substanțe biologic active. Astfel, procesul de selecție a solventului a fost realizat în strânsă legătură cu cerințele de compatibilitate și siguranță ale produselor (dermato)cosmetice.

II.2.2.1.1.1 Etanolul

Etanolul a fost ales ca solvent de extracție pentru caracteristicile sale favorabile atât în extragerea eficientă a polifenolilor și flavonoidelor, cât și în integrarea ulterioară a extractelor în formulările (dermato)cosmetic, fiind utilizat în mod frecvent pentru formularea produselor de îngrijire personală (Hakim și Saputri, 2020).

II.2.2.1.1.2 Propanediolul

Propanediolul este din ce în ce mai des folosit în formulările (dermato)cosmetice ca agent de textură sau umectant (Chemat și colab., 2019), sau în scopul stabilizării și conservării produsului (Kerdudo și colab., 2015). Extractele naturale în solvenți purtători, cum ar fi glicerina sau glicolii (cei mai comuni fiind propilenglicolul și 1,3-propanediolul) sunt preferate solvenților clasici, astfel că în baza de date Coptis, ce cuprinde peste 15.000 de materii prime cosmetice, unul din două extracte naturale comercializate pe piața ingredientelor cosmetice este diluat în glicerina sau propanediol (Canton și colab., 2021). Obținut prin fermentarea glucozei, este considerat un solvent natural și biodegradabil și studiat adesea ca solvent alternativ de extracție, ca donor de legături de hidrogen în solvenții eutectici profunzi (DES), fiind capabil să extragă o cantitate mare de polifenoli comparativ cu solvenții hidroetanolic (Vieira și colab., 2020). Datorită funcției de ingredient în produsul cosmetic, încorporarea solventului în formula finală elimină procesele ulterioare de separare a compușilor.

II.2.2.1.1.3 Solvenți NADES

Solvenții eutectici naturali (Natural Deep Eutectic Solvents – NADES) au câștigat un interes sporit pentru extracția compușilor bioactivi din matrici vegetale, în principal datorită avantajelor lor ecologice, inclusiv provenienței din surse naturale și caracterului lor sustenabil, reprezentând o alternativă promițătoare la solvenții organici tradiționali (a se vedea și Studiul de literatură, Capitolul I.3.3.). În plus, NADES prezintă o toxicitate redusă față de organismele vii, ceea ce le permite utilizarea în aplicații sensibile, cum ar fi industria farmaceutică și (deramto)cosmetică. De asemenea, se remarcă

printr-o biodegradabilitate ridicată, având capacitatea de a se descompune rapid în mediu fără a genera poluanți persistenți, contribuind la reducerea impactului negativ.

Amestecurile eutectice sunt sisteme multicomponente cu un punct de topire mai mic decât componentele lor individuale, formate prin interacțiuni moleculare specifice care inhibă cristalizarea (Gala și colab., 2013).

II.2.2.2.2. Metodele de extracție aplicate în studiul experimental

Așa cum este menționat în studiul de literatura (Tabelul I.3.3), sunt utilizate diverse metode de extracție pentru a obține randamente maxime de compuși activi, fiecare având avantaje și limitări în funcție de tipul de solvent, de compoziția plantei, și de caracteristicile chimice ale compușilor. Deoarece obiectivul studiului este cuantificarea polifenolilor și flavonoidelor din speciile vegetale selectate, vor fi detaliate tehnicile de extracție utilizate, cum ar fi macerarea, extracția asistată de ultrasunete, extracția în regim vibrator, refluxarea la cald caldă și refluxarea la cald în aparat Soxhlet, evidențiind eficiența și aplicabilitatea fiecărei metode.

II.2.2.2.2.6. Evaluarea eficienței metodelor de extracție

Calculul randamentului într-o extracție joacă un rol bine definit în aprecierea eficienței procesului de extracție și în optimizarea acestuia. Randamentul indică proporția de substanță extrasă din materialul vegetal, după îndepărtarea solventului de extracție. Un randament mai mare sugerează o extracție eficientă, în timp ce un randament mic poate indica o extracție incompletă sau ineficientă, astfel ca se poate determina cât de bine se recuperează compușii de interes din materialul vegetal, iar acest lucru este un prim indiciu al performanței metodei de extracție. Pentru obținerea randamentului de extracție s-a procedat astfel: 4 mL de extract au fost cântăriți într-un creuzet de porțelan, apoi supus evaporării într-o etuvă model Poleko SLW53, la o temperatură de maxim 50°C. După evaporarea completă a solventului și răcirea creuzetului în exicator, acesta a fost recântărit, calculul randamentului făcându-se după formula (II.2.1.). Metoda este limitată la extracție în solvenți ușor volatili la temperaturi de până la 50°C, pentru a nu distruge compușii chimici extrași.

$$\eta = \frac{m_{\text{reziduu}} \cdot v_{\text{extract}}}{n_{\text{extract}} \cdot m_{\text{probă solidă}}} \cdot 100 \quad (\text{II.2.1.})$$

unde: m_{reziduu} este masa rezidului solid rezultat după evaporarea la sec a probei de extract (g); v_{extract} este volumul probei supuse evaporării (mL); n_{extract} este volumul total al extractului obținut inițial (mL); $m_{\text{probă solidă}}$ reprezintă masa probei de plantă utilizată în procesul de extracție lichid-solid (g).

Pentru realizarea studiului experimental, am investigat și optimizat o serie de parametri considerați esențiali pentru obținerea unor rezultate relevante și reproductibile. În acest sens, au fost variate temperatura de extracție, tipul și concentrația solvenților utilizați, precum și raportul solvent /material vegetal. De asemenea, au fost luați în considerare și alți factori importanți, precum durata procesului de extracție, cu scopul de a identifica condițiile optime care favorizează extragerea eficientă a polifenolilor și flavonoidelor din speciile vegetale considerate.

II.2.3. Metode de caracterizare aplicate în studiul experimental

În studiul experimental privind extracția compușilor bioactivi din plante, caracterizarea extractelor vegetale reprezintă un pas esențial pentru validarea rezultatelor. Necesitatea unei caracterizări riguroase derivă din faptul că utilizarea ulterioară a extractelor în preparate (dermato)cosmetice impune cerințe stricte privind compoziția chimică, stabilitatea și eficacitatea biologică. Prin aplicarea metodelor analitice avansate, precum spectroscopia și cromatografia lichidă de înaltă performanță, se poate determina profilul fitochimic al extractelor, evaluând concentrațiile de polifenoli, flavonoide și alte substanțe active relevante, esențială pentru standardizarea formulărilor cosmetice.

II.2.3.4. Determinarea conținutului total de polifenoli

Metoda Folin-Ciocalteu se bazează pe o tehnică spectrofotometrică utilizată pentru cuantificarea compușilor fenolici din diverse matrici vegetale, identificându-se categorii de compuși și nu compuși individuali. Aceasta metodă are la bază o reacție de transfer de electroni în care specia antioxidantă acționează ca donor de electroni, iar reactivul Folin-Ciocalteu acționează ca oxidant, generând o culoare albastră a cărei intensitate este măsurată spectrofotometric (Singleton și colab., 1999; Csepregi și colab., 2013; Perez și colab., 2023).

II.2.3.5. Determinarea conținutului total de flavonoide

Determinarea conținutului total de flavonoide se bazează pe formarea unui complex colorat între flavonoide și o soluție de $AlCl_3$. Mai multe studii au optimizat și validat această metodă pentru diverse materiale vegetale, inclusiv *Ocimum basilicum* (da Silva și colab., 2015), specii de *Plantago* (Grubešić și colab., 2007) și *Thuja occidentalis* (Figueirêdo și colab., 2016). În ciuda anumitor limitări, metoda de complexare cu $AlCl_3$ rămâne utilizată pe scară largă pentru cuantificarea flavonoidelor în extractele vegetale datorită simplității și rentabilității sale (Soares și colab., 2003; Matić și colab., 2017).

Capitolul II.3.

Obținerea și caracterizarea extractelor vegetale din *Acmella oleracea*

II.3.1. Consideratii generale privind extractelor vegetale din *Acmella oleracea*

Aclimatizarea cu succes a *A. oleracea* în România oferă o soluție sustenabilă pentru valorificarea unei plante tropicale cu potențial dermatocosmetic ridicat, făcând posibilă utilizarea sa ca sursă accesibilă și locală de compuși bioactivi. *Acmella oleracea* este considerată un ingredient promițător în dermatocosmetică datorită efectului miorelaxant asociat spilantholului, dar și datorită acțiunii cumulate a altor constituenți bioactivi din plantă, care conferă extractelor un profil complex de beneficii asupra pielii (Fajardo și colab., 2025).

În acest context, direcția de cercetare a urmărit valorificarea extractului integral de *A. oleracea*, având ca obiectiv păstrarea interacțiunilor sinergice dintre constituenții bioactivi și conservarea matricei fitocomplexe native, evidențiind totodată importanța cuantificării polifenolilor și flavonoidelor ca indicatori relevanți ai potențialului antioxidant al plantei, direcție ce va fi aprofundată prin investigarea suplimentară a activității antioxidante. Pentru atingerea acestui obiectiv, metodele de extracție și selecția solvenților au fost adaptate, vizând obținerea unor extracte integrale, cu stabilitate chimică și activitate biologică optimă, adecvate utilizării directe în formulări cosmetice, eliminând astfel etapele suplimentare de purificare sau izolare a compușilor individuali.

II.3.1. Extracția solid-lichid a compușilor activi din *A. oleracea*

Pentru obținerea extractelor destinate utilizării directe în formulări (dermato)cosmetice au fost investigate trei direcții principale de cercetare, definite de natura solventului utilizat: extracția hidroalcoolică, extracția glicolică și extracția în sisteme eutectice naturale (NADES). Alegerea acestor direcții a fost fundamentată atât pe datele existente în literatura de specialitate, cât și pe observațiile experimentale proprii, urmărind obținerea unor extracte sigure, biocompatibile și adaptate utilizării practice în produse cosmetice.

II.3.2.1. Obținerea de extracte vegetale cu solvenți hidroalcoolici

În continuare, au fost evaluate o serie de tehnici de extracție, respectiv:

- macerare la temperatura camerei,
- extracție la cald prin refluxare (R),
- extracție asistată de ultrasunete (US),
- metodă combinată constând în extracție asistată de ultrasunete urmată de macerare (USM),
- extracția la cald prin refluxare în instalația Soxhlet (Sx),

Extracția hidroalcoolică a fost investigată prin analiza a trei factori esențiali: influența concentrației solventului, influența raportului solid/lichid (S/L) și influența timpului de extracție (Tabel. II.4.2), în conformitate cu un protocolul deja stabilit de Turcov și colaborarii săi (Turcov și colab., 2022).

II.3.2.2. Randamentul de extracție

Eficiența metodelor de extracție a fost evaluată, într-o primă etapă, pe baza randamentului de extracție, care reprezintă un parametru primar relevant în evaluarea eficienței metodelor de extracție și constituie un indicator precoce esențial pentru optimizarea proceselor ulterioare.

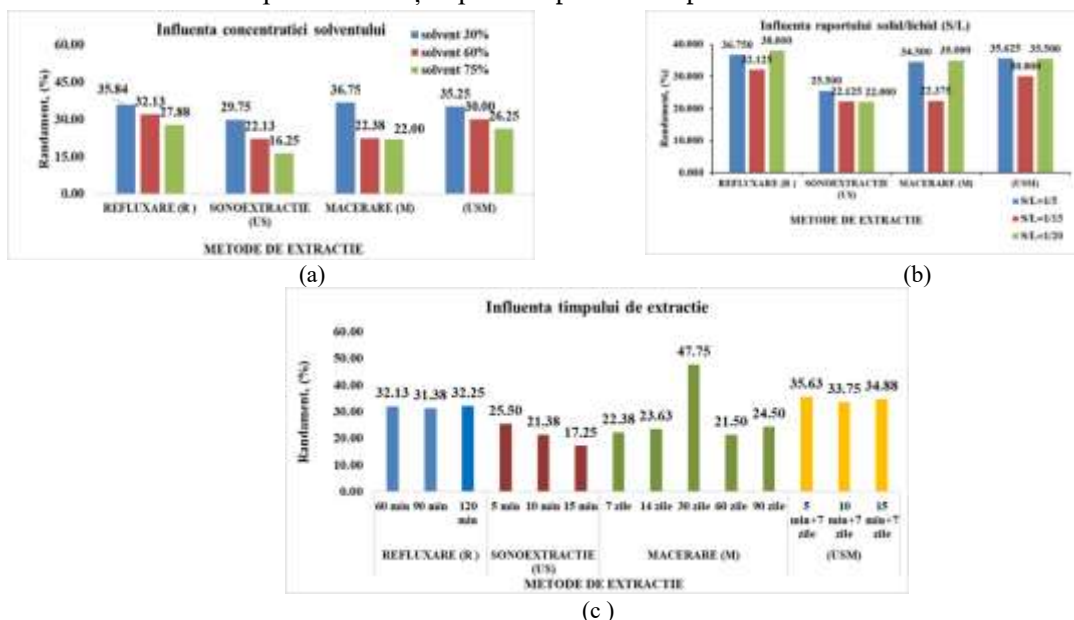


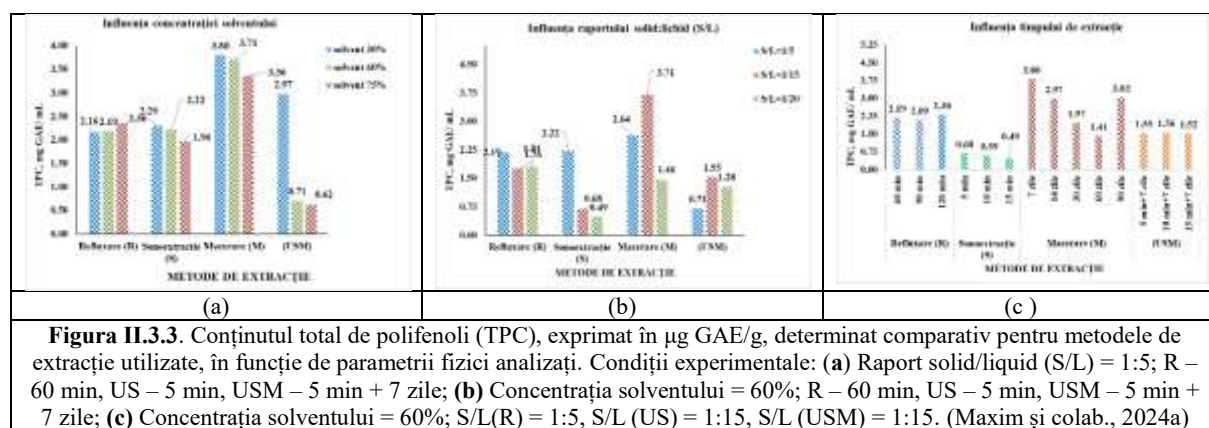
Figura II.3.2. Randamentul extracției (%) determinat în funcție de parametrii procesului de extracție. Condiții experimentale : **(a)** Influența concentrației solventului (30%, 60%, 75%) asupra randamentului. Raport S/L: R și M = 1:5, US și USM = 1:15.; **(b)** Influența raportului solid/lichid (S/L) (1:5, 1:15, 1:20) asupra randamentului. Concentrația solventului = 60%; **(c)** Influența timpului de extracție asupra randamentului, pentru fiecare metodă de extracție. Concentrația solventului = 60%; Raport S/L: R = 1:5, US = 1:15, M = 1:15, USM = 1:15 (Maxim și colab., 2024a)

În concluzie, ținând cont de randamentul extracției, metoda macerării (M) utilizând solvent alcoolic de 30%, raport S/L de 1:15-1:20 și timp de extracție de până la 30 zile, oferă rezultate optime. Metoda combinată USM constituie o alternativă eficientă și rapidă, obținând rezultate bune într-un interval de timp mult mai scurt. Aceste date oferă recomandări practice clare pentru optimizarea extracției din *A. oleracea* (Maxim și colab., 2024a).

II.3.2.3. Caracterizarea cantitativă a extractelor hidroalcoolice de *A. oleracea*

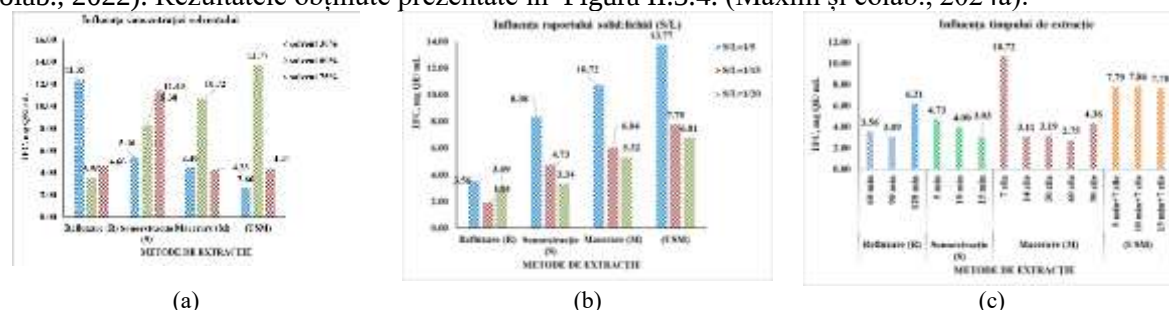
II.3.2.3.1. Determinarea conținutului total de polifenoli

Determinarea conținutului total de polifenoli (TPC) s-a făcut prin tratarea probelor cu reactiv Folin-Ciocalteu și o soluție de Na_2CO_3 , după protocolul descris în capitolul Materiale și metode (Capitolul II.2.3.4.). Rezultatele obținute pentru fiecare condiție experimentală sunt prezentate în Figura II.3.3. și evidențiază impactul fiecărui parametru asupra conținutului total de polifenoli (TPC), exprimat în mg GAE/mL extract (Maxim și colab., 2024a).



II.3.2.3.2. Determinarea conținutului total de flavonoide

Determinarea conținutului total de flavonoide (TFC) exprimat în mg de echivalent quercetină (QE) per mL extract (mg QE/mL) s-a realizat prin tratarea probei cu o soluție de 2% de $AlCl_3$ în metanol, metodă descrisă în capitulul Materiale și metode (Capitolul II.2.3.5.) (Pavun și colab., 2018; Turcov și colab., 2022). Rezultatele obținute prezentate în Figura II.3.4. (Maxim și colab., 2024a).



II.3.2.3.3. Concluzii privind cantitățile de polifenoli și flavonoide din extractele hidroalcoolice de *A. oleracea*

Extracția prin macerare și combinația sonoextracție + macerare (USM), aplicate în condiții moderate (60% etanol, S/L = 1:15, timp scurt urmat de macerare prelungită), au dus atât la randamente bune, cât și la valori ridicate ale conținutului de polifenoli și flavonoide. Cele mai bune rezultate pentru **polifenoli** au fost înregistrate în cazul macerării simple, timp de 7 zile, cu solvent 30% și raport S/L = 1:5 (3,80 mg GAE/mL), iar pentru **flavonoide**, în cazul metodei USM, raport 1:5, dar cu solvent 60% (13,77 mg QE/mL). Prin urmare, alegerea atentă a metodei și a condițiilor de lucru, optimizează extracția, având ca rezultat obținerea unor extracte valoroase din punct de vedere biochimic.

II.3.2.4. Evaluarea activității antioxidante a extractelor hidroalcoolice de *A. oleracea*

Activitatea antioxidantă a extractelor selectate obținute din *A. oleracea* a fost evaluată prin metodele DPPH și ABTS, protocol detaliat în capitulul "Materiale și metode" (Capitolul I.3.4.1.).

II.3.3. Extracte în 1,3-propanediol

În ultimii ani 1,3-propanediolul a început să fie utilizat în mod activ drept solvent extractiv pentru compuși vegetali, în special în industria cosmetică. În 2018, compania Givaudan (Franța) a fost printre primii producători care au introdus extracte naturale formulate în 1,3-propanediol, precum cel din *Orobancha rapum*, menționat în brevetul US11278483B2, pentru utilizare în produse destinate pielii sensibile (Givaudan, 2018). Prin urmare, includerea 1,3-propanediolului în această cercetare reflectă nu doar o orientare sustenabilă, ci și una inovatoare, în acord cu direcțiile actuale de formulare avansată în industria (dermato)cosmetică.

Metodele de extracție în acest caz, au fost selectate având în vedere particularitatea solventului extractiv (punct de fierbere ridicat: $\sim 214^{\circ}\text{C}$, volatilitate extrem de scăzută) și eficiența dovedită în literatura de specialitate pentru compuși fenolici și flavonoide din matrici vegetale. Astfel aplicând un protocol general de lucru exemplificat în Figura II.3.5, am utilizat:

1. Macerarea la temperatura camerei (M),
2. Sonoextracția (US),
3. Macerare urmată de sonoextracție (MUS)
4. Sonoextracție urmată de macerare (USM).

II.3.3.1. Caracterizarea cantitativă a extractelor hidroglicolice

Extracția cu 1,3-propanediol a fost investigată prin analiza a trei factori esențiali: influența concentrației solventului, influența raportului S/L și influența timpului de extracție asupra procesului de obținere a extractului (Tabelul II.3.5). Solventul de extracție a fost reprezentat de soluții apose în concentrații de 40% și 60% conținut de 1,3-propanediol (Maxim și colab., 2024b).

Eficiența metodelor de extracție a fost evaluată în funcție de cantitatea de polifenoli și flavonoide obținută, în raport cu metodologia de lucru și condițiile de extracție stabilite. Pentru cele mai performante dintre acestea, din punct de vedere al conținutului de polifenoli, am evaluat și capacitatea antioxidantă.

II.3.3.1.1. Determinarea conținutului total de polifenoli în extractele hidroglicolice

Determinarea conținutului total de polifenoli a fost realizată prin metoda spectrofotometrică, utilizând reactivul Folin-Ciocalteu (Grochowski și colab., 2017; Luca și colab., 2022) conform protocolului descris de către Turcov și colaboratorii săi (Turcov și colab.2022). Rezultatele sunt prezentate în Figura II.3.6.

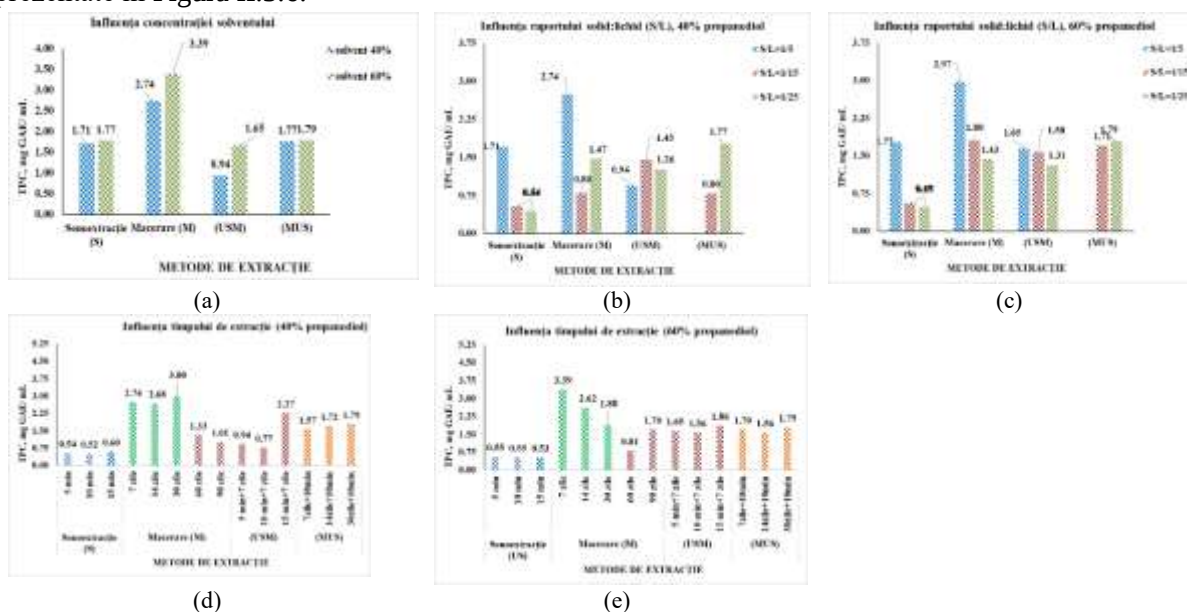


Figura II.3.6. Conținutul de polifenoli (TPC), exprimat în mg GAE/mL, determinat în funcție parametrii procesului de extracție. Condiții de extracție: **(a)** Influența concentrației solventului (40% și 60%). Condiții: S/L = 1:5; M – 7 zile, US – 5 min., USM – 5 min + 7 zile; MUS – S/L = 1:20, 30 zile + 10 min.; **(b)** Influența raportului S/L, utilizând 40% propanediol. Condiții: M – 7 zile, US – 5 min., USM – 5 min + 7 zile; MUS – 30 zile + 10 min.; **(c)** Influența raportului solid:lichid (S/L), utilizând 60% propanediol. Condiții: M – 7 zile, US – 5 min., USM – 5 min + 7 zile; MUS – 30 zile + 10 min.; **(d)** Influența timpului de extracție, utilizând 40% propanediol. Condiții: M, US, USM – S/L = 1:5; MUS – S/L = 1:20; **(e)** Influența timpului de extracție, utilizând 60% propanediol. Condiții: M, US, USM – S/L = 1:5; MUS – S/L = 1:20 (Maxim și colab., 2024b)

II.3.3.1.2. Determinarea conținutului total de flavonoide în extractele hidroglicolice

Determinarea conținutului total de flavonoide (TFC), din extractele hidroglicolice, exprimat în mg echivalent quercetină (QE) per mL de extract (mg QE/mL), utilizând metoda spectrofotometrică cu

AlCl₃ 2% în metanol, a fost realizată după același protocol descris anterior pentru probele hidroalcoolice (Pavun și colab., 2018; Turcov și colab., 2022). Rezultatele obținute sunt ilustrate în Figura II.3.7.

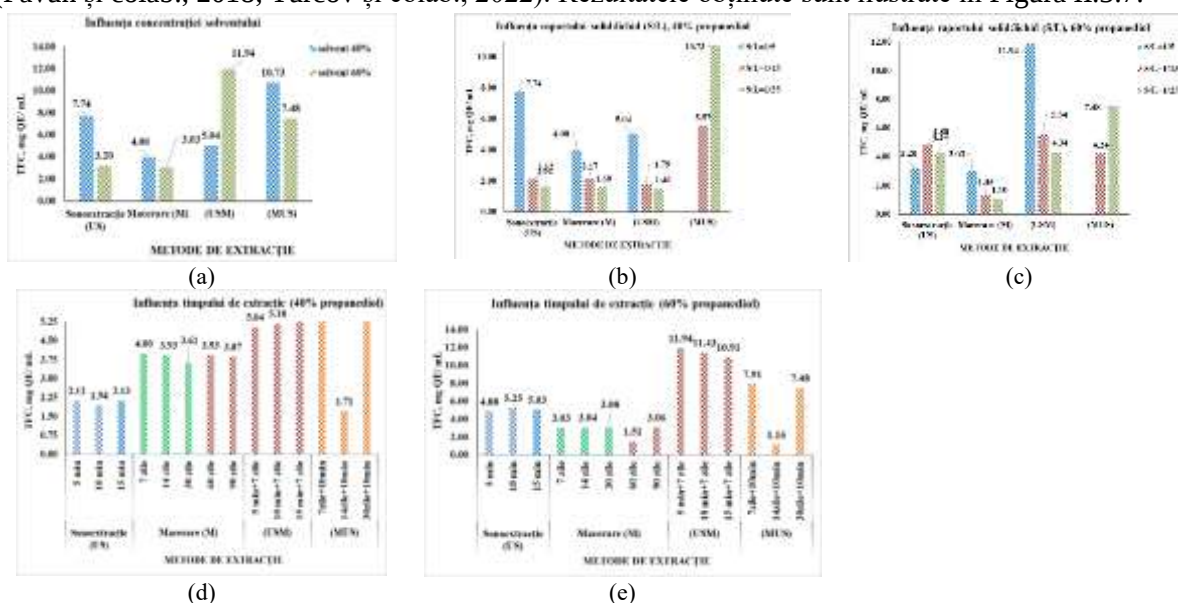


Figura. II.3.7. Conținutul total de flavonoide (TFC), (mg QE/mL), determinat în funcție de parametrii procesului de extracție din *A. oleracea*, utilizând propanediol ca solvent. Parametrii de lucru: **(a)** Influența concentrației solventului (40% și 60%). Condiții de extracție: S/L = 1:5; macerare (M) – 7 zile, sonoextracție (US) – 5 min, USM – 5 min + 7 zile; MUS – 30 zile + 10 min.; **(b)** Influența raportului solid:lichid (S/L), utilizând 40% propanediol. Condiții de extracție: M – 7 zile, US – 5 min, USM – 5 min + 7 zile; MUS – 30 zile + 10 min.; **(c)** Influența raportului solid:lichid (S/L), utilizând 60% propanediol. Condiții de extracție: M – 7 zile, US – 5 min, USM – 5 min + 7 zile; MUS – 30 zile + 10 min.; **(d)** Influența timpului de extracție, utilizând 40% propanediol. Condiții de extracție: M, US, USM – S/L = 1:5; MUS – S/L = 1:20.; **(e)** Influența timpului de extracție, utilizând 60% propanediol. Condiții de extracție: M, US, USM – S/L = 1:5; MUS – S/L = 1:20 (Maxim și colab., 2024b)

II.3.3.1.3. Concluzii referitoare la conținutul total de polifenoli și flavonoide în extractele hidroglicolice

Valorile conținutului total de polifenoli (TPC) și de flavonoide (TFC) din extractele în 1,3-propanediol la concentrație de 60% 1,3-propanediol s-au apropiat semnificativ de cele înregistrate în extractele etanolice, demonstrând că 1,3-propanediolul nu doar înlocuiește cu succes etanolul, ci oferă în anumite condiții o eficiență egală sau chiar superioară. Astfel, metodele optimizate, în special extracția combinată USM (ultrasunete + macerare), au condus la concentrații maxime de 3,39 mg GAE/mL (TPC) și 11,94 mg QE/mL (TFC), comparabile cu randamentele etanolice.

II.3.4. Obținerea de extracte vegetale cu solvenți pe bază de sisteme eutectice naturale (NADES)

Validarea 1,3-propanediolului ca solvent extractiv eficient a constituit baza extinderii cercetării către dezvoltarea unui sistem NADES formulat din betaină și 1,3-propanediol, utilizat pentru extracția compușilor bioactivi cu aplicabilitate dermatocosmetică.

Astfel, cercetarea a fost extinsă prin formularea și caracterizarea NADES-urilor obținute, pe bază de betaină și 1,3-propanediol, în vederea utilizării acestuia în extracția compușilor bioactivi din *A. oleracea*, cu potențial de aplicare directă în produse dermato-cosmetice. Am lucrat cu trei tipuri de amestec NADES având raportul molar betaină-propanediol diferit între componenți (1:3; 1:4 și 1:6). Prepararea acestora și caracterizarea lor fizico-chimică a fost prezentată în capitolul II.2.2.1.1.3.

II.3.4.1. Caracterizarea fizico-chimică a sistemului NADES studiat înainte și după extracție

Pentru evidențierea interacțiunilor specifice dintre componentele NADES am utilizat spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR). Spectrele au fost înregistrate cu un spectrometru Thermo Nicolet IS50 (Madison, WI, SUA), echipat cu module ATR și ESP, în mod de detecție în timp real, cu o rezoluție de 4 cm⁻¹ și un unghi de incidență de 45°, pe o durată de 30 de secunde. Intervalul spectral analizat a fost cuprins între 4000 și 600 cm⁻¹, la temperatura camerei.

Formarea unui solvent eutectic este caracterizată prin măsurarea interacțiunilor de tip legături de hidrogen dintre acceptorul (HBA) și donatorul (HBD) de legături de hidrogen. Spectrele obținute sunt prezentate în Figura II.3.8. (Maxim și colab., 2024c)

Prin analizarea spectrelor în infraroșu ale materialelor componente și ale combinației finale eutectice, s-au obținut dovezi privind sinteza NADES-urilor. Analiza spectrelor FTIR prezentate în Figura II.3.8 confirmă formarea amestecului eutectic dintre betaină și propanediol (1:3) prin păstrarea benzilor caracteristice ale compușilor individuali, care reflectă grupările funcționale implicate în interacțiunile dintre componentele NADES, precum și formarea legăturilor de hidrogen între acestea.

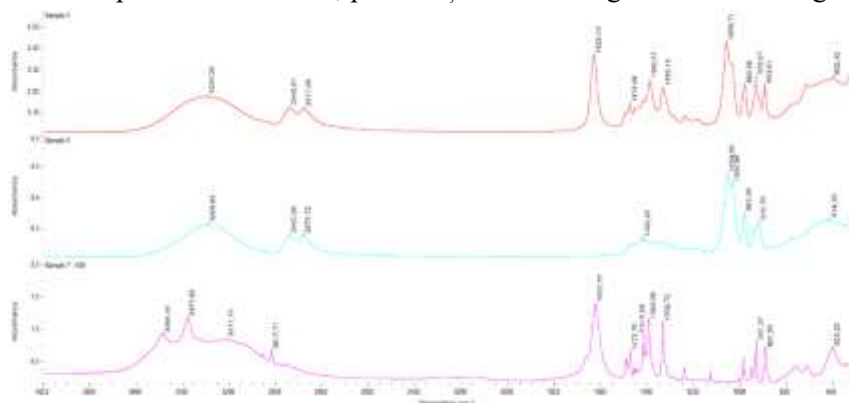


Figura II.3.8. Spectre FTIR pentru NADES sintetizate: proba 5 este amestec betaină/propanediol (1:3 molar); proba 6 este doar propanediol; proba 7 este doar betaină. (Maxim și colab., 2024c).

II.3.4.2. Caracterizarea cantitativă a extractelor în sisteme NADES

Evaluarea conținutului de polifenoli și flavonoide din extractele obținute cu solvenți NADES (Tabelul II.3.7.), au fost analizați mai mulți parametri experimentali: raportul molar dintre acceptorul și donorul de legături de hidrogen (HBA/HBD) care compun solventul, raportul solid/lichid, durata extracției, temperatura și procentul de apă adăugat fiecărui NADES.

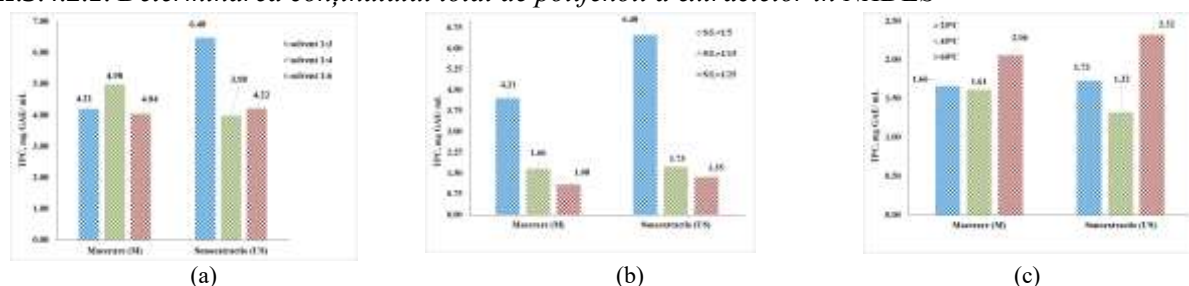
Un parametru extrem de critic este conținutul de apă în compoziția NADES, acesta influențează direct proprietățile fizico-chimice ale sistemului. O proporție moderată de apă (ex. 30–40%) reduce vâscozitatea și optimizează polaritatea, facilitând difuzia solutului și interacțiunile specifice solvent–compus. Depășirea unui anumit prag ($\geq 50\%$) poate perturba echilibrul eutectic și compromite rețeaua de legături de hidrogen, transformând sistemul într-o soluție apoasă diluată, cu capacitate de solvatare scăzută și proprietăți distincte față de NADES-ul inițial (Dai și colab., 2015; Rozas și colab., 2021; García-Roldán și colab., 2023).

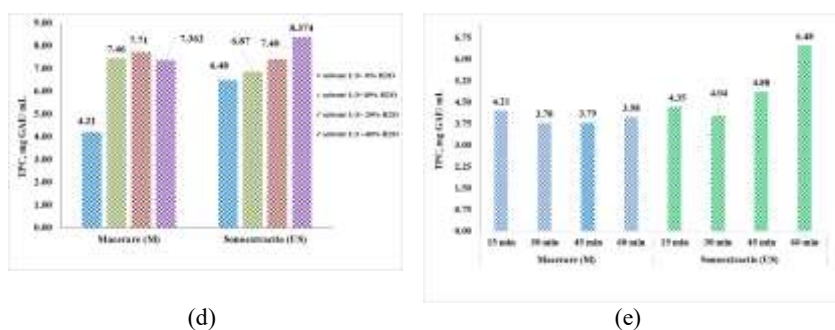
Pe baza considerentelor teoretice privind influența parametrilor operaționali asupra eficienței extracției, au fost realizate o serie de extracții experimentale cu scopul de a evalua impactul acestor factori asupra conținutului total de polifenoli și flavonoide.

În acest sens, au fost aplicate două metode distincte de extracție:

1. Macerarea la temperatura camerei cu agitare vibrațională (M)
2. Extracția asistată de ultrasunete (US).

II.3.4.2.1. Determinarea conținutului total de polifenoli a extractelor în NADES





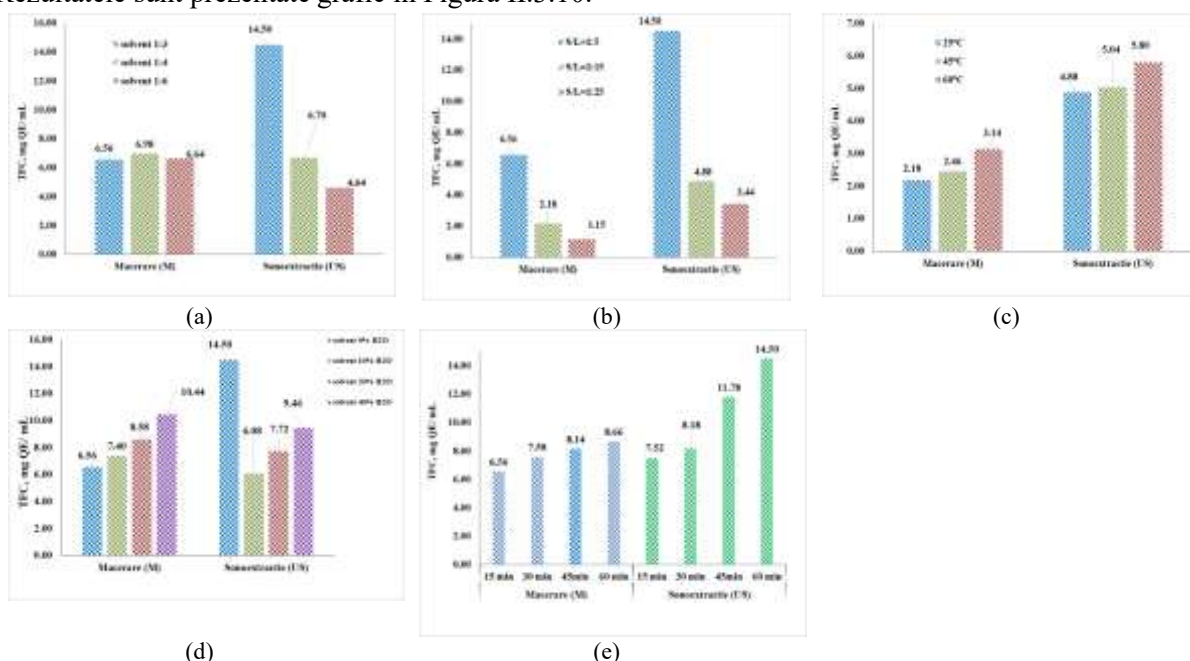
(d) (e)

Figura II.3.9. Conținutul total de polifenoli (TPC) determinat pentru metodele de extracție utilizate, în funcție de parametrii fizici luați în considerare. Condiții: (a) S/L = 1:5, temperatură de extracție 25°C, M = 15 min, US = 60 min; (b) compoziția solventului = 1:3, temperatură de extracție 25 °C, M = 15 min, US = 60 min; (c) compoziția solventului = 1:3, S/L = 1:5; (d) compoziția solventului = 1:3, S/L = 1:15, M = 15 min, US = 60 min; (e) compoziția solventului = 1:3, S/L = 1:5, temperatură de extracție 25 °C (Maxim și colab., 2024c)

Cel mai performant extract din *A. oleracea* (8,374 mg GAE/mL) a fost obținut prin utilizarea unui solvent NADES format din betaină și propanediol în raport molar 1:3, cu un adaos de 40% apă, obținut prin sonoextracție, timp de 60 de minute, la temperatura de 25°C, cu un raport solid/lichid de 1:5 (Maxim și colab., 2024c).

II.3.4.2.2. Determinarea conținutului total de flavonoide din extractele în NADES

Studiul conținutului de flavonoide din extractele în solvenți NADES a fost efectuat conform aceluiași criterii ca în cazul polifenolilor, după protocoalele descrise anterior în această teză de doctorat. Rezultatele sunt prezentate grafic în Figura II.3.10.



(d) (e)

Figura II.3.10. Conținutul de flavonoide (TFC) determinat comparativ pentru metodele de extracție utilizate, în funcție de parametrii fizici luați în considerare. Condiții: (a) S/L = 1:5, temperatură de extracție 25 °C, M = 15 min, S = 60 min; (b) compoziția solventului = 1:3, temperatură de extracție 25 °C, M = 15 min, US = 60 min; (c) compoziția solventului = 1:3, S/L = 1:5; (d) compoziția solventului = 1:3, S/L = 1:15, M = 15 min, US = 60 min; (e) compoziția solventului = 1:3, S/L = 1:5; temperatură de extracție 25 °C (Maxim și colab., 2024c).

Rezultatele obținute demonstrează că sonoextracția s-a dovedit a fi cea mai performantă metodă, oferind un conținut superior de flavonoide în comparație cu macerarea, în condiții similare. Cele mai bune rezultate au fost obținute pentru un raport S/L de 1:5, o durată de 60 de minute, prin sonoextracție și o temperatură de 25 °C (14,5 mg QE/mL), ceea ce subliniază importanța optimizării acestor factori.

De asemenea, compoziția solventului NADES și conținutul său de apă influențează semnificativ randamentul extracției, dar efectul este dependent de metoda aplicată: în timp ce prin metoda macerării, cele mai bune rezultate se obțin prin adăugarea unui adaos de apă, în cazul sonoextracției, solventul anhidru oferă rezultate superioare (Maxim și colab., 2024c).

II.3.5. Evaluarea comparativă a celor mai eficiente extracte obținute din *A.oleracea* (alcoolice, glicolice și NADES)

Rezultatele obținute și sistematizate în Tabelul II.3.8. au evidențiat diferențe semnificative în funcție de tipul solventului și de condițiile aplicate, atât în ceea ce privește conținutul total de polifenoli, cât și cel de flavonoide.

Tabel II.3.8. Conținutul de polifenoli și flavonoide în cele mai performante extracte în funcție de solventul folosit.

Tipul de solvent și parametrii metodei			
Compus extras	Etanol	1,3 Propanediol	NADES (B:PDO)
Polifenoli, mg GAE/mL	3,80 (M ; S/L=1:5; EtOH 30% v/v; 7 zile, 20°C)	3,39 (M; S/L=1:5; 1,3 PDO 60% v/v, 7 zile, 20°C)	8,374 (US; S/L=1:5; 1:3 NADES + 40% apă, v/v, 60 minute, 20°C)
Flavonoide, mg QE/ML	13,77 (US+M; S/L= 1:5; EtOH 60% v/v; 5 minute+7 zile, 20°C)	11,94 (US+M; S/L = 1:5; 1,3 PDO 60%; 5 minute+7 zile, 20°C)	14,5 (US; S/L = 1:5; 1:3 NADES; 60 minute; 25 °C)

* B-betaină; PDO – 1,3 propanediol

II.3.5.2. Evaluarea activității antioxidante

Extracțele selectate obținute din *A. oleracea* au fost evaluate comparativ și prin interpretarea activității antioxidante, care a fost determinată prin metodele DPPH și ABTS, protocol detaliat în capitolul "Materiale și metode" (Capitolul I.3.4.1.). Analiza valorilor obținute (Tabel II.3.9.) a permis o interpretare aprofundată a influenței solventului asupra activității antioxidante măsurate, precum și asupra comportamentului diferit față de radicalii DPPH și ABTS.

Tabel II.3.9. Probele selectate pentru evaluarea activității antioxidante din *A. oleracea*

Solvent (v/v)	Polifenoli (mg GAE/g)	Flavonoide (mg QE/g)	DPPH (mg TE/mL extract)	ABTS (mg TE/mL extract)
EtOH 30%	3,798	4,49	0.42 ± 0.02	2.27 ± 0.04
1,3 Propanediol 60%	3,386	3,03	0.57 ± 0.01	1.97 ± 0.06
NADES 1:3, anhidru	8,37	9,46	0.05 ± 0.00	2.27 ± 0.03

II.3.6. Caracterizarea prin HPLC a extractelor de *Acmella oleracea*

În scopul caracterizării calitative a principalilor compuși polifenolici, flavonoidici și alchilamidici prezenți în extracțele din *A. oleracea* și pentru a evidenția diferențele între cele 3 direcții de extracție, hidroalcoolica, glicolice și NADES, au fost selectate 5 probe relevante (Tabel II.3.10), pe baza conținutului ridicat de polifenoli și flavonoide determinat anterior prin metodele spectrofotometrice Folin-Ciocalteu și AlCl₃.

Tabel II.3.10. Probe supuse analizei HPLC, din *A. oleracea* (L.) (Maxim și colab. 2025)

Probă	Solvent în probă (v/v)	Parametrii extracție	Polifenoli mg (GAE/mL)	Flavonoide mg (QE/mL)
IS 1	PDO 60%	M; S/L=1:5; 1,3 PDO 60% v/v, 7 zile, 25°C	3,386	3,03
IS 2	PDO 40%	M; S/L=1:5; 1,3 PDO 40% v/v, 30 zile, 25°C	3,003	3,61
IS 3	EtOH 30%	M; S/L=1:5; EtOH 30% v/v, 7 zile, 25°C	3,798	4,49
IS 4	EtOH 60%	M; S/L=1:5; EtOH 60% v/v, 7 zile, 25°C	3,71	10,72
IS 8	NADES 1:3 (B- PDO)	US; S/L=1:5, raport molar NADES 1:3 B- PDO, 60 minute; 25°C	8,37	9,46

* B-betaină; PDO – 1,3 propanediol

Cromatogramele obținute au fost integrate și prezentate în Figura II.3.11.

Tabel II.3.11. Compuși polifenolici identificați în extractele de *A. oleracea*

Extract analizat	Lungime de undă		
	237 nm	270 nm	350 nm
IS 1	Spilanthol	Acid p-cumaric	Rutin, Isorhamnetin-3-o-rutinozide, Quercitrin, Luteolin, Isorhamnetin
IS 2			Isorhamnetin, Luteolin
IS 3	Spilanthol		Luteolin
IS 4			Rutin, Quercitrin, Luteolin
IS 8	Spilanthol		Rutin, Quercitrin, Luteolin

Analiza HPLC a extractelor din *A. oleracea* a evidențiat o compoziție bogată în compuși polifenolici și flavonoidici, cu variații notabile în funcție de solventul utilizat la extracție. Compușii majori detectați la 270 nm și 350 nm au inclus acid p-cumaric, rutin, isorhamnetin-3-o-rutinozid, quercitrin, isorhamnetin și luteolin.

Aceste rezultate indică eficiența scăzută a solventilor foarte polari ce nu pot solubiliza flavonoidele glicozilate, comparativ cu solventii pe baza de 1,3 propanediol. Rezultate sunt în concordanță cu datele din literatura de specialitate (Nascimento și colab., 2020; Belumorri și colab., 2022; Moura și colab., 2023; Csabai și colab., 2024), care confirmă prezența flavonoizilor și a acizilor fenolici la *A. oleracea*.

Astfel, 1,3 propanediolul și NADES au fost validați ca solventi superiori față de etanol pentru extragerea simultană a polifenolilor (inclusiv flavonoide glicozilate și agliconi metoxilați) și a spilantolului. Acești solventi oferă nu doar o eficiență crescută, ci și avantaje ecologice, de stabilizare și compatibilitate cu aplicațiile (dermato)cosmetice, consolidându-le potențialul ca solventi verzi pentru metabolomul complex al *A. oleracea*.

II.3.7. Evaluarea conținutului de ioni metalici din proba inițială de plantă

În contextul poluării tot mai accentuate cu metale grele, devine esențială investigarea concentrației acestor contaminanți în materiile prime de origine vegetală, în special în plantele provenite din diverse zone geografice. Astfel de analize contribuie la evaluarea riscurilor asupra sănătății publice și susțin luarea unor decizii informate privind utilizarea acestor materii în diferite industrii (Hlihor și colab., 2022).

În cadrul studiului de față, determinarea conținutului de metale grele a fost realizată Spectrometrie de Emisie Optică cu Plasmă cuplată inductiv (ICP-OES), în conformitate cu un protocol riguros de control al calității aplicat materialului vegetal uscat de *A. oleracea*, descris în capitolul II.2.3.1. Acuratețea și fiabilitatea metodei analitice au fost validate prin analiza diferențiată a materialului de referință, (a) 1547 și (b) 1575a. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura II.3.12 (Maxim și colab., 2024d)

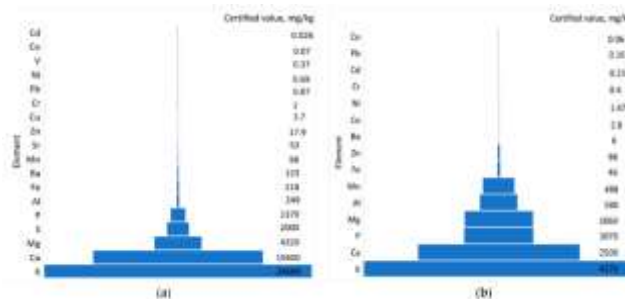


Figura II.3.12. Conținutul de microelemente din planta uscată conform următoarelor materiale de referință: (a) 1547 și (b) 1575a. (Maxim și colab., 2024d)

Valorile determinate în cadrul acestui studiu se încadrează în limitele admise, indicând faptul că extractele vegetale nu vor fi contaminate cu ioni metalici toxici. Acest aspect susține conformitatea cu cerințele de calitate impuse de reglementările internaționale și garantează siguranța utilizării acestor extracte în formulările dermatocosmetice (Maxim și colab., 2024d).

Capitolul II.4.

Obținerea și caracterizarea extractelor vegetale din *Daucus carota* subsp. *carota*

II.4.2. Extracția solid-lichid a compușilor activi din *D. carota* subsp. *carota*

Strategia de cercetare aplicată în cazul *Daucus carota* subsp. *carota* (*D. carota*, a subsp. *carota*) urmat direcții metodologice asemănătoare celor utilizate pentru *A. oleracea*, dar particularizat pentru condițiile concrete.

Am folosit ca solvent de extracție (1) soluții hidroalcoolice (pe bază de etanol 96%), (2) soluții hidroglolicice pe bază de 1, 3 propanediol și (3) solvenți NADES.

Tehnicile de extracție folosite au fost selectate în funcție de tipul de solvent. Astfel, dacă în cazul solvenților hidroalcoolici am folosit macerarea, extracția la cald și extracția la cald în echipament Soxhlet, în cazul solvenților hidroglolicici și NADES am optat pentru extracție prin macerare în câmp vibrațional și extracție asistată de ultrasunete. Tehnicile de refluxare la cald și refluxare la cald în echipament Soxhlet (utilizate pentru extractele alcoolice) au fost evitate pentru solventul 1,3-propanediol deoarece există posibilitatea modificării puternice a vâscozității la temperatură ridicată, dar și a denaturării unor proprietăți ale acestuia.

II.4.2.1. Extracția hidroalcoolică (etanol/apă)

În cadrul extracției hidroalcoolice, am optat pentru aplicarea unor metode clasice de extracție, cum ar fi macerarea (M), refluxarea convențională la cald (R) și extracție în Soxhlet (Sx), bine documentate în literatură și validate prin eficiența lor în extracția polifenolilor și flavonoidelor din specii vegetale, dar mai puțin validate pentru *D. carota* subsp. *carota*. Alegerea acestor metode a fost motivată de accesibilitatea și robustețea lor, dar și de necesitatea stabilirii unui cadru de referință reproductibil și eficient economic, care să permită comparații între direcțiile metodologice selectate, urmărindu-se în special conturarea unui profil extractiv standard, care să poată servi drept reper în explorarea ulterioară a unor sisteme extractive mai moderne sau neconvenționale, precum solvenții glicolici sau solvenții eutectici naturali (NADES).

II.4.2.1.1. Randamentul de extracție

Pentru evaluarea randamentului, s-a determinat conținutul de reziduu uscat, prin evaporarea a 4 mL de probă de extract la 50 °C într-un cuptor termostatat, până la eliminarea completă a solventului. Valorile obținute sunt sistematizate în Tabelul II.4.2. și au fost reprezentate grafic în Figura II.4.1. Sintetizând rezultatele obținute, am constatat că metoda de refluxare termică, folosind un raport S/L de 1:20 și utilizând concentrații alcoolice de 30–50% au oferit cele mai bune randamente de extracție. Refluxarea a permis atingerea rapidă a echilibrului extractiv, iar volumul mai mare de solvent a favorizat transferul compușilor în toate metodele analizate. Extinderea duratei extractive a avut efecte limitate, cu excepția metodei Soxhlet, unde randamentul a crescut progresiv (Maxim și colab., 2025).

II.4.2.2. Caracterizarea cantitativă a extractelor hidroalcoolice

II.4.2.2.1 Determinarea conținutului total de polifenoli în extractele hidroalcoolice

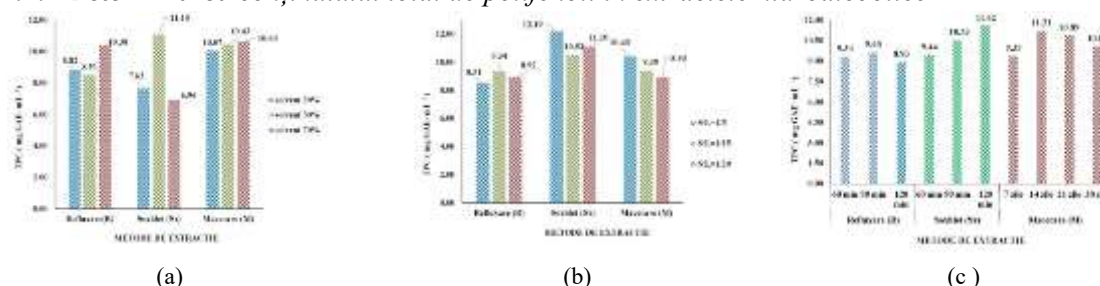


Figura II.4.2. Conținutul total de polifenoli (TPC) din inflorescențe de *D. carota* subsp. *carota* Condiții: (a) R – S/L = 1:5, timp de extracție: 60 minute; M – S/L = 1:5, timp de extracție: 7 zile; Sx – S/L = 1:20, timp de extracție: 90 minute;

(b) R – 50%, timp de extracție: 60 minute; M – 50%, timp de extracție: 7 zile; Sx – 50%, timp de extracție: 90 minute; (c) R, M, Sx – 50%, S/L = 1:15 (Maxim și colab., 2025).

Evaluând influența parametrilor testați, putem sublinia că soluția de etanol de 50% s-a dovedit a avea concentrația cea mai eficientă pentru extragerea polifenolilor, în special prin metoda Soxhlet. Raportul solid/lichid de 1:5 a condus la cele mai bune rezultate în cazul macerării și metodei Soxhlet, în timp ce pentru refluxare, un raport mai mic (1:15) a favorizat o extracție mai intensă. În ceea ce privește timpul, s-a observat că metoda Soxhlet atinge un randament maxim după intervalul maxim de timp (120 min), în timp ce în cazul macerării, valoarea maximă a TPC a fost atinsă la 14 zile, fiind urmată de o scădere progresivă (Maxim și colab., 2025).

II.4.2.1.2. Determinarea conținutului de flavonoide în extractele hidroalcoolice

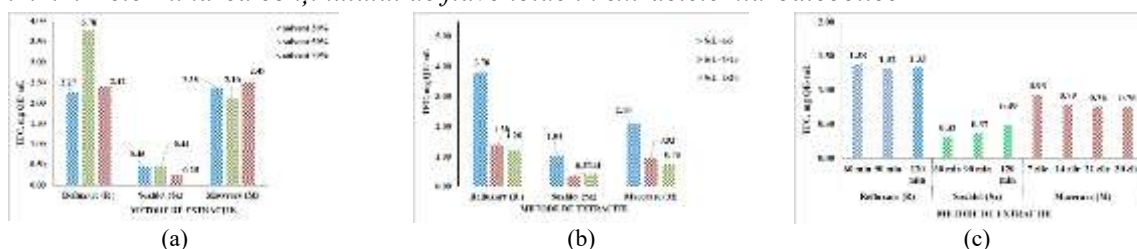


Figura II.4.3. Conținutul total de flavonoide (TFC) din inflorescențe de *D. carota* . subsp. *carota* în funcție de parametrii luați în considerare în extracția hidroalcolică. Condiții: (a) R – S/L = 1:5, timp de extracție: 60 minute; M – S/L = 1:5, timp de extracție: 7 zile; Sx – S/L = 1:20, timp de extracție: 90 minute; (b) R – 50%, timp de extracție: 60 minute; M – 50%, timp de extracție: 7 zile; Sx – 50%, timp de extracție: 90 minute; (c) R, M, Sx – 50%, S/L = 1:15 (Maxim și colab., 2025).

Cele mai bune rezultate privind conținutul total de flavonoide au fost obținute prin extracția prin refluxare, aplicată în parametrii: concentrație solvent 50% etanol, raport S/L = 1:5 și timp de extracție 60 min, cu un conținut de 3,78 mg QE/mL. Această abordare a depășit eficiența macerării, care, deși a oferit rezultate bune, nu a atins valorile obținute prin refluxare. Metoda extracției în Soxhlet s-a dovedit inadecvată pentru extracția flavonoidelor din inflorescențe de *D. carota* ssp. *carota* cu cele mai mici valori în toți parametrii studiați (Maxim și colab., 2025).

II.4.2.2. Extracția hidro-glicolică (propanediol/apă)

În consecință, macerarea la temperatura camerei a fost selectată ca metodă optimă pentru obținerea extractelor glicolice în aceste condiții, cu variabilitatea parametrilor de extracție: timp, raport S/L și concentrația solventului (Tabel II.4.3.).

Tabel II.4.3. Caracteristicile și parametrii utilizați în extracția hidro-glicolică pentru *D. carota*

Metoda de extracție	Proba	Caracteristici		
		Timp	Raport S:L	Concentrația solventului [%]
Macerare (M)	67	7 zile	1:5	30
	68			50
	69			70
	70	7 zile	1:15	50
	71	7 zile	1:20	50
	75	14 zile	1:15	50
	76	21 zile	1:15	50
	77	30 zile	1:15	50

II.4.2.2.1 Determinarea conținutului total de polifenoli (TPC) în extractele hidro-glicolice

Rezultatele obținute au fost centralizate și reprezentate grafic pentru evidențierea variației conținutului de polifenoli în funcție de timpul de extracție, raportul material vegetal/solvent și concentrația de 1,3-propanediol utilizată.

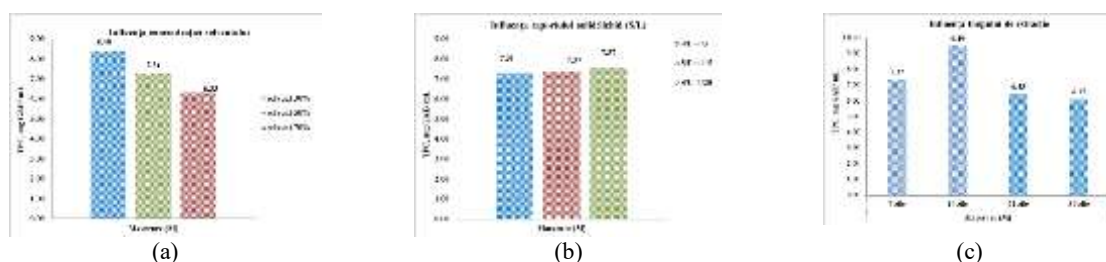


Figura II.4.4. Conținutul total de polifenoli (TPC) din inflorescențe de *D. carota* . subsp. *carota* în funcție de parametrii luați în considerare în extracția hidro glicolică. Condiții: **(a)** S/L = 1:5, timp de extracție: 7 zile; concentrație-30%,50%, 70%;**(b)**concentrație- 50%, timp de extracție: 7zile; **(c)** concentrație - 50%, S/L = 1:15

II.4.2.2.2. Determinarea conținutului total de flavonoide (TFC) în extractele hidro-glicolice

Rezultatele obținute au fost reprezentate grafic pentru a avea o primă evidențiere a variației conținutului de flavonoide în funcție de timpul de extracție, raportul material vegetal/solvent și concentrația de 1,3-propanediol utilizată (Figura II.4.5).

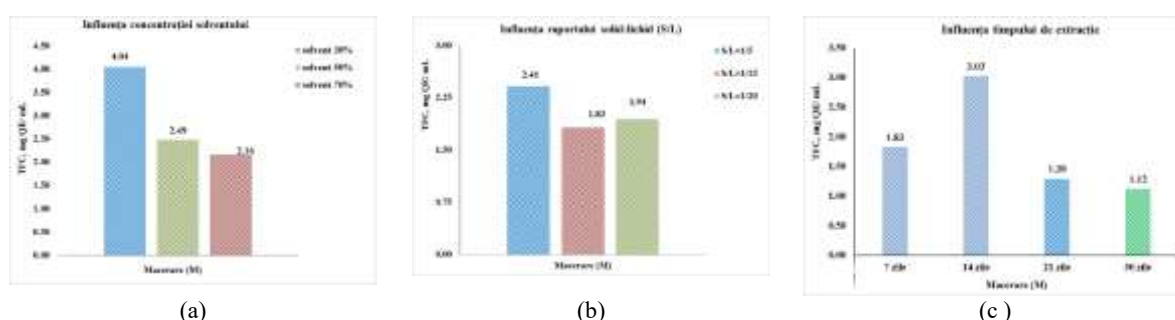


Figura II.4.5. Conținutul total de flavonoide (TFC) din inflorescențe de *D. carota* . subsp. *carota* în funcție de parametrii luați în considerare în extracția hidro- glicolică. Condiții: **(a)** S/L = 1:5, timp de extracție: 7 zile; concentrație- 30%, 50%,70%; **(b)** concentrație -50%, timp de extracție: 7zile; **(c)** concentrație -50%,S/L=1:15

II.4.2.2.3. Concluzii privind determinarea cantității de polifenoli și flavonoide din extractele hidro-glicolice

Comparația parametrilor tehnologici testați indică faptul că polaritatea medie a solventului, obținută prin utilizarea unei concentrații de 30% 1,3-propanediol, asigură un rezultat bun între solubilitate, difuzie și stabilitate a compușilor extrași, cu un maxim de 8,40 mg GAE/mL pentru polifenoli și 4,04 mg QE/mL pentru flavonoide. Aceste rezultate demonstrează că prezența apei este esențială în menținerea unei polarități suficiente pentru a permite stabilirea de legături de hidrogen între moleculele solventului și grupele hidroxilice ale compușilor fenolici, în special ale flavonoidelor, cunoscute pentru structura lor rigidă și masă moleculară relativ mare. Parametrii experimentali optimi pentru extracția prin macerare cu 1,3-propanediol s-au dovedit a fi o concentrație a solventului de 30%, un raport solid:lichid de 1:5 pentru flavonoide, respectiv 1:20 pentru polifenoli, și o durată a extracției de 14 zile.

II.4.2.3. Extracția în sisteme eutectice naturale (NADES)

Revizuiind detaliat literatura științifică existentă, nu am identificat până la momentul scrierii acestui capitol nici un studiu privind utilizarea sistemelor eutectice naturale betaină:1,3-propanediol în extracția compușilor bioactivi din *Daucus carota* subsp. *carota*, majoritatea cercetărilor existente concentrându-se asupra speciei cultivate (subsp. *sativus*) și a utilizării solvenților clasici, precum etanolul și alți solvenți organici. Această lipsă de date justifică abordarea prezentului studiu, ce constă în evaluarea eficienței sistemului NADES betaină:1,3-propanediol în extracția compușilor bioactivi din *D. carota* subsp. *carota*, în comparație cu solvenții tradiționali, precum etanolul și 1,3-propanediol.

Evaluarea conținutului total de polifenoli și flavonoide din *D. carota* subsp. *carota* a fost realizată prin aceleași metode și parametrii folosiți anterior pentru celelalte specii vegetale și anume:

1. Macerarea la temperatura camerei, realizată sub agitare vibrațională (M);
2. Extracția asistată de ultrasunete (US)

Parametrii investigați au fost: raportul HBA/HBD, raportul solid/lichid, durata extracției, temperatura și procentul de apă adăugat în sistemul NADES, parametri sintetizați în tabelul Tabel II.4.4.

II.4.2.3.1. Determinarea conținutului total de polifenoli în extractele în NADES

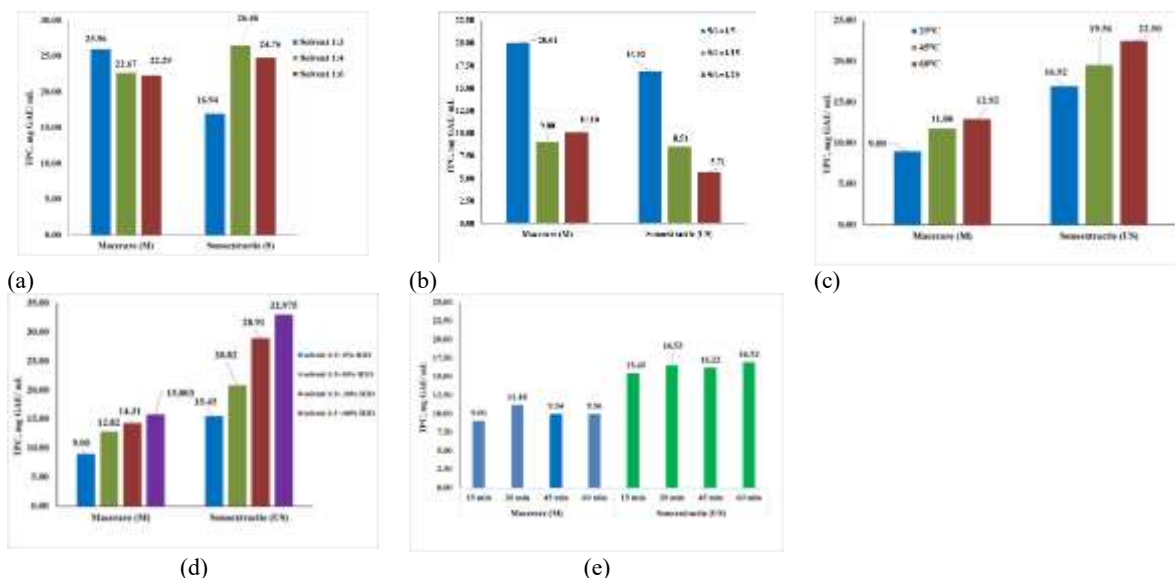


Figura II.4.6 Conținutul total de polifenoli (TPC) determinat pentru metodele de extracție utilizate în solvent NADES, în funcție de parametrii testați. Condiții experimentale: **(a)** Influența raportului betaină:1,3-propanediol (1:3, 1:4, 1:6) asupra TPC. Raport S/L: M și US = 1:5; temperatură = 25 °C; **(b)** Influența raportului solid/lichid (S/L) (1:5, 1:15, 1:25) asupra TPC. Solvent NADES la raport 1:3 betaină:1,3-propanediol; temperatura = 25 °C; **(c)** Influența temperaturii de extracție (20 °C, 45 °C, 60 °C) asupra TPC. Raport S/L = 1:15; solvent NADES 1:3; **(d)** Influența adaosului de apă (0%, 10%, 20%, 40%) asupra TPC. Raport S/L = 1:5; temperatura = 25 °C; **(e)** Influența timpului de extracție (15, 30, 45, 60 min) asupra TPC. Raport S/L = 1:5; temperatură = 25 °C

Cele mai bune rezultate au fost obținute prin combinarea sistemului NADES 1:3 (betaină:1,3-propanediol) cu adaos de 40% apă, la 60°C și un timp de 30 minute, prin sonoextracție, condiții în care s-a înregistrat un conținut total de polifenoli de 32,98 mg GAE/mL.

II.4.2.3.2. Determinarea conținutului total de flavonoide a extractelor în NADES

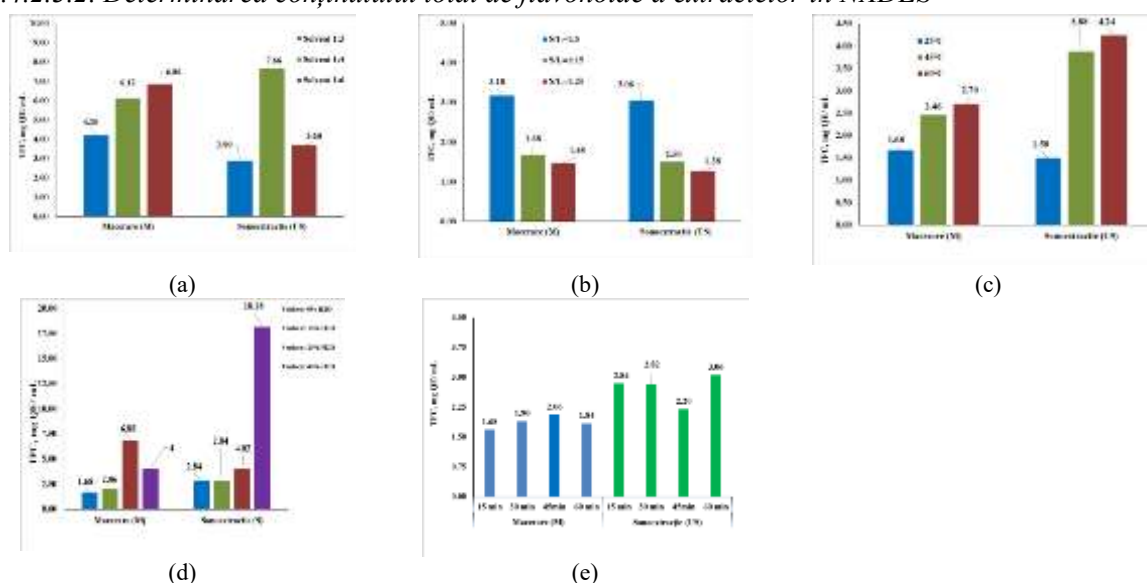


Figura II.4.7. Conținutul de flavonoide (TFC) determinat comparativ pentru metodele de extracție utilizate, în funcție de parametrii fizici luați în considerare. Condiții: **(a)** S/L = 1:5, temperatură de extracție 25 °C, M = 15 min, S = 60 min; **(b)** compoziția solventului = 1:3, temperatură de extracție 25 °C, M = 15 min, US = 60 min; **(c)** compoziția solventului = 1:3,

S/L = 1:5; (d) compoziția solventului = 1:3, S/L = 1:15, M = 15 min, US = 60 min; (e) compoziția solventului = 1:3, S/L = 1:5; temperatură de extracție 25 °C

În acest context, sonoextracția, aplicată sistemului NADES format din betaină:1,3-propanediol (1:3) cu un adaos de 40% apă, a generat cea mai ridicată valoare a TPC, de 18,18 mg QE/mL, valoare semnificativ mai mare celor obținute cu solvent hidro-alcoolic (3,78 mg QE/mL) sau 1,3 propanediol (4,04 mg QE/mL), rezultate ce validează sistemul NADES format din betaina-1,3 propanediol ca solvent performant pentru extracția flavonoidelor din inflorescențe de *D. carota* subsp. *carota*.

II.4.2.4. Evaluarea comparativă a celor mai eficiente extracte din *D. carota* subsp. *carota* (alcoolice, glicolice și NADES)

Tabel II.4.5. Conținutul de TPC și TFC în cele mai performante extracte de *D. carota* subsp. *carota*, în funcție de solventul folosit

Tipul de solvent și parametrii metodei			
Compus extras	Etanol	1,3-Propanediol	NADES (B:PDO)
Polifenoli, mg GAE/mL	12,19 (Sx; S/L=1:5; EtOH 50% v/v, 90 min.)	9,49 (M; S/L=1:15; 1,3 PDO 50% v/v; 14 zile, 25°C)	32,98 (US; S/L=1:5; 1:3 NADES + 40% apă, v/v, 15 minute, 25°C)
Flavonoide, mg QE/mL	3,78 (R; S/L= 1:5; EtOH 50% v/v; 60 min.)	11,94 (M; S/L = 1:5; 1,3 PDO 30%; 7 zile, 25°C)	18,18 (US; S/L=1:5; 1:3 NADES + 40% apă, v/v, 15 minute, 25°C)

* B-betaină; PDO – 1,3 propanediol

Comparând valorile pentru conținutul total de polifenoli și flavonoide (Tabel II.4.5), extractul obținut cu sistemul NADES format din betaină și 1,3-propanediol (1:3), cu adaos de 40% apă, obținut prin sonoextracție este net superior celorlalte. Aceste extracte au înregistrat cele mai ridicate concentrații atât pentru polifenoli (32,98 mg GAE/mL), cât și pentru flavonoide (18,18 mg QE/mL), depășind semnificativ valorile obținute cu etanol sau 1,3-propanediol.

II.4.3. Caracterizarea fizico-chimică a extractelor din *Daucus carota* subsp. *Carota*

Pentru caracterizarea calitativă a compușilor polifenolici și flavonoidici din extractele obținute din *D. carota* subsp. *carota* a fost folosită metoda HPLC folosind 3 probe relevante, selectate pe baza conținutului de polifenoli și flavonoide, determinat anterior spectrophotometric (Maxim și colab., 2025).

Tabel II.4.4. Probe supuse analizei cromatografice HPLC, din *D. carota* subsp. *carota*

Metoda de extracție	Notăție	Solvent probă v/v	Parametrii extracție	Polifenoli mg GAE/mL	Flavonoide mg QE/mL
Refluxare termică în Soxhlet	IS 5	EtOH 50%	Sx; S/L=1:5; EtOH 50% v/v, 90 min.	12,19	1,01
	IS 6	EtOH 50%	Sx; S/L=1:15; EtOH 50% v/v, 120 min.	11,62	0,48
Macerare	IS 7	PDO 50%	M; S/L=1:15;1,3 PDO 50% v/v; 14 zile, 25°C	9,49	1,24

* PDO – 1,3 propanediol

Evaluarea peak-urilor prezente în cromatogramele extractelor precum și a timpilor de retenție ai acestora a evidențiat prezența compușilor polifenolici atât la 270 nm cât și la 350 nm, prezentați în Tabel II.4.5.

Tabel II.4.5. Compuși polifenolici identificați în extractele de *D. carota* subsp. *carota*

Extract analizat	Caracteristici extract	Lungime de undă	
		270 nm	350 nm
IS 5	Soxhlet, hidroalcoolic 50%; S/L=1:5, 90 min; 12,19 mg GAE/mL	Acid p-cumarinic, Acid galic	Rutin, Quercitrin, Isorhamnetin, Luteolin

IS 6	Soxhlet , hidroalcoolic 50%; S/L=1:15, 120 min; 11,62 mg GAE/mL	Acid p-cumaric, Acid galic	Rutin, Quercitrin, Isorhamnetin
IS 7	Macerare cu soluție hidroglicolică (1,3 propanediol) 50%; S/L=1:15, 14 zile; 9,5 mgGAE/mL	Acid p-cumaric, Acid galic, Catehina	Rutin, Isorhamnetin, Luteolin, Kaempferol

Capitolul II.5.

Obținerea și caracterizarea extractelor vegetale din *Artemisia annua*

II.5.1. Considerații generale despre extractul de *Artemisia annua*

Selecția *A. annua* pentru studiul de față a fost motivată de utilizările sale tradiționale topice documentate în medicina populară unde este folosită în mod empiric pentru răni, inflamații, infecții cutanate sau afecțiuni dermatologice, această specie oferind premise solide pentru explorarea unor extracte cu aplicabilitate directă în dermatocosmetică, în special prin prisma conținutului său de flavonoide, acizi fenolici și lactone sesquiterpenice, compuși recunoscuți pentru activitatea antioxidantă, antiinflamatoare și cicatrizantă (Sadiq și colab., 2013, Septembre-Malaterre și colab., 2020, Ekiert și colab., 2021, de Faveri Favero și colab., 2024).

II.5.2. Considerații privind extracția solid-lichid a compușilor activi din *A. annua*

Pentru valorificarea potențialului biologic al speciei *A. annua* în context dermatocosmetic, am optat pentru două direcții de extracție solid-lichid, selectate pe baza compatibilității lor cu utilizarea (dermato)cosmetică, a siguranței oferite de solvenți și a capacității lor de a extrage compuși fenolici, flavonoide și alți metaboliți cu relevanță biologică din *A. annua*:

1. Extracția hidroalcoolică
2. Extracția în sistem NADES: betaină - 1,3-propanediol

II.5.2.1. Obținerea de extracte în solvenți hidroalcoolici

În vederea obținerii extractelor etanolice din *A. annua*, au fost aplicate trei metode convenționale de extracție: macerare, refluxare simplă și refluxare în sistem Soxhlet, pentru a permite compararea eficienței lor în condiții experimentale controlate și reproductibile.

Pentru fiecare metodă, au fost variați sistematic următorii parametri de extracție:

- Concentrația solventului (etanol 30%, 50%, 60%, 70% v/v)
- Raportul material vegetal/solvent (S/L) (1:5, 1:15, 1:20 g/mL)
- Timpul de extracție, în funcție de metodă: 7–30 zile pentru macerare, 60–120 min pentru refluxare simplă, 90–150 min pentru Soxhlet.

II.5.2.1.1 Randamentul de extracție

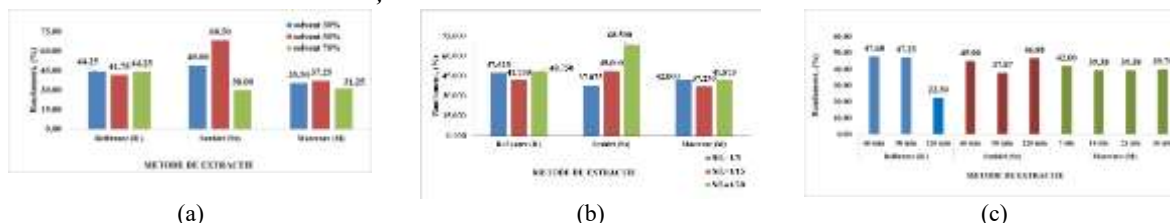


Figura II.5.2. Randamentul extracției (%) determinat în funcție de parametrii procesului.

Condiții experimentale : **(a)** Influența concentrației solventului (30%, 50%, 70%). Raport S/L: R și M = 1:5, Sx = 1:5; **(b)** Influența raportului solid/lichid (S/L) (1:5, 1:15, 1:20). Concentrația solventului = 50%; **(c)** Influența timpului de extracție. Concentrația solventului = 50%; Raport S/L: R = 1:15, Sx = 1:15, M = 1:15 (Maxim și colab., 2025).

Putem spune că în cazul *A. annua*, extracția în Soxhlet utilizând etanol 50% și un raport S/L de 1:20 s-a dovedit a fi cea mai eficientă strategie experimentală, atingând un randament de aproape 70%.

Deși macerarea este o metodă mai blândă, cu potențial aplicabil în produse sensibile la temperatură, randamentele obținute sunt mai reduse. Concentrațiile de etanol mai mari (70%) nu au adus beneficii suplimentare, iar prelungirea excesivă a timpului de extracție la temperaturi ridicate poate avea efecte negative asupra eficienței, după cum s-a observat în cazul refluxării timp de 120 minute (Maxim și colab., 2025).

II.5.2.1.2. Caracterizarea cantitativă a extractelor hidroalcoolice

II.5.2.1.2.1. Determinarea conținutului total de polifenoli

Cantitățile obținute de polifenoli (TPC) au fost exprimate în miligrame echivalenți acid galic pe mL de extract (mg GAE/mL), determinările fiind realizate în duplicat, iar valorile medii au fost corelate ulterior cu parametrii experimentali și cu metoda de extracție aplicată. Rezultatele (Figura II.5.3.) evidențiază în mod clar influența factorilor operaționali asupra cantității de polifenoli din extractele de *A. annua*.

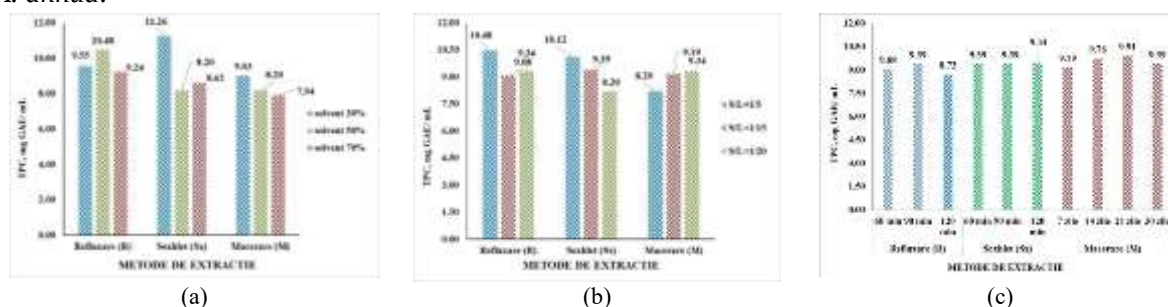


Figura II.5.3. Conținutul total de polifenoli (TPC, mg GAE/mL) determinat în funcție de parametrii procesului de extracție pentru *A. annua*. Condiții experimentale : (a) Influența concentrației solventului (30%, 50%, 70%) asupra TPC. Raport S/L: R și M = 1:5; Sx și M = 1:5; (b) Influența raportului solid/lichid (S/L) (1:5, 1:15, 1:20) asupra TPC. Concentrația solventului = 50%; (c) Influența timpului de extracție asupra TPC, pentru fiecare metodă de extracție. Concentrația solventului = 50%; Raport S/L: R = 1:15, Sx = 1:15, M = 1:15 (Maxim și colab., 2025)

În concluzie, cele mai bune rezultate se obțin (Maxim și colab., 2025):

- Metoda Soxhlet (condiții moderate, solvent 50%, timp scurt): TPC maxim: 11,26 mg GAE/mL (solvent 50%, S/L=1:15, timp = 90 min).
- Metoda Refluxare (rapoarte S/L concentrate, extracție rapidă): TPC maxim: 10,48 mg GAE/mL (solvent 50%, raport S/L=1:5, timp=60 min).
- Metoda Macerare simplă (condiții blânde, durată mai lungă): TPC optim: 9,91 mg GAE/mL (solvent 50%, raport S/L=1:15, timp=21 zile).

II.5.2.1.2.2. Determinarea conținutului total de flavonoide

Caracterizarea cantitativă prin conținutul total de flavonoide (TFC) a extractelor obținute din *A. annua*, a fost realizată pe baza protocolului descris în capitolul II.2.3.5. prin metoda spectrofotometrică de complexare cu clorură de aluminiu ($AlCl_3$), rezultatele fiind exprimate în miligrame echivalente de quercetină pe mililitru de extract (mg QE/mL). Rezultatele sunt redată grafic în Figura II.5.4.

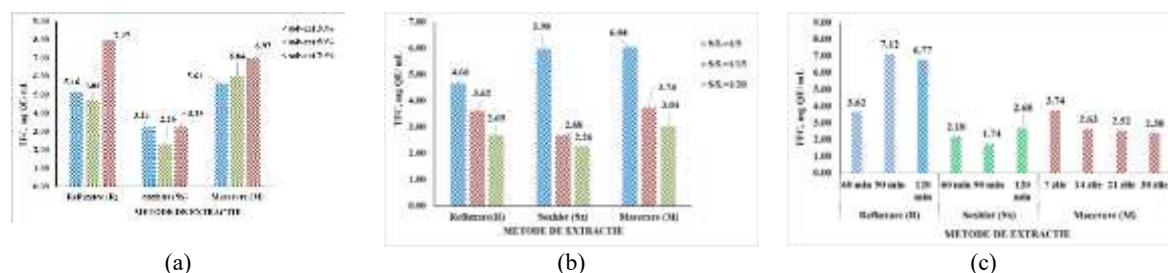


Figura II.5.4. Conținutul total de flavonoide (TFC, mg QE/mL) determinat în funcție de parametrii procesului de extracție pentru *A. annua*. Condiții experimentale : (a) Influența concentrației solventului (30%, 50%, 70%) asupra TFC. Raport S/L: R și M = 1:5; Sx și M = 1:5; (b) Influența raportului solid/lichid (S/L) (1:5, 1:15, 1:20) asupra TFC. Concentrația solventului = 50%; (c) Influența timpului de extracție asupra TFC, pentru fiecare metodă de extracție. Concentrația solventului = 50%; Raport S/L: R = 1:15, Sx = 1:15, M = 1:15 (Maxim și colab., 2025).

Dintre toate variantele testate, extractul obținut prin reflux cu etanol 70%, la un raport solid/lichid de 1:5 și un timp de extracție de 90 de minute s-a dovedit a fi cel mai eficient, atingând un conținut maxim de 7,97 mg QE/mL flavonoide totale. Acest rezultat confirmă faptul că o polaritate intermediară a solventului, asociată cu o temperatură controlată și un volum optim de lucru, oferă condițiile favorabile pentru solubilizarea și extragerea flavonoidelor din *A. annua* (Maxim și colab., 2025).

II.5.2.2. Obținerea de extracte cu solvenți NADES

Evaluarea conținutului de polifenoli și flavonoide din extractele obținute cu solvenți NADES (Tabelul II.5.4.), a fost realizat prin prisma aceluiași parametri experimentali cercetați anterior: raportul molar dintre acceptorul și donorul de legături de hidrogen (HBA/HBD) care compun solventul, raportul solid/lichid (S/L), durata extracției, temperatura și procentul de apă adăugat fiecărui NADES. Pe lângă parametrii clasici, așa cum am mai subliniat și într-un capitol anterior (Capitolul II.3.9.) controlul conținutului de apă este esențial într-un NADES pe bază de betaină-1,3 propanediol, deoarece apa nu doar reduce vâscozitatea și crește mobilitatea moleculară, ci și mediază interacțiuni critice de tip "H-bond" între donatorul și acceptorul de legături de hidrogen (HBD și HBA), contribuind astfel la stabilizarea rețelei eutectice într-o fază lichidă. Pentru evaluarea eficienței influența parametrilor operaționali, au fost aplicate două metode de extracție (Maxim și colab., 2026):

1. Macerarea la temperatura camerei cu agitare vibrațională (M)
2. Extracția asistată de ultrasunete (US).

II.5.2.2.1. Determinarea conținutului total de polifenoli din extractele în NADES

Rezultatele obținute în urma extracțiilor, exprimate prin conținutul total de polifenoli și flavonoide, menținând protocolul metodologic utilizat anterior și pentru celelalte specii studiate, sunt ilustrate în Figura II.5.5. Sunt evidențiate variațiile generate de modificarea raportului HBA/HBD, cuprins între 1:3 și 1:6, urmat de testarea celorlalți parametri specifici, a raportului plantă-solvent, procentului de apă, duratei și temperaturii de extracție. Determinările TPC au fost realizate pornind de la raportul molar HBA/HBD selectat, urmate de modificarea celorlalți parametri pentru a surprinde impactul acestora asupra randamentului.

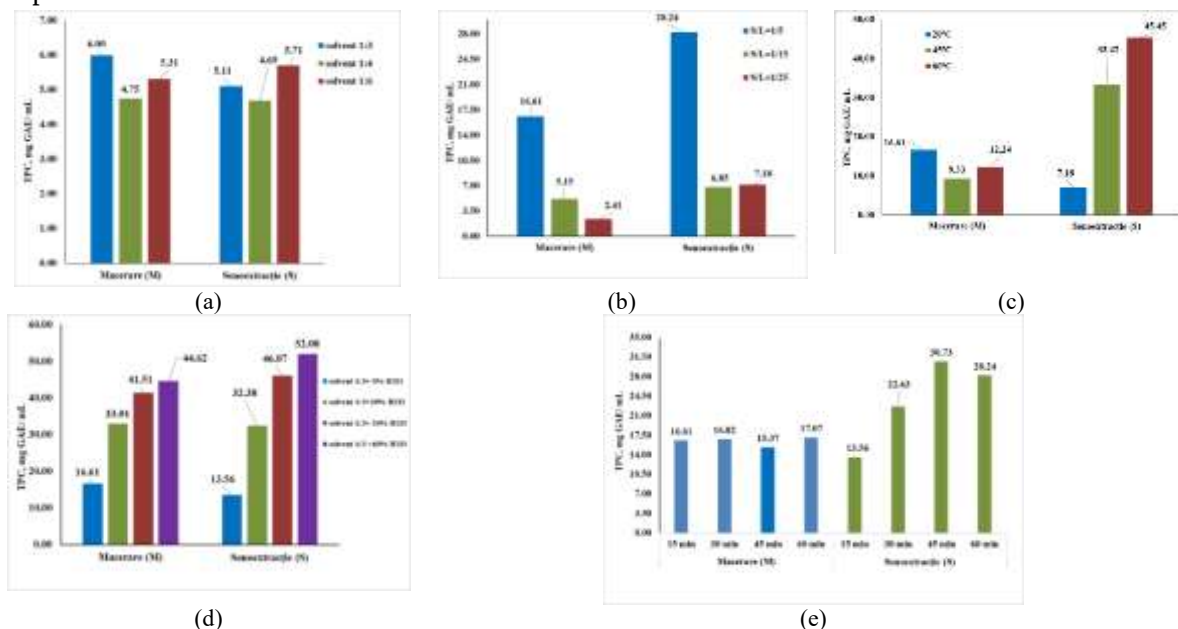
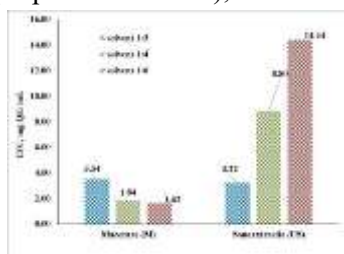


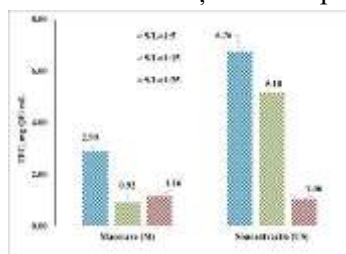
Figura II.5.5. Conținutul total de polifenoli (TPC) determinat pentru metodele de extracție utilizate în solvent NADES, în funcție de parametrii testați. Condiții experimentale: **(a)** Influența raportului betaină:1,3-propanediol (1:3, 1:4, 1:6) asupra TPC. Raport S/L: M și US = 1:5; temperatură = 25 °C; **(b)** Influența raportului solid/lichid (S/L) (1:5, 1:15, 1:25) asupra TPC. Solvent NADES la raport 1:3 betaină:1,3-propanediol; temperatura = 25 °C; **(c)** Influența temperaturii de extracție (20 °C, 45 °C, 60 °C) asupra TPC. Raport S/L = 1:15; solvent NADES 1:3; **(d)** Influența adaosului de apă (0%, 10%, 20%) asupra TPC. Raport S/L = 1:5; temperatura = 25 °C; **(e)** Influența timpului de extracție (15, 30, 45, 60 min) asupra TPC. Raport S/L = 1:5; temperatură = 25 °C (Maxim și colab., 2026)

II.5.2.2.2. Determinarea conținutului total de flavonoide din extractele în NADES

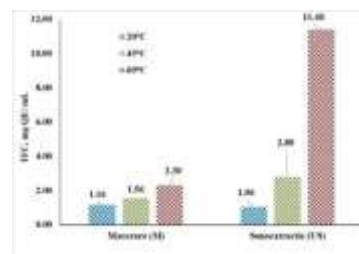
Determinarea conținutului total de flavonoide (TFC) a permis evaluarea modului în care parametrii operaționali influențează selectiv extracția acestui grup de compuși. Valorile obținute sunt reprezentate în Figura II.5.6, și evidențiază diferențele apărute în funcție de raportul HBA/HBD, precum și de ceilalți factori analizați: raport S/L, procent de apă, durată și temperatură de extracție. Pentru flavonoide, investigațiile au continuat pe baza raportului molar stabilit anterior (raport molar betaina-propanediol de 1:3), cu evaluarea succesivă a celorlalți factori operaționali



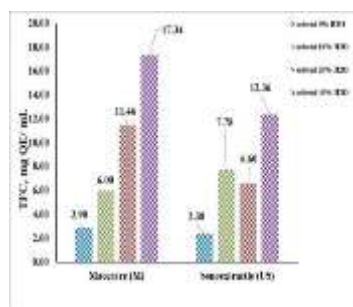
(a) Condiții experimentale: S/L - 1:15 (M) 1:5 (US); temperatură = 20 °C; timp -15 min (M și US); 0% apă



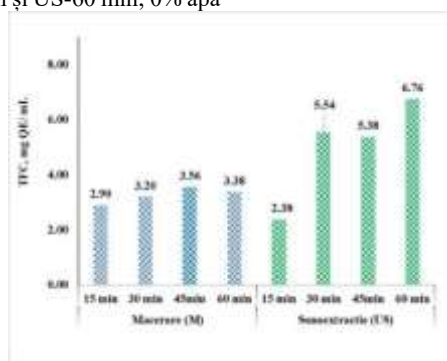
(b) Condiții experimentale: NADES cu raport 1:3 (betaină:1,3-propanediol); temperatură = 20°C; timp: M-15 min și US-60 min; 0% apă



(c) Condiții experimentale: S/L = 1:15; solvent NADES 1:3; timp: M-15 min și US-60 min; 0% apă



(d) Condiții experimentale: S/L = 1:5; temperatură = 20 °C; time: -15 min (M și US)



(e) Condiții experimentale: solvent NADES 1:3; S/L - 1:5 (M și US) ; temperatură = 20 °C; 0% apă

Figura II.5.6. Conținutul total de flavonoide (TFC) determinat pentru metodele de extracție utilizate în solvent NADES. Condiții : (a) Influența raportului betaină:1,3-propanediol (1:3, 1:4, 1:6); (b) Influența raportului solid/lichid (S/L) (1:5, 1:15, 1:25); (c) Influența temperaturii de extracție (20 °C, 45 °C, 60 °C); (d) Influența adaosului de apă (0%, 10%, 20%, 40%); (e) Influența timpului de extracție (15, 30, 45, 60 min) (Maxim și colab., 2026).

II.5.2.2.3. Concluzii privind performanța extracției cu solvenți NADES

Compușii fenolici au arătat o preferință clară pentru un mediu relativ diluat și o rețea de legături de hidrogen NADES relativ echilibrată, sugerând sensibilitate termică și o nevoie de stabilitate a solventului. În aceste condiții, cea mai bună extracție a fost obținută prin extracție asistată de ultrasunete (15 min, 20°C, NADES 1:3 diluat cu 40% H₂O, raport S/L 1:5), unde procesul de cavitație a permis eliberarea rapidă și controlată a compușilor, atingând un conținut maxim de 52,08 mg GAE/mL.

Extracția flavonoidelor s-a îmbunătățit odată cu creșterea conținutului de apă, probabil datorită reducerii vâscozității NADES și polarității sporite, ambele facilitând solubilizarea flavonoidelor. În plus, stabilitatea lor termică a permis utilizarea unor temperaturi de extracție mai ridicate fără o degradare substanțială a compusului. În acest context, cea mai eficientă extracție a fost obținută prin macerare vibrațională folosind NADES diluat cu 40% apă, atingând o concentrație de 17,34 mg QE/mL (NADES 1:6 cu 40% apă, S/L = 1:5, 45 min), obținută printr-o metodă blândă cu potențial ridicat pentru aplicații sensibile, cum ar fi (dermato)cosmeticele sau produsele farmaceutice.

II.5.2.2.4. Modelarea și optimizarea procesului de extracție cu solvenți NADES

Pentru a modela procesul, a fost utilizată o combinație de rețele neuronale profunde cu algoritmul de optimizare SHADE (Success-History based Adaptive Differential Evolution). SHADE reprezintă o tehnică avansată de optimizare evolutivă și funcționează ca o metaeuristică bazată pe populație care menține adaptarea parametrilor de control adaptiv printr-un mecanism de memorie istorică (Tanabe și colab., 2013). Deoarece se bazează pe algoritmul Differential Evolution, are patru operații fundamentale: inițializare, mutație, încrucișare și selecție.

Schema simplificată a procedurii generale de modelare și optimizare în combinație cu configurația experimentală este prezentată în Figura II.5.7. Procedura de modelare este implementată în Python folosind bibliotecile Keras, Tensorflow și Mealyppy.

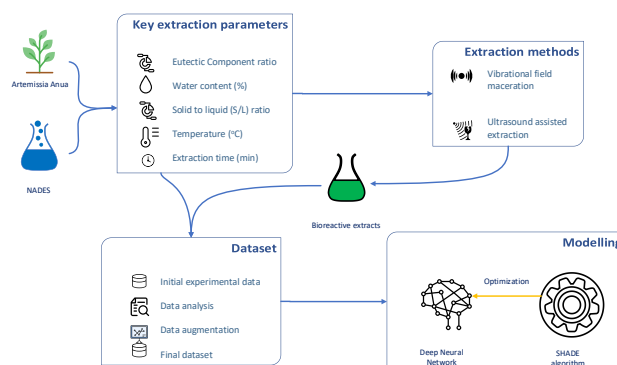


Figura II.5.7. Schema pașilor parcurși în cadrul acestei modelări (Maxim și colab., 2026).

Pentru a determina impactul parametrilor procesului, au fost calculate valorile SHAP (Figura II.5.9.).

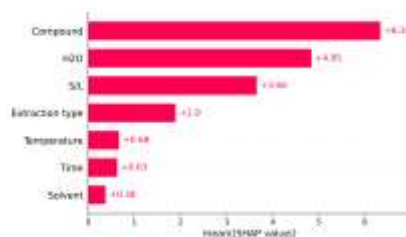


Figura II.5.9. Valorile SHAP (Maxim și colab., 2026).

După cum se poate observa, cea mai mare valoare corespunde compusului extras, indicând faptul că acesta este cel mai influent parametru de proces. Conținutul de apă este al doilea parametru ca influență; impactul general al datelor arată că valorile mai mari tind să aibă un efect pozitiv asupra rezultatului. Raportul S/L este al treilea parametru de proces ca influență. În acest caz, comportamentul general tinde să fie pozitiv (producție generală mai mare) pentru valori mai mici. Cu toate acestea, se observă curbe distincte în raport cu tipul de extracție. Pentru macerare, producția scade pe măsură ce raportul S/L crește, în timp ce pentru sonoextracție, producția crește odată cu creșterea raportului S/L.

Parametrii de proces cu cel mai mic impact sunt reprezentați de temperatură, timp și raportul solventului NADES. Pentru acești trei parametri de proces, deși există diferențe individuale, valorile mai mari tind să aibă un impact mai mare în comparație cu cele mai mici valori (Maxim și colab., 2026).

În studiul de optimizare a procesului de extracție s-a lucrat cu același algoritm SHADE și s-a căutat optimul pentru conținutul de polifenoli (Figura II.5.10.) și pentru flavonoide (Figura II.5.11.). Analiza rezultatelor obținute prin modelare-optimizare prezentate în Figurile II.5.10 și II.5.11 (ieșirea Y1 sau Y1 cu rotunjiri) sunt sistematizate în Tabelul II.5.6., comparativ cu cele rezultate experimentale.

Tabel II.5.6. Conținutul de polifenoli și flavonoide obținut experimental și prin programul de optimizare

Compus extras	Experimental	Optimizare
---------------	--------------	------------

Polifenoli, mg GAE/mL	52,08 (US; S/L=1:5; 1:3 NADES, 15 minute, 25°C)	60,7 (US; S/L=1:5; solvent NADES cu raport molar între componente de 1:3,36 ; 27,75 min; 58,42 °C)
Flavonoide, mg QE/mL	17,34 (M; S/L = 1:5; NADES 1:6 + 40% apa v/v ; 45 minute; 20 °C)	28,6 (US; S/L=1:5; solvent NADES cu raport molar între componente de 1:3 ; 24,67 min.; 60 °C)

II.5.2.3. Evaluarea comparativă a celor mai eficiente extracte din *A. annua* (alcoolice și NADES)

În consecință, în cazul *A. annua*, s-a efectuat o comparație între rezultatele extracției obținute folosind o metodă hidroalcoolică convențională și cele obținute cu un sistem NADES pe bază de betaină-1,3-propanediol (Tabelul II.5.7.).

Tabel II.5.7. Conținutul de polifenoli și flavonoide în cele mai performante extracte din *A. annua* în funcție de solventul folosit.

Compus extras	Etanol	NADES (B:PDO)
Polifenoli, mg GAE/mL	11,26 (Sx ; S/L=1:5; EtOH 50% v/v; 7 zile)	52,08 (US; S/L=1:5; 1:3 NADES, 15 minute, 25°C)
Flavonoide, mg QE/mL	7,97 (R; S/L= 1:5 EtOH 70% v/v; 90 min)	17,34 (M; S/L = 1:5; NADES 1:6 + 40% apa v/v ; 45 minute; 20 °C)

Rezultatele prezentate în Tabelul II.5.6. evidențiază diferențe semnificative în eficiența extracției în funcție de sistemul de solvent și de parametrii operaționali, atât în ceea ce privește TPC, cât și TFC. În mod notabil, sistemul bazat pe NADES a depășit etanolul, cu o eficiență clar mai mare.

II.5.3. Evaluarea activității antioxidante a celor mai performante extracte din *A. annua*

Pentru a evalua potențialul antioxidant al extractelor din *A. annua*, similar cu testarea activității antioxidante din *A. oleracea*, s-au aplicat metodele DPPH și ABTS, descrise detaliat în Capitolul II.2.3.3. (Materiale și metode). Datele obținute și sistematizate în Tabelul II.5.8. au permis evaluarea modului în care solventul utilizat la extracție influențează activitatea antioxidantă și au oferit informații privind diferențele de reactivitate a probelor față de radicalii DPPH și ABTS.

Tabel II.5.8. Evaluarea activității antioxidante pentru o serie de extracte din *A. annua*

Metoda de extracție/caracteristici	Solvent probă v/v	Polifenoli mg GAE/mL	DPPH (mg TE/mL extract)	ABTS (mg TE/mL extract)
Sx: S/L=1:5; 7 zile/	EtOH: 50%	11,26	0.32 ± 0.02	2.22 ± 0.04
US: S/L=1:5; 15 min.; 25°C	NADES 1:3	52,08	0.84 ± 0.01	2.50 ± 0.02

Capitolul II.6.

Sistem emulsionant cu ingrediente de origine naturală pentru livrarea complexului N-Prolyl Palmitoyl Tripeptide-56 Acetate – bakuchiol, destinat combaterii stresului oxidativ al pielii

II.6.2. Evaluarea potențialului biologic al asocierii substanțelor active utilizate

Evaluarea potențialului biologic al substanțelor active luate în considerare pentru a fi introduse în preparatele cosmetice studiate și anume Bakuchiol (BAK) și Peptida Matrixyl® Morphomics (PP56) s-a făcut pentru a evidenția concentrația și combinația optimă în formulare. Astfel, evaluarea activității antioxidante s-a efectuat prin:

- *determinarea capacității antioxidante cu utilizarea radicalului DPPH*: se efectuează prin metoda decolorării radicalului stabil DPPH (2,2, difenil-picril-hidrazil), de către substanțe cu caracter antioxidant din compoziția substanțelor active menționate mai sus.
- *determinarea capacității de scavenger față de radicalul cation ABTS*: se bazează pe neutralizarea radicalului ABTS de către antioxidanții naturali de tipul compușilor polifenolici din compoziția substanțelor active utilizate în formularea preparatelor cosmetice.

➤ *determinarea conținutului total de polifenoli (TPC) în baza metodei descrise de anterior (Grochowski și colab., 2017; Trifan și colab., 2021).*

II.6.3. Dezvoltarea vehiculului de livrare

Au fost dezvoltate patru prototipuri de emulsii, cu materii prime de origine naturală, cu obiectivul inițial de a evalua stabilitatea și de a selecta variantele stabile, care oferă totodată un profil senzorial optim.

Tabel II.6.3. Ingrediente utilizate în formularea emulsiilor O/W

Denumire materie primă (INCI)		%	Imagine emulsie
Formula I			
Emulgator	Polyglyceryl-6 Stearate,Polyglyceryl-6 Behenate	4	
Co-emulgator	Glyceryl stearate	2	
Fază lipofilă	Euterpe oleracea oil	5	
Faza lipofila	Oenothera Biennis oil	10	
Fază lipofilă	Punica granatum seed extract	5	
Fază hidrofilă	Rosa Damascene Water	73,2	
Agent de textură	Xanthan gum	0,2	
Conservant	Benzyl alcohol, salicylic acid, glycerin, sorbic acid	0,6	
Formula II			
Emulgator	Cetearyl olivate, sorbitan olivate	5	
Co-emulgator	Glyceryl stearate	1	
Fază lipofilă	Plukenetia Volubilis Seed Oil	10	
Fază lipofilă	Vaccinium Macrocarpon Seed Oil	10	
Fază lipofilă	Euterpe oleracea oil	5	
Fază hidrofilă	Rosa Damascene Water	68,4	
Conservant	Benzyl alcohol, salicylic acid, glycerin, sorbic acid	0,6	
Formula III			
Emulgator	Methyl Glucose Sesquistearate	4	
Co-emulgator	Cetyl Alcohol	3	
Fază lipofilă	Oenothera biennis oil	10	
Fază lipofilă	Punica granatum seed extract	5	
Fază lipofilă	Plukenetia Volubilis Seed Oil	8	
Agent de textură	Xanthan gum	0,2	
Fază hidrofilă	Rosa Damascene Water	69,2	
Conservant	Benzyl alcohol, salicylic acid, glycerin, sorbic acid	0,6	

Tabel II.6.4. Concentrații stabilite pentru formulare (Maxim, 2022)

Pentru a nu degrada compușii biologic activi, Bakuchiol și N-Prolyl Palmitoyl Tripeptide-56 Acetate au fost încorporați în emulsie la o temperatură sub 40 °C. Amestecul este omogenizat manual timp de 2-3 minute, pentru a asigura o dispersie uniformă a ingredientelor în masa emulsiei. Concentrațiile substanțelor active sunt stabilite în conformitate cu intervalele de referință specificate în fișele tehnice ale ingredientelor furnizate de producător.	notație probă		Concentrație active	
			Bakukiol	TPA
	E.1	1.1	0,5 %	0,5 %
		1.2	1 %	1 %
		1.3	1 %	2 %
	E.2	2.1	0,5 %	0,5 %
		2.2	1 %	1 %
		2.3	1 %	2 %
	E.3	3.1	0,5 %	0,5 %
		3.2	1 %	1 %
3.3		1 %	2 %	

II.6.4. Testarea stabilității emulsiilor preparate

Pentru a estima stabilitatea în timp a emulsiilor (dermato)cosmetice, au fost realizate mai multe teste în conformitate cu Ghidul „Guidelines on Stability Testing of Cosmetic Products” publicat în 2004 de către Cosmetics Europe și Cosmetic Toiletry and Fragrance Association (CTFA), incluzând determinarea pH-ului, separarea fazelor sub forță centrifugă, măsurarea conductibilității, evaluarea omogenității și controlul microbiologic (Cosmetics Europe și CTFA, 2004).

Rezultatele au demonstrat stabilitate fizico-chimică adecvată utilizării dermato-cosmetice. Valorile pH-ului s-au menținut în interval compatibil cu pielea, iar testele de centrifugare și vibrație mecanică nu au evidențiat separarea fazelor. Analiza microscopică optică și electronică a confirmat omogenitatea și distribuția uniformă a fazei dispersate, fără defecte structurale sau contaminări detectabile prin SEM–EDX.

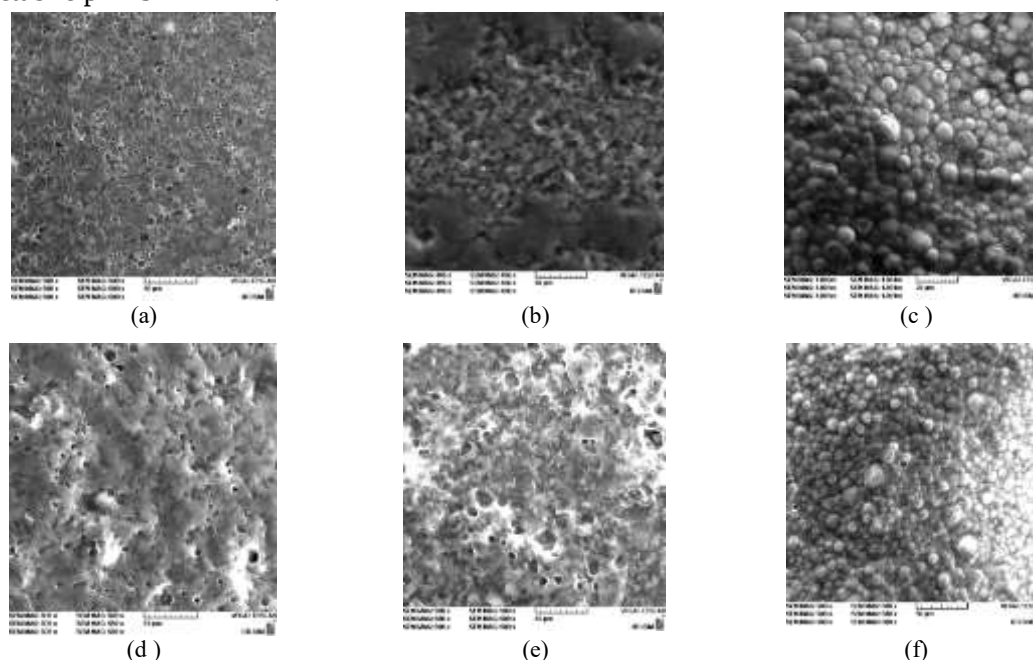


Figura II.6.2. Microscopia electronică cu scanare (SEM) a emulsiei E.1.0., E.2.0. și E.3.0. (a, b, c) și a emulsiilor E.1.3., E.2.3 și respectiv E.3.3. (d, e, f)

Aceleași emulsii au fost caracterizate prin spectroscopie EDX, determinările fiind realizate în trei zone distincte de pe suprafața materialului (1 mm²), făcându-se o medie a valorilor obținute. Analiza spectrelor emulsiei fără substanțe active (Figura II.6.3a și II.6.4a) a indicat prezența elementelor C, O și N la diferite energii ale razelor X, în timp ce spectrele emulsiei cu substanțe active (Figura II.6.3b și II.6.4b) au evidențiat o compoziție similară, cu variații minore datorate încorporării ingredientelor active în concentrațiile specificate, respectiv 1% BAK și 2% TPA (E.1.3. și E.3.3.).

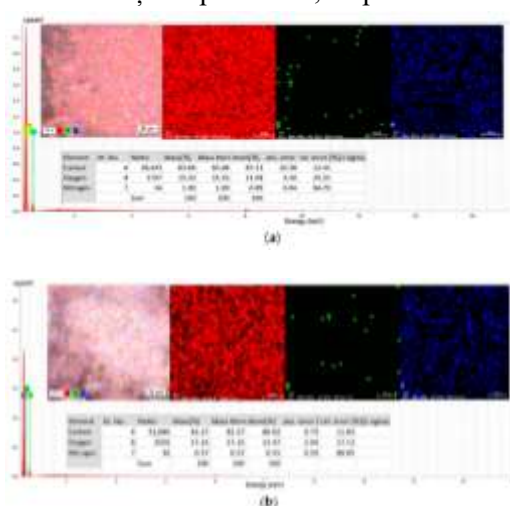


Figura II.6.3. Spectrele de raze X cu dispersie energetică (EDX) ale emulsiei E.1.0. - fără activ (a) și emulsiei E.1.3. - cu active (b).

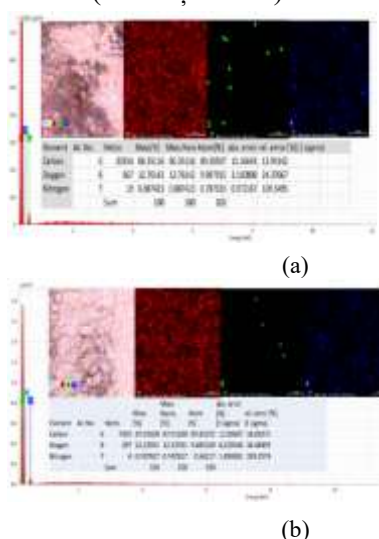


Figura II.6.4. Spectrele de raze X cu dispersie energetică (EDX) ale emulsiei E.3.0. - fără active (a) și emulsiei E.3.3. - cu active (b).

Informațiile obținute, prezentate în Figura II.6.2., Figura II.6.3. și Figura II.6.4. evidențiază faptul că emulsiile analizate, atât bazele, cât și cele cu active incluse, prezintă o omogenitate și stabilitate ridicată a fazelor pe durata perioadei de depozitare (Barna și colab., 2023).

II.6.6. Studiul de difuzie *in vitro* pentru emulsiile obținute

Rezultatele acestui studiu au fost exprimate după cum urmează:

- (i) polifenoli eliberați în 5mL din camera receptorului, exprimați în TPC, $\mu\text{g/mL}$ funcție de timp;
- (ii) rata de eliberare a polifenolilor, exprimată în TPC $\mu\text{g/mL/t}$;
- (iii) eficiența trecerii polifenolilor prin membrană, E%.

În figura II.6.11. am prezentat rezultatele comparativ pentru cele trei emulsii pentru a le putea aprecia eficiența.

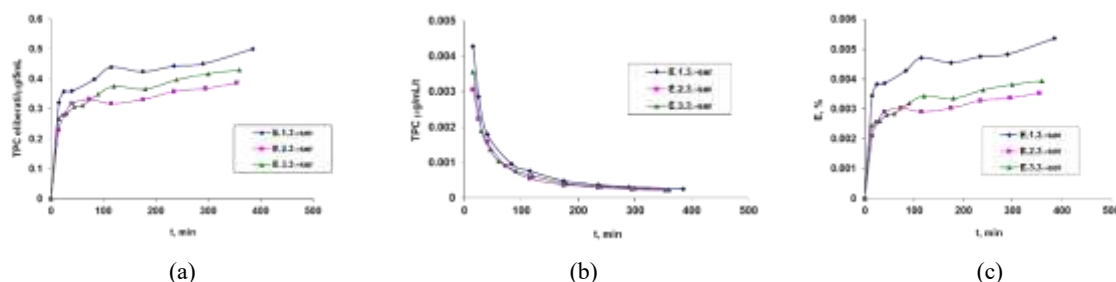


Figura II.6.11. (a) Cantitatea de polifenoli (TPC) eliberați în compartimentul receptor (5 mL) ($\mu\text{g TPC} / 5 \text{ mL}$) de către emulsiile E.1.3., E.2.3. și E.3.3.; (b) viteza de eliberare a polifenolilor în funcție de timp ($\mu\text{g TPC/mL/t}$); (c) eficiența permeației polifenolilor din probele de emulsii: E.1.3., E.2.3. și E.3.3.

Deși studiul alinării graficelor ar conduce la ideea că emulsiile au o comportare similară, totuși din punct de vedere al trecerii polifenolilor prin membrană, în cazul emulsiei E.2.3. (Figura II.6.11a) apare o notă discordantă. Astfel se indică o trecere limitată a polifenolilor, ceea ce presupune o retenție predominantă la nivel cutanat. Acest comportament este considerat favorabil din punct de vedere dermatocosmetic, întrucât numeroase studii demonstrează că activitatea antioxidantă a compușilor fenolici se manifestă preponderent la nivelul pielii, în special în stratul dermic, unde neutralizează speciile reactive de oxigen și protejează structurile matricei extracelulare (Ratz-Lyko și colab., 2015; de Lima Cherubim și colab., 2020; Butkeviciute și colab., 2022; Lee și colab., 2022). De asemenea, instalarea liniarității valorilor obținute pentru substanțele active eliberate, sugerează trei idei distincte: (1) atingerea stării de echilibru în sistem, pe baza gradientului de concentrație constant dintre cele 2 compartimente (aici pot fi mai multe cauze, nu aș intra în detalii ca nici nu le pot proba nici nu știu care ar avantaja autorul), (2) irelevanța prelungirii duratei experimentului, (3) importanța reaplicării unui dermatocosmetic după un interval de 4-5 ore pentru asigurarea concentrației în țesut a activelor din dermatocosmetice până la capacitatea optimă de rezervor a pielii.

Rezultatele testelor *in vitro* completează investigațiile anterioare și demonstrează că emulsiile poate fi încorporate în noi formulări dermato-cosmetice cu scopul de a reduce stresul oxidativ al pielii. Obiectivul de a sublinia funcționalitatea sistemului de difuzie în contextul utilizării unei noi emulsii a fost îndeplinit, iar acest studiu servește ca un prim pas important pentru cercetările viitoare.

Capitolul II.7

Integrarea extractelor vegetale ca ingrediente active în sisteme de livrare dermatocosmetică

II.7.1. Formularea emulsiilor

Emulsiile sunt cele mai adecvate și folosite forme de livrare topica a polifenolilor în piele datorită capacității lor de a solubiliza concomitent compuși lipofili și hidrofilii, însă, compoziția emulsiei,

natura fazei uleioase și tipul emulgatorului, influențează semnificativ pătrunderea polifenolilor până în stratulintă (Zillich și colab., 2013).

În prima etapă a studiului, am formulat șase emulsii prototip (Figura II.7.1.), exclusiv cu ingrediente de origine naturală în care fazele apoasă și uleioasă au fost menținute identice ca și compoziție, diferențierea fiind realizată prin utilizarea unor emulgatori diferiți (Tabel II.7.1.).

Tabel II.7.1. Materiile prime folosite în scenengul emulsiilor preliminare

	Denumire INCI materie primă	Denumire comercială materie primă	%	Funcție ingredient
FAZA A Faza lipofilă	<i>Amaranthus Spinous</i> Seed Oil	Ulei de amarant	5	Emolient
	<i>Psoralea corylifolia</i> Seed Oil	Ulei de bakuchi	5	
	<i>Malus domestica</i> Seed Oil	Ulei din seminte de mar	5	
	<i>Solanum Lycopersicum</i> Seed Oil	Ulei de tomate	5	
Emulgatorii folositi pentru cele 6 prototipuri	F1: Cetearyl Alcohol, Glyceryl Stearate, Jojoba Esters, <i>Helianthus Annuus</i> Seed Wax, Sodium Stearoyl Glutamate, Water, Polyglycerin-3	<i>Emulium Dolceea</i>	5	Emulgator
	E2: Behenyl Alcohol (and) Glyceryl Behenate (and) Lecithin	Heliosoft	5	
	E3: Polyglyceryl-3 Cetyl Ether Olivat/Succinate	Emulsol X	5	
	E4: Glyceryl Stearate, Cetearyl Alcohol, Sodium Stearoyl Lactylate	Plant HP 30	5	Emulgator Co-emulgator
	E5: Potassium cetyl phosphate, Cetearyl Alcohol	Amphisol K RSPO MB	2 3	
	E6: Sodium Stearoyl Glutamate	Amisoft HS11	5	
FAZA B Faza hidrofilă	<i>Acmella oleracea</i> Flower Water	Hidrolat de <i>Acmella oleracea</i>	71,7	Solvent
	Glycerin	Glicerina	2	Agent de condiționare
	Lecithin, Sclerotium Gum, Pullulan, Xanthan Gum	Siligel	0,3	Agent de vâscozitate
FAZA C Conservant	Benzyl Alcohol, Dehydroacetic Acid	Salvacosm DB	1	Conservat

II.7.3.2. Protocol tehnologic de formulare a emulsiilor de tip ulei-în-apă (O/W)

Prepararea emulsiei de tip ulei-în-apă (O/W) s-a realizat printr-un proces etapizat (figura Figura II.7.2.) cu control strict al parametrilor tehnologici.



Figura II.7.2. Succesiunea etapelor tehnologice de preparare a emulsiei dermatocosmetice

II.7.4. Caracterizarea emulsiilor cu extracte vegetale încorporate

Dintre cele șase emulsii - bază testate:

✓ baza emulsionată cu Emulium® Dolceea (Cetearyl Alcohol, Glyceryl Stearate, Jojoba Esters, *Helianthus Annuus* Seed Wax, Sodium Stearoyl Glutamate, Polyglycerin-3) a fost selectată ca bază optimă pentru formularea ulterioară a emulsiilor cu extracte de *A. oleracea* și *A. annua*,

✓ baza emulsionantă cu emulgatorul Heliosoft (Behenyl Alcohol, Glyceryl Behenate, Lecithin) a fost selectată ca bază optimă pentru formularea ulterioară a emulsiilor cu extracte vegetale de *D. carota* subsp. *carota*.

În etapa următoare, au fost selectate 2 baze pentru încorporarea extractelor de *A. oleracea* și *A. annua* și *D. carota* subsp. *carota*.

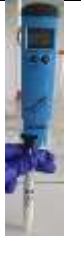
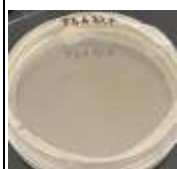
II.7.4.1. Caracterizarea emulsiilor cu extract de *Acmella oleracea*

Pentru evaluarea impactului tipului de solvent și a concentrației extractului de *A. oleracea* asupra proprietăților emulsiei finale am utilizat baza emulsionantă special selectată (cu Emulium® Dolcea (Cetearyl Alcohol, Glyceryl Stearate, Jojoba Esters, Helianthus Annuus Seed Wax, Sodium Stearoyl Glutamate, Polyglycerin-3) în care au fost încorporate separat extractele de *A. oleracea* obținute prin diferite metode de extracție (etanol, 1,3-propanediol și NADES betaină:propanediol).

Analiza preliminară a formulărilor a inclus determinarea pH-ului, testarea stabilității fizice prin centrifugare și miscări vibratorii, controlul microbiologic și examinarea microstructurii prin microscopie optică. Aceste investigații au oferit o imagine de ansamblu asupra comportamentului inițial al emulsiilor și sunt prezentate în Tabelul II.7.4.

Tabel II.7.4. Caracterizarea preliminară a emulsiilor cu extract de *A. oleracea*

Parametrii	EMULSII				
	Emulsia bază	Formula 1, (cu extract alcoolic 3%)	Formula 2 (cu extract alcoolic 5%)	Formula 3 (cu extract în propanediol 3%)	Formula 4 (cu extract în NADES 3%)
Aspectul emulsiei după centrifugare					
Aspectul emulsiei după testul de vibrații (vortex)					
pH-ul emulsiei bază și al formulelor cu extractele încorporate					
Analiza organoleptică					
Imagini microscopice după 24 ore de la prepararea emulsiei și depozitare la 25 °C					

Conductivitatea (mS) măsurată după 24 de ore de la prepararea emulsiei, depozitare 25 °C					
Testarea microbiologică după 24 de ore de la preparare					
Testarea microbiologică la 30 de zile după preparare					

Rezultatele obținute au demonstrat că toate formulările testate sunt conforme fizico-chimic și microbiologic pentru produse (dermato)cosmetice. Emulsiile au demonstrat stabilitate fizică la testele de stres mecanic (centrifugare, vibrații), menținându-și omogenitatea structurală și microstructura internă, confirmată prin microscopie optică. Parametrii pH și conductivitate au variat în funcție de tipul extractului și al solventului utilizat, însă aceste modificări sunt explicabile prin natura solvenților de extracție și pot fi corectate prin ajustarea pH-ului pentru a asigura compatibilitatea cutanată. Evaluarea organoleptică și analiza microscopică a emulsiilor, au pus în evidență diferențe de consistență și de dispersie corelate atât cu solventul de extracție, cât și cu parametrii procesului de emulsifiere (turație, volum de lot). Din punct de vedere microbiologic, probele analizate au prezentat o încărcătură extrem de redusă (1 UFC/g în cazul unei singure probe din cele cinci testate), situându-se mult sub limitele stabilite de ISO 17516:2014, ceea ce confirmă siguranța și conformitatea formulărilor.

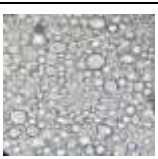
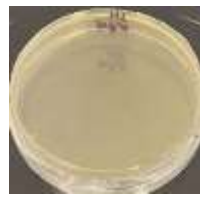
II.7.4.2. Caracterizarea emulsiilor cu extract de *Daucus carota* subsp. *Carota*

Pentru formulările cu extracte de *D. carota*, s-a utilizat aceeași bază de ingrediente ca în cazul emulsiilor cu *A. oleracea*, singura diferență fiind înlocuirea sistemului emulsifiant. În acest caz, emulsifiantul selectat a fost Heliosoft® (Lucas Meyer Cosmetics, Franța), un emulsifiant lamelar blând, ideal pentru formulări naturale, versatile, pentru sensibilitate cutanată crescută.

Pentru emulsiile obținute cu extracte de *Daucus carota* subsp. *carota*, au fost aplicate aceleași metode de caracterizare utilizate și pentru emulsiile cu *A. oleracea* și anume: determinarea pH-ului și a conductivității, teste de stabilitate fizică (centrifugare și vibrații), controlul microbiologic și analiza microstructurală prin microscopie optică, rezultatele fiind prezentate în Tabelul II.7.6.

Tabel II.7.6. Caracterizarea preliminară a emulsiilor cu extract de *D. carota* subsp. *carota*

Parametrii	EMULSII			
	Emulsia baza	Formula 1 cu 3% extract alcoolic	Formula 2 cu 5 % extract în alcoolic	Formula 3 cu 3% extract în 1,3 propanediol
Aspectul emulsiei după centrifugare				

Aspectul emulsiei după testul vortex				
pH-ulu bazei si emulsiilor cu extracte încorporate				
Analiza organoleptică				
Imagini microscopice după 24 ore de la prepararea emulsiei și depozitare la 25 °C				
Conductivitatea (mS) măsurată după 24 de ore de la prepararea emulsiei și depozitare la 25 °C				
Testarea microbiologică la 24 de ore după preparare				
Testarea microbiologică la 30 de zile după preparare și depozitare la 25 °C				

În ansamblu, rezultatele obținute pentru emulsile formulate cu extracte de *D. carota* subsp. *carota* confirmă stabilitatea fizico-chimică, structurală și microbiologică a sistemului emulsionant bazat pe Heliosoft®. Formulările s-au menținut conforme la testele de stres mecanic și au prezentat valori ale pH-ului încadrate în intervalul fiziologic cutanat, fără a necesita ajustări suplimentare. Conductivitatea foarte redusă, explicabilă prin compoziția neionică a emulgatorului, susține caracterul slab ionic al sistemului și stabilitatea coloidală asociată. Evaluarea organoleptică și analiza microscopică au confirmat omogenitatea și integritatea microstructurii. Din punct de vedere microbiologic, aparițiile punctuale ale unor colonii izolate nu au relevanță practică, iar încărcătura microbiană totală s-a menținut mult sub limitele impuse de ISO 17516:2014, ceea ce demonstrează eficiența sistemului conservant și siguranța utilizării produselor.

II.7.4.3. Caracterizarea emulsiilor cu extract de *Artemisia annua*

Pentru obținerea emulsiilor cu extracte de *Artemisia annua* (*A. annua*) am utilizat aceeași bază emulsionantă utilizată și pentru *A. oleracea*. Scopul studiilor preliminare a fost evaluarea inițială a stabilității emulsiilor. Astfel, am preparat 3 variante de emulsii: emulsia bază și emulsiile în care au fost încorporate extracte le hidroalcoolice și extracte obținute în NADES (betaină: propanediol), conform tehnicii de preparare descrise anterior (Tabel II.7.7.). Rezultatele inițiale ale testelor fizico-chimice și microbiologice obținute pentru emulsiile în care au fost încorporate extracte de *A. annua*, sunt prezentate în Tabel II.7.8.

Tabel II.7.8. Determinări fizico-chimice și microbiologice inițiale asupra emulsilor cu extract de *A. annua*

Parametrii	EMULSII		
	Emulsia bază	Formula 1 (extract alcoolic 3%)	Formula 2 (extract în NADES 3%)
Aspectul emulsiei după centrifugare			
Aspectul emulsiei după testul vortex			
pH-ul emulsiei de bază și al formulelor cu extractele încorporate			
Analiza organoleptică			
Imagini microscopice după 24 ore de la prepararea emulsiei, depozitare 25 °C			
Măsurarea conductivității, mS după 24 de ore de la prepararea emulsiei, depozitare 25 °C			

Testarea microbiologică la 24 de ore după preparare			
Testarea microbiologică la 30 de zile de la preparare			

Emulsiile cu extracte de *A. annua* au demonstrat o stabilitate fizico-chimică și structurală bună, confirmată prin testele de stres mecanic, evaluările pH-ului și conductivității, analiza organoleptică și examinarea microscopică. Toate formulările au prezentat un profil senzorial plăcut și o microstructură omogenă, fără semne de instabilitate. Valorile pH-ului au depășit ușor intervalul fiziologic al pielii, ceea ce sugerează necesitatea ajustării acestui parametru pentru compatibilitate cutanată. Din punct de vedere microbiologic, rezultatele au fost conforme și confirmă eficiența sistemului conservant utilizat.

II.7.5. Evaluarea microbiologică a emulsiilor formulate cu extracte vegetale

Analizele microbiologice au fost efectuate pentru microorganismele aerobe mezofile (număr total de germeni aerobi viabili și număr total de drojdii și mușcăiuri), conform unui protocol adaptat după ISO 18415:2017. Determinările au fost realizate la 24 de ore de la prepararea și ambalarea emulsiei și repetate la 30 de zile de păstrare la temperatura camerei. Toate etapele controlului microbiologic s-au desfășurat într-o hotă cu flux laminar (Steril Helios MI2754b, Milano, Italia). Spațiul de lucru și recipientele au fost dezinfectate cu o soluție apoasă conținând 1% HCl și 70% etanol. Toate probele au fost analizate în triplicat, fiind efectuat în paralel și controlul sterilității mediilor de cultură.

Rezultatele obținute reflectă conformitatea microbiologică a tuturor emulsiilor analizate, cu încărcături bacteriene mult sub limitele prevăzute de ISO 17516:2014 și absența agenților patogeni restricționați. Eficiența conservantului folosit (alcool benzilic și acid dehidroacetic, 1%) a menținut probele sterile pe termen scurt și lung, chiar în condițiile utilizării unor extracte vegetale obținute în laborator de cercetare, fără flux de igienă standard pentru un spațiu de producție, în condiții susceptibile de contaminare. Mai mult, stabilitatea microbiologică observată susține rolul protector intrinsec al solvenților de extracție (etanol, 1,3-propanediol și NADES), care au contribuit nu doar la eficiența procesului de extracție, ci și la conservarea extractelor.

II.7.6. Evaluarea activității antioxidante a emulsiilor

În cazul produselor (dermato)cosmetice finite de tip emulsie (O/W sau W/O), aplicarea directă a metodelor DPPH și ABTS nu este posibilă, din cauza naturii lor heterogene și a turbidității, care generează interferențe optice majore la lungimile de undă de interes. Pentru a depăși aceste limitări, literatura de specialitate recomandă utilizarea unui pas premergător de extracție a formulării. Astfel, antioxidanții prezenți în emulsie sunt transferați într-o soluție limpede, compatibilă cu tehnicile spectrofotometrice. Pentru testarea activității antioxidante, au fost selectate 5 emulsii reprezentative (3 emulsii cu extract de *A. oleracea* și 2 cu extract de *A. annua*), în funcție de valoarea relevantă a activității antioxidante a extractelor brute (figura II.7.3.).

Rezultatele obținute au fost sintetizate în Tabelul II.7.9. unde sunt redate atât conținutul total de polifenoli și flavonoide din extractele utilizate în emulsii, solvenții folosiți pentru extracție, cât și activitatea antioxidantă emulsiilor.

Tabel II.7.9. Conținutul total de polifenoli și flavonoide al extractelor și solvenții utilizați, corelat cu activitatea antioxidantă (DPPH, ABTS) a emulsiei formulate cu acestea

Notăție probă*	Solvent probă v/v	Polifenoli mg GAE/mL	Flavonoide mg QE/mL	DPPH (mg TE/100 g emulsie)	ABTS (mg TE/100 g emulsie)
----------------	-------------------	----------------------	---------------------	----------------------------	----------------------------

1. Baza	Fără extract	-	-	32.46 ± 1.50	142.80 ± 5.25
2. F1A	EtOH 30%	3,798	4,49	51.84 ± 1.30	178.56 ± 3.62
3. F3A	1,3 PDO 60%	3,386	3,03	28.88 ± 1.83	206.14 ± 5.66
4. F5A	NADES, 1:3 betaina-PDO	8,37	9,46	36.53 ± 1.67	171.78 ± 6.80
5.F1AA	EtOH 50%	11,26	7,97	126.53 ± 1.19	318.79 ± 2.91
6.F2AA	NADES , 1:3 betaina-PDO	22,63	17,34	20.73 ± 0.93	284.44 ± 4.79

*Notatii tabel: 1. baza de emulsie; 2. emulsie cu extract alcoolic *A. oleracea*; 3. emulsie cu extract în 1,3-propanediol (PDO) a *A. oleracea*; 4. emulsie cu extract în NADES a *A. oleracea*; 5. emulsie cu extract alcoolic de *A. annua*; 6. emulsie cu extract în NADES *A. annua*

Aceste rezultate confirmă că solventul utilizat pentru extracție joacă un rol determinant nu doar asupra conținutului de compuși fenolici ci și asupra modului în care activitatea antioxidantă a acestora se exprimă în emulsii cosmetice. Astfel ca activitatea antioxidantă a produsului cosmetic finit nu depinde doar de conținutul total de polifenoli al activelor incorporate, ci și de accesibilitatea și reactivitatea acestora în funcție de natura solventului și de tipul radicalilor utilizați.

II.7.7. Testarea permeabilității cutanate *in vitro* utilizând celula Franz

II.7.7.2. Determinarea permeabilității formulărilor cu extracte de *Acmella oleracea*

Rezultatele testelor de permeație cu celula Franz au arătat diferențe marcante între emulsii, diferențe ce pot fi explicate printr-o combinație de factori: compoziția extractelor, natura solventului de extracție, natura vehiculului de livrare (emulsia), vâscozitatea fazei continue și modul în care acestea influențează difuzia termodinamică a polifenolilor și flavonoidelor.

Rezultatele obținute arată că solventul de extracție și vehiculul de livrare influențează decisiv permeația polifenolilor din *A. oleracea*. Extractul hidroalcoolic a prezentat o permeație rapidă și constantă, favorizată de etanol și de compuși mici și lipofili. În cazul extractului în 1,3-propanediol, permeația a fost mai lentă și selectivă, limitată la flavonoizi, din cauza vâscozității și interacțiunilor solut-solvent. Pentru extractul în NADES, permeația a fost foarte slab detectabilă, cu valori negative inițiale, ceea ce sugerează retenție locală crescută în epidermă și derm. Acest comportament confirmă nu doar rolul NADES ca solvenți verzi de extracție, ci și potențialul lor de a funcționa ca vehicule selective, capabile să moduleze diferențiat livrarea substanțelor active: polifenolii sunt reținuți local, constituind un rezervor antioxidant, în timp ce molecule precum spilantholul pot difuza mai departe, până la nivel dermic, unde își exercită efectul miorelaxant.

II.7.7.3. Determinarea permeabilității formulărilor cu extracte de *D. carota* subsp. *carota*

Comportamentul emulsiilor cu extract hidroalcoolic de *D. carota* subsp. *carota* a urmat un tipar foarte asemănător cu cel observat pentru *A. oleracea*, ceea ce sugerează că diferențele majore de permeație nu sunt dictate doar de compoziția fitochimică specifică, ci mai ales de tipul de solvent în care este realizat extractul vegetal și de vehiculul de livrare (emulsia). În ambele cazuri, extractele hidroalcoolice au prezentat permeație clară și constantă a polifenolilor și flavonoidelor (Figura II.7.6.).

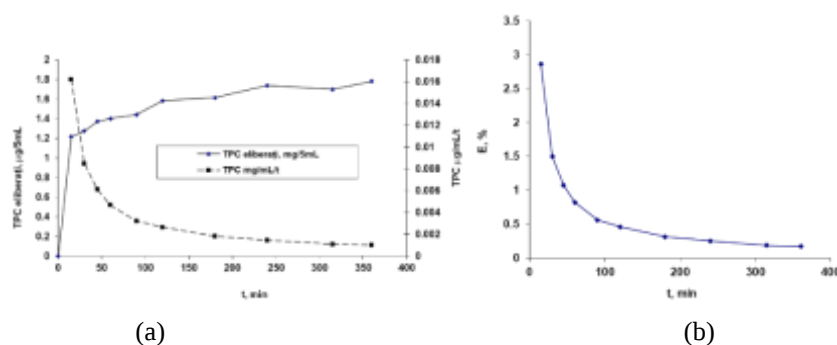
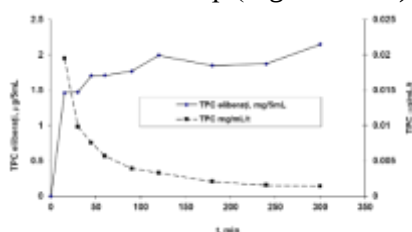


Figura II.7.6. (a) Cantitatea de polifenoli (TPC) eliberați în compartimentul receptor (5 mL) de către emulsia cu extract hidroalcoolic de *D. carota* subsp. *carota* (mg TPC / 5 mL -linia continuă) și viteza de eliberare a polifenolilor (mg TPC / mL/t -linia punctată), în funcție de timp. **(b)** Eficiența permeației polifenolilor din emulsie (E%)

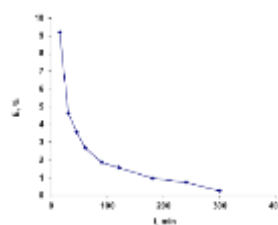
Pentru emulsia cu 3% extract în 1,3 propanediol, valorile pentru polifenoli au rămas negative până la minutul 180, fiind detectați abia la 240 min (0,075), cu o creștere modestă ulterior (0,140 la 360 min). Acest profil indică o permeație foarte lentă, cu un timp de întârziere considerabil și o disponibilitate redusă a polifenolilor la interfața piele-vehicul. În schimb, flavonoidele au fost detectabile încă de la primele prelevări și au arătat o creștere constantă, ajungând la valori de 0,272–0,266 spre final, ceea ce arată că anumite fracțiuni flavonoidice, mai ales agliconii, au capacitatea de a difuza chiar și printr-un vehicul polar și vâcos precum 1,3-propanediolul (Tabel II.7.11).

II.7.7.4. Determinarea permeabilității pentru formulările cu extracte de *A. annua*

În cazul emulsiei cu extract hidroalcoolic de *A. annua*, compușii polifenolici au traversat pielea de pui într-un ritm susținut, încă din primele momente ale experimentului. Acest comportament confirmă că solventul hidroalcoolic favorizează atât eliberarea din matrice, cât și pătrunderea prin stratul cornos, datorită efectelor bine-cunoscute ale etanolului: reducerea rezistenței difuzionale a emulsiei, modificarea organizării lipidice a barierei cutanate și creșterea concentrației locale a solutului la interfață. Nivelurile ridicate înregistrate chiar și după 6 ore arată că sistemul a reușit să mențină un flux constant, combinând efectul inițial de accelerare indus de etanol cu formarea unui depozit cutanat care alimentează difuzia în timp (Figura II.7.5.).



(a)



(b)

Figura II.7.7. (a) Cantitatea de polifenoli (TPC) eliberați în compartimentul receptor (5 mL) (mg TPC /5 mL - linia continuă) și viteza de eliberare a polifenolilor (mg TPC /mL/t - linia punctată), în funcție de timp; **(b)** Eficiența permeației polifenolilor din emulsie (E%)

În schimb, emulsia formulată cu extractul în NADES a arătat un cu totul alt tipar: valorile pentru polifenoli au rămas la limita de detecție, după primele două intervale de timp negative, dar nu au conturat o evoluție cumulativă clară (Tabelul II.7.11.).

II.7.7.5. Concluzii privind testarea permeabilității emulsiilor cu extracte vegetale cu celula Franz

Rezultatele testelor de permeație prin celula Franz au demonstrat că tipul de solvent de extracție și natura vehiculului de livrare influențează decisiv disponibilitatea cutanată a polifenolilor și flavonoidelor. Pentru toate cele trei plante studiate, (*A. oleracea*, *D. carota* subsp. *carota* și *A. annua*), extractele hidroalcoolice au prezentat o permeație rapidă și constantă, cu o valoare totuși mică, datorată atât efectului etanolului cât și a naturii polifenolilor din compoziție. Emulsiile cu extracte în 1,3-propanediol au arătat o permeație redusă și întârziată, limitată la anumite flavonoide, efect posibil explicat prin vâscozitatea vehiculului și interacțiunile solut-solvent. Emulsiile formulate în NADES au prezentat valori la început sub limita de cuantificare, mai apoi o cuantificare foarte redusă, ceea ce poate sugera o retenție locală a polifenolilor în straturile cutanate, un comportament care poate fi considerat avantajos pentru formulările cosmetice și dermatocosmetice orientate către acțiune topică, susținută, cu risc minim de absorbție sistemică.

II.7.9. Evaluarea citotoxicității și viabilității celulare a formulărilor cu extracte vegetale de *Acmella oleracea* și *Artemisia annua*

Pentru fundamentarea profilului de siguranță al extractelor selectate, incluse în emulsii, a fost utilizat un set complementar de teste *in vitro* pe fibroblaste dermice umane adulte (HDFa), un model celular cu relevanță directă pentru expunerea cutanată. Testul MTT evaluează viabilitatea celulară prin cuantificarea activității dehidrogenazelor mitocondriale, oferind un indicator robust al integrității

metabolismului oxidativ și al capacității celulelor de a reduce sărurile tetrazolice la formazan insolubil. (Barile și Cardona 1998; Bulbule și colab., 2019). În paralel, evaluarea morfologiei celulare prin microscopie fluorescentă și colorare cu calceină-AM ofera informații complementare testului MTT, evidențiind integritatea membranei celulare și activitatea esterazelor intracelulare, parametri esențiali pentru aprecierea stării funcționale a celulelor (Vasilaki și colab., 2024).

Această abordare a permis detectarea atât a modificărilor fenotipice asociate stresului celular (precum retracția citoplasmei, pierderea extensiilor sau alterarea atașării), cât și a afectării severe a viabilității celulare. Corelarea rezultatelor obținute din testul MTT cu cele provenite din analiza calceinei-AM și inspecția morfologică reduce riscul de interpretări eronate asociate utilizării unei singure metode. Cele cinci emulsii testate (Tabel II.7.11) au integrat extracte de *A. oleracea* și *A. annua*, obținute în solvenți diferiți (etanol, 1,3-propanediol și NADES), selecția acestora având ca scop inclusiv investigarea extinsă a impactului solventului asupra viabilității celulare.

Tabel II.7.11. Emulsiile selectate pentru testarea citotoxicității și viabilității celulare

Notăție probă	Planta	Solventul folosit pentru extracție, v/v	Procent de extract în emulsie
1. F1A	<i>A. oleracea</i> (Maxim și colab., 2025b)	EtOH 30%	5
2. F1B		1,3 PDO 60%	5
3. F5A		NADES (1:3 betaina-PDO)	3
4.F1AA	<i>A. annua</i>	EtOH 50%	3
5.F2AA	<i>A. annua</i>	NADES (1:3 betaina-PDO)	3

*PDO – 1,3 propendiol

Se poate observa din Figura II.7.8. faptul că extractele testate nu prezintă efecte citotoxice asupra fibroblastelor, viabilitatea celulară înregistrând valori de peste 95% comparative cu celulele de control, neexpuse extractelor, pentru toate cele 3 concentrații testate, în cele trei zile de testare.

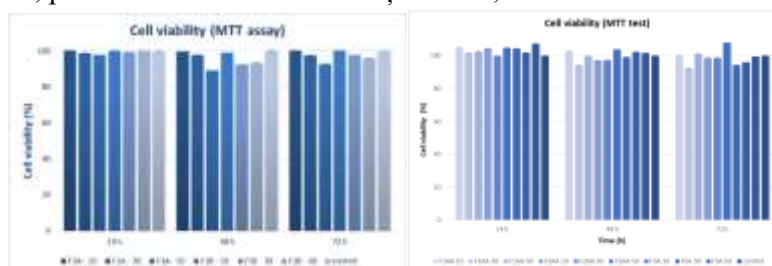


Figura II.7.8. Testarea viabilității celulare folosind testul MTT

Aceste valori ridicate ale absorbției MTT sugerează păstrarea activității mitocondriale și absența afectării metabolice semnificative, ceea ce indică o tolerabilitate celulară bună a extractelor, indiferent de solventul utilizat pentru obținerea acestora (etanol, 1,3-propanediol sau NADES). Prin urmare, rezultatele confirmă faptul că extractele vegetale integrate în emulsii, în concentrații uzuale pentru aplicații dermato-cosmetice, nu afectează viabilitatea fibroblastelor și pot fi considerate non-citotoxice în condițiile testului MTT.

II.7.9.2. Evaluarea morfologiei celulare

Pentru evaluarea efectelor extractelor testate asupra morfologiei celulare, celulele HDFa au fost cultivate și distribuite în plăci de 48 de godeuri, în aceleași condiții ca cele prezentate pentru testul MTT. Acestea au fost expuse la cele 3 concentrații (10 μ l, 30 μ l, 50 μ l) timp de 72 h după care s-a evaluat morfologia și viabilitatea celulară prin colorarea cu calceină AM.

Rezultatele obținute în urma evaluării morfologiei celulare, prezentate în Figura II.7.9 și II.7.10., arată că fibroblastele HDFa expuse la emulsiile testate nu prezintă modificări semnificative față de celulele martor, neexpuse. Morfologia celulară a fost păstrată în toate condițiile analizate, indiferent de tipul de emulsie și concentrația utilizată. Celulele au rămas bine aderente la substrat, au prezentat o

formă tipică fusiformă, extensii citoplasmatic bine conturate și nucleu rotunzi, omogeni, fără semne de condensare sau fragmentare.

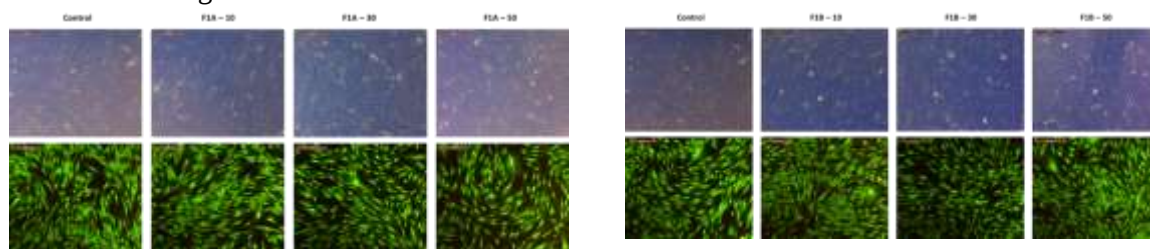


Figura II.7.9. Evaluării morfologiei celulare pentru formulele F1A și F1B cu extract de *A. oleracea* (Maxim și colab., 2025b)

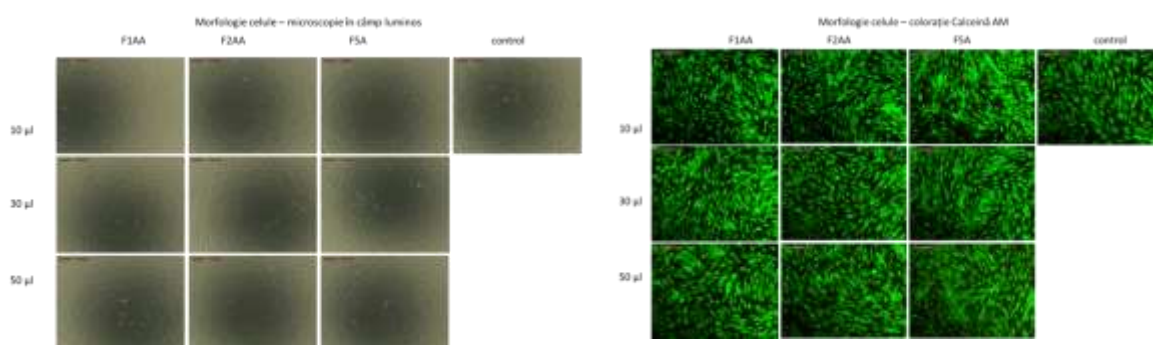


Figura II.7.10. Evaluării morfologiei celulare pentru formulele F1AA și F2AA cu extract de *A. annua* și formula F5A cu extract de *A. oleracea*

Capitolul II.8.

Transpunerea rezultatelor cercetărilor sub formă de produs pe piața economică

II.8.2. Introducerea pe piața din Uniunea Europeană a produselor (dermato)cosmetice

Introducerea pe piața din Uniunea Europeană a produselor (dermato)cosmetice este reglementată de Regulamentul (CE) nr. 1223/2009 privind produsele cosmetice, adoptat în 2009 și intrat în vigoare la 11 iulie 2013. Acesta cuprinde mai multe cerințe referitoare la siguranța, etichetarea și Persoana Responsabilă de punerea pe piață, proces ce include mai multe etape esențiale (Regulamentul (CE) nr. 1223/2009, 2009) (Figura II.8.1.).

Astfel, formularea produsului (dermato)cosmetic trebuie să respecte listele de substanțe interzise sau restricționate și să includă doar ingrediente permise, acestea regăsindu-se în Anexa II (substanțele interzise complet), Anexa III (substanțele restricționate) și Anexele IV-VI (conservanții, coloranții și filtrele UV).



Figura II.8.1. Etapele de dezvoltare și lansare a unui produs cosmetic (adaptare după Cosmetics Business, „Streamlining regulatory throughout product development”, 2021)

II.8.4. Translația cercetării în produse (dermato)cosmetice finite



Figura II.8.2. Forma finală a produsului cosmetic introdus pe piață cu denumirea comercială de **Phyto Retinol**

Formula finală a emulsiei prezentate în Capitolul II.6. a fost transpusă în produs finit și introdusă pe piață sub denumirea comercială **Phyto-Retinol**, ca emulsie (dermato)cosmetică de origine naturală destinată îngrijirii pielii, cu efect antioxidant și anti-aging, susținut de complexul activ N-Prolyl Palmitoyl Tripeptide-56 Acetate în asociere cu bakuchiol.

Pornind de la rezultatele obținute în cadrul studiului asupra extractelor din *A. oleracea*, aceste date au constituit fundamentul dezvoltării unei linii dedicate pielii mature, lansată sub denumirea **Spilanthèra™**. Gama este în acest stadiu formată din două produse complementare o emulsie de zi și o emulsie pentru zona periorculară, produse ce care urmează să parcurgă etapele finale în vederea introducerii pe piață.



Figura II.8.3. Emulsiile din gama *Spilanthèra™* ce urmează a fi introduse pe piață.

În perspectivă, gama *Spilanthèra™* va fi extinsă prin dezvoltarea unor formule destinate îngrijirii de noapte și îngrijirii corporale, pentru a se constitui ca un sistem complet de suport (dermato)cosmetic.

Această linie valorifică proprietățile neuromodulatoare ale spilantholului cunoscute în literatura de specialitate sub denumirea de „botox-like” precum și capacitatea antioxidantă a extractelor, evidențiate în studiile experimentale din capitolele anterioare. Conceptul formulativ urmărește o abordare integrată a proceselor de îmbătrânire cutanată, prin reducerea stresului oxidativ, diminuarea micro-tensiunilor musculare subdermice, susținerea fermității pielii și îmbunătățirea calității texturale și expresive a tegumentului, cu scopul de a restabili aspectul uniform, suplu și luminos al pielii.

În mod similar, rezultatele obținute asupra extractelor din *D. carota* subsp. *carota* și *A. annua*, analizate în cadrul tezei din perspectiva profilului fitochimic, capacității antioxidante și potențialului de modulare a răspunsurilor inflamatorii, constituie baza dezvoltării unor viitoare game dermatocosmetice dedicate tipurilor de piele sensibilă, reactivă sau expusă stresului oxidativ.

Capitolul II.9.

CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE

Teza s-a axat pe investigarea unor strategii de obținere și valorificare a extractelor vegetale, având ca punct de plecare selectarea unor specii cu potențial bioactiv relevant și continuând cu optimizarea proceselor de extracție în vederea obținerii unor ingrediente funcționale compatibile cu aplicațiile dermatocosmetice. Demersul experimental a urmărit:

- Evidențierea modului în care parametrii de extracție și natura solventului influențează compoziția fitochimică și activitatea biologică a extractelor,
- Comportamentul acestora în sisteme de formulare complexe.

În concordanță cu obiectivul general al tezei, cercetarea s-a axat pe obținerea și caracterizarea unor extracte vegetale obținute din *Acmella oleracea*, *Daucus carota* subsp. *carota* și *Artemisia annua*, în vederea valorificării acestora ca ingrediente active „ready to use”, în aplicații de cosmetică activă, demers susținut de obiectivele stabilite.

În acest context, cercetarea valorifică solvenți emergenți, precum sistemele NADES, selectați pentru capacitatea lor de a influența nu doar eficiența extractivă, ci și stabilitatea și comportamentul funcțional al extractelor în formulări dermatocosmetice.

Demersul experimental a inclus obținerea și caracterizarea extractelor vegetale, formularea sistemelor de livrare sub forma de emulsii și investigarea proprietăților funcționale relevante, cu accent pe stabilitate, activitate antioxidantă, siguranță microbiologică și permeație cutanată.

Pentru atingerea obiectivului general, cercetarea a fost structurată pe mai multe direcții complementare, incluzând caracterizarea botanică și fitochimică a speciilor vegetale studiate, optimizarea proceselor de extracție utilizând solvenți compatibili cu aplicațiile dermatocosmetice și

evaluarea parametrilor de extracție. Compoziția fitochimică și activitatea antioxidantă a extractelor obținute au constituit criterii esențiale pentru selecția acestora în vederea integrării în sisteme de livrare cutanată.

Ulterior, extractele selectate au fost încorporate în emulsii O/W, acestea fiind ulterior evaluate din punct de vedere al stabilității fizico-chimice, siguranței microbiologice și capacității antioxidante. Investigarea permeației și retenției cutanate, completată de testele de citotoxicitate, au permis aprecierea relevanței biologice și a siguranței în contextul aplicării topice. Corelarea parametrilor fitochimici, biologici și de formulare au constituit etapa finală a demersului experimental, orientată spre identificarea extractelor cu potențial optim pentru utilizare în cosmetica activă.

Prin abordarea integrativă propusă, prezenta teză contribuie la extinderea cunoașterii existente prin corelarea sistematică a parametrilor de extracție, a compoziției fitochimice și a comportamentului extractelor vegetale în sisteme de livrare topică, oferind o perspectivă aplicativă asupra modului în care aceste extracte își pot exprima eficiența biologică în condiții reale de formulare dermatocosmetică.

În ansamblu, teza conturează o schimbare de paradigmă în designul produsului dermatocosmetic, abordând extractele vegetale nu ca simple surse de compuși bioactivi, ci ca elemente funcționale integrate într-un sistem coerent, în care procesul de obținere, formularea și evaluarea biologică sunt interdependente și determinante pentru performanța finală a produsului.

II.9.7. Concluzii Finale

- ✓ Studiul realizat a demonstrat că plantele selectate (*Acmella oleracea*, *Artemisia annua* și *Daucus carota* subsp. *carota*) reprezintă surse valoroase de compuși bioactivi, cu relevanță reală pentru aplicații dermatocosmetice orientate spre combaterea stresului oxidativ cutanat.
- ✓ Metodele de extracție aplicate au permis obținerea unor extracte bogate în polifenoli și flavonoide, cu profiluri distincte în funcție de solventul utilizat, evidențiind rolul determinant al solventului asupra compoziției și comportamentului biologic ulterior al extractelor.
- ✓ Integrarea extractelor vegetale obținute experimental în emulsii, ca sisteme de livrare, a fost realizată cu succes, fără a compromite stabilitatea fizico-chimică a formulărilor, confirmând compatibilitatea extract-vehicul în condiții dermatocosmetice.
- ✓ Evaluarea activității antioxidante a arătat că eficiența antioxidantă a produsului finit nu este determinată exclusiv de conținutul total de polifenoli, ci de măsura în care acești compuși sunt disponibili și pot participa efectiv la reacțiile antioxidante în cadrul emulsiei formulate.
- ✓ Solventul de extracție influențează decisiv modul în care activitatea antioxidantă a extractelor se exprimă după formulare, conducând la profile antioxidante diferite în produsul dermatocosmetic final.
- ✓ Testele de permeație *in vitro* au evidențiat că, în emulsiile formulate care conțin extracte obținute în NADES și 1,3-propanediol, profilurile distincte de permeație transcutanată și retenție locală rezultă dintr-un cumul de factori, incluzând natura solventului, distribuția compușilor bioactivi în emulsie și interacțiunile extract-emulsie, care influențează mobilitatea și disponibilitatea acestora la nivel cutanat.
- ✓ Din perspectivă dermatocosmetică, retenția controlată a compușilor antioxidanți în straturile cutanate superficiale s-a dovedit un rezultat favorabil, susținând o acțiune locală eficientă și reducerea riscului de absorbție sistemică.
- ✓ Rezultatele obținute arată că utilizarea sistemelor NADES influențează distribuția cutanată a compușilor bioactivi după formulare, generând profile distincte de permeație și retenție locală, cu relevanță directă pentru dezvoltarea formulărilor dermatocosmetice funcționale.
- ✓ Evaluarea siguranței biologice a indicat că extractele obținute în NADES și 1,3-propanediol, integrate în emulsii, sunt bine tolerate de fibroblastele dermice umane, fără efecte citotoxice sau modificări morfologice semnificative, susținând utilizarea acestor solvenți neconvenționali în formulări dermatocosmetice.

- ✓ Corelarea rezultatelor de viabilitate celulară cu cele de stabilitate și permeație confirmă că formulările dezvoltate îndeplinesc cerințele fundamentale de siguranță pentru utilizare dermatocosmetică.
- ✓ Abordarea experimentală integrată, care a combinat extracția, formularea, evaluarea funcțională și testarea biologică, a permis o validare coerentă a extractelor ca ingrediente active în emulsiile dermatocosmetice și susține ideea că formularea este un factor cheie în transformarea unui extract vegetal dintr-un simplu amestec biochimic într-un ingredient activ cu eficiență demonstrabilă la nivel cutanat.
- ✓ Rezultatele finale ale cercetării demonstrează că utilizarea sistemelor NADES, alături de solvenți alternativi precum 1,3-propanediol, permite nu doar optimizarea proceselor de extracție, ci și controlul comportamentului biologic al compușilor bioactivi după integrarea în emulsii dermatocosmetice. Prin optimizarea formulării, au fost dezvoltate produse dermatocosmetice stabile și bine tolerate, fără efecte citotoxice la dozele studiate, bogate în compuși bioactivi, cu activitate antioxidantă relevantă și profiluri controlate de permeație și retenție cutanată.
- ✓ Prin corelarea etapelor de extracție, formulare și evaluare biologică, studiul creează un cadru coerent pentru transferul rezultatelor din cercetare către dezvoltarea de produse dermatocosmetice funcționale, cu potențial de valorificare economică, compatibile cu cerințele actuale de siguranță, stabilitate și eficiență funcțională.

II.9. 8. Perspective

- ✓ Datele obținute sugerează că solvenții NADES pe bază de 1,3-propanediol pot avea un rol extins în formulările (dermato)cosmetice, dincolo de funcția de solvent de extracție. Integrarea acestora în sisteme de livrare și evaluarea lor prin studii microbiologice, senzoriale și de consolidare a stabilității reprezintă direcții viitoare relevante pentru aprofundarea contribuției lor la stabilitatea și funcționalitatea produselor finale.
- ✓ Limitările testelor clasice DPPH și ABTS în caracterizarea extractelor obținute cu solvenți emergenți, precum NADES și 1,3-propanediolul, evidențiază necesitatea identificării și adaptării unor metode complementare de evaluare a activității antioxidante. Astfel de abordări ar permite o caracterizare mai fidelă a activității antioxidante atât la nivelul extractelor, cât și al formulărilor emulsionate, surprinzând mai adecvat complexitatea și funcționalitatea sistemelor dezvoltate.
- ✓ Rezultatele obținute susțin necesitatea unor studii viitoare dedicate evaluării comportamentului cutanat diferențiat al polifenolilor și spilanholului din *Acmella oleracea* vehiculați în sisteme NADES, prin modele *ex vivo* și celule Franz, pentru aprofundarea mecanismului selectiv de livrare sugerată.
- ✓ Abordarea extractelor obținute în NADES ca ingrediente cu funcționalitate orientată („delivery-by-design”) poate constitui o direcție de dezvoltare în dermatocosmetică, în care modul de livrare cutanată este influențat încă din etapa de extracție, și nu exclusiv în formularea finală. În acest context, NADES ar putea deveni parte activă a ingredientului, contribuind la stabilitatea și disponibilitatea cutanată a compușilor bioactivi, iar ajustarea compoziției sale ar permite conturarea unor profile de livrare anticipate și reproductibile.
- ✓ Integrarea NADES ca parte funcțională a ingredientului activ deschide perspectiva simplificării arhitecturii formulelor, prin reducerea numărului de excipienți necesari pentru stabilizare, solubilizare sau conservare. Această abordare ar putea contribui la optimizarea costurilor și a robusteții tehnologice a produsului finit.
- ✓ Evaluarea formulărilor pe subiecți umani constituie o direcție viitoare relevantă pentru verificarea comportamentului cutanat al ingredientelor dezvoltate, în special din perspectiva toleranței, acceptabilității și coerenței cu mecanismele de livrare sugerate de studiile experimentale.
- ✓ Dezvoltarea unor formulări complexe prin asocierea extractelor obținute în NADES cu alte ingrediente active complementare reprezintă o direcție viitoare relevantă pentru extinderea aplicabilității acestora în produse (dermato)cosmetice.

- ✓ Investigarea comportamentului cutanat al extractelor NADES în vehicule de livrare diferite de emulsiile clasice, incluzând geluri, sisteme filmogene, sisteme anhidre, sau nanoemulsiile, poate contribui la clarificarea relației dintre matricea formulării și permeabilitatea cutanată a compușilor bioactivi.
- ✓ Explorarea proprietăților biologice de interes farmacologic ale extractelor studiate, în corelație cu compoziția și modul de livrare.
- ✓ Dezvoltarea de noi produse pe baza acestor extracte și punerea lor pe piața individual sau ca parte a unor game de produse.

Bibliografie (selectie)

- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(1), 1-10.
- Alam, F., Khan, G. N., Asad, M. H. H. B. (2018). *Psoralea corylifolia* L: Ethnobotanical, biological, and chemical aspects: A review. *Phytotherapy Research*, 32(4), 597-615.
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.-M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E. H., Rollinger, J. M., Schuster, D., Breuss, J. M., Bochkov, V., Mihovilovic, M. D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V. M., Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1582-1614.
- Baldi, M., Reynaud, R., Lefevre, F., Fleury, M., Scandolera, A., Maramaldi, G. (2023). Synergistic use of bioactive agents for the management of different skin conditions: an overview of biological activities. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 27(4).
- Barile, F. A., & Cardona, M. (1998). Acute cytotoxicity testing with cultured human lung and dermal cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 34(8), 631-635.
- Barna, A. S., Maxim, C., Trifan, A., Blaga, A. C., Cimpoesu, R., Turcov, D., & Suteu, D. (2023). Preliminary Approaches to Cosmeceuticals Emulsions Based on N-ProlylPalmitoyl Tripeptide-56 Acetat-Bakuchiol Complex Intended to Combat Skin Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7004.
- Bellumori, M., Zonfrillo, B., Maggini, V., Bogani, P., Gallo, E., Firenzuoli, F., Mulinacci, N., Innocenti, M. (2022). *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen: Alkylamides and phenolic compounds in aerial parts and roots of in vitro seedlings. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 220, 114991.
- Bom, S., Jorge, J., Ribeiro, H. M., & Marto, J. O. A. N. A. (2019). A step forward on sustainability in the cosmetics industry: A review. *Journal of cleaner production*, 225, 270-290.
- Boskovic, I., Đukić, D., Mašković, P., Mandić, L. (2022). Influence of solvent type on the phenolic content and antimicrobial and antioxidant properties of *Echium vulgare* L. extracts. *Farmacia*, 70(4), 665-670.
- Bragagnolo, F. S., Strieder, M. M., Pizani, R. S., de Souza Mesquita, L. M., Gonzalez-Miquel, M., & Rostagno, M. A. (2024). Revisiting natural deep eutectic solvents (NADES) as extraction media and ready-to-use purposes. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 175, 117726.
- Brusotti, G., Cesari, I., Dentamaro, A., Caccialanza, G., Massolini, G. (2014). Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: the role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 218-228.
- Bulbule, A. M., Mandroli, P. S., Bhat, K. G., Bogar, C. M. (2019). In vitro evaluation of cytotoxicity of *Emblica officinalis* (amla) on cultured human primary dental pulp fibroblasts. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 37(3), 251-257.
- Butkeviciute, A., Ramanauskiene, K., Kurapkiene, V., Janulis, V. (2022). Dermal penetration studies of potential phenolic compounds ex vivo and their antioxidant activity *in vitro*. *Plants*, 11(15), 1901.
- Cannavacciuolo, C., Pagliari, S., Frigerio, J., Giustra, C. M., Labra, M., & Campone, L. (2022). Natural deep eutectic solvents (NADESs) combined with sustainable extraction techniques: a review of the green chemistry approach in food analysis. *Foods*, 12(1), 56.
- Canton, M., Poigny, S., Roe, R., Nuzillard, J. M., & Renault, J. H. (2021). Dereplication of natural extracts diluted in propylene glycol, 1, 3-propanediol and glycerin. Comparison of *Leontopodium alpinum* Cass.(Edelweiss) extracts as a case study. *Cosmetics*, 8(1), 10.
- Chandogya Upanishad. (n.d.). In *The Upanishads: A new translation* (<https://sacred-texts.com/hin/sbe01/index.htm>)
- Chaudhri, S. K., & Jain, N. K. (2009). History of cosmetics. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP)*, 3(3).
- Chemat, F., Abert Vian, M., Ravi, H. K., Khadhraoui, B., Hilali, S., Perino, S., Fabiano Tixier, A. S. (2019). Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects. *Molecules*, 24(16), 3007.

- Choi, S. Y., Lee, S., Choi, W. H., Lee, Y., Jo, Y. O., Ha, T. Y. (2010). Isolation and anti-inflammatory activity of Bakuchiol from *Ulmus davidiana* var. *japonica*. *Journal of Medicinal Food*, 13(4), 1019-1023.
- Chuo, S.C., Nasir, H.M., Mohd-Setapar, S.H., Mohamed, S.F., Ahmad, A., Wani, W.A., Muddassir, M., & Alarifi, A. (2022). A Glimpse into the Extraction Methods of Active Compounds from Plants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 52(4), 667 - 696.
- Cosmetics Business, 2021. *Streamlining regulatory throughout product development*. Cosmetics Business. <https://cosmeticsbusiness.com/streamlining-regulatory-throughout-product-development-144907>
- Cosmetics Europe, & CTFA. (2004). *Guidelines on stability testing of cosmetic products*. Cosmetics Europe & Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association (CTFA).
- Csabai, J., Kolesnyk, A., Hörcsik, Z. T., Kolesnyk, O., Dobránszki, J., Cziáky, Z. (2024). A comprehensive study to identify novel active components, amino acids, and antibiotic activity of *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen. *South-Western Journal of Horticulture Biology & Environment*, 15(2).
- Csepregi, K., Kocsis, M., Hideg, É. (2013). On the Spectrophotometric Determination of Total Phenolic and Flavonoid Contents. *Acta Biologica Hungarica*, 64, 500-509.
- da Silva, L. A. L., Pezzini, B. R., Soares, L. (2015). Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L.(Lamiaceae) leaves. *Pharmacognosy Magazine*, 11(41), 96.
- Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2015). Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food chemistry*, 187, 14-19
- Das, K., Tiwari, R. K. S., Shrivastava, D. K. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2), 104-111.
- Dayan, N., & Kromidas, L. (2011). *Formulating, packaging, and marketing of natural cosmetic products*. Wiley
- de Faveri Favero, F., Basting, R. T., de Freitas, A. S., Rabelo, L. D. S. D., Nonato, F. R., Zafred, R. R. T., Sousa, I. M. de O., Queiroz, N. de C. A., Napimoga, J. T. C., Carvalho, J. E. de, Foglio, M. A. (2024). Artemisinin and deoxyartemisinin isolated from *Artemisia annua* L. promote distinct antinociceptive and anti-inflammatory effects in an animal model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 178, 117299
- de Lima Cherubim, D. J., Buzanello Martins, C. V., Oliveira Fariña, L., da Silva de Lucca, R. A. (2020). Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(1), 33-37.
- De Rossi, S., Di Marco, G., D'Agostino, A., Braglia, R., Mecca, G., Canini, A., Gismondi, A. (2023). Influence of environmental conditions on the production of nutraceuticals in Italian edible plant landraces. *Food Research International*, 165, 112483.
- Ekiert, H., Klimek-Szczykutowicz, M., Rzepiela, A., Klin, P., Szopa, A. (2022). *Artemisia* species with high biological values as a potential source of medicinal and cosmetic raw materials. *Molecules*, 27(19), 6427.
- Eloff, J. N. (1998). Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology*, 60(1), 1-8.
- Fajardo, J. B., Vianna, M. H., Polo, A. B., Comitre, M. R. C., de Oliveira, D. A., Ferreira, T. G., Silva, M. A., Lopes, N. P., & Fabri, R. L. (2025). Insights into the bioactive potential of the Amazonian species *Acmella oleracea* leaves extract: A focus on wound healing applications. *Journal of Ethnopharmacology*, 337, 118866.
- Ferreira, M. S., Magalhães, M. C., Sousa-Lobo, J. M., Almeida, I. F. (2020). Trending anti-aging peptides. *Cosmetics*, 7(4), 91
- Figueirêdo, C. B. M., Alves, L. D. S., Silva, C. C. A. R., Soares, M. F. D. L. R., Ferreira, P. A., da Silva, R. M. F., Rolim-Neto, P. J. (2015). Doseamento de flavonoides totais das partes aéreas de *Thuja occidentalis* Linn.(Cupressaceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 36(4).
- Gala, U. R. V. I., Pham, H., Chauhan, H. A. R. S. H. (2013). Pharmaceutical applications of eutectic mixtures. *J. Dev. Drugs*, 2(3), 1-2.
- García-Roldán, A., Piriou, L., Jauregi, P. (2023). Natural deep eutectic solvents as a green extraction of polyphenols from spent coffee ground with enhanced bioactivities. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1072592.
- Géa, A., Kammoun, H., Armand, V., Ghenassia, F. (2024). Guide pro de la cosmétique responsable. Dunod
- Ghenabzia, I., Hemmami, H., Amor, I. B., Zeghoud, S., Seghir, B. B., Hammoudi, R. (2023). Different methods of extraction of bioactive compounds and their effect on biological activity: A review. *International Journal of Secondary Metabolite*, 10(4), 469-494.
- Givaudan. (2018). *Cosmetic composition comprising a plant extract and a sugar compound* (US Patent No. US11278483B2). United States Patent and Trademark Office. Retrieved from <https://patents.google.com/patent/US11278483B2/en>
- González-Laredo, R. F., Sayago-Monreal, V. I., Moreno-Jiménez, M. R., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Landeros-Macias, L. F., & Rosales-Castro, M. (2023). Natural deep eutectic solvents (NaDES) as an emerging technology for the valorisation of natural products and agro-food residues: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 58(12), 6660-6673.
- Griffiths, W. J., Karu, K., Hornshaw, M., Woffendin, G., & Wang, Y. (2007). Metabolomics and metabolite profiling: past heroes and future developments. *European journal of mass spectrometry*, 13(1), 45-50.

- Grochowski, D. M., Uysal, S., Aktumsek, A., Granica, S., Zengin, G., Ceylan, R., Locatelli, M., & Tomczyk, M. (2017). In vitro enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical profile of *Potentilla thuringiaca*. *Phytochemistry Letters*, 20, 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.03.005>
- Grubešić, R. J., Vuković, J., Kremerb, D., Vladimir-Knežević, S. (2007). Flavonoid Content Assay: Prevalidation and Application on *Plantago L.* Species. *Acta Chimica Slovenica*, 54(2).
- Gupta, A., Naraniwal, M., Kothari, V. (2012). Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International Journal of Applied and Natural Sciences*, 1(1), 8-26.
- Hakim, A. R., Saputri, R. (2020). Narrative Review: Optimization of Ethanol as a Solvent for Flavonoids and Phenolic Compounds. *Jurnal Surya Medika (JSM)*, 6(1), 177-180.
- Hashemi, B., Shiri, F., Švec, F., & Nováková, L. (2022). Green solvents and approaches recently applied for extraction of natural bioactive compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 157, 116732.
- Hikmawanti, N. P. E., Ramadon, D., Jantan, I., & Mun'im, A. (2021). Natural deep eutectic solvents (NADES): Phytochemical extraction performance enhancer for pharmaceutical and nutraceutical product development. *Plants*, 10(10), 2091.
- Hlihor, R. M., Roșca, M., Hagi-Zaleschi, L., Simion, I. M., Daraban, G. M., Stoleru, V. (2022). Medicinal plant growth in heavy metals contaminated soils: Responses to metal stress and induced risks to human health. *Toxics*, 10(9), 499.
- Humadi, S. S., & Istudor, V. (2009). *Lythrum salicaria* (purple loosestrife). Medicinal use, extraction and identification of its total phenolic compounds. *Farmacia*, 57(2), 192-200.
- Humulescu, I. O., Flutur, M. M., Cioanca, O., Mircea, C., Robu, S., Marin-Batir, D., Vlase, L., & Hancianu, M. (2021). Comparative chemical and biological activity of selective herbal extracts. *Farmacia*, 69(5).
- Iordanescu, O., Alexa, E., Micu, R., Poiana, M. A. (2012). Bioactive compounds and antioxidant properties at different maturity stages of apple cultivars from Romania. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 10(1).
- Ivanović, M., Islamčević Razboršek, M., & Kolar, M. (2020). Innovative extraction techniques using deep eutectic solvents and analytical methods for the isolation and characterization of natural bioactive compounds from plant material. *Plants*, 9(11), 1428.
- Ivkovic, D., Cvijetic, I., Radoicic, A., Stojkovic-Filipovic, J., Trifkovic, J., Krstic Ristivojevic, M., & Ristivojevic, P. (2024). NADES-Based Extracts of Selected Medicinal Herbs as Promising Formulations for Cosmetic Usage. *Processes*, 12(5), 992.
- Jibhkate, Y. J., Awachat, A. P., Lohiya, R., Umekar, M. J., Hemke, A. T., Gupta, K. R. (2023). Extraction: An important tool in the pharmaceutical field. *International Journal of Science and Research Archive*, 10(1), 555-568.
- Kadam Vaishali, S., Chintale Ashwini, G. D. K. P., Deshmukh Kshitija, P., Nalwad Digambar, N. (2013). Cosmeceuticals an emerging concept: A comprehensive Review. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 3(2), 308-316.
- Kerdudo, A., Fontaine-Vive, F., Dingas, A., Faure, C., Fernandez, X. (2015). Optimization of cosmetic preservation: water activity reduction. *International Journal of Cosmetic Science*, 37(1), 31-40.
- Kowalczyk, S., Grymel, M., Bilik, J., Kula, W., Wawoczny, A., Grymel, P., Gillner, D. (2024). Selected Plants as Sources of Natural and Active Ingredients for Cosmetics of the Future. *Applied Sciences*, 14(8), 3487.
- Krenisky, J. M., Luo, J., Reed, M. J., Carney, J. R. (1999). Isolation and antihyperglycemic activity of bakuchiol from *Otholobium pubescens* (Fabaceae), a peruvian medicinal plant used for the treatment of diabetes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 22(10), 1137-1140.
- Kusumawati, I., & Indrayanto, G. (2013). Natural antioxidants in cosmetics. *Studies in natural products chemistry*, 40, 485-505.
- Lee, J. H., Park, J., Shin, D. W. (2022). The molecular mechanism of polyphenols with anti-aging activity in aged human dermal fibroblasts. *Molecules*, 27(14), 4351.
- Lim, J. R., Chua, L. S., & Mustaffa, A. A. (2022). Ionic liquids as green solvent and their applications in bioactive compounds extraction from plants. *Process Biochemistry*, 122, 292-306.
- Luca, S. V., Kulinowski, Ł., Ciobanu, C., Zengin, G., Czerwińska, M. E., Granica, S., Xiao, J., Skalicka-Woźniak, K., Trifan, A. (2022). Phytochemical and multi-biological characterization of two *Cynara scolymus L.* varieties: A glance into their potential large scale cultivation and valorization as bio-functional ingredients. *Industrial Crops and Products*, 178, 114623.
- Matić, P., Jakobek, L. (2021). Spectrophotometric Folin-Ciocalteu and aluminium chloride method validation for the determination of phenolic acid, flavan-3-ol, flavonol, and anthocyanin content. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 13(2), 176-183.
- Maxim, C.,** Turcov, D., Luca, A., Butnaru, M., Apreutesei, O. T., Cretu, R. M., Zbranca-Toporas, A., Suteu, D. (2025). Dermatocosmetic emulsions based on *Acmella oleracea* extract: biocompatibility and tolerability studies. *Farmacia*, 73(3), 971-978.
- Maxim, C.** (2022). *Preparate cosmetice cu proprietăți de anti-îmbătrânire cutanată* (Teză de disertație, Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași, Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului „Cristofor Simionescu”).

- Maxim, C.,** Apreutesei, O. T., Cretu, R. M., Blaga, A. C., Turcov, D., Suteu, D., Barna, A. S. (2025). Characterization of the alcoholic phytoextracts from wild carrot (*Daucus carota* L.) with potential applicability as active in cosmetics. *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 26(2), 141–150.
- Maxim, C.,** Badeanu, M., Turcov, D., Suteu, D. (2025). Potential of *Artemisia annua* hydroalcoholic extracts in skin care and dermatocosmetic products. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 53(4), 14788.
- Maxim, C.,** Blaga, A. C., Cimpoeșu, R., Zinicovscaia, I., Peshkova, A., Danu, M., Barna, A. S., Șuteu, D. (2024d). Natural antioxidants from *Acmella oleracea* extract as dermatocosmetic actives. *Scientia Pharmaceutica*, 92(3), 52.
- Maxim, C.,** Blaga, A. C., Tataru-Farmus, R. E., & Suteu, D. (2024c). *Acmella Oleracea* Metabolite Extraction Using Natural Deep Eutectic Solvents. *Processes*, 12(8), 1686.
- Maxim, C.,** Blaga, A. C., Tataru-Farmus, R. E., & Suteu, D. (2024c). *Acmella Oleracea* Metabolite Extraction Using Natural Deep Eutectic Solvents. *Processes*, 12(8), 1686.
- Maxim, C.,** Dragoi, E. N., Blaga, A. C. Suteu, D., (2026). Sustainable phytochemical extraction from *Artemisia annua*: Integrating natural deep eutectic solvents with machine learning optimization. – in press,
- Maxim, C.,** Trifan, A., Suteu, D. (2024b). Obtaining and characterization of propanediol phytoextracts from *Acmella oleracea*. *Studia Universitatis Babes-Bolyai, Chimia*, 69(3).
- Maxim, C.,** Turcov, D., Luca, A., Butnaru, M., Apreutesei, O. T., Cretu, R. M., Zbranca-Toporas, A., Suteu, D. (2025). Dermatocosmetic emulsions based on *Acmella oleracea* extract: biocompatibility and tolerability studies, *Farmacia*, 73(3), 971-978
- Maxim, C.,** Turcov, D., Trifan, A., Suteu, D., & Barna, A. S. (2024a). Preliminary characterization of the phytoextracts from *Acmella oleracea* with therapeutic potential and applicability in active cosmetics. *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 25(2), 169-182.
- McMullen, R. L., & Dell'Acqua, G. (2023). *History of natural ingredients in cosmetics*. *Cosmetics*, 10(3), 71.
- Mosić, M., Dramićanin, A., Ristivojević, P., & Milojković-Opšenica, D. (2020). Extraction as a critical step in phytochemical analysis. *Journal of AOAC International*, 103(2), 365-372.
- Moura, J. D. S., Gemaque, E. D. M., Bahule, C. E., Martins, L. H. D. S., Chisté, R. C., Lopes, A. S. (2023). Bioactive compounds of Jambu (*Acmella oleracea* (L.) RK Jansen) as potential components of biodegradable food packing: a review. *Sustainability*, 15(21), 15231.
- Nascimento, L. E. S., Arriola, N. D. A., da Silva, L. A. L., Faqueti, L. G., Sandjo, L. P., de Araújo, C. E. S., Biavatti, M. W., Barcelos-Oliveira, J. L. Amboni, R. D. D. M. C. (2020). Phytochemical profile of different anatomical parts of jambu (*Acmella oleracea* (L.) RK Jansen): A comparison between hydroponic and conventional cultivation using PCA and cluster analysis. *Food Chemistry*, 332, 127393.
- Naser, W. (2020). Recently Emerged Bioactive Cosmeceuticals for Skin Rejuvenation: AReview. *Pharmacology Online*, 2, 243-250.
- Nawaz, H., Shad, M. A., Rehman, N., Andaleeb, H., Ullah, N. (2020). Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56, e17129.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770-803.
- Ohno, O., Watabe, T., Nakamura, K., Kawagoshi, M., Uotsu, N., Chiba, T., Yamada, M., Yamaguchi, K., & Uemura, D. (2010). Inhibitory effects of bakuchiol, bavachin, and isobavachalcone isolated from *Piper longum* on melanin production in B16 mouse melanoma cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(7), 1504–1506
- Pandey, A., & Tripathi, S. (2014). Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(5), 115-119.
- Pavun, L., Uskokovic-Marković, S., Jelikić-Stankov, M., Đikanović, D., Durdević, P. (2018). Determination of flavonoids and total polyphenol contents in commercial apple juices. *Czech Journal of Food Sciences*, 36(3), 233-238.
- Payyappallimana, U. (2010). Role of traditional medicine in primary health care: an overview of perspectives and challenging. *Yokohama Journal of Social Sciences*, 14(6), 57-77.
- Pensé-Lhéritier, A.-M. (2014). Conception des produits cosmétiques: la formulation). Tec & Doc Lavoisier. (p. 138-139).
- Perez, M., Domínguez-López, I., Lamuela-Raventós, R.M. (2023). The chemistry behind the Folin–Ciocalteu method for the estimation of (poly)phenol content in food: total phenolic intake in a mediterranean dietary pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71, 17543 – 17553
- Pérez-Arantegui, J. (2021). Not only wall paintings—pigments for cosmetics. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 13(11), 189.
- Personal Care Products Council. (n.d.). *European glossary of common ingredient names for use in the labelling of cosmetics*. Personal Care Products Council, disponibil online la: <https://www.personalcarecouncil.org/>
- Petkov, H., Trusheva, B., Krustanova, S., Grozdanova, T., Popova, M., Alipieva, K., & Bankova, V. (2022, August). Green extraction of antioxidants from natural sources with natural deep eutectic solvents. *In Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences* (Vol. 75, No. 8, pp. 1129-1137).

- Pietrzak, W., & Nowak, R. (2021). Impact of harvest conditions and host tree species on chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Viscum album* L. *Molecules*, 26(12), 3741.
- Rähse, W. (2020). Cosmetic creams: development, manufacture and marketing of effective skin care products. John Wiley & Sons.
- Rähse, W., & Dicci, O. (2009). Produktdesign disperser Stoffe: Emulsionen für die kosmetische Industrie. *Chemie Ingenieur Technik*, 81(9), 1369-1383.
- Ratz-Lyko, A., Arct, J., Majewski, S., Pytkowska, K. (2015). Influence of polyphenols on the physiological processes in the skin. *Phytotherapy Research*, 29(4), 509-517.
- Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. Official Journal of the European Union, L 342, 22 December 2009
- Riaz, R., Zucca, P., Rescigno, A., Peddio, S., Saleem, R.S., & Batool, S. (2020). Plants as a Promising Reservoir of Tyrosinase Inhibitors. *Mini-reviews in Organic Chemistry*, 17.
- Rozas, S., Benito, C., Alcalde, R., Atilhan, M., & Aparicio, S. (2021). Insights on the water effect on deep eutectic solvents properties and structuring: The archetypical case of choline chloride+ ethylene glycol. *Journal of Molecular Liquids*, 344, 117717.
- Sadiq, A., Hayat, M. Q., Ashraf, M. (2013). Ethnopharmacology of *Artemisia annua* L.: A review. *Artemisia Annua-Pharmacology and Biotechnology*, 9-25.
- Salam, A. M., Lyles, J. T., & Quave, C. L. (2018). Methods in the extraction and chemical analysis of medicinal plants. In *Methods and techniques in ethnobiology and ethnoecology* (pp. 257-283). New York, NY: Springer New York.
- Saravanabavan, N., Salwe, K. J., Codi, R. S., & Kumarappan, M. (2020). Herbal extraction procedures: Need of the hour. *Int. J. Basic Clin. Pharmacol*, 9(7), 1135.
- Schafer, N., Balwierz, R., Biernat, P., Ochędzan-Siodłak, W., Lipok, J. (2023). Natural ingredients of transdermal drug delivery systems as permeation enhancers of active substances through the stratum corneum. *Molecular Pharmaceutics*, 20(7), 3278-3297.
- Schagen, S. K. (2017). Topical peptide treatments with effective anti-aging results. *Cosmetics*, 4(2), 16
- Septembre-Malaterre, A., Lalarizo Rakoto, M., Marodon, C., Bedoui, Y., Nakab, J., Simon, E., Hoarau, L., Savriama, S., Strasberg, D., Guiraud, P., Selambarom, J., Gasque, P. (2020). *Artemisia annua*, a traditional plant brought to light. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 4986.
- Sharma, M., Suresh, P. S., Gupta, S. S., & Sharma, U. (2023). NADES-based selective extraction of bioactive molecules: A case study with commercially important Himalayan medicinal plant *Aconitum heterophyllum*. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 36, 101305.
- Sikora, E. (ed.) (2019). Cosmetic emulsions: monograph, Politechnika Kracowka
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178).
- Soares, L. L., Bassani, V. L., Ortega, G. G., Petrovick, P. R. (2003). Total flavonoid determination for the quality control of aqueous extractives from *Phyllanthus niruri* L. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 22(3), 203-208.
- Socas-Rodríguez, B., Torres-Cornejo, M. V., Álvarez-Rivera, G., & Mendiola, J. A. (2021). Deep eutectic solvents for the extraction of bioactive compounds from natural sources and agricultural by-products. *Applied Sciences*, 11(11), 4897.
- Soquetta, M. B., Terra, L. D. M., & Bastos, C. P. (2018). Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), 400-412.
- Sumner, L. W., Mendes, P., & Dixon, R. A. (2003). Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, 62(6), 817-836.
- Tanabe, R., Fukunaga, A. (2013). Success-history based parameter adaptation for differential evolution. In Proceedings of the IEEE Congress on Evolutionary Computation (CEC '13), 2013, pp. 71-78
- Trifan, A., Zengin, G., Brebu, M., Skalicka-Woźniak, K., & Luca, S. V. (2021). Phytochemical characterization and evaluation of the antioxidant and anti-enzymatic activity of five common spices: Focus on their essential oils and spent material extractives. *Plants*, 10(12), 2692.
- Turcov, D., Barna, A.S., Apreutesei (Ciuperca), O.T., Trifan, A., Puitel, A.C., Suteu, D. (2022): Valorization of bioactive compounds from residual Saffron biomass (*Crocus sativus* L.) for obtaining of high value added dermato-cosmetic products. *BioResource*, 17, 4730-4744.
- Turcov, D., Barna, S., Profire, L., Iacob, A. T., Lisa, G., Puițel, A. C., Zbranca, A., & Suteu, D. (2022). Physico-chemical characterization of the antioxidant mixture resveratrol-ferulic acid for applications in dermato-cosmetic products. *Farmacía*, 70(3), 410-416.
- Upton, R. (2022). Traditional herbal medicine, pharmacognosy, and pharmacopoeial standards: A discussion at the crossroads in the age of COVID. In *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine* (pp. 109-148). Elsevier.
- Vasilaki, D., Bakopoulou, A., Papadopoulou, L., Papachristou, E., Michailidis, N., Tsouknidas, A., Tsouknidas A., Dratsios S., Taylor T., Michalakis, K. (2024). Viability and proliferation assessment of gingival fibroblasts cultured on silver nanoparticle-doped Ti-6Al-4V surfaces. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 39(2).

- Vieira, V., Calhella, R. C., Barros, L., Coutinho, J. A., CFR Ferreira, I., Ferreira, O. (2020). Insights on the extraction performance of alkanediols and glycerol: Using *Juglans regia* L. leaves as a source of bioactive compounds. *Molecules*, 25(11), 2497.
- Villa, C., Caviglia, D., Robustelli della Cuna, F. S., Zuccari, G., & Russo, E. (2024). NaDES application in cosmetic and pharmaceutical fields: *An overview. Gels*, 10(2), 107.
- Yara-Varón, E., Li, Y., Balcells, M., Canela-Garayoa, R., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2017). Vegetable oils as alternative solvents for green oleo-extraction, purification and formulation of food and natural products. *Molecules*, 22(9), 1474.
- Zhang, X., Zhao, W., Wang, Y., Lu, J., Chen, X. (2016). The chemical constituents and bioactivities of *Psoralea corylifolia* Linn.: a review. *The American Journal of Chinese Medicine*, 44(01), 35-60.
- Zillich, O. V., Schweiggert-Weisz, U., Hasenkopf, K., Eisner, P., Kersch, M. (2013). Release and in vitro skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions. *International Journal of Cosmetic Science*, 35(5), 491-501.
- Zuo, J., Geng, S., Kong, Y., Ma, P., Fan, Z., Zhang, Y., & Dong, A. (2023). Current progress in natural deep eutectic solvents for the extraction of active components from plants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 53(1), 177-198.

INDEX DE ABREVIERI

ABTS – testul de captare a radicalilor 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolină)-6-sulfonic

B – betaină

BAK – bakuchiol

CTFA – Cosmetic Toiletry and Fragrance Association

DES – solvenți eutectici profunzi (*Deep Eutectic Solvents*)

DPPH – testul 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

EDX – spectroscopia cu raze X cu dispersie de energie

FTIR – spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier

GAE – echivalent acid galic

HBA – acceptor de legături de hidrogen

HBD – donator de legături de hidrogen

HDFa – fibroblaste dermice umane adulte

HPLC – cromatografie lichidă de înaltă performanță

ICP-OES – Spectrometrie de emisie optică cu plasmă cuplată inductiv

IL – lichide ionice

INCI – Nomenclatorul Internațional al Ingredientelor Cosmetice

ISO – Organizația Internațională de Standardizare

M – macerare

MTT – test de viabilitate celulară bazat pe reducerea sării tetrazoliu

MUS – macerare urmată de ultrasunete

NADES – solvenți eutectici profunzi naturali (*Natural Deep Eutectic Solvents*)

O/W – emulsii ulei/ apă

PDO – 1,3-propanediol

PP56 – N-Prolyl Palmitoyl Tripeptide-56 Acetate

QE – quercetină

R – refluxare

S/L – raport solid/lichid

SEM – microscopie electronică de scanare

SHADE- Success-History based Adaptive Differential Evolution

Sx – extracție Soxhlet

TFC – conținut total de flavonoide

TPC – conținut total de polifenoli

UFC – unități formatoare de colonii

US – extracție cu ultrasunete

USM – extracție cu ultrasunete urmată de macerare

UV – radiații ultraviolete

W/O – emulsii apă/ulei