

Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



**Formularea și caracterizarea chimică și
funcțională a unor produse farmaceutice
pentru uz extern, pe bază de compuși
naturali bioactivi și bacterii lactice
(Rezumatul tezei de doctorat)**

Doctorand,
Monica (BOEV) GĂUREANU

Conducător științific,
Prof.univ.dr.ing Gabriela Elena BHRIM

Seria I.1: BIOTEHNOLOGII Nr. 10

GALAȚI
2019

Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



**Formularea și caracterizarea chimică și
funcțională a unor produse farmaceutice
pentru uz extern, pe bază de compuși
naturali bioactivi și bacterii lactice
(Rezumatul tezei de doctorat)**

Doctorand

Monica (BOEV) GĂUREANU

Conducător științific,

Prof. univ.dr.ing. Gabriela-Elena BHRIM

Referenți științifici

Prof. univ.dr. farmacist Monica HĂNCIANU
Conf. univ.dr. ing. Lidia FAVIER
Conf. univ.dr. ing. Nicoleta Maricica MAFTEI

Seria I.1: BIOTEHNOLOGII Nr. 10

GALAȚI

2019

Seriile tezelor de doctorat susținute public în UDJG începând cu 1 octombrie 2013 sunt:

Domeniul **ȘTIINȚE FUNDAMENTALE ȘI INGINEREȘTI**

Seria I 1: **Biotehnologii**

Seria I 2: **Calculatoare și tehnologia informației**

Seria I 3: **Inginerie electrică**

Seria I 4: **Inginerie industrială**

Seria I 5: **Ingineria materialelor**

Seria I 6: **Inginerie mecanică**

Seria I 7: **Ingineria produselor alimentare**

Seria I 8: **Ingineria sistemelor**

Domeniul **ȘTIINȚE ECONOMICE**

Seria E 1: **Economie**

Seria E 2: **Management**

Domeniul **ȘTIINȚE UMANISTE**

Seria U 1: **Filologie- Engleză**

Seria U 2: **Filologie- Română**

Seria U 3: **Istorie**

Cuprins

1. Bacteriile probiotice, descriere și aplicații farmaceutice	10
1.1. Considerații generale	10
1.2. Bacteriile lactice probiotice	12
1.3. Mecanisme de acțiune in vivo	19
1.4. Utilizări terapeutice ale bacteriilor probiotice	22
2. Planta <i>Aloe vera</i> - o sursă importantă de compuși bioactivi cu valoare funcțională ...	25
2.1. Considerații generale	25
2.2. Compoziția chimică și proprietățile compușilor bioactivi	26
2.3. Efectele terapeutice și aplicații	28
3. Tendințe moderne în formularea și caracterizarea unor produse farmaceutice funcționale utilizate în tratamentul cutanat	31
3.1. Considerații generale	31
3.2. Caracterizarea generală a formelor farmaceutice semisolide bioadezive	32
3.3. Eliberarea topică a substanței active	37
3.4. Principii de formulare a produselor farmaceutice de uz topic.....	38
4. Extracția și caracterizarea compușilor bioactivi din <i>Aloe vera</i> (<i>Aloe barbadensis</i> Miller)	52
4.1. Introducere.....	52
4.2. Materiale și metode.....	53
4.2.1. Materialul vegetal și procesarea acestuia	53
4.2.2. Reactivi.....	55
4.2.3. Caracterizarea fizico-chimică a gelului proaspăt, a cortexului presat proaspăt, a gelului liofilizat și a cortexului presat liofilizat.....	55
4.2.4. Cromatografie pe strat subțire (TLC).....	61
4.2.5. Dozarea polifenolilor totali din extractul alcoolic de <i>Aloe vera</i> prin metoda spectrofotometrică Folin-Ciocalteu.....	62
4.2.6. Dozarea flavonoidelor din extractul alcoolic de <i>Aloe vera</i>	62
4.2.7. Separarea, identificarea și dozarea principalilor compuși polifenolici din extractele de <i>Aloe vera</i> prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC).....	63
4.2.8. Identificarea grupărilor funcționale din extractele de <i>Aloe vera</i> prin analiza FTIR	64
4.2.9. Prelucrarea statistică și interpretarea datelor experimentale.....	65
4.3. Rezultate și discuții	65
4.3.1. Caracteristicile morfologice ale gelului de <i>Aloe vera</i> evaluate prin microscopie confocală	65

4.3.2. Caracteristicile fizico-chimice ale materialului vegetal proaspăt	65
4.3.3. Proprietățile antioxidante.....	67
4.3.4. Proprietățile hidrocoloidale	69
4.3.5. Caracterizarea compoziției extractului etanolic din <i>Aloe vera</i> prin analiză cromatografică.....	70
4.3.6. Analiza FT-IR	72
4.4. Concluzii parțiale.....	77
5. Studiul comportamentului fermentativ și fiziologic al unor tulpini de bacterii probiotice în medii suplimentate cu <i>Aloe vera</i>.....	81
5.1. Introducere.....	81
5.2. Materiale și metode.....	81
5.2.1. Materiale	81
5.2.2. Metode de analiză, prelucrare și interpretare a datelor experimentale	83
5.2.2.1. Obținerea și conservarea culturilor pure de bacterii probiotice	83
5.2.2.2. Obținerea și dimensionarea inoculului	84
5.2.2.3. Cultivarea individuală a bacteriilor probiotice	84
5.2.2.4. Co-cultivarea a două specii de bacterii lactice probiotice în mediu minimal de cultură	84
5.2.2.5. Numărarea bacteriilor probiotice prin metoda indirectă Koch	85
5.2.2.6. Stabilirea parametrilor cinetici pentru înmulțire a bacteriilor probiotice.....	86
5.2.2.7. Metoda difuziei radiale pentru evaluarea activității antimicrobiene (metoda godeurilor)	86
5.2.2.8. Tehnica de evaluare a capacității de aderență a <i>L. plantarum</i> și <i>L. casei</i> la celule epidermale în prezența mediilor fermentate	88
5.2.2.9. Tehnica de evaluare a capacității de inhibare a aderenței unor microorganisme patogene la celulele epidermale în prezența mediilor fermentate.....	89
5.2.2.10. Prelucrarea statistică a datelor experimentale	91
5.3. Rezultate și discuții	91
5.3.1. Dinamica fermentației lactice	91
5.3.2. Dinamica de multiplicare și viabilitatea bacteriilor probiotice în timpul fermentației și păstrării mediilor fermentate	93
5.3.3. Variația pH-ului în timpul fermentației și a conservării mediului fermentat	101
5.3.4. Dinamica de multiplicare și stabilitatea bacteriilor lactice în mediul fermentat ..	103
5.3.5. Evaluarea activității antimicrobiene a mediilor fermentate	104
5.3.6. Capacitatea de aderență a tulpinilor de bacterii lactice probiotice la linia celulară HeLa-2.....	106

5.3.7. Capacitatea de aderență a tulpinilor patogene în prezența mediilor fermentate cu bacterii lactice probiotice.....	108
5.4. Concluzii parțiale.....	118
6. Formularea unui unguent inovativ pe bază de produse fermentate cu bacterii lactice probiotice și <i>Aloe vera</i>.....	123
6.1. Introducere.....	123
6.2. Materiale și metode.....	124
6.2.1. Materiale.....	124
6.2.2. Metode de investigare și prelucrare statistică a datelor experimentale.....	125
6.2.2.1. Prepararea unguentului inovativ.....	125
6.2.2.2. Determinarea proprietăților reologice ale unguentului bioactiv.....	125
6.2.2.3. Testarea viabilității tulpinilor probiotice în produsul farmaceutic bioactiv.....	127
6.2.2.4. Analiza probelor de unguent prin microscopie confocală.....	127
6.2.2.5. Testarea activității antimicrobiene a unguentului inovativ.....	128
6.2.2.6. Prelucrarea statistică a datelor experimentale.....	128
6.3. Rezultate și discuții.....	128
6.3.1. Caracterizarea organoleptică a probelor de unguent.....	128
6.3.2. Caracteristicile reologice ale unguentelor bioactive.....	129
6.3.2.1. Variația modulelor cu frecvența.....	129
6.3.2.2. Variația tensiunii de forfecare corelată cu viteza de forfecare.....	131
6.3.2.3. Tixotropia unguentelor bioactive.....	133
6.3.2.4. Variația vâscozității în funcție de viteza de forfecare și de frecvență	136
6.3.2.5. Reograme cu histerezis.....	137
6.3.3. Evaluarea proprietăților funcționale ale unguentelor bioactive formulate.....	141
6.3.3.1. Studiul viabilității bacteriilor lactice în unguente.....	141
6.3.3.2. Activitatea antimicrobiană a unguentelor bioactive.....	144
6.4. Concluzii parțiale.....	145
7. Concluzii generale.....	147
8. Contribuții la dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspective.....	149
9. Diseminarea rezultatelor cercetării.....	150
Anexe.....	158

INTRODUCERE

În ultima decadă, s-a constatat incapacitatea asigurării unor tratamente eficiente și sigure pentru diverse afecțiuni ale pielii, coroborată cu o prevalență crescută și cu manifestări premature, din primii ani de viață, ale unor boli de piele din ce în ce mai refractare la tratamentele uzuale. Cauzele, sunt plurifactoriale și sunt necesare studii avansate atât din punct de vedere medical cât și în ceea ce privește stilul de viață, asigurarea și menținerea imunității, precum și particularitățile individuale ale fiecărui organism. Cercetările în acest domeniu vizează identificarea unor alternative de tratament pentru diverse afecțiuni cutanate, non-invazive, sigure și eficiente. Pentru a evita tratamentele de lungă durată, cu produse conținând substanțe medicamentoase, care pot genera intoleranță, reacții alergice sau fragilizarea cutanată, produsele farmaceutice cu conținut de compuși biologic activi de origine vegetală pot fi o alegere sigură și viabilă, studiile din literatura de specialitate susținând numeroasele efecte terapeutice benefice pe care extractele naturale le manifestă.

Organismul uman este populat în mod natural cu o microbiotă benefică, cu efecte protectoare și imunomodulatoare. S-a demonstrat științific că una dintre cauzele apariției multiplelor afecțiuni, care afectează starea generală de sănătate, s-ar datora lipsei din microbiomul individual a unor tulpini benefice, capabile să furnizeze protecție locală și sistemică prin antagonismul față de patogeni și, totodată, prin activitatea lor metabolică, să ofere organismului substanțe postbiotice utile pentru întărirea imunității și pentru sănătatea întregului organism. La nivelul pielii sănătoase, microbiota este oarecum similară, conținând microorganisme probiotice utile colonizate prevalent pe diferite suprafețe cu particularități specifice. Apariția unor modificări nedorite la nivel cutanat este asociată cu dezechilibre din punct de vedere calitativ și cantitativ în compoziția microbiotei comensale, care sunt asociate cu particularitățile individuale, dar în primul rând cu stilul de viață la nivel global (hrană, igienă etc).

Microoganismele probiotice au nenumărate beneficii demonstrate în multitudinea de studii prezentate în literatură. Majoritatea vizează utilizarea acestora ca alimente sau nutraceutice, pentru uz intern (hrană sau suplimente). În acest context, noutatea studiilor dezvoltate în prezenta lucrarea derivă din încercarea de a demonstra eficacitatea bacteriilor probiotice prin administrare topică, externă, țintită, la locul afectat de la suprafața epidermei. Beneficiile produsului farmaceutic funcțional, inovativ, propus, rezultă din posibilitatea de a oferi un tratament natural, alternativ, acelor pacienți care au dezvoltat intoleranță la anumite substanțe chimice, care manifestă reacții alergice sau de hipersensibilizare cutanată.

Pe lângă beneficiile multiple conferite de prezența probioticelor în acest produs, prezența compușilor bioactivi din planta *Aloe vera* adaugă produsului calități suplimentare nutraceutice și terapeutice, cu nenumărate beneficii dovedite încă din antichitate și demonstrate științific de-a lungul anilor prin trial-uri randomizate pe diferite segmente de pacienți.

Teza de doctorat intitulată „**Formularea și caracterizarea chimică și funcțională a unor produse farmaceutice pentru uz extern, pe bază de compuși naturali bioactivi și bacterii lactice**”, a vizat studierea comportamentului unor specii de bacterii lactice cu dovedite proprietăți probiotice de a se adapta, prin cultivare, în medii minimale, suplimentate cu *Aloe vera* (pulbere liofilizată din frunze sau extract etanolic), cu scopul de a deveni ingrediente active în proiectarea și formularea unui produs farmaceutic pentru uz extern. Prin aplicarea unor metode analitice performante, precum analiza FT-IR și cromatografia HPLC, s-au analizat din punct de vedere calitativ și cantitativ principalii compuși biologic activi din frunzele de *Aloe vera* (varietatea *barbadensis* Miller). Produsele derivate din *Aloe vera* (pulbere liofilizată și extract etanolic 10% din pulbere liofilizată) au fost utilizate pentru suplimentarea mediilor de cultivare a bacteriilor lactice, speciile selecționate, *Lactobacillus plantarum* și *Lactobacillus casei*.

Au fost testate mai multe variante experimentale, iar produsul fermentat cu calități funcționale adecvate (capacitatea de aderență la celule HeLa, activitate antimicrobiană) s-a utilizat pentru formularea unui unguent hidrofili, pentru aplicare topică, cu scopul de a preveni, trata și vindeca diverse afecțiuni cutanate.

Studiile au avut în vedere obiective științifice formulate în acord cu studiile experimentale realizate, după cum urmează:

1. Caracterizarea fizico-chimică a produselor derivate din planta *Aloe vera* (turtă, gel, pulbere integrală liofilizată și extracte), potențiale ingrediente pentru formularea unguentului funcțional.

2. Izolarea, selecția și testarea unor bacterii lactice cu potențial fermentativ și stabilitate în medii minimale în vederea obținerii și utilizării produselor fermentate pentru efectele tribiotice (prebiotice, probiotice și postbiotice).

3. Formularea și caracterizarea unui unguent funcțional, conținând compuși bioactivi și bacterii lactice vii, cu capacitate de aderență la celulele epiteliale, cu acțiune antagonică împotriva microorganismelor patogene frecvente la suprafața pielii (*Staphylococcus aureus* și *Candida albicans*).

4. Demonstrarea prin teste *in vitro* a eficacității funcționale a ingredientelor utilizate (medii fermentate cu bacterii lactice selecționate, derivate din medii minimale suplimentate cu *Aloe vera*) și a produsului farmaceutic formulat.

Teza va fi structurată în 2 părți, după cum urmează:

I. STUDIUL DOCUMENTAR, structurat în 3 capitole, prezintă date recente din literatura de specialitate privind caracterizarea morfologică și fiziologică a bacteriilor lactice clasificate în genul *Lactobacillus* spp., a bacteriilor probiotice și descrierea caracteristicilor fizico-chimice ale compușilor bioactivi din *Aloe vera*, plantă recunoscută încă din antichitate ca având extraordinare proprietăți terapeutice, imuno-modulatoare, antiinflamatoare, antioxidante ș.a. și totodată beneficiile pentru sănătate, în special pentru calitatea epidermei, ale produselor naturale conținând bacterii lactice și compuși bioactivi din surse vegetale.

Capitolul 1, intitulat **Bacteriile probiotice, descriere și aplicații farmaceutice** vizează prezentarea principalelor beneficii demonstrate de utilizarea bacteriilor lactice probiotice, înțelegerea exhaustivă a mecanismelor de acțiune ale acestora, precum și indicațiile terapeutice majore. Deși există numeroase studii ce descriu beneficiile oferite de administrarea orală a bacteriilor probiotice, studiile recente și-au orientat atenția spre potențialele utilizări topice, prin încorporarea diferitelor tulpini de bacterii lactice probiotice în forme farmaceutice inovative pentru utilizare externă, precum ovule, emplastre, biofilme. Înțelegerea mecanismelor de acțiune și mai ales de inhibare competitivă a anumitor patogeni, pot extinde aria de utilizare a acestor probiotice.

Capitolul 2, intitulat **Planta Aloe vera - o sursă importantă de compuși bioactivi cu valoare funcțională**, vizează descrierea fito-chimică a plantei cu identificarea principalelor efecte benefice, precum și potențiale aplicații farmaceutice ale acesteia. Numeroase studii susțin multiplele efecte terapeutice pe care extractul de *Aloe vera* îl poate manifesta la nivelul pielii, motiv pentru care gelul de *Aloe vera* se regăsește ca ingredient activ în sute de produse dermato-cosmetice.

Capitolul 3, intitulat ***Tendențe moderne în formularea și caracterizarea unor produse farmaceutice funcționale utilizate în tratamentul cutanat***, face referire la caracterizarea formelor farmaceutice semisolidе bioadezive, precum și la principiile de formulare ale unui unguent hidrofil pentru uz topic. Unguentele, ca forme farmaceutice semisolidе bioadezive, cu conținut de compuși biologic activ, sunt responsabile atât de acțiune locală, cât și sistemică, iar proprietățile compușilor extrași din diverse materiale vegetale reprezintă cea mai eficientă, sigură și compliantă formă de tratament.

II. Partea experimentală prezintă rezultatele experimentelor derulate pe parcursul studiilor în cadrul programului doctoral, și este structurată în 3 capitole, după cum urmează:

Capitolul 4, intitulat ***Extracția și caracterizarea compușilor bioactivi din Aloe vera (barbadensis Miller)***, prezintă rezultatele investigațiilor privind caracterizarea fizico-chimică a subproduselor obținute după separarea gelului proaspăt și a cortexului, respectiv după liofilizarea celor două secțiuni vegetale. Gelul proaspăt și cortexul, precum și produsele liofilizate au fost testate pentru evaluarea conținutului de substanță uscată, a acidității, a compoziției în compuși bioactivi (polifenoli totali, flavonoide, proteine, lipide ș.a.) și a capacității antioxidante. Pentru analiză, s-au utilizat metode uzuale și moderne de investigare, precum analiza spectrofotometrică, cromatografia HPLC și analiza FTIR.

Capitolul 5, intitulat ***Studiul comportamentului fermentativ și fiziologic al unor tulpini de bacterii probiotice în medii suplimentate cu Aloe vera***, prezintă rezultatele obținute privind descrierea comportamentului cinetic al tulpinilor de bacterii lactice selecționate în monoculturi și culturi multiple, prin cultivare în mediul MRS și mediul minimal pe bază de soluție de electroliți, suplimentate cu *Aloe vera* (pulbere liofilizată sau extract etanolic). S-au analizat dinamica de multiplicare, parametrii cinetici de multiplicare, precum și viabilitatea bacteriilor în mediile fermentate, pe o perioadă de 21 de zile, prin păstrare în condiții de refrigerare. S-au analizat, prin teste *in vitro*, realizate pe linii celulare HeLa-2, capacitatea de aderență la celulele epiteliale precum și capacitatea de inhibare a aderenței patogenilor epiteliali (*Stahylococcus aureus* și *Candida albicans*). Produsele fermentate au prezentat activitate antimicrobiană (antibacteriană și antifungică) împotriva tulpinilor patogene testate care pot coloniza accidental epiderma.

Capitolul 6, intitulat ***Formularea unui unguent inovativ pe bază de produse fermentate cu bacterii lactice probiotice și Aloe vera***, prezintă rezultatele investigațiilor care au vizat formularea produsului farmaceutic funcțional. Se prezintă rezultatele obținute privind caracterizarea reologică a unguentelor hidrosolubile pe bază de polietilenglicoli, preliminară formulării produsului farmaceutic de uz topic, extern, cu conținut de bacterii lactice viabile și compuși bioactivi din *Aloe vera*. Pentru produsul obținut s-a demonstrat eficacitatea antibacteriană și antifungică precum și funcționalitatea pe o perioadă de păstrare timp de 21 zile, la temperaturi de 0-4°C.

Fiecare capitol al părții experimentale este structurat în subcapitole, după cum urmează: *Introducere*, în care se prezintă oportunitatea cercetărilor în contextul actual pe fluxul principal al publicațiilor; *Materiale și metode*, prezintă descrierea materialelor, culturilor de microorganisme, a variantelor de medii de cultură utilizate și formulele pentru unguente, precum și metodele de investigare și de prelucrare și interpretare a datelor experimentale utilizate; *Rezultate și discuții*, în care se prezintă rezultatele originale obținute prin compararea cu date similare din literatura de specialitate; *Concluzii parțiale*; *Referințe bibliografice*.

Capitolul 7, Concluzii generale, sumarizează principalele concluzii rezultate în urma derulării experimentelor științifice, care au condus la formularea și caracterizarea unui produs farmaceutic inovativ, de uz extern, ale cărui ingrediente active sunt constituite din bacterii lactice în stare activă și compuși bioactivi din *Aloe vera*.

Abordarea științifică și aplicativă a studiilor realizate în această teză de doctorat este nouă, atât în țara noastră șcât și pe plan mondial, existând foarte puține abordări de acest tip. Majoritatea studiilor publicate pe fluxul principal au vizat utilizarea individuală bacteriilor lactice sau a compușilor bioactivi din diverse surse vegetale. Combinarea principiilor active prin aportul bacteriilor lactice cu potențial probiotic și a compușilor vegetali deschide noi perspective de cercetare, oferă posibilitatea diversificării largi a gamei de produse farmaceutice pentru uz farmaceutic sau cosmetic, cu beneficii multiple pentru sănătate și creșterea calității vieții.

În final, sunt prezentate **contribuțiile originale** ale tezei de doctorat, cu impact în dezvoltarea cunoașterii în domeniul tehnicii farmaceutice, al farmacognoziei și al microbiologiei, având un caracter inter- și multidisciplinar, precum și perspectivele de cercetare care se deschid, perspective ce vizează optimizarea ingredientelor, creșterea funcționalității produsului și, nu în ultimul rând, creșterea eficienței terapeutice a produsului farmaceutic inovativ.

Teza de doctorat cuprinde 163 pagini, dintre care 23 tabele și 85 figuri. Studiul documentar reprezintă 25 %, iar partea experimentală 75 %.

Rezultatele cercetărilor au fost valorificate prin elaborarea a 2 articole științifice, publicate sau în curs de publicare în reviste cotate ISI (*Romanian Biotechnology Letters, Journal of Biotechnology,*) și indexate în baze de date internaționale (*Jurnal Medical Brașovean*). De asemenea, pe parcursul stagiului doctoral, au fost prezentate rezultatele cercetărilor la conferințe reprezentative din străinătate și din țară (Conferința Internațională Eurobiotech, organizată la București, 2015; Simpozionul EuroAliment, 2017; precum și la Conferințele Științifice ale Școlii Doctorale din Universitatea "Dunărea de Jos", 2015, 2016, 2017, Galați).

Activitățile experimentale de cercetare din cadrul tezei de doctorat au fost derulate în cadrul *Centrului integrat de cercetare, expertiză și transfer tehnologic (BioAliment-TehnIA)* (www.bioaliment.ugal.ro), din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, a laboratorului de Chimie organică, din cadrul Facultății de Științe și mediu, Universitatea "Dunărea de Jos", Galați. Testele *in vitro* de aderență la celulele cutanate și de inhibare a aderenței patogenilor la linia celulară s-au realizat cu suportul specialiștilor și a infrastructurii laboratorului de Microbiologie, din cadrul Facultății de Biologie, Universitatea din București, iar testele de evaluare a activității antimicrobiene, s-au derulat în cadrul laboratorului Clinic de analize medicale, din cadrul Spitalului de Pediatrie "Sf. Ioan", Galați.

Comisia de îndrumare a tezei de doctorat este compusă din:

- **Prof. univ. dr. ing. Gabriela-Elena BHRIM** – conducător de doctorat.
- **Prof. univ. dr. chim. Rodica DINICĂ** – coordonator studii de extracție și caracterizare a principiilor vegetale din *Aloe vera*.
- **Prof. univ. dr. chim. Ștefan DIMA** – coordonator studii de caracterizare reologică și formulare a unguentului hidrosolubil.
- **Conf. dr. biolog Vasilica BARBU** – coordonator studii de izolare, selecție a bacteriilor lactice și a testelor *in vitro* de aderență și activitate antimicrobiană.

4. Extracția și caracterizarea compușilor bioactivi din *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller)

4.1. Introducere

Studiul cuprins în acest capitol a vizat analiza compoziția chimice a plantei de *Aloe vera*, cultivată în condiții de seră în România, în vârstă de 4 ani, comparativ cu a altor varietăți de *Aloe vera* cultivate în alte zone. Astfel, în extractul etanolic din planta proaspătă s-a analizat conținutul în compuși bioactivi, în special polifenoli și flavonoide și s-a determinat activitatea antioxidantă. De asemenea, pentru reziduul solid, presat și deshidratat (turtă), rezultat din materia primă vegetală, procesată în diverse maniere, în stare naturală, deshidratată sau liofilizată.

Caracterizarea din punctul de vedere al conținutului de apă, al conținutului de fibre dietetice precum și al unor proprietăți fizico-chimice a materiei prime vegetale a fost necesară atât în vederea formulării preparatului farmaceutic inovativ cât și pentru conservarea tuturor principiilor active cu obținerea unui beneficiu terapeutic sporit în produsul finit.

4.2. Materiale și metode

Planta de *Aloe vera*, cu origine certificată, a fost achiziționată în anul 2016 dintr-o seră din județul Galați. Frunzele utilizate în cadrul acestui studiu au avut lungimea de 50-58 cm și lățimea bazei de 5-7 cm, planta având 4 ani. Frunzele tăiate de la bază au fost spălate de mai multe ori cu apă distilată. Spinii laterali și marginile au fost îndepărtate înainte de disecția materialului vegetal. Cortexul a fost separat de parenchim cu ajutorul unui bisturiu. Gelul extras a fost spălat de două ori cu apă ultrapură pentru îndepărtarea exudatului superficial. O parte din gel și reziduul vegetal epidermal s-au menținut în congelator, la temperatura de -40°C , până la inițierea experimentului. Gelul extras și cortexul presat au fost liofilizate separat, utilizând aparatul Alpha 1-4 LD Plus (Martin Christ, Germania). Înainte de liofilizare, gelul a fost menținut 1 oră la -18°C .

Produsele liofilizate au fost păstrate la temperatura de 4°C , în recipiente din sticlă, închise etanș, pentru a preveni contaminarea și absorbția umidității din aer.

Pentru fiecare tehnică utilizată, extractele vegetale au fost diluate conform protocoalelor de lucru.

Caracterizarea fizico-chimică a subproduselor vegetale obținute din *Aloe vera* a vizat:

- ✓ observarea morfologiei gelului de *Aloe vera* prin microscopie confocală;
- ✓ determinarea parametrilor care caracterizează gelul și cortexul proaspăt: pH, aciditate, conținut de proteine, lipide, fibre etc.;
- ✓ determinarea caracteristicilor hidro-coloidale ale gelului și cortexului liofilizate;
- ✓ determinarea activității antiradicalice (DPPH RSA);
- ✓ determinarea spectrofotometrică a conținutului de polifenoli totali și a flavonoidelor din materiale vegetale procesate diferit: stare naturală, uscare la etuvă, liofilizare.
- ✓ identificarea și dozarea principalilor compuși polifenolici prin HPLC;
- ✓ identificarea aloinei prin TLC și a principalelor grupări funcționale prin FT-IR.

4.3. Rezultate și discuții

4.3.2. Caracteristicile fizico-chimice ale materialului vegetal proaspăt

Randamentul de extragere a gelului din produsul vegetal proaspăt a fost raportat la masa frunzei integrale (100%). Cortexul a reprezentat 20,25% , gelul a reprezentat 69,87%, cu o pierdere de 9,88%.

Randamentul obținut prin presarea turtei a fost de 96,3%, cu o pierdere de 3,7% în filtrul de presare.

Randamentul de obținere a gelului liofilizat a fost de 0,9%, iar a turtei presate liofilizate, de 0,95%, care confirmă cantitatea mare de apă liberă și apă legată din această plantă. Pentru a stabili cantitatea de apă pe care o poate încorpora planta s-a determinat umiditatea materialul vegetal proaspăt (Tabelul 4.2.).

Tabelul 4.2. Caracteristici fizico-chimice ale subproduselor obținute din planta *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller)

Caracteristici	Gel proaspăt	Material vegetal presat
Umiditate (%)	98,84%±0,46	89,26%±0,66
pH	4,53 ±0,12	4,69 ±0,06
Aciditate (% acid malic)	0,065%±0,01	0,38%±0,02

pH-ul probelor este ușor acid, situându-se între 4,5 și 4,7. Valoarea pH-ului este strâns corelată cu conținutul de acizi organici, a cărui acumulare crește în timpul nopții, ținând cont că *Aloe vera* este o plantă CAM (crassulacean acid methabolism). Acizii organici din plantă sunt acid citric, tartric și malic, însă *Aloe vera* este o plantă cu asimilare nocturnă a CO₂ (metabolism al acidului crassulacean), de aceea majoritar va fi acidul malic. Aciditatea a fost relativ asemănătoare în gel și în turta presată, cu un pH de 4,53, respectiv 4,69 în turtă și cu un procent de acizi organici de 0,065% în gel și 0,38% în turta presată.

Analiza conținutului de nutrienți din materialul vegetal liofilizat (gel și cortex), s-a realizat după modelul Weend's. După o perioadă de depozitare de 7 zile, la temperatura camerei, umiditatea din gel a fost menținută la 4,23%, ușor mai crescută decât în cazul cortexului liofilizat, care a înregistrat o valoare a umidității de 2,4%, deoarece gelul este alcătuit majoritar din polizaharide cu rolul de a reține apa. Turta presată a prezentat o umiditate de 2,4%, deoarece randamentul de obținere a fost ridicat, deci turta a fost lipsită de gel rezidual. Umiditatea din gel depinde de modul de depozitare al gelului liofilizat. În cazul acestui studiu, gelul liofilizat a fost menținut la temperatura camerei, în recipiente bine închise, în prezența unei substanțe deshidratante, reușind astfel să se obțină o umiditate de 4,23% (Tabelul 4.3.).

Tabelul 4.3. Compoziția chimică subproduselor obținute din frunze de *Aloe vera*

Parametri	Gel liofilizat (g %)*	Turtă (g %)*
Umiditate	4,23 ± 1,05	2,4 ± 0,88
Proteine	8,07 ± 3,47	13,76 ± 1,64
Lipide	3,30 ± 0,61	2,20 ± 0,50
Fibre	1,25 ± 0,10	12,52 ± 2,18
Cenușă	18,33 ±0,99	11,15 ± 0,52
Compuși neazotați	64,82 ± 3,78	57,97 ± 2,28

*Raportat la conținutul de substanța uscată

Conținutul de fibre brute din turta presată este de 10 ori mai ridicat decât în gel, deoarece cortexul și clorenchimul conțin polimeri poliglucidici precum celuloza, diferite tipuri de hemiceluloză și lignină, spre deosebire de gel care conține doar pectină și hemiceluloză.

Din studiile menționate putem evidenția faptul că fibrele din *Aloe vera* pot fi utilizate ca fibre dietetice, utile în dietele de slăbire. Fibrele brute au o importanță redusă în nutriție, deoarece conțin o cantitate scăzută de proteine asociate, însă prezintă beneficii în tratarea constipației, în scăderea nivelului glicemiei și colesterolului în sânge și în prevenirea cancerului colorectal.

Cantitatea de proteine, determinată prin metoda colorimetrică Bradford, a relevat un conținut de 1,7 ori mai mare în turta presată decât în gel.

Masa pierdută prin incinerarea rezidului rămas după tratarea cu acid sulfuric și hidroxid de sodiu a confirmat conținutul mare de fibre din cortex (12,52 %), comparativ cu gelul (1,25%), deoarece cortexul conține majoritar țesut parenchimos spre deosebire de gel care conține majoritar polizaharide.

4.3.3. Proprietățile antioxidante

Capacitatea antioxidantă evaluată prin capacitatea de legare a radicalilor liberi a fost determinată pe gelul proaspăt și pe liofilizat. S-a evidențiat o capacitate antioxidantă ușor mai crescută pentru gelul liofilizat, comparativ cu gelul proaspăt care își pierde destul de rapid această proprietate, observându-se în același timp și îmbrunarea gelului și scăderea capacității antioxidante, care, după 2 zile de menținere la rece (2-8 °C) a înregistrat o scădere a RSC de la 60,81% la 32,11% (Tabelul 4.4.).

Tabelul 4.4. Capacitatea antioxidantă a produselor vegetale proaspete și liofilizate din *Aloe vera*

Probă	Concentrație extract stoc	RSC %	RSC% (după 48 h)
Gel proaspăt	10%	60,81 ± 0,53	32,11 ± 0,2
Gel liofilizat	10%	66,67 ± 0,28	67,25 ± 0,34
Cortex proaspăt	10%	48,35 ± 0,1	-
Cortex liofilizat	10%	57,51 ± 0,35	-

Activitatea anti-radicalică a materialului vegetal din *Aloe vera* a fost măsurată prin scăderea absorbției DPPH-ului la 515 nm. Prezența compușilor antioxidanți în mediul de reacție poate interacționa cu radicalul DPPH, ducând la scăderea intensității culorii.

Conținutul în compuși polifenolici s-a analizat în extractul în alcool etilic 96%. Rezultatele obținute demonstrează că extractul obținut din produsul vegetal liofilizat a prezentat cea mai echilibrată proporție de compuși biologic activi, necesari în produsul farmaceutic final. Deși rezultatele obținute se încadrează în intervalul de valori menționat în literatura de specialitate, totuși nu s-a putut realiza o corelație strânsă între conținutul de polifenoli totali, flavonoide și activitatea antioxidantă a celor trei extracte.

Concentrațiile de polifenoli și flavonoide au fost exprimate în mg compus bioactiv/g masă uscată (Tabelul 4.5.).

Tabelul 4.5. Compoziția în compuși bioactivi a subproduselor derivate din frunze de *Aloe vera*

Probă**	Concentrație de flavonoide (mg/g**)	Concentrație de polifenoli (mg/g**)	Activitatea antioxidantă (RSC), (%)
PVN	12,812 ± 0,12	21,00 ± 1,1	5,00
PVL	38,26 ± 0,25	65,39 ± 2,32	43,60
PVU	11,85 ± 1,2	9,4 ± 0,17	43,38

* PVN = produs vegetal natural (proaspăt); PVL = produs vegetal liofilizat; PVU = produs vegetal uscat (etuvă); ** Substanța uscată

Calculul concentrației de polifenoli totali a variat în funcție de procedeul de prelucrare a materiei prime procesate. Din datele prezentate în tabelul 4.5., se poate observa că s-a obținut o concentrație mai ridicată în extractul alcoolic obținut din produsul vegetal liofilizat, comparativ cu celelalte două extracte, corelat și cu activitatea antioxidantă a acestui extract. Concentrația de flavonoide a fost net superioară în extractul obținut din produsul vegetal liofilizat, întrucât compușii bioactivi cu acțiune terapeutică se păstrează în proporție mai mare prin acest procedeu de prelucrare a masei vegetale, comparativ cu tratamentul prin uscare. Cele mai mici valori ale concentrației de flavonoide și polifenoli s-au obținut în cazul produsului vegetal uscat la etuvă, ceea ce înseamnă că, odată cu pierderea apei de constituție, se pierd și importante principii bioactive și totodată temperatura mai ridicată poate influența stabilitatea compușilor biologici activi.

În ceea ce privește activitatea antioxidantă au fost obținute valori între 5% (planta neprelucrată) și 43,60% și 43,38 (planta liofilizată sau uscată), valori apreciabil mai reduse comparativ activitatea cu acidului ascorbic (80,5%) și a rutinului (86,7%).

4.3.4. Proprietățile hidrocoloidale

Proprietățile de hidrocoloidale ale materialului vegetal sunt strâns legate de compoziția și structura polizaharidelor și suferă modificări datorate greutatei moleculare, formelor ionice, pH-ului, temperaturii etc.. Bineînțeles că, în ceea ce privește capacitatea de retenție a apei, gelul liofilizat a prezentat o valoare superioară, comparativ cu cea a cortexului liofilizat, coroborată cu creșterea volumului, conform datelor prezentate în tabelul 4.6..

Tabelul 4.6. Proprietățile hidrocoloidale ale gelului și ale turtei de *Aloe vera* în stare liofilizată

Probă	Capacitatea de retenție a apei (g apă/g liofilizat)	Capacitate de umflare (mL apă/g liofilizat)	Capacitate de adsorbție a grăsimilor (g ulei/g liofilizat)
Gel liofilizat	32,21 ± 2,35	33,67 ± 4,40	4,5 ± 0,03
Cortex liofilizat	23,15 ± 0,26	8,27 ± 0,15	6,9 ± 0,05

În gelul liofilizat, capacitatea de reținere a apei (CRA) a fost de 32,21% g apă/g gel liofilizat. Diferențele în comportament se datorează probabil procedurii diferit de îndepărtare a apei, care a influențat deshidratarea cortexului și a parenchimului.

CRA a cortexului a fost de 23,15 g apă/ g probă, demonstrând din nou că *Aloe vera* este o plantă CAM, prezentând un conținut ridicat de polizaharide, acemannanul, un galactoglucomannan acetilat, cu o capacitate excelentă de legare a apei prin legături de hidrogen, prezent în gel și pectinele și proteinele glicozilate din pereții celulari parenchimali, capabile, de asemenea, să rețină o cantitate mare de apă.

Capacitatea de umflare (CU) a prezentat valori de 33,67% pentru gel liofilizat, după 16h de hidratare, ceea ce relevă o bună capacitate de a reține apa sau alți solvenți polari. Cortexul

are o slabă capacitate de umflare, de 4 ori mai redusă, comparativ cu gelul, deoarece fibrele din conținutul său sunt barieră pentru pierderea apei, nu prezintă și capacitate de retenție.

4.3.5. Caracterizarea compoziției extractului etanolic din *Aloe vera* prin analiză cromatografică

Analiza HPLC a evidențiat prezența compușilor polifenolici cu activitate antioxidantă (Figura 4.13.), după cum urmează:

- Peak-ul 1 corespunde acidului galic, într-o concentrație de 7,97 $\mu\text{g/mL}$.
- Peak-ul 2 este specific acidului vanilic și cafeic, ce eluează la timpi de retenție apropiați, în concentrație de 7,34 $\mu\text{g/mL}$.
- Peak-ul 3 și picul 4 corespund epicatehinei, respectiv catehinei, în concentrații de 20,82 $\mu\text{g/mL}$, respectiv 12,25 $\mu\text{g/mL}$.
- Peak-ul 5 corespunde acidului ferulic în concentrație de 9,86 $\mu\text{g/mL}$.
- Peak-ul 6 corespunde quercetinei, în concentrație de 204,75 $\mu\text{g/mL}$.

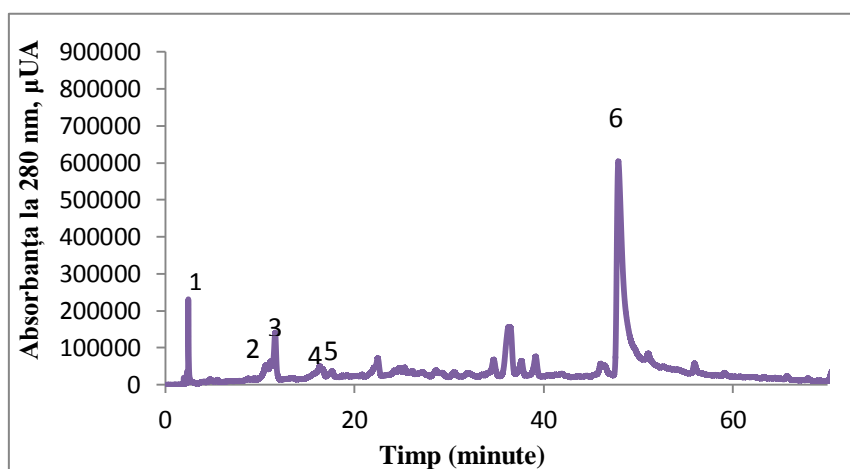


Figura 4.13. Cromatograma HPLC a extractului etanolic din pulbere liofilizată de *Aloe vera*

Compoziția comparativă în compuși bioactivi identificați prin cromatografie HPLC se prezintă și în figura 4.14, fiind evident conținutul în quercetină, fapt ce explică și activitatea antioxidantă superioară.

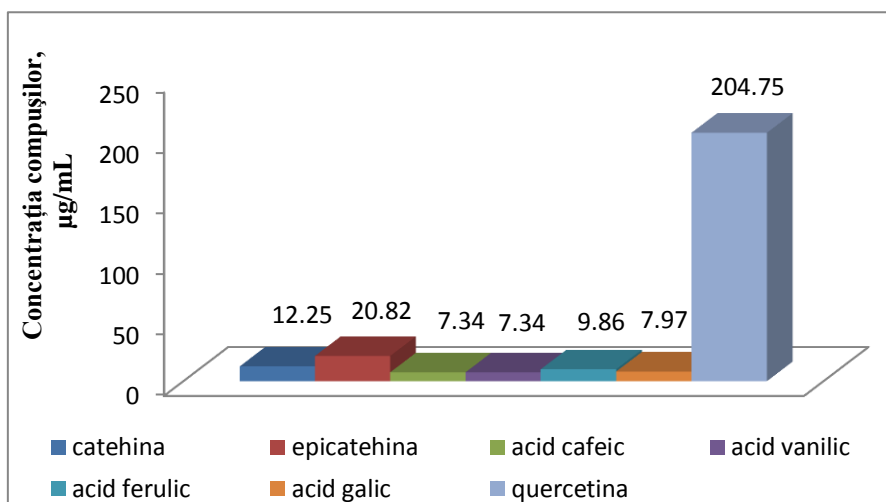


Figura 4.14. Concentrația compușilor bioactivi din extractul etanolic din pulbere liofilizată de *Aloe vera*

4.3.6. Analiza FT-IR

Analiza FT-IR a fost realizată pentru a evidenția grupările funcționale predominante prezente în extractele etanolicе din produsul vegetal natural, din produs liofilizat și din produs uscat. Analiza FT-IR a eșantioanelor vegetale de cortex, gel și suc din gel de *Aloe vera* au evidențiat prezența unor grupări funcționale specifice: -OH – specific benzii de absorbție 3426 cm^{-1} ; C=O – cu benzi de absorbție caracteristice între 1750-1655 cm^{-1} și aminoacizi – cu benzi de absorbție specifice între 3300-3250, specifice legăturilor N-H, respectiv 1550, specifice grupărilor carboxil COO^- .

Analiza comparativă a spectrelor FT-IR realizate din extractele etanolicе obținute prin procesarea în diferite moduri a frunzei de *Aloe vera* (naturală, deshidratată, liofilizată) a evidențiat benzi de absorbție apropiate pentru toate cele trei probe. Peak-uri de intensitate mai crescută s-au înregistrat pentru extractul etanolic obținut din pulberea liofilizată, ceea ce indică un grad optim de menținere a compușilor biologic activi prin acest mod de procesare a materialului vegetal. Prezența hidroxililor fenolici indică o concentrație crescută de compuși fenolici specifici în extractele etanolicе obținute din *Aloe vera* – flavonoide, acizi fenolici, antrachinone, iar banda de intensitate crescută în regiunea fenolică indică acumularea compușilor fenolici într-o proporție ridicată.

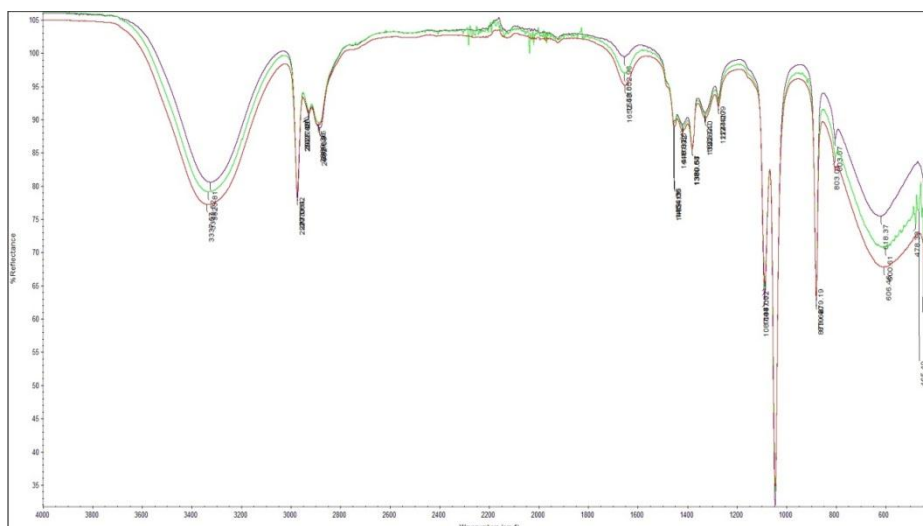


Figura 4.22. Spectrele FT-IR ale extractelor etanolicе din *Aloe vera*: *pulbere liofilizată – roșu*; *pulbere deshidratată – verde*; *produs proaspăt – mov*.

Aceste grupări funcționale sunt responsabile de natura polară a compușilor polifenolici din compoziția extractului etanolic de *Aloe vera*.

Benzile specifice grupării C=O de intensitate medie se regăsesc în jurul valorii de 1653 cm^{-1} , indicând prezența compușilor carbonilici de tip-antrachinone. Benzile de intensitate mică la frecvența de aproximativ 800 cm^{-1} , sunt atribuite legăturilor C-H, prezente în compușii polimerici din extractele studiate. Benzile de absorbție în regiunea de 1332 cm^{-1} corespund legăturilor simetrice de NO_2 caracteristice compușilor aromatici azotați.

Absorbția în jurul valorilor de 1620 – 1610 cm^{-1} corespunde legăturilor C=C, ceea ce indică prezența grupărilor specifice eterilor vinilici și a aloinei în probă. În extractele analizate prin metoda FT-IR s-a îndepărtat fracțiunea de clorofilă, ceea ce a dus și la separarea aloinei, însă aceasta este prezentă în eșantionul din cortex de *Aloe vera*.

Peak-urile la 2926 cm^{-1} corespund legăturilor C-H determinate de formarea legăturilor de hidrogen la concentrații crescute de compuși bioactivi. Benzile de intensitate medie au fost observate la 1720 și la 1255 cm^{-1} și indică prezența grupărilor C=O și C-O-C, specifice grupărilor acetil și carboxil din probe. Identificarea unor benzi intense în zona 1050 cm^{-1}

confirmă prezența unităților monoglucidice în regiunile apropiate, precum galactoză, glucoză ș.a.

4.4. Concluzii parțiale

1. S-a studiat compoziția chimică și compoziția fenolică a diferitelor subproduse derivate din frunze de *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller), gel, turte după presarea gelului, extracte etanolice obținute din frunze neprelucrate, uscate la etuvă sau prin liofilizare.

2. S-a demonstrat că planta prezintă o compoziție bogată în compuși chimici cu valoare nutritivă dar și cu rol funcțional, cum sunt compușii polifenolici care induc și activitatea antioxidantă comparabilă cu a compușilor standard, în cazul extractelor etanolice obținute din frunze liofilizate sau uscate.

3. Prin compoziția chimică și valoarea funcțională, produsele derivate din prelucrarea plantei *Aloe vera* (gel, turte, pulberi, extracte etanolice) pot constitui substraturi benefice pentru dezvoltarea și activitatea metabolică a microorganismelor, în special a bacteriilor lactice probiotice.

4. Planta *Aloe vera* prezintă proprietăți benefice pentru utilizare în produse cosmetice și farmaceutice, dacă se are în vedere capacitatea de reținere a apei și de adsorbție a grăsimilor.

5. Pentru studiile următoare, s-a optat pentru utilizarea extractului etanolic din pulbere liofilizată pentru dezvoltarea bacteriilor lactice, stimularea activității metabolice, a activității antimicrobiene și a potențialului de refacere a microbiotei utile la nivelul epidermei pentru formularea unui unguent hidrofil ce are ca potențiale utilizări terapeutice dermatită atopică, psoriazis, diverse tipuri de eczeme și dermatite, precum și arsuri de gradul I și gradul II necomplicate.

5. Studiul comportamentului fermentativ și fiziologic al unor tulpini de bacterii probiotice în medii suplimentate cu *Aloe vera*

5.1. Introducere

Studiile prezentate în acest capitol au vizat evaluarea comportamentului fermentativ și funcțional pentru trei tulpini de bacterii lactice probiotice din genul *Lactobacillus*, speciile *L. rhamnosus*, *L. plantarum* și *L. casei*, prin cultivare în mediul specific MRS și într-un mediu neconvențional pe bază de electroliți, îmbogățite cu 0,5% pulbere liofilizată de *Aloe vera*.

Parametrii analizați, atât în perioada de fermentație, cât și de păstrare a produselor fermentate (la temperatura de 4°C, timp de 21 de zile) au fost:

- dinamica fermentației lactice;
- dinamica și parametrii cinetici de multiplicare ai bacteriilor probiotice;
- viabilitatea bacteriilor probiotice în mediile fermentate, pe perioada păstrării;
- capacitatea de aderență a bacteriilor probiotice multiplicat în diferite medii fermentative (teste in vitro în culturi de celule epiteliale);
- activitatea antimicrobiană a produselor fermentate.

Rezultatele obținute sunt inovative deoarece, tulpini de bacterii probiotice izolate din preparate comerciale au fost cultivate pentru prima dată într-un mediu formulat pe bază de soluție de electroliți, suplimentat cu 0,5% pulbere liofilizată obținute din frunze de *Aloe barbadensis* Miller. Studiile realizate în această etapă sunt importante din punct de vedere biotehnologic, deoarece vor permite selecția unei/unor tulpini probiotice performante capabile

să se înmulțească și să supraviețuiască în medii fermentate pe bază de *Aloe vera*, în vederea formulării unor unguente noi funcționale destinate prevenirii și tratării unor afecțiuni cutanate.

5.2. Materiale și metode

Speciile *Lactobacillus rhamnosus* GG (Gyniel plus®, Hyllan Pharma, România), *Lactobacillus plantarum* (din colecția Platformei BioAliment, Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor, Galați), *Lactobacillus casei* (GynOphylus®, Beaufour Ipsen Industries, Marea Britanie), au fost izolate prin repicări succesive pe mediul MRS cu agar. Din fiecare tulpină s-a realizat inocul dozat spectrofotometric la o D.O. = 0,5, la $\lambda = 600$ nm, în mediu MRS lichid, MRS lichid suplimentat cu pulbere liofilizată de *Aloe vera*, soluție electroliți suplimentată cu pulbere liofilizată de *Aloe vera*. Parametri urmăriți au fost:

- ✓ pH;
- ✓ numărul de unități formatoare de colonii ($N_{ufc/mL}$) prin metoda de numărare indirectă Koch;
- ✓ viabilitatea bacteriilor lactice în perioada de depozitare.

Ulterior, s-au selectat tulpinile de *L. casei* și *L. plantarum* pentru a fi testate în inocul combinat în mediu experimental de soluție de electroliți suplimentată cu pulbere liofilizată de *Aloe vera*.

Pentru *L. casei* și *L. plantarum* s-a determinat capacitatea de aderență la monostrat celular epitelial HeLa-2, precum și activitatea antimicrobiană și antifungică pe **microorganisme patogene**: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* (clinic – din plagă tegumentară), *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* (clinic – din exudat vaginal) prin metoda difuziei radiale (Kirby - Bauer) și prin inhibarea competitivă a aderenței la monostratul celular HeLa-2.

Reactivi utilizați: metanol reactiv de laborator 96%, etanol reactiv de laborator 96%, acetonă reactiv de laborator 96% au fost achiziționați de la Chemical Co., iar tampon fosfat salin dela Sigma-Aldrich, Germania. Aparatura utilizată a fost: Spectrofotometru UV-VIS 6505 (Jenway, Germania), Analizor Multiparametric Seven Easy tip F20K (Mettler Toledo, Elveția), Incubator termostatat ICT-18 (Falc Instruments, Italia), Incubator cu circulație de aer forțată BF 4000 (Binder, Germania), Microscop cu imersie și epifluorescență BX 41 (Olympus, SUA), Balanța analitică de înaltă precizie XS403SM (Mettler-Toledo, Elveția).

5.3. Rezultate și discuții

5.3.1. Dinamica fermentației lactice

S-a analizat evoluția pH-ului în cele 3 medii fermentative (probele PI, PII și PIII), pentru cele trei tulpini probiotice, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* și *Lactobacillus casei*, atât pe perioada fermentării (48 de ore) cât și după 7, 14 și 21 zile (pe perioada păstrării mediului fermentat).

Pentru tulpinile studiate s-a urmărit dinamica creșterii microorganismului, viabilitatea și adaptabilitatea la diferite substraturi pe care au fost însămânțate, în două stadii, unul de fermentație, altul de conservare.

În urma experimentelor efectuate, s-a stabilit că perioada optimă de fermentare este de 72 ore, iar perioada optimă de conservare este de 21 de zile. Din acest motiv, dinamica de creștere a fost urmărită pe parcursul a 72 de ore, iar viabilitatea, pe parcursul a 21 de zile. Pentru a obține un mediu benefic dezvoltării bacteriilor probiotice vizate în studiu, s-a stabilit ca obiectiv al studiului urmărirea comportamentului celor trei tulpini, prin inocularea acestora în trei medii diferite din punct de vedere compozițional: un mediu martor (MRS broth selectiv pentru

lactobacili), un mediu de tranziție (MRS broth și liofilizat de *Aloe vera* în concentrație de 0,5%) și un mediu pe bază de electroliți cu pH=6,8, suplimentat cu liofilizat de *Aloe vera* 0,5%), ce nu a mai fost testat până în prezent.

Capacitatea de acidifiere este în strânsă corelație cu gradul de înmulțire al bacteriilor lactice, iar menținerea aproape constantă a pH-ului pe perioada de depozitare este direct coroborată cu menținerea viabilității tulpinilor studiate.

În cazul tulpinii de *L. rhamnosus*, s-a observat o reducere bruscă a pH-ului în primele 24 de ore de fermentare, pentru toate cele trei probe, de la pH 5,4 la pH 3,9, nefiind remarcată o diferență între proba martor și celelalte două probe suplimentate cu *A. vera* (Figura 5.1).

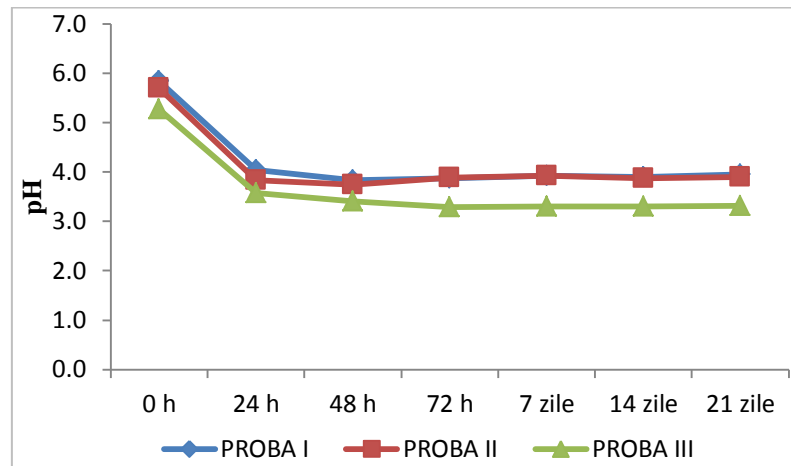


Figura 5.1. Variația pH-ului în timpul cultivării și păstrării culturii *L. rhamnosus*

De asemenea, pe perioada depozitării, de la 7 la 21 de zile la temperatura de 4°C, se observă o menținere a pH-ului pentru toate cele trei probe, cu o ușoară creștere spre finalul perioadei de depozitare, în cazul cultivării pe mediul MRS lichid suplimentat cu 0,5% pulbere liofilizată de *A. vera*.

Cea mai constantă menținere a pH-ului s-a înregistrat pentru cultura *L. plantarum*, de la 24 h până la 21 de zile (Figura 5.2.). Cea mai importantă scădere a pH-ului s-a înregistrat între 0 și 24 h, apoi acesta s-a menținut constant, deși multiplicarea a fost progresivă. Mediul inovativ pe bază de electroliți a prezentat un pH constant de 3,77 pe întreaga perioadă de fermentare și conservare.

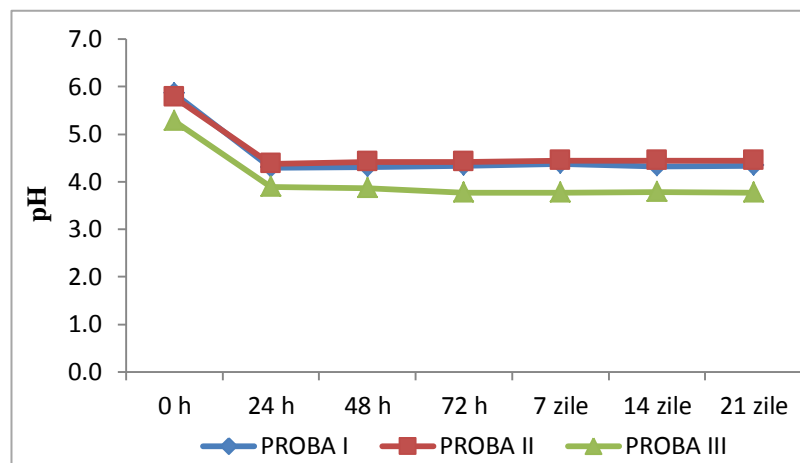


Figura 5.2. Variația pH-ului pe perioada multiplicării și conservării culturii *L. plantarum*

În cazul culturii *L. casei* (Figura 5.3.) evoluția pH a înregistrat o dinamică asemănătoare cu a culturilor studiate anterior, observându-se de asemenea o creștere a valorilor de pH la 4,23, după 72 de ore de fermentare, la 37°C, pe perioada păstrării mediului fermentat pe bază

de MRS suplimentat cu *Aloe vera*. Cea mai scăzută valoare a pH-ului s-a înregistrat pentru mediul fermentativ pe bază de electroliți, 3,19, la 72 de ore de menținere la incubator, 37°C.

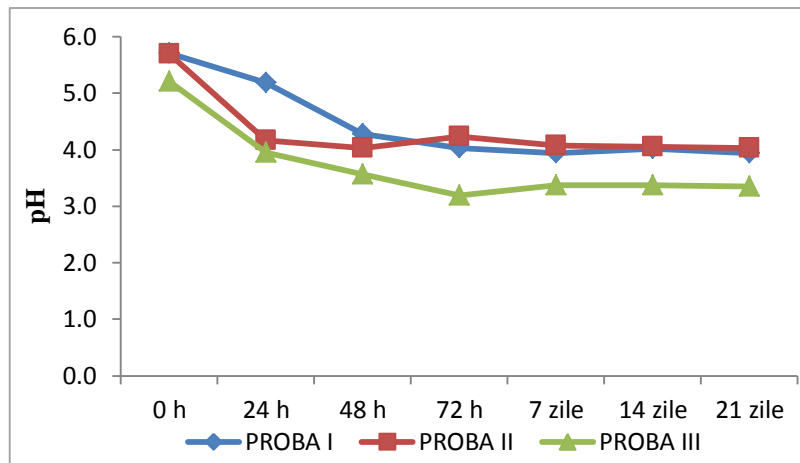


Figura 5.3. Variația pH-ului pe perioada multiplicării și conservării culturii *L. casei*

5.3.2. Dinamica de multiplicare și viabilitatea bacteriilor probiotice în timpul fermentației și păstrării mediilor fermentate

Dinamica de multiplicare în perioada de fermentare

Pentru tulpina *L. rhamnosus*, dinamica de creștere a tulpinii probiotice cultivată pe MRS lichid suplimentat cu 0,5% pulbere de *Aloe vera*, s-a înregistrat cea mai rapidă viteză de multiplicare în primele 24 ore, cu o scădere bruscă în următoarele 24 ore, urmată de o menținere a $N_{ufc/mL}$ în următoarele 24 de ore (Figura 5.4.).

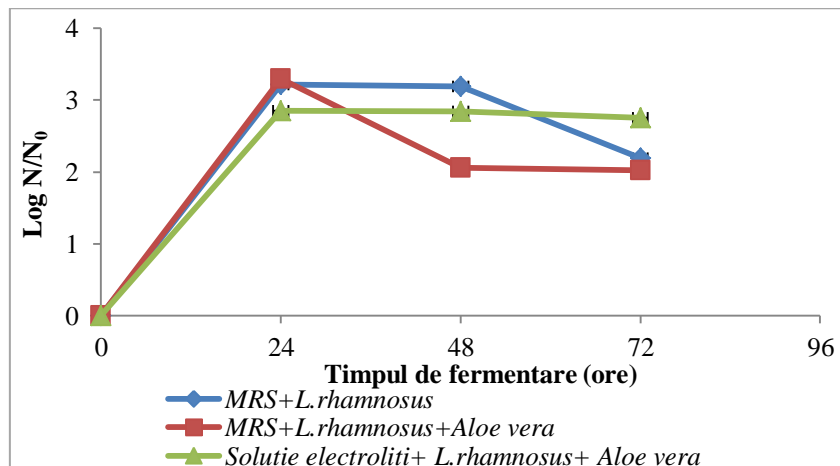


Figura 5.4. Dinamica de multiplicare a culturii *L. rhamnosus* în perioada de fermentație

Proba martor prezintă o curbă previzionată de creștere, cu un maxim de creștere, o perioadă de staționare, urmată de fază de declin. Cea mai interesantă comportare o prezintă proba III (mediul pe bază de soluție electroliti, pH = 6,8, suplimentat cu 0,5% pudră liofilizată de *Aloe vera*). Pe acest mediu, în primele 24 de ore, s-a înregistrat o multiplicare mai lentă, comparativ cu proba martor, însă cultura a prezentat cea mai bună stabilitate în ceea ce privește viabilitatea celulelor ($N_{ufc/mL}$, după 48 și 72 de ore de cultivare),

În cazul culturii *L. plantarum* s-a observat un comportament aproape similar în mediul pe bază de soluție de electroliți suplimentat cu *Aloe vera* și mediul MRS lichid (Figura 5.5.). În

acest caz, cultura s-a multiplicat mai lent și a avut o viabilitate mai redusă, după 48 și 72 de ore în mediul MRS lichid cu 0,5% pulbere liofilizată din *Aloe vera*.

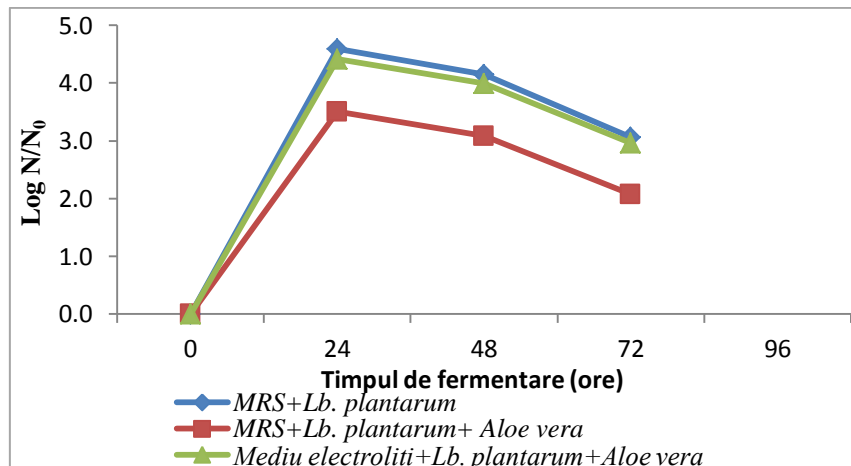


Figura 5.5. Dinamica de multiplicare a culturii *L. plantarum* în perioada de fermentație

Valorile maxime ale numărului de celule se situează aproximativ la același nivel, după 24 ore de fermentare, pentru proba martor, respectiv proba cu mediul fermentativ inovativ, pe bază de electroliți, $1,4 \cdot 10^9$ ufc/mL, iar după 72 ore viabilitatea se reduce ușor la $1,2 \cdot 10^8$ ufc/mL, și respectiv $1,28 \cdot 10^8$ ufc/mL, pentru aceleași două probe. Proba în care bacteriile lactice probiotice au fost cultivate pe MRS cu adaos de pulbere liofilizată de *Aloe vera*, au prezentat o dinamică diferită, cu valori mai reduse, de 10^9 ufc/mL la 24 ore, respectiv $9,95 \cdot 10^7$ ufc/mL la 72 ore, figura 5.5. relevând o rată de regresie a viabilității proporțională cu a celorlalte două probe.

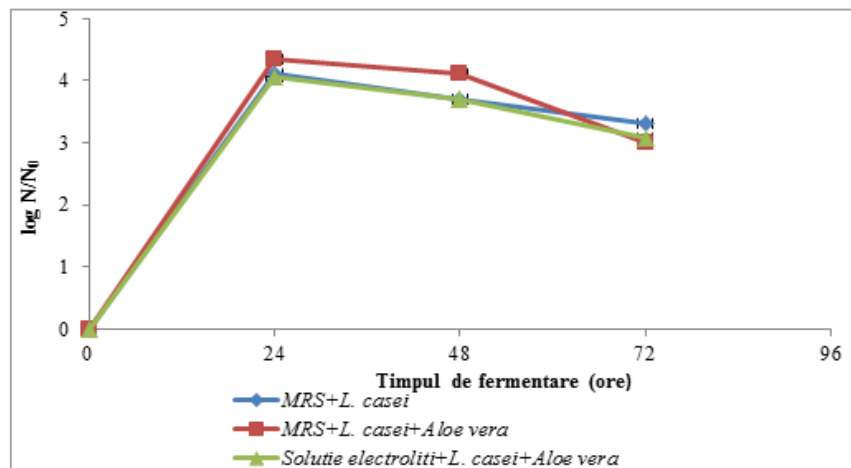


Figura 5.6. Dinamica de multiplicare a culturii *L. casei* în perioada de fermentație

Tulpina *L. casei* a avut un maxim de creștere în primele 24 ore, cea mai mare multiplicare fiind înregistrată prin cultivare în mediul MRS lichid suplimentat cu *Aloe vera* (Figura 5.6.), $2,8 \cdot 10^9$ ufc/mL, comparativ cu $4 \cdot 10^8$ ufc/mL pentru proba martor.

Urmărind dinamica *L. casei*, în proba III, mediul pe bază de soluție electroliți + *Aloe vera*, s-a observat o multiplicare superioară față de cea a probei martor, în primele 24 ore, $1,14 \cdot 10^9$ ufc/mL și s-au obținut valori ușor mai reduse după 72 de ore de fermentare, comparativ cu proba martor, $8,35 \cdot 10^8$ ufc/mL. După 72 ore, probele II și III prezintă același $N_{ufc/ml}$, $2,18 \cdot 10^8$, respectiv $4,64 \cdot 10^8$, valori ușor mai mici comparativ cu proba martor.

Pentru fiecare tulpină studiată s-au calculat parametrii cinetici care descriu multiplicarea, numărul de generații, viteza de multiplicare și timpul de generație. Datele obținute sunt prezentate în tabelul 5.4.

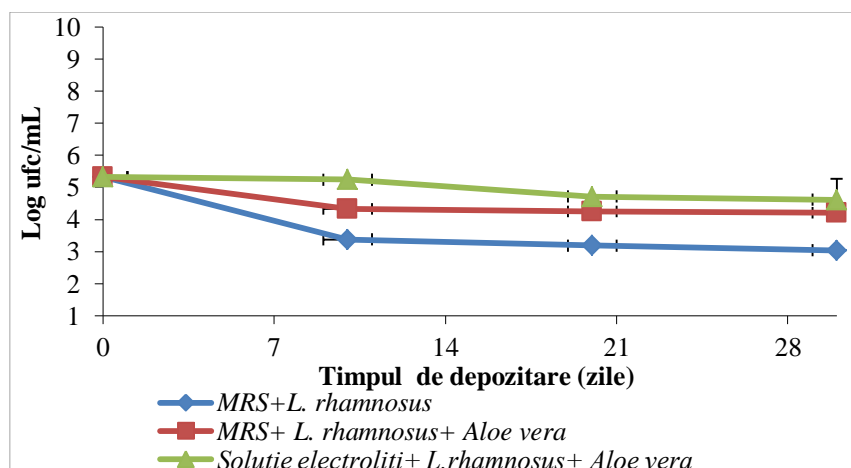
Tabelul 5.4. Parametri cinetici de multiplicare a bacteriilor probiotice (după 72 ore de cultivare, la temperatura de 37°C)

Tulpina	Numărul de generații			Viteza de multiplicare (h ⁻¹)			Timpul de generație (h)			Gradul de menținere a viabilității (%)		
	PI	PII	PIII	PI	PII	PIII	PI	PII	PIII	PI	PII	PIII
<i>L. plantarum</i>	3,82	16,77	13,32	0,57	0,69	0,55	1,75	1,43	1,8	71,10	61,56	63,81
<i>L. rhamnosus</i>	10,66	10,96	9,47	0,44	0,45	0,39	2,27	2,19	2,53	73,98	69,23	61,55
<i>L.casei</i>	10,59	13,71	12,19	0,44	0,57	0,50	2,27	1,75	1,97	61,93	61,49	69,84

Datele obținute demonstrează capacitatea culturilor *L. plantarum* și *L.casei* de multiplicare în toate mediile studiate și în special în mediile suplimentate cu Aloe vera. În ceea ce privește viabilitatea, aceasta se reduce cu 29 - 30%, după 72 ore de cultivare, în funcție de tulpină și mediul de fermentare utilizat. Parametri cinetici ai *L. casei* prezintă cea mai favorabilă evoluție în mediul experimental pe bază de electroliți suplimentat cu 0,5% pulbere liofilizată de *A. vera*, prezentând o viteză de multiplicare de $\sim 0,5 \pm 0,7 \text{ h}^{-1}$.

Viabilitatea bacteriilor probiotice în perioada de conservare a mediilor fermentate

Mediile fermentate au fost păstrate în condiții de refrigerare (2-8°C), timp de 21 de zile și analizate după 7, 14 și 21 de zile. Pentru tulpina *L. rhamnosus*, cele trei probe menținute la temperatura de 4°C, prezintă o evoluție similară în ceea ce privește viabilitatea. Proba martor prezintă o scădere a viabilității la 7 zile, apoi o scădere ușoară până la 21 de zile (Figura 5.7.). Comparativ cu aceasta, probele suplimentate cu *Aloe vera*, prezintă o scădere mai redusă a viabilității și o menținere a N_{ufc}/mL mai crescute decât proba martor. Cea mai crescută viabilitate o prezintă celulele crescute și menținute în mediul pe bază de soluție de electroliți suplimentat cu 0,5% pudră liofilizată de *Aloe vera*.

**Figura 5.7.** Viabilitatea celulelor de *L. rhamnosus* în perioada de conservare a mediilor fermentate

Pe perioada de conservare, *L. plantarum* prezintă cea mai ridicată viabilitate în probele experimentale II și III, comparativ cu proba martor. Astfel, după cum se poate observa din Figura 5.8, cea mai mare viabilitate după 21 de zile a fost observată pentru proba în care bacteria a fost cultivată în mediul pe bază de soluție de electroliți (ME) suplimentat cu 0,5% pulbere de Aloe vera. Acest fapt ne demonstrează că tulpina poate fi utilizată în studiul experimental, adaosul de pulbere liofilizată de *Aloe vera* fiind un bun substrat de creștere pentru

bacteriile lactice. Totodată, un studiu viitor ar trebui să urmărească și comportamentul pentru *L. plantarum* în mediul experimental propus, suplimentat cu *Aloe vera*, prin co-cultivare cu *L. rhamnosus* și/sau *L. casei*.

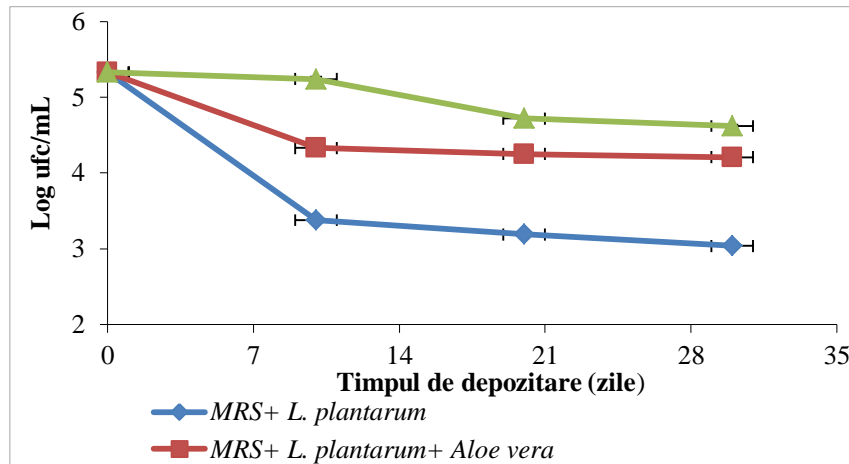


Figura 5.8. Viabilitatea celulelor de *L. plantarum* în perioada de conservare a mediilor fermentate

În cazul culturii *L. casei* (Figura 5.9.) s-a obținut de asemenea cel mai mare grad de menținere a viabilității, după 21 de zile, în cazul culturii dezvoltate în mediul pe bază de soluție de electroliți îmbogățit cu *Aloe vera*. După 7 zile, cea mai drastică descreștere a viabilității celulelor s-a observat în cultura pe mediul MRS și mediul MRS suplimentat cu *Aloe vera*, apoi moartea celulelor a încetinit, ceea ce certifică efectul protectiv al plantei asupra celulelor. Astfel, după 21 de zile, în proba experimentală, bazată pe MRS broth suplimentat cu pulbere liofilizată de *Aloe vera*, s-a determinat un $N_{ufc/mL}$ superior celui din proba martor, $5,63 \cdot 10^7$ ufc/mL, comparativ cu $2,52 \cdot 10^5$ ufc/mL, în proba martor.

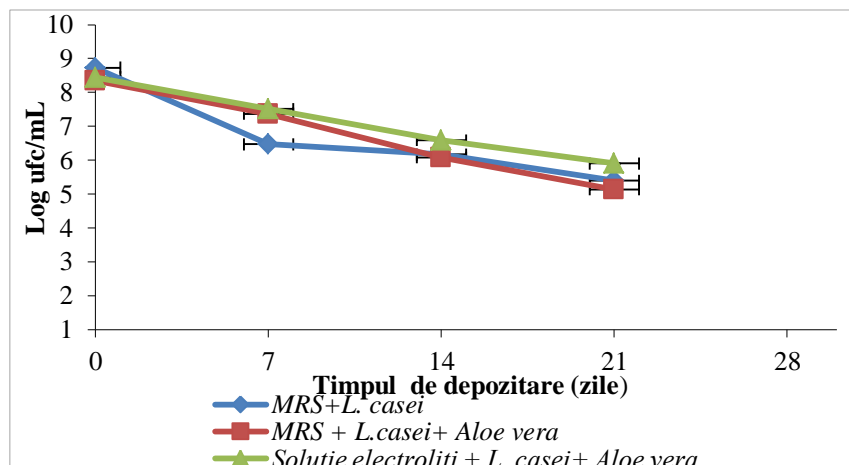


Figura 5.9. Variația viabilității celulelor de *L. casei* în perioada de conservare a mediilor fermentate

Tulpinile *L. plantarum* și *L. casei* au demonstrat o bună adaptabilitate prin cultivare pe mediul pe bază de soluție de electroliți (ME) suplimentat cu 0,5% pulbere de *Aloe vera* și capacitatea de a menține viabilitatea celulară timp de 21 de zile, prin păstrarea mediilor fermentate în condiții de refrigerare (2-8°C).

Posibila asociere a 2 tulpini probiotice va crește funcționalitatea produsului farmaceutic inovativ, produsul obținut beneficiind astfel atât de proprietățile antioxidante, antiinflamatorii, cicatrizante ale *Aloe vera* cât și de efectul antimicrobian și imunomodulator al tulpinilor probiotice.

Pe perioada de la 72 h până la 21 de zile, probele au fost menținute la 4°C, iar tulpinile studiate au prezentat grade diferite de menținere a viabilității. Pentru aceasta s-a calculat proporția de menținere a viabilității pentru fiecare tulpină pentru intervalul mai sus menționat.

În cazul tulpinii *L. rhamnosus* s-a observat o scădere marcată a viabilității de la 72 ore la 7 zile, adică în momentul tranziției temperaturii de la 37°C la 4°C (Figura 5.10.) Cea mai mare scădere a viabilității se remarcă pentru proba III, soluția electrolică experimentală (ME), în care probabil nutrienții au fost mai repede consumați. Proba II, mediul de tranziție, prezintă o scădere mare a viabilității la modificarea temperaturii, însă ulterior, se înregistrează o fază staționară, astfel că, după 21 de zile, probele experimentale prezintă valori apropiate pentru gradul de menținere a viabilității comparativ cu proba martor, 61,56 % și 63,81%, comparativ cu 71,1%.

Pentru îmbunătățirea viabilității se propun studii de optimizare a compoziției mediului pe bază de electroliți (ME) prin echilibrare din punct de vedere nutritiv sau crescând concentrația de pulbere liofilizată de *Aloe vera*. Totodată, se pot realiza teste privind utilizarea acestora sub formă microîncapsulată, cedarea din matrice, adaptarea la substrat și colonizarea suprafeței vizate.

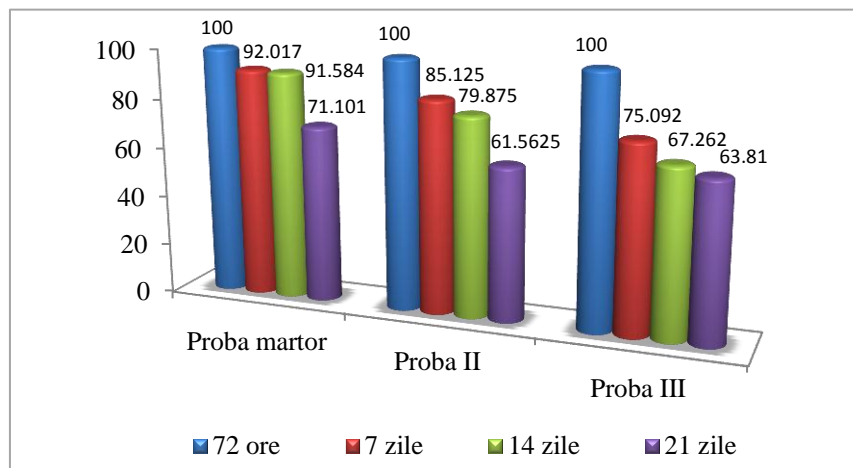


Figura 5.10. Gradul de menținere a viabilității culturii *L. rhamnosus* în mediile fermentate (păstrare la temperatura de 0-4°C)

L. plantarum a prezentat un grad superior de menținere a viabilității după 21 de zile, în cazul probei III (cultivare pe mediul ME, suplimentat cu *Aloe vera*), comparativ cu proba martor (Figura 5.11.). Deși comparativ cu proba martor, proba III prezintă o scădere a viabilității mai rapidă la 7 și la 14 zile, proba II prezintă aproximativ aceeași curbă de scădere a viabilității comparativ cu proba martor.

L. plantarum prezintă o bună viabilitate în proba III la finalul celor 21 de zile de păstrare a mediului fermentat în condiții de refrigerare, ceea ce înseamnă că *L. plantarum* este o tulpină care se pretează a fi utilizată pentru formularea produsului farmaceutic vizat (gel de uz extern).

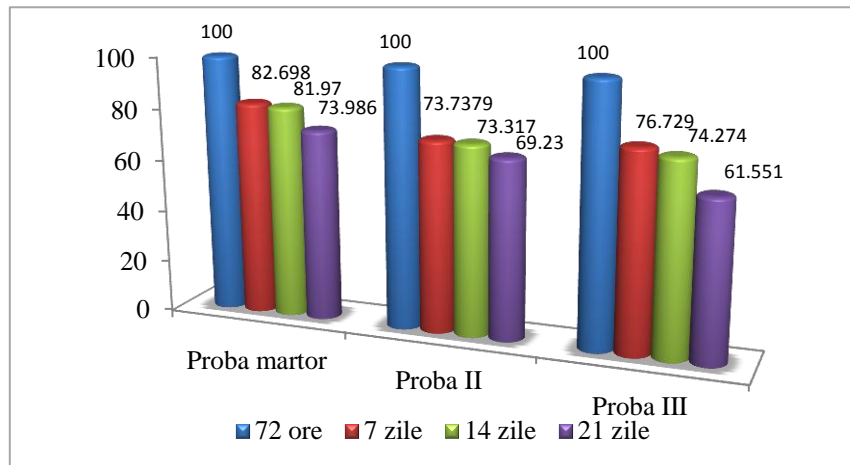


Figura 5.11. Gradul de menținere a viabilității culturii *L. plantarum* în mediile fermentate (păstrare la temperatura de 0-4°C)

Fără îndoială, cea mai bună evoluție privind multiplicarea și stabilitatea a avut-o cultura *L. casei* în mediul ME suplimentat cu *Aloe vera*. Astfel, în toate probele analizate această cultură s-a comportat cel mai bine, comparativ cu *L. rhamnosus* și *L. plantarum*, având cele mai crescute valori ale gradului de menținere a viabilității, comparativ cu martorul atât, după 7 zile, cât și după 14 și respectiv 21 de zile, de menținere a produselor fermentate în condiții de refrigerare (Figura 5.12.). Proba II prezintă după 7 zile același grad de menținere a viabilității ca și proba III, însă viabilitatea celulelor începe să scadă mai brusc până la 14 zile, iar la 21 de zile prezintă aceeași viabilitate ca martorul.

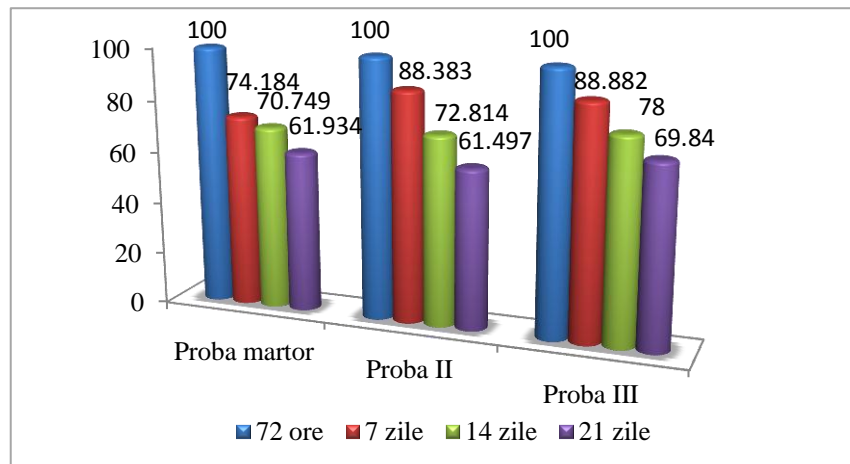


Figura 5.12. Gradul de menținere a viabilității culturii *L. casei* în mediile fermentate (păstrare la temperatura de 0-4°C)

Cercetările recomandă și această tulpină pentru utilizare în formularea produsului farmaceutic. Utilizarea în co-cultură a speciilor *L. plantarum* și *L. casei* poate fi o variantă benefică atât din punct de vedere tehnologic cât și funcțional. Funcționalitatea va fi demonstrată în etapele ulterioare.

5.3.3. Variația pH-ului în timpul fermentației și a conservării mediului fermentat

Pentru toate variantele de lucru testate, în perioada de cultivare, s-a constatat o scădere a pH-ului corelat cu multiplicarea bacteriilor lactice (Figura 5.13 și 5.14). Aceste evoluții certifică buna funcționalitate a bacteriilor în mediile fermentative utilizate. Cea mai accentuată reducere

a pH-ului s-a înregistrat în primele 48 de ore de cultivare. Pe perioada păstrării produsului fermentat, pH-ul se păstrează relativ constant.

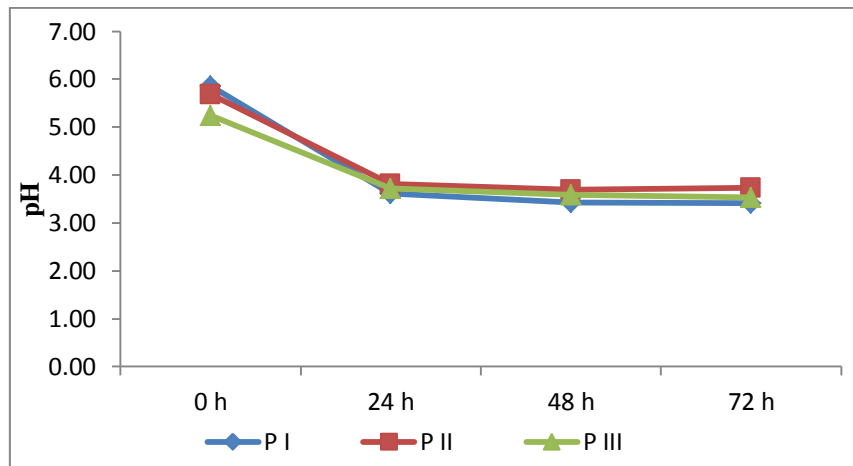


Figura 5.13. Variația pH-ului în perioada de fermentație

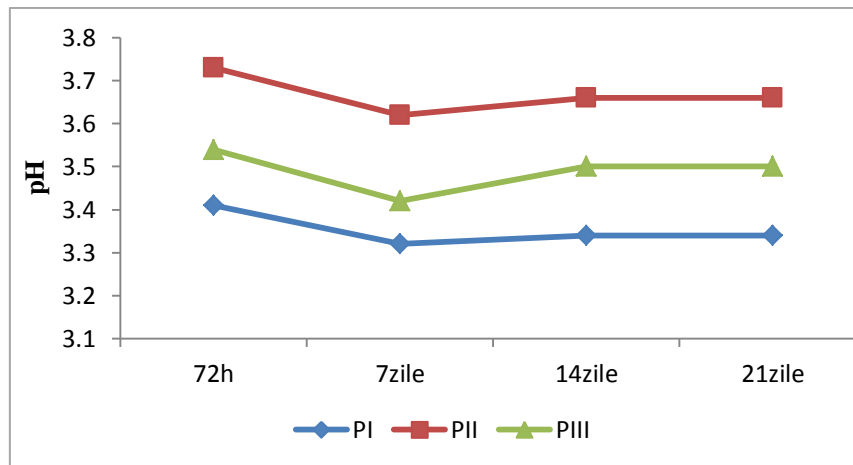


Figura 5.14. Variația pH-ului în perioada de conservare a mediului fermentat

5.3.4. Dinamica de multiplicare și stabilitatea bacteriilor lactice în mediul fermentat

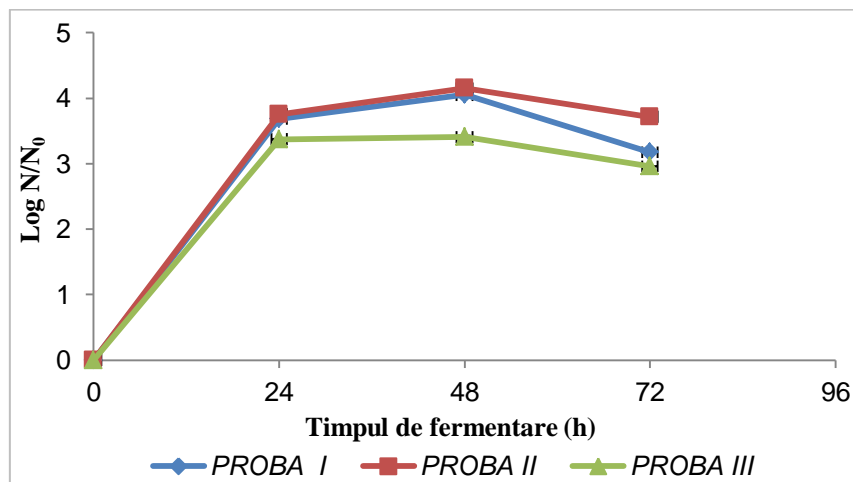


Figura 5.15. Dinamica de multiplicare a bacteriilor lactice în perioada de fermentare

În ceea ce privește dinamica de multiplicare a bacteriilor lactice în mediul pe bază de soluție de electroliți, suplimentat cu 0,5% pulbere liofilizată de *Aloe vera*, din figura 5.15 se poate observa pentru toate probele o multiplicare accentuată în primele 24 h, cu o ușoară creștere până la 48 h, urmată de etapă staționară până la 72 h de cultivare. Deși au înregistrat o viteză de multiplicare mai scăzută, în proba care conține cele două specii cultivate împreună, bacteriile sunt mai stabile din punctul de vedere al viabilității.

Parametrii cinetici de multiplicare ai bacteriilor lactice

În tabelul 5.5. sunt prezentați parametrii cinetici în timpul multiplicării și gradul de menținere a viabilității bacteriilor lactice, pentru a aprecia stabilitatea acestora și capacitatea de păstrare a unei viabilități $\geq 10^6$ ufc/mL, necesară pentru manifestarea unor efecte benefice pentru sănătate.

Tabelul 5.5. Parametrii cinetici de multiplicare a bacteriilor lactice în mediul pe bază de soluție de electroliți, suplimentat cu 0,5% pulbere liofilizată de *Aloe vera*

Probe	Numărul de generații	Viteza de multiplicare (h^{-1})	Timpul de generație (h)	Gradul de menținere a viabilității (%)
Proba I	12,19	0,43	1,972	91,73
Proba II	13,32	0,38	1,801	95,36
Proba III	11,255	0,32	2,136	95,21

Se observă o multiplicare încetinită a bacteriilor lactice în mediul minimal, specia *L.casei* fiind mai adaptată. În co-cultură amestec 1:1 a celor două specii, viteza de multiplicare și timpul de generație demonstrează o înmulțire ușor încetinită, însă gradul de viabilitate este comparabil cu al probei cu cultura *L. casei* singulară.

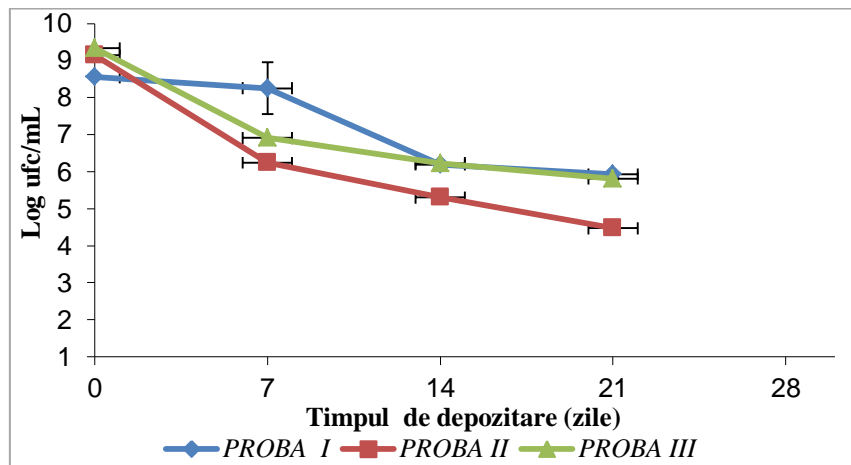


Figura 5.16. Menținerea viabilității culturilor de bacterii lactice în perioada de conservare a mediului fermentat

Din figura 5.16. se poate observa o menținere constantă a viabilității bacteriilor lactice din proba III, de 10^6 ufc/mL, comparativ cu probele I și II, care, fie au o dinamică discontinuă, cu scăderi bruște, fie se află într-o scădere continuă pe toată perioada de conservare, atingând valori de 10^4 ufc/mL.

5.3.5. Evaluarea activității antimicrobiene a mediilor fermentate

Utilizând variantele de culturi și medii codificate în capitolul materiale și metode s-a testat activitatea antimicrobiană a produselor fermentate, după 48 ore de cultivare, la temperatura de 37°C. Urmând tehnica de analiză descrisă anterior, utilizând în calitate de microorganism indicator tulpini de *Staphylococcus aureus* și *Candida albicans*, cele mai bune rezultate împotriva bacteriei *S. aureus* ATCC s-au obținut cu mediile fermentate codificate 12, 8 și 5' (Figura 5.17).

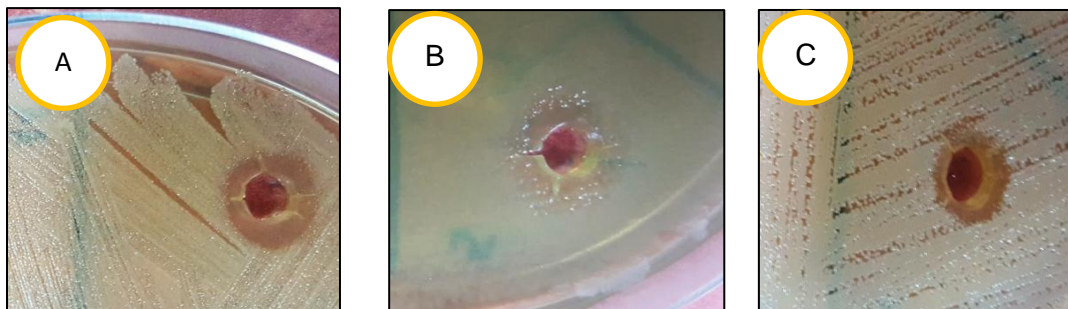


Figura 5.17. Activitatea antimicrobiană față de *S.aureus* ATCC a unor medii fermentate

A) proba 12; B) proba 8'; C) proba 5'

Diametrele de inhibiție măsurate după 24 ore de termostatare, la temperatura de 37°C au variat între 7 și 12 mm.

Diametrele de inhibiție obținute în testele pe *S. aureus* ATCC și clinic au prezentat valori moderate 8-15 mm, remarcându-se o activitate antimicrobiană mai evidentă pentru probele care au beneficiat de suplimentarea mediului de fermentație cu 2 mL extract etanolic din pulbere liofilizată de *A. vera*. De remarcat faptul că majoritatea probelor experimentale utilizate în acest studiu, care au prezentat capacitate antimicrobiană relevantă, probele 12, 8' și 5' (Figura 5.17.) au fost cele optimizate prin adaos de extract alcoolic de *Aloe vera* liofilizată, de aceea în produsul farmaceutic inovativ pentru uz topic se va suplimenta mediul de fermentație cu extract etanolic de liofilizat de *Aloe vera*, care și-a demonstrat activitatea benefică atât asupra creșterii numărului de celule viabile, cât și asupra activității antimicrobiene.

Testarea activității antifungice pe una dintre cele mai răspândite și adaptabile tulpini ale drojdiei patogene *Candida albicans*, a relevat o capacitate destul de redusă de inhibare a creșterii acesteia prin cultivare pe mediul specific Sabouraud. Rezultate mai bune s-au obținut în ceea ce privește inhibarea creșterii tulpinii de *C. albicans* din exudat vaginal, unde s-au înregistrat diametre de inhibiție cuprinse între 10 – 12 mm în cazul a 5 probe: 5', 6', 7', 9, 10, comparativ cu diametrele de inhibiție înregistrate pe *C.albicans* ATCC, între 8 - 10mm, doar în cazul a trei probe: 5, 5' și 7. Probele obținute prin fermentarea *L. casei* și *L. plantarum* în medii cu adaos de extract alcoolic de 10% *Aloe vera* au demonstrat activitatea antifungică medie (Figura 5.18).

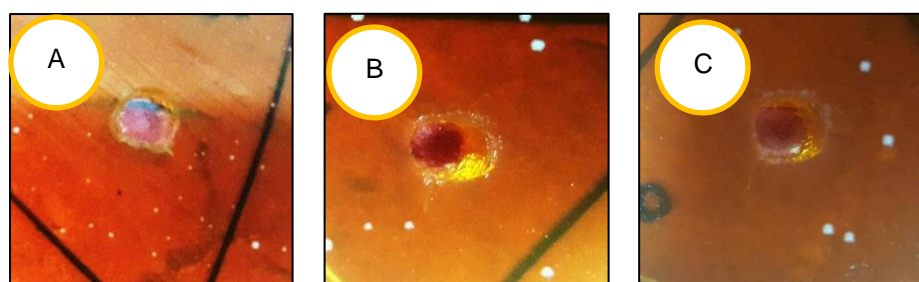


Figura 5.18. Activitatea antimicrobiană față *C. albicans* clinic ale unor medii fermentate:

A) proba 6'; B) proba 10'; C) proba 9

5.3.6. Capacitatea de aderență a tulpinilor de bacterii lactice probiotice la linia celulară HeLa-2

Studiul a vizat testarea capacității de aderență a tulpinilor lactice probiotice *L. casei* și *L. plantarum* de a adera și coloniza monostratul celular HeLa-2. Capacitatea de aderență a variat în funcție de tulpina probiotică testată, de mediul de fermentație utilizat, MRS sau mediu de electroliți (ME) și de adaosul a 2 mL de extract alcoolic de *Aloe vera* (EAA) în diferite variante de medii fermentative (Figura 5.19).

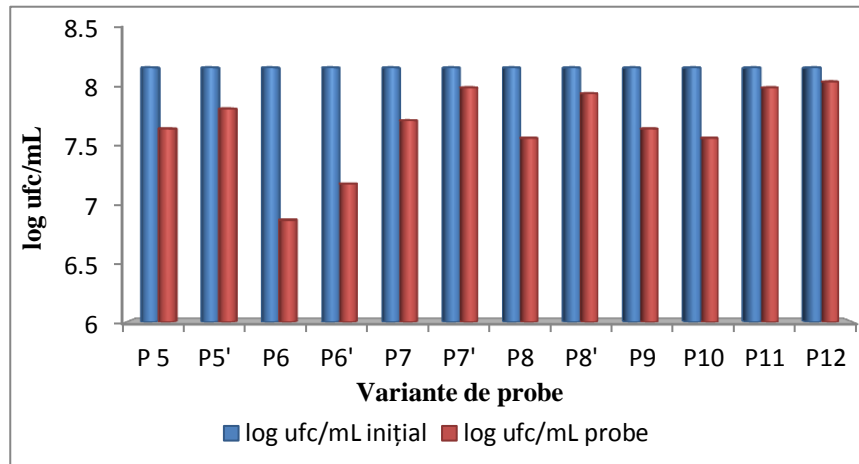


Figura 5.19. Gradul de aderență a *L. casei* și *L. plantarum* la linia celulară HeLa-2

Astfel, tulpina probiotică *L. casei* cultivată individual în MRS a prezentat un indice de aderență de 30%, corespunzător la $4,5 \cdot 10^7$ ufc/mL, respectiv o optimizare a capacității de aderență de 45%, corespunzător la $6,75 \cdot 10^7$ ufc/mL, la suplimentarea mediului fermentativ cu 2 mL de EAA. Totodată, același comportament s-a observat și în cazul tulpinii probiotice *L. plantarum* cultivată individual pe MRS suplimentat cu EAA, care a prezentat un indice de aderență de 70%, respectiv $1 \cdot 10^8$ ufc/mL, comparativ cu doar 35% în cazul variantei de cultivare în MRS (Figura 5.19.).

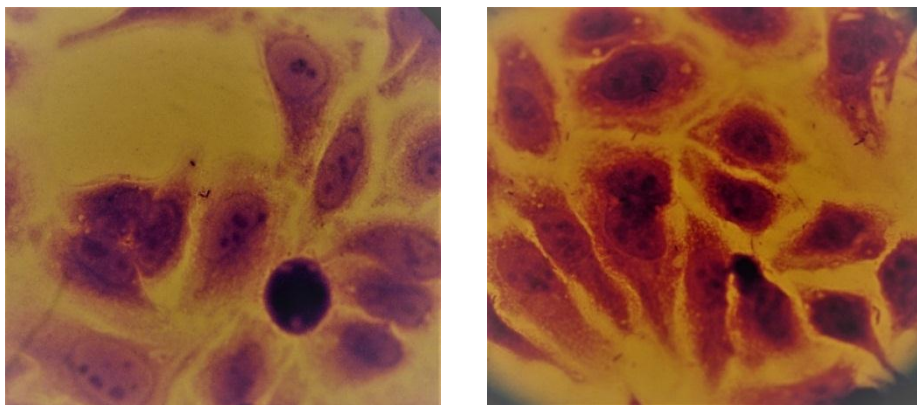


Figura 5.20. Capacitatea de aderență *L. casei* (variante 5') -stânga- și *L. plantarum* (variante 7')-dreapta

Variantele de probe care au avut tulpinile de bacterii lactice probiotice cultivate individual în mediu experimental de electroliți (ME) au prezentat o capacitate moderată de aderență la monostratul celular HeLa-2, excepție făcând *L. plantarum* cultivat în ME suplimentat cu EAA, care a atins un indice de aderență de 60%, corespunzător unei valori de $9 \cdot 10^7$ ufc/mL (Figura 5.20.).

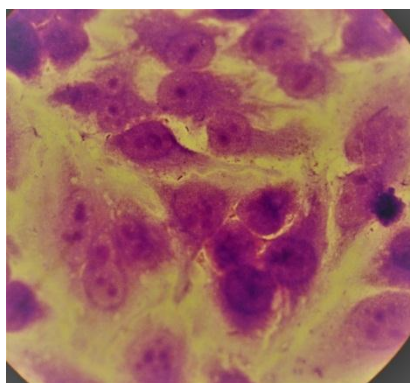


Figura 5.21. Capacitatea de aderență *L. plantarum* (varianta 8')

Stimularea capacității de aderență în acest caz se datorează exclusiv adaosului de EAA, deoarece varianta cu mediu de electroliți fără EAA a atins un indice de aderență de doar 25%.

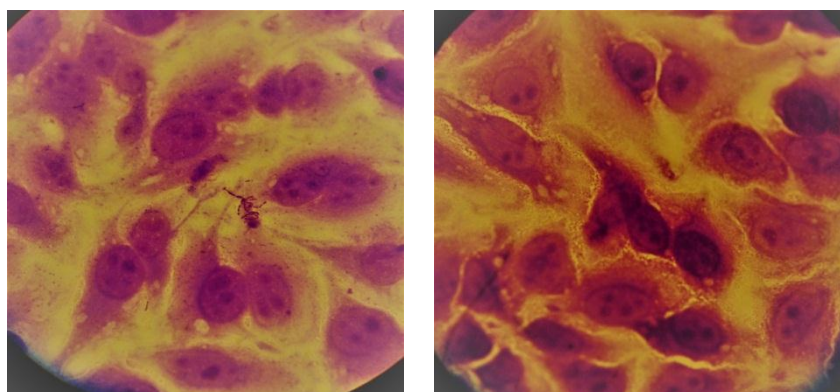


Figura 5.22. Capacitatea de aderență a tulpinilor co-cultivate 1:1 *L. casei*:*L. plantarum* (varianta 11) – stânga – (varianta 12) – dreapta

Valorile optime ale indicelui de aderență s-au înregistrat în cazul variantelor de medii fermentate în care tulpinile probiotice au fost co-cultivate 1:1 și au beneficiat și de prezența compușilor bioactivi din extractul alcoolic de *A. vera*. Variantele 11 și 12 au prezentat un indice de aderență de 70%, respectiv 75%, ceea ce reprezintă un Nufc/mL de bacterii lactice aderate la monostratul celular de $1 \cdot 10^8$ ufc/mL, respectiv $1,13 \cdot 10^8$ ufc/mL, aderența fiind stimulată de introducerea în substratul fermentativ a extractului de *A. vera* (Figura 5.22.).

5.3.7. Capacitatea de aderență a tulpinilor patogene în prezența mediilor fermentate cu bacterii lactice probiotice

Punctul de plecare al acestei cercetări a avut în vedere studiile care au demonstrat capacitatea antagonică a probioticelor împotriva majorității patogenilor intestinali și a unor uropatogeni și gonococi.

Pentru a studia această terapie inovativă, sigură și potențial eficientă, s-a realizat acest studiu de cercetare, care a investigat posibilele interacțiuni a două bacterii lactice (*L. plantarum* și *L. casei*) cu tulpinile patogene *Staphylococcus aureus*, respectiv *Candida albicans*, izolate clinic din medii contaminate.

Având în vedere adaptabilitatea speciilor patogene, atât cele bacteriene, cât mai ales a tulpinii de *C. albicans*, care prezintă rezistență la majoritatea antibioticelor, respectiv antimicoticele, posibilitatea de a disloca competitiv sau prin exclusiune aceste tulpini patogene prin aportul produselor fermentate cu bacterii lactice probiotice, este o descoperire importantă. Răspândirea dramatică a rezistenței la antibiotice, respectiv antimicotice poate avea ca și

alternativă de tratament utilizarea tulpinilor probiotice în prevenirea și vindecarea unor afecțiuni ale pielii. În plus, compușii bioactivi din planta *Aloe vera* au rol prebiotic important stimulând multiplicarea, viabilitatea și aderența bacteriilor probiotice.

Studiul a vizat proprietatea anti-adezivă pe care *L. casei* și *L. plantarum* o manifestă împotriva tulpinilor bacteriene *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 și *Staphylococcus aureus* din plagă tegumentară și a tulpinilor fungice *Candida albicans* ATCC10231 și *Candida albicans* din exudat vaginal. Pentru toate tulpinile patogene s-a aplicat metoda competitivă și s-a urmărit modificarea pattern-ului de aderență, precum și variația indicelui de aderență la celulele epiteliale HeLa-2, prin co-cultivarea microorganismelor indicator cu variante de medii fermentate cu bacterii lactice și extract alcoolice de *Aloe vera* din pulbere liofilizată.

În anumite cazuri, microorganismul indicator și-a menținut pattern-ul de aderență, însă capacitatea de aderență la linia celulară a scăzut procentual cu până la 90%, altele indicele de aderență nu a reușit să înregistreze valori mai mari de 50%, însă modificarea pattern-ului de aderență poate avea consecințe în reducerea manifestării elementelor de patogenitate (Figura 5.23.).

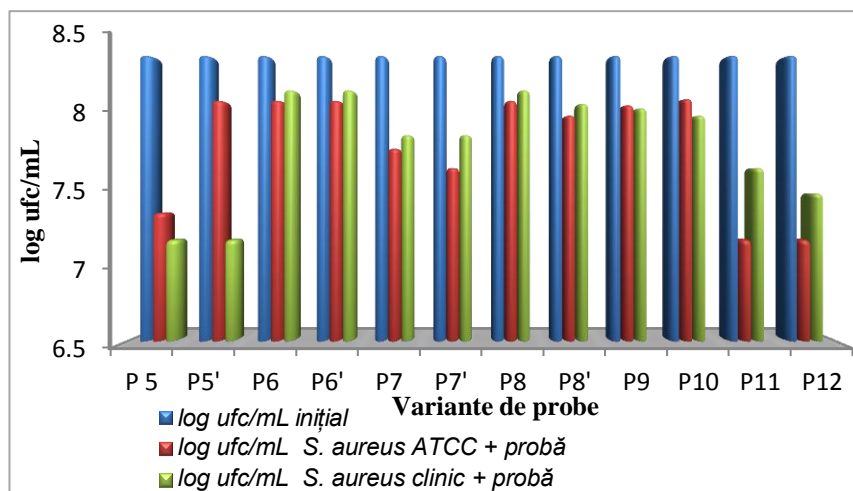


Figura 5.23. Modificarea indicelui de aderență pentru tulpinile bacteriene *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 și *Staphylococcus aureus* clinic în prezența mediilor fermentate cu *Lactobacillus* spp. și extract alcoolice de *Aloe vera*

Tulpina probiotică *L. casei* cultivată individual (P₅) a prezentat o inhibare competitivă a aderenței *S. aureus* ATCC de 85%, producând o scădere a log ufc/mL de 1:10, atunci când s-a utilizat ca mediu fermentativ MRS broth, comparativ cu o inhibare de doar 15% în cazul cultivării pe mediu MRS suplimentat cu extract alcoolice de *Aloe vera*. Dacă în cazul tulpinii de *L. casei*, prezența compușilor din *Aloe vera* nu a avut un efect stimulator, în cazul mediilor fermentate conținând *L. plantarum* în MRS (P₇) și mediu de electroliți (P₈), adaosul de extract alcoolice de *Aloe vera* (EAA) a prezentat un efect stimulator, reducând competitiv indicele de aderență al *S. aureus* cu 10%, respectiv 30%, comparativ cu variantele de cultivare ale *L. plantarum* în MRS și mediu de electroliți, fără EAA, microorganismul patogen indicator ajungând de la $1,5 \cdot 10^8$, la $2,25 \cdot 10^7$ în prezența supernatantelor de *L. casei* (P₅) și de $4,5 \cdot 10^7$ în prezența supernatantelor de *L. plantarum* (P₇). Acțiunea anti-aderentă optimă s-a înregistrat în cazul variantelor de lucru P₁₁ și P₁₂, unde co-cultivarea tulpinilor probiotice *L. casei* și *L. plantarum* în ambele medii de fermentație, suplimentate cu 2 mL EAA a determinat o inhibare maximă a capacității de aderență a *S. aureus*, acesta prezentând un număr de celule de $1,5 \cdot 10^7$ ufc/mL, comparativ cu matorul.

Inhibarea aderenței la monostratul celular HeLa-2 a *S. aureus* clinic, a prezentat aproximativ aceeași evoluție prin aplicarea metodei competitive descrisă anterior. *L. casei* a prezentat capacitate maximă de inhibare a aderenței față de tulpina patogenă clinică, atât în cazul cultivării sale individuale, cât și în varianta co-cultivării 1:1 cu *L. plantarum*, adaosul de

extract alcoolic de *A. vera* având un evident efect stimulat. Astfel, supernatantele de bacterii lactice co-cultivate 1:1 în mediu MRS și mediu de electroliți (ME), ambele suplimentate cu EAA (P_{11} și P_{12}) au redus indicele de aderență al *S. aureus* clinic cu 70%, respectiv 80%, patogenul atingând un număr de celule de $4,5 \cdot 10^7$ ufc/mL, respectiv $3 \cdot 10^7$ ufc/mL, comparativ cu martorul, $1,5 \cdot 10^8$ ufc/mL.

Vizualizate la microscopul optic cu epifluorescență Olympus BX 41, cu obiectiv de imersie 100x, metoda competitivă a co-cultivării *S. aureus* cu variante de probe fermentate conținând supernatante de bacterii lactice *L. casei*, *L. plantarum* în medii de cultură suplimentate cu extract de *Aloe vera* liofilizată, a relevat modificarea pattern-ului de aderență, ceea ce determină fie incapacitatea utilizării liganzilor la situsurile de legare celulară, fie reducerea exprimării patogenității.

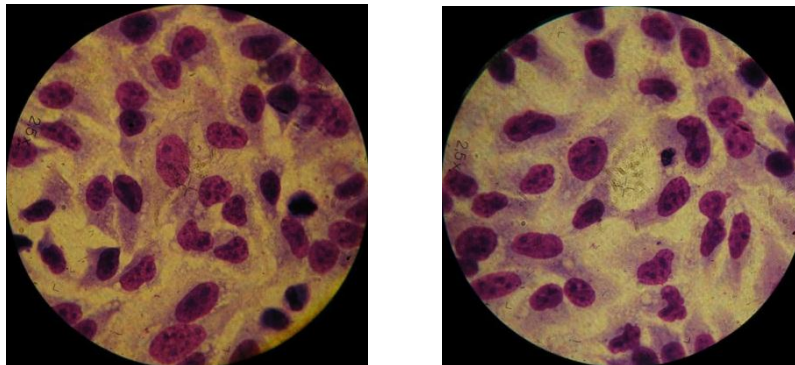


Figura 5.24. Inhibarea aderenței tulpinii *S. aureus* ATCC 25922 la substrat celular, în co-culturi cu probele codificate 5' - stânga și 7' - dreapta

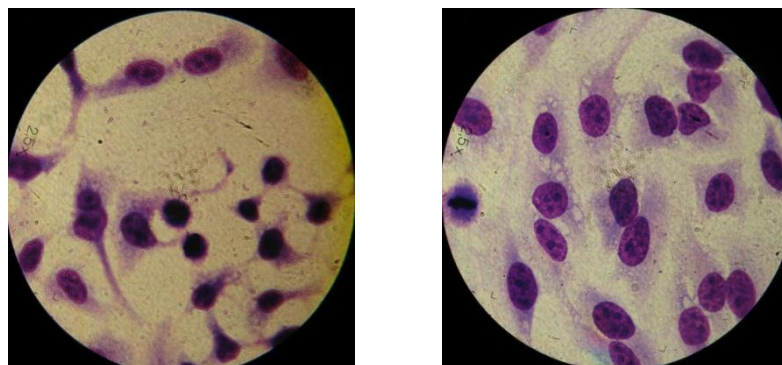


Figura 5.25. Inhibarea aderenței tulpinii *S. aureus* ATCC 25922 la substrat celular, în co-cultură cu proba 11 – stânga și 12 - dreapta

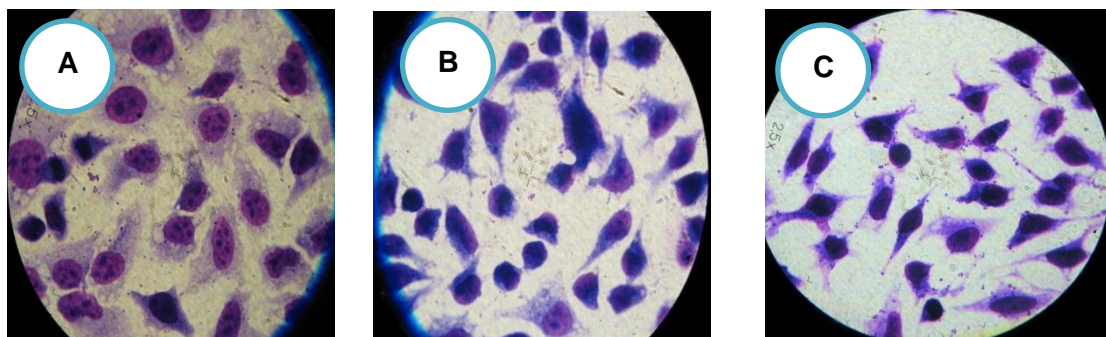


Figura 5.27. Inhibarea aderenței tulpinii *S. aureus* clinic în prezența supernatantelor de *L. casei* și *L. plantarum* A - P_5 ; B - P_{11} ; C - P_{12}

Studiul a vizat, de asemenea, urmărirea comportamentului tulpinilor fungice de *Candida albicans* ATCC 10231 și *Candida albicans* din exudat vaginal în prezența supernatantelor de

bacterii lactice cultivate 48 ore în medii fermentative diferite, MRS broth sau mediu electrolitic sărac nutritiv, cu/fără adaos de extract alcoolic de *Aloe vera* din pulbere liofilizată (Figura 5.28).

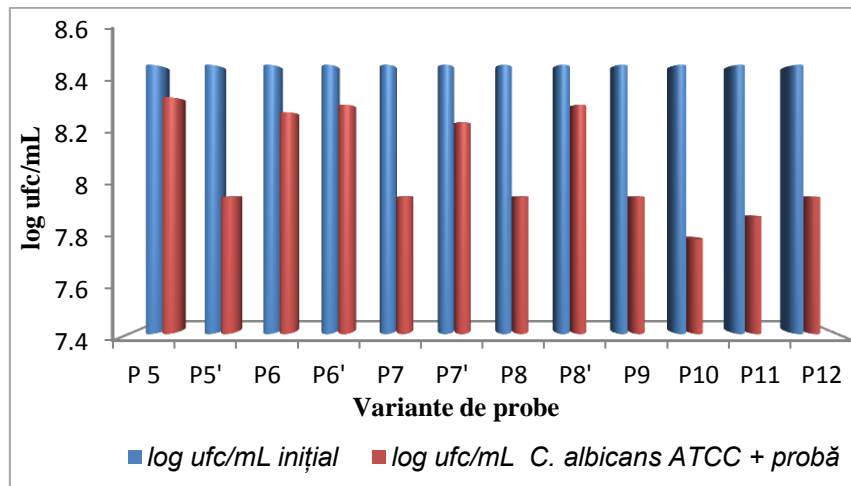


Figura 5.28. Modificarea indicelui de aderență pentru tulpinile bacteriene *Candida albicans* ATCC 10231 în prezența supernatantelor de *Lactobacillus* spp. și extract alcoolic de *Aloe vera*

Tulpina probiotică *L. casei* a prezentat proprietatea anti-adezivă față de drojdia patogenă *C. albicans* ATCC, atât în varianta cultivării individuale (P_5 , P_5'), cât și în varianta co-cultivării 1:1 cu *L. plantarum* (P_9 , P_{12}). Astfel, *L. casei* a înregistrat o reducere cu 70% a capacității de aderență la monostratul celular a *C. albicans*, aceasta atingând un log 7,95 ufc/mL, comparativ cu martorul, log 8,48 ufc/mL. Suplimentarea mediului fermentativ cu 4% extract alcoolic de *Aloe vera* 10% (EAA), s-a dovedit a fi extrem de benefică, crescând capacitatea *L. casei* de inhibare a patogenului de la 25% (P_5), până la 70% (P_5'). În mediul fermentativ electrolitic, *L. casei* a prezentat o capacitate anti-adezivă de ~30%. Totuși, cel mai redus indice de aderență a fost atins în co-cultivării patogenului *C. albicans* ATCC cu supernatantele obținute prin cultivarea celor două tulpini de bacterii lactice *L. casei* și *L. plantarum* în MRS broth suplimentat cu EAA, caz în care drojdia patogenă a atins un ufc/mL de $6 \cdot 10^7$, comparativ cu martorul, $3 \cdot 10^8$ ufc/mL.

Spre deosebire de *L. casei*, *L. plantarum* a prezentat proprietate anti-adezivă față de *C. albicans* ATCC de 70% doar în variantele cultivării sale în mediile MRS și ME, însă nesuplimentate cu EAA (P_7 , P_8). Acest fapt ne îndreptățește să afirmăm că inhibarea aderenței *C. albicans* în co-cultivare cu supernatantele obținute din variantele complexe P_{10} și P_{11} , se datorează majoritar tulpinii probiotice *L. casei*.

Vizualizate la microscopul optic cu epifluorescență Olympus BX 41, cu obiectiv de imersie 100x, metoda competitivă a co-cultivării *C. albicans* cu variante de probe fermentate conținând supernatante de bacterii lactice *L. casei*, *L. plantarum* în medii de cultură suplimentate cu extract de *Aloe vera* liofilizată, a relevat modificarea pattern-ului de aderență ce va avea consecințe în capacitatea adezivă a acestora.

Tulpina probiotică *L. casei* a prezentat cea mai marcată caracteristică antifungică, atât prin inhibarea aderenței *C. albicans* la substratul monocelular HeLa-2, cât și prin modificarea pattern-ului de aderență al martorului, reușind o dislocare competitivă de până la 70-80% și împiedicarea dezvoltării filamentației fungice la suprafața substratului. Prezența extractului alcoolic de *Aloe vera* 10% din pulberea liofilizată a avut un efect stimulator în manifestarea capacității antiadezive asupra *C. albicans* și a *L. casei*. De altfel, acest aspect al studiului prezintă caracter de originalitate.

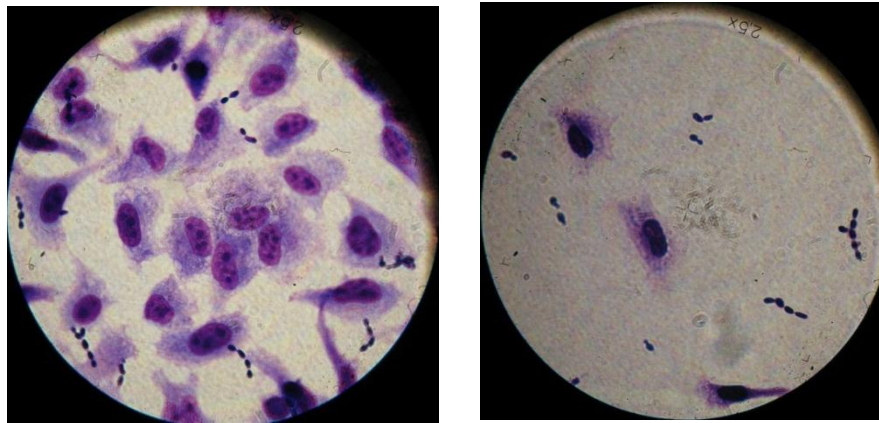


Figura 5.30. Inhibarea aderenței tulpinii patogene *C.albicans* ATCC 10231 în prezența supernatantelor de bacterii lactice: P_9 (stânga) și P_{10} (dreapta)

Tulpina fungică *C. albicans*, mai ales cea izolată clinic, prezintă o extraordinară adaptabilitate, ceea ce crește nu doar prevalența crescută a infectării, cât mai ales ineficacitatea majorității tratamentelor medicamentoase convenționale. Rezultatele studiilor de până acum au prezentat date mulțumitoare, însă nu optime. De aceea, studiul a vizat și comportamentul *C. albicans* izolată din exudat vaginal în prezența supernatantelor de bacterii lactice *L. casei* și *L. plantarum*, cultivate pe medii fermentative diferite, cu adaos de extract alcoolic de *Aloe vera*.

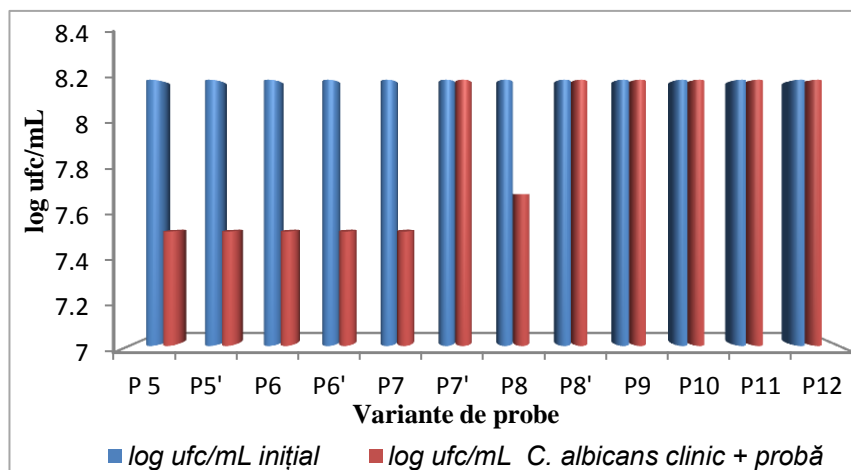


Figura 5.31. Modificarea indicelui de aderență pentru *C.albicans* tulpină izolată clinic în prezența supernatantelor de *Lactobacillus* spp. și extract alcoolic de *Aloe vera*

Tulpina probiotică *L.casei* cultivată individual, atât în mediu MRS broth, cât și în mediu experimental de electroliti, cu/fără adaos de extract alcoolic de *Aloe vera* (EAA), a prezentat cea mai bună capacitate anti-adezivă pentru drojdia patogenă *C. albicans*, realizând o inhibare a aderenței de 35%. Aderența *C. albicans* la monostratul celular s-a redus astfel de la $1,65 \cdot 10^8$ ufc/mL la $3,3 \cdot 10^7$ ufc/mL prin co-cultivarea tulpinii fungice cu supernatantele de bacterii lactice. Prezența extractului alcoolic de *Aloe vera* nu a determinat modificări majore în manifestarea capacității de inhibare a aderenței *C. albicans* la monostratul celular HeLa-2, însă nu a reprezentat un impediment în manifestarea proprietăților benefice ale *L. casei*.

În schimb, tulpina probiotică *L. plantarum* a prezentat capacitatea de inhibare a aderenței *C. albicans* izolată clinic numai în două situații. Doar supernatantele de bacterii lactice *L. plantarum* cultivate individual, în medii fermentative diferite, însă fără EAA, au fost capabile să inducă reducerea aderenței *C. albicans* cu 35% (P_7), respectiv 25% (P_8). Astfel, *C. albicans* izolată clinic, în prezența supernatantelor de bacterii lactice, a prezentat o reducere a indicelui

de aderență și o scădere a numărului de celule aderente la substrat de 0,69 log ufc/mL (*L. casei*), respectiv 0,59 log ufc/mL (*L. plantarum*).

Vizualizată la microscopul optic cu epifluorescență Olympus BX 41, cu obiectiv de imersie 100x, metoda competitivă a co-cultivării *C. albicans*, tulpina izolată clinic din secreție vaginală (Figura 5.33), cu variante de probe fermentate conținând supernatante de bacterii lactice *L. casei*, *L. plantarum* în medii de cultură suplimentate cu extract de *Aloe vera* liofilizată, a relevat modificarea pattern-ului de aderență, ceea ce va determina modificări conformaționale ale suprafeței celulare și va avea consecințe în capacitatea adezivă a acestora.

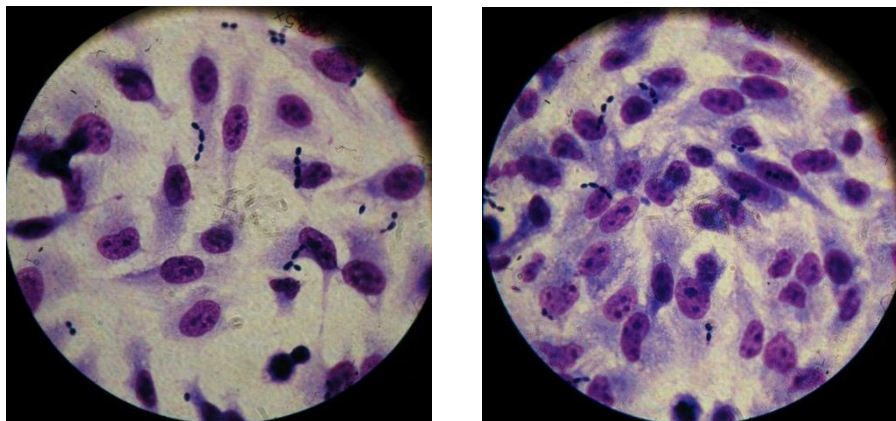


Figura 5.33. Modificarea pattern-ului de aderență a *C. albicans* tulpină izolată clinic prin co-cultivare cu *L. casei* (P_6 – stânga) și *L. plantarum* (P_8 – dreapta)

Din totalul probelor de medii fermentate cu bacterii lactice, la care s-a variat compoziția mediului de cultură (MRS sau ME), și s-au suplimentat cu 2 mL extract etanolic 10% din pulbere liofilizată de *Aloe vera*, 85% au prezentat aderență la monostratul celular de celule epiteliale, o cerință esențială pentru o tulpină probiotică.

Studiul a vizat capacitatea de inhibare, în mod competitiv și prin exclusiune, a aderenței unor tulpini patogene la substratul celular epitelial, în prezența supernatantelor obținute din probele fermentate timp de 48 ore, la temperatura de 37°C, ale tulpinilor probiotice. Din cele 12 probe testate cu bacterii lactice probiotice, 9 au avut capacitatea să inhibe aderența bacteriei *S. aureus*, atât a tulpinii etalon din colecția ATCC cât și a tulpinii izolate din mediul clinic la substratul celular (celule epiteliale HeLa-2), în proporții variabile, între 15-90%. În ce privește drojdia patogenă *C. albicans*, probele fermentate cu lactobacili au avut un efect de inhibare mai pregnant asupra tulpinii izolate clinic, când procentul maxim de inhibare a aderenței la substratul celular a fost de 80%, comparativ cu cel al tulpinii din colecția ATCC, la care procentul maxim de inhibare a fost de 70%. De remarcat este faptul că, în cazul testărilor efectuate pe tulpina *C. albicans* izolată din mediul clinic, toate supernatantele de bacterii lactice probiotice cultivate individual pe medii fermentative, suplimentate cu extract alcoolic de *Aloe vera* 10% au inhibat aderența acestora la substrat, în proporție de 80%.

Interferența directă a inhibării creșterii patogenilor pe substrat cutanat a fost studiată pe aceleași tulpini, *Staphylococcus aureus* ATCC și clinic, din exudat tegumentar, precum și pe *Candida albicans* ATCC și clinică, din exudat vaginal.

5.4. Concluzii parțiale

1. S-a studiat posibilitatea obținerii unor medii fermentate funcționale, pornind de la medii de cultură simple (MRS și ME), suplimentate cu *Aloe vera* 0,5% (m/v) pulbere liofilizată și 4 % (v/v) extract etanolic 10% din pulbere liofilizată), prin cultivarea unor bacterii probiotice (*L. rhamnosus*, *L. plantarum* și *L. casei*).

2. S-a demonstrat efectul benefic al compușilor bioactivi din *Aloe vera* asupra multiplicării și menținerii viabilității bacteriilor lactice probiotice, cultivate în MRS și într-un mediu minimal pe bază de soluție de electroliți (ME).

3. Pe baza comportamentului fermentativ și rezistența în timpul păstrării mediilor fermentate s-au selectat pentru studii ulterioare tulpinile *L. plantarum* și *L. casei*, care au fost cultivate în monocultură și cultura multiplă și au fost apoi testate pentru activitatea antimicrobiană și antifungică, pentru capacitatea de aderență la celulele epiteliale și pentru potențialul competitiv de reducere a aderenței microorganismelor patogene la celulele epiteliale.

4. S-a demonstrat menținerea unui grad superior de viabilitate, în special pentru cultura *L. casei* pe o perioadă de păstrare a mediului fermentat, obținut prin cultivare pe mediul minimal ME suplimentat cu *Aloe vera*, timp de 21 de zile, în condiții de refrigerare.

5. Produsele fermentate cu *L. plantarum* și *L. casei*, în culturi singulare sau cu inocul combinat 1:1, prezintă activitatea antimicrobiană asupra microorganismelor patogene (*Staphylococcus aureus* și *Candida albicans*), cu potențial diferit în funcție de mediul de cultivare. Suplimentarea mediului cu *Aloe vera* potențează capacitatea de inhibare.

6. Tulpinile de bacterii lactice *L. casei* și *L. plantarum* prezintă proprietatea de aderență la linia celulară HeLa-2, varianta optimă fiind reprezentată de inoculul combinat 1:1 cultivat în mediu de electroliți suplimentat cu extract alcoolic de *Aloe vera* 10%.

7. Activitatea antimicrobiană și antifungică s-a evaluat totodată prin cultivare *in vitro* în culturi de celule epiteliale (HeLa-2) în co-culturi microorganismelor patogene și medii fermentate cu bacterii lactice, când s-a demonstrat un efect benefic în inhibarea aderenței microorganismelor patogene (*Staphylococcus aureus* și *Candida albicans*) la substratul celular și asupra pattern-ului de aderență, ceea ce afectează manifestarea patogenității microorganismelor indicator.

6. Formularea unui unguent inovativ pe bază de produse fermentate cu bacterii lactice probiotice și *Aloe vera*

6.1. Introducere

Obiectivul general al studiului în această etapă a fost formularea unui unguent funcțional, un sistem bioadeziv inovativ, semisolid, suplimentat cu un produs fermentat cu bacterii lactice într-un mediu minimal pe baza de *Aloe vera*.

Produsul farmaceutic inovativ obținut va avea ca funcție fiziologică adeziunea optimă la țesutul biologic cutanat a unor organisme probiotice benefice, cu rol în restabilirea funcțiilor fiziologice ale pielii, precum și capacitatea de dislocare competitivă a unor microorganisme patogene, pentru a redobândi starea de sănătate a epidermei.

Produsul farmaceutic inovativ a cărui formulare s-a vizat în acest studiu este un unguent hidrofil pe bază de polietilenglicol, un unguent cu bază anhidră, miscibilă cu apa, conținând polietilenglicol (macrogol) 4000, glicerol, rezultatul fiind un organogel, cu proprietăți gelifiante, pentru acțiune topică, epidermică și dermică. Calea de administrare este cea cutanată sau dermică, adică pielea și anexele ei.

Unguentele sunt forme farmaceutice semisolide, destinate administrării pe piele sau mucoase, în scop terapeutic sau de protecție. Sunt constituite din excipienți (baze de unguent) în care se dispersează substanța activă. În funcție de gradul de dispersie a substanțelor active, unguentele pot fi: unguente-soluții, unguente-emulsii, unguente-suspensii sau unguente polifazice (FR X).

Unguentele cu aplicare topică, locală, sunt o alternativă viabilă, non-invazivă și compliantă în tratarea unor afecțiuni ale pielii, precum alergiile cutanate, dermatita atopică,

eczema sau ulcerul varicos. Pentru fiecare afecțiune se face apel la diverse clase medicamentoase, care să aducă beneficii în starea de sănătate a individului și care să fie capabile să restaureze funcțiile normale ale pielii.

S-a demonstrat capacitatea unor specii de bacterii lactice probiotice de a dislocui competitiv unele specii de microorganisme patogene, frecvent întâlnite în afecțiunile cutanate și de a coloniza corect suprafața pielii, pentru a favoriza restabilirea funcției de barieră și pentru a prezenta un aspect sănătos

6.2. Materiale și metode

Unguentele experimentale au fost preparate respectând condițiile de formulare și prepararea impuse de Farmacopeea Română X, având următoarele ingrediente:

Rp: PEG 400020 g
 Glicerol 40%.....5 mL
 Mediu fermentat7 mL.

Mediile fermentate au fost pregătite conform protocoalelor anterioare și au fost adăugate după răcirea bazei de unguent. Reactivii utilizați: PEG 4000, glicerol 40%, MRS lichid, MRS agar, provin de la Merck, Germania.

În cadrul experimentelor s-au urmărit:

- caracteristicile reologice ale unguentelor experimentale;
- determinarea viabilității tulpinilor de bacterii lactice inoculate;
- capacitatea antimicrobiană a probelor de unguent.

Pentru observarea omogenității probelor s-a utilizat microscopul confocal LSM 710 (Carl Zeiss, Germania), iar pentru determinările reologice, Reometru rotațional AR2000ex (TA Instruments, USA).

Unguentul bioactiv formulat prezintă ca element de noutate utilizarea a două tulpini de bacterii lactice *Lactobacillus casei* și *Lactobacillus plantarum*, în proporție de 1:1, menținute în fermentare 48 de ore, la 37°C, la incubator Binder cu circulație de aer forțată BF 4000, în medii de cultură diferite: unul clasic, de creștere selectivă pentru lactobacili, de Man Rogosa and Sharp (MRS), altul experimental, un amestec inovativ de electroliți (ME), ambele prezentând un pH apropiat, $6,5 \pm 0,2$ pentru MRS lichid, respectiv $6,7 \pm 0,2$, pentru soluția de electroliți.

Probele de unguent au fost realizate în aceleași condiții, în zonă sterilă și cu ustensile sterile, utilizând ambele tulpini de bacterii lactice, după 48 de ore de fermentare la 37°C, în mediu MRS lichid, respectiv mediu de soluție electrolitică, suplimentate cu extract alcoolic de *Aloe vera* 10%.

Suspensiile de lactobacili co-cultivați, fermentate 48 de ore la 37°C, în cele două medii de cultură diferite, au avut titrul inițial $N_{ufc/mL} = 6,9 \times 10^7$ și $\log_{ufc/mL} = 7,84$, pentru tulpinile cultivate în MRS lichid, respectiv de $N_{ufc/mL} = 1,5 \times 10^7$ și $\log_{ufc/mL} = 7,18$, pentru tulpinile cultivate în soluție electrolitică.

Mediile fermentate utilizate pentru formularea unguentelor au fost astfel:

- **Proba I** – 0,5 mL inocul *L. casei* + 0,5 mL inocul *L. plantarum* + 2 mL extract etanolic 10% din pulbere de *Aloe vera* în 50 mL MRS lichid.
- **Proba II** – 0,5 mL inocul *L. casei* + 0,5 mL inocul *L. plantarum* + 2 mL extract etanolic 10% din pulbere de *Aloe vera* în 50 mL soluție de electroliți (ME).

Pentru a demonstra funcționalitatea unguentelor formulate s-a analizat viabilitatea bacteriilor lactice în unguente pe o perioadă de 28 de zile de păstrare în condiții de refrigerare (2-8°C).

Utilizarea unei baze hidrofile pe bază de polietilenglicol 4000 și glicerol în formularea unguentelor a prezentat avantajul dispersării omogene în soluție de ser fiziologic a 1 g de probă din unguentul experimental, pentru a realiza diluții decimale succesive (metoda Koch).

6.3. Rezultate și discuții

6.3.1. Caracterizarea organoleptică a probelor de unguent

Probele de unguent au fost preparate în condiții aseptice, pentru a se evita contaminarea preparatelor cu microorganisme. Preparatele topice formulate conform Rp au prezentat următoarele caracteristici:

✓ **Aspect:**

Sub aspect organoleptic, probele de unguent au culoare gălbuie, în cazul mediului fermentat derivat din MRS lichid și culoare albă sidefată, în cazul mediului fermentat derivat din soluție de electroliți. Consistența este semisolidă, mai vâscoasă după refrigerare, însă revine la o consistență mai moale după aducerea la temperatura camerei. Etalarea pe piele este ușoară, se observă că prin întinderea în strat subțire, se formează un film plastic. Se îndepărtează cu ușurință, prin lavaj cu apă, nu este gras, nu lasă urme pe piele și nu irită. Prezintă un ușor miros dulceag, plăcut.

Menținute la rece o perioadă îndelungată de 2-3 luni, probele studiate nu au prezentat semne de oxidare sau o posibilă contaminare cu microorganisme (bacterii sau fungi).

✓ **pH:**

pH-ul probelor de unguent a înregistrat valori de la 4,8 - 5,7, valori care respectă pH-ul fiziologic al pielii – 4 - 6,5.

6.3.2. Caracteristicile reologice ale unguentelor bioactive

În general, gelurile sunt forme farmaceutice vâscoelastice sau plastice. Aceste proprietăți pot fi caracterizate prin variația modulelor mecanice: modulul de înmagazinare (engl. *storage modulus*) G' și modulul de pierdere (engl. *loss modulus*) G'' .

Modulul de înmagazinare G' măsoară elasticitatea materialului și reprezintă capacitatea sa de a păstra energia primită, în timp ce modulul de pierdere G'' caracterizează vâscozitatea materialului și exprimă capacitatea materialului de a disipa energia.

În acest studiu s-a analizat variația vâscozității dinamice corelată cu viteza de forfecare, observându-se în toate cazurile o scădere a acesteia cu frecvența, ceea ce denotă că unguentele analizate au un comportament reologic nenenewtonian.

6.3.2.1. Variația modulelor cu frecvența

Prin creșterea frecvenței se poate observa o creștere a modulului de înmagazinare, asemănător modulului probei blanc și o menținere a modulului de pierdere, la o valoare de trei ori mai scăzută. Acest aspect demonstrează capacitatea polietilenglicolilor din baza de unguent de a prezenta o bună stabilitate și o menținere a omogenității la etalarea pe piele (Figura 6.1; Figura 6.2; Figura 6.3; Figura 6.4.).

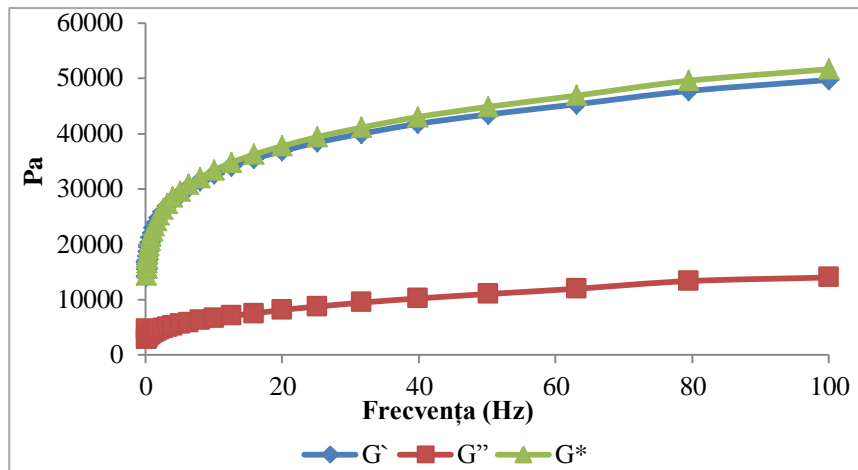


Figura 6.1. Variația modulelor cu frecvența în cazul unguentului obținut cu mediul fermentat varianta 5'

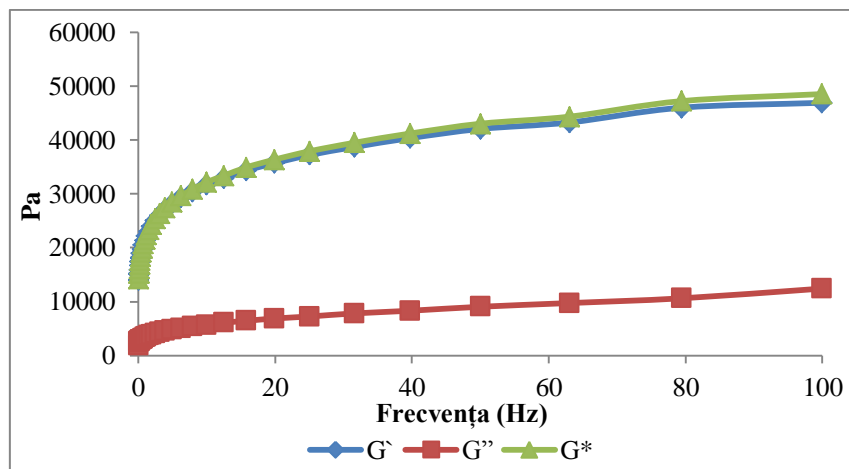


Figura 6.2. Variația modulelor cu frecvența în cazul unguentului obținut cu mediul fermentat varianta 7'

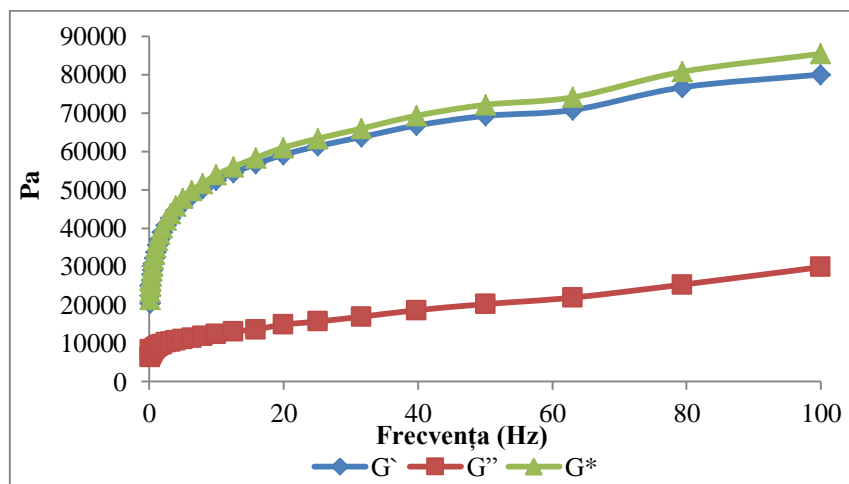


Figura 6.3. Variația modulelor cu frecvența în cazul unguentului obținut cu mediul fermentat varianta 11

În figura 6.3., se remarcă o valoare crescută a modulului de pierdere, de două ori mai mare comparativ unguentele obținute cu mediul fermentat varianta în variantele 5' și 7', coroborată însă cu o valoare de până la 80000 Pa a modulului de înmagazinare. Acest aspect

întărește convingerea că probele ce conțin ambele specii de bacterii lactice sunt stabile pe perioada conservării și eficiente la etalarea pe piele.

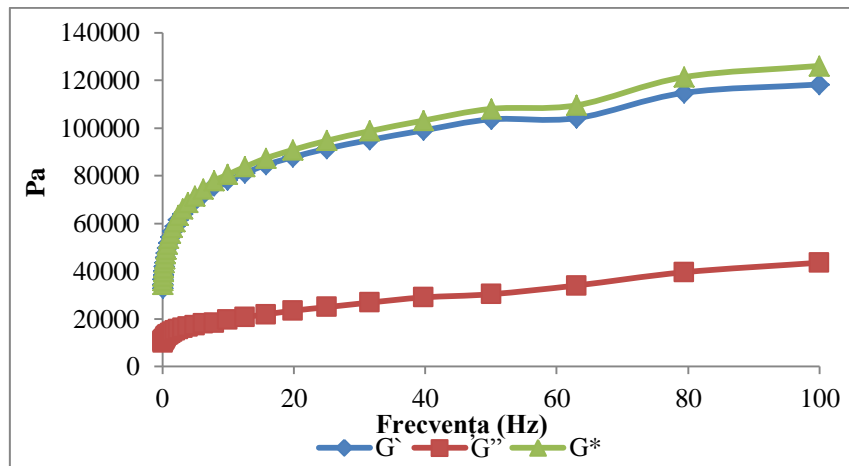


Figura 6.4. Variația modulelor cu frecvența în cazul unguentului obținut cu mediul fermentat varianta 12

Variația modulelor probelor analizate este asemănătoare. Cele mai mari valori ale modulelor le au unguentele obținute cu mediul fermentat variantele 11 și 12, care variază între 80000-120000 Pa.

Aceste date confirmă observațiile organoleptice realizate pe probele studiate, în sensul că prezintă aceleași proprietăți de etalare pe piele, aproximativ aceeași vâscozitate, iar filmul pelicular ce se formează pe piele după etalare are ca timp de instalare 3 secunde, iar filmul poate ușor fi îndepărtat prin spălare cu apă.

6.3.2.2. Variația tensiunii de forfecare corelată cu viteza de forfecare

Unguentele obținute cu mediul fermentat variantele 5' și 7' prezintă o curgere plastică, adică viteza de modificare a structurii gelice variază proporțional crescător cu tensiunea de forfecare aplicată unguentului (Figura 6.5; Figura 6.6., Figura 6.7. și Figura 6.8.).

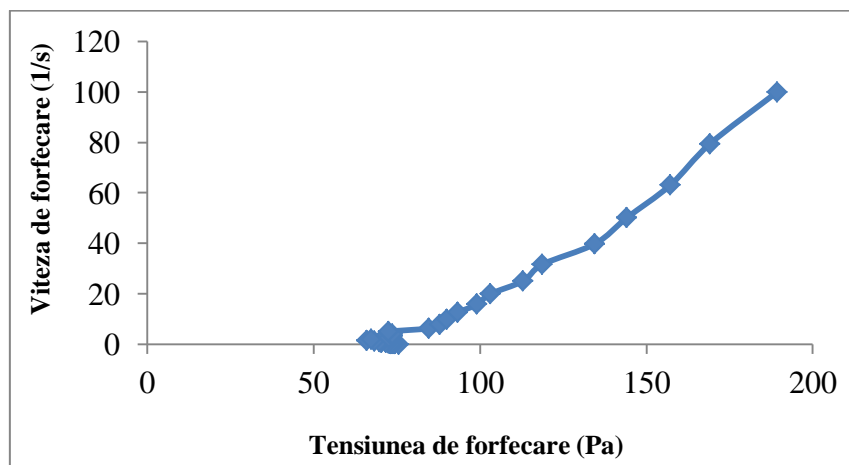


Figura 6.5. Reograma unguentului obținut cu mediul fermentat varianta 5'

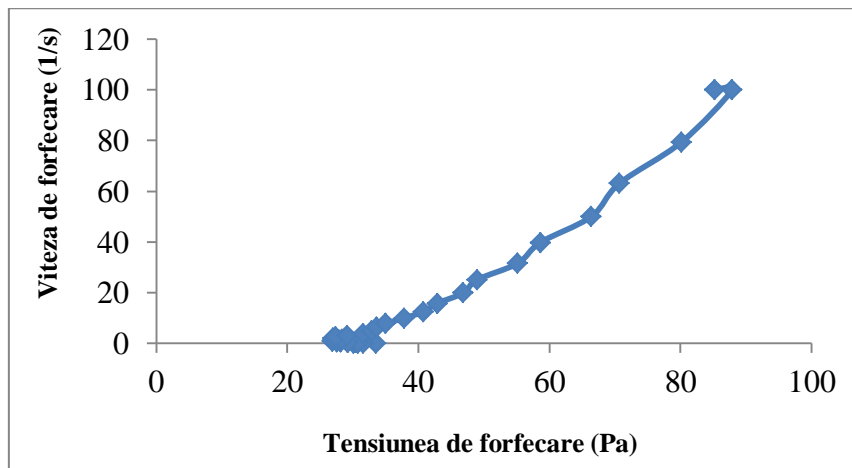


Figura 6.6. Reograma unguentului obținut cu mediul fermentat varianta 7'

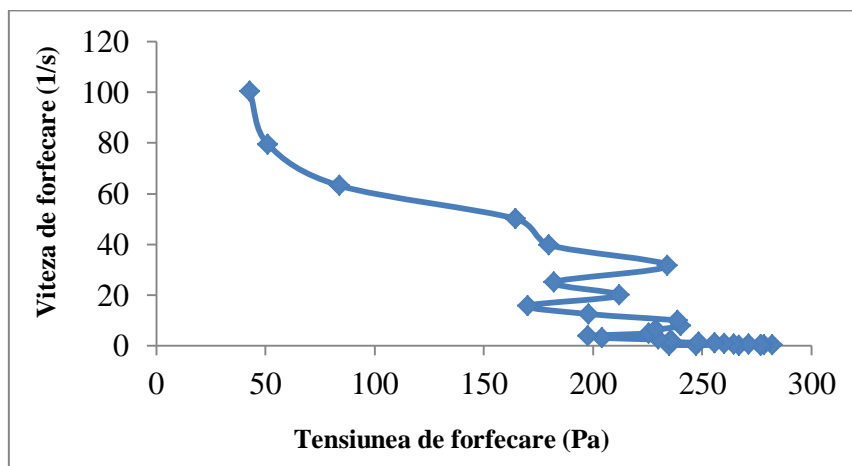


Figura 6.7. Reograma unguentului obținut cu mediul fermentat varianta 11

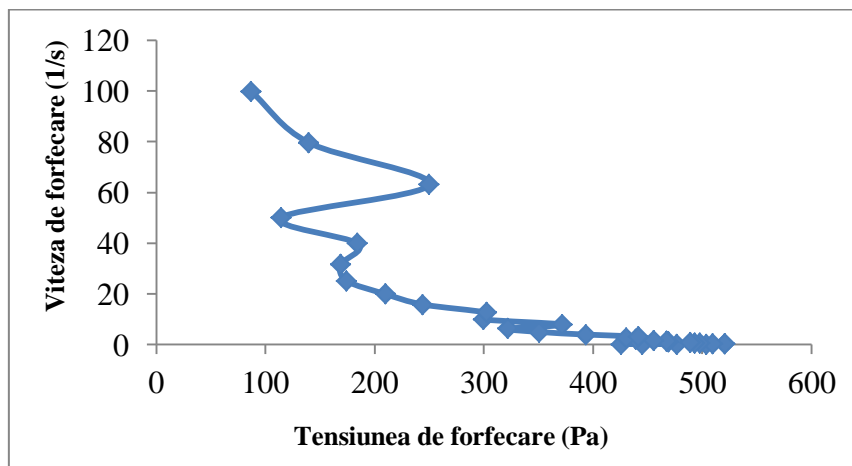


Figura 6.8. Reograma unguentului obținut cu mediul fermentat varianta 12

Curbele reologice ale unguentelor obținute cu mediul fermentat în variantele 5' și 7' demonstrează că aceste fluide au o curgere corespunzătoare corpurilor plastice, cu praguri de curgere diferite, variind între 30 - 80 Pa.s. În cazul probelor obținute cu mediul fermentat în variantele 11 și 12, care conțin ambele specii de bacterii lactice probiotice, se poate observa o curgere neuniformă, deși caracteristicile organoleptice și de etalare pe piele ale acestor unguente au fost similare celorlalte.

6.3.2.3. Tixotropia unguentelor bioactive

Tixotropia este proprietatea corpurilor vâsco-elastice de a reveni la starea inițială, semisolidă, după îndepărtarea forței de forfecare sau a unei temperaturi imprimată asupra acestora. Trecerea dintr-o stare în cealaltă se poate face de un număr nedefinit de ori.

Probele testate au fost supuse unei tensiuni de forfecare variabile, observându-se astfel comportamentul reologic, destructurarea și restructurarea preparatului la îndepărtarea forței.

În funcție de valorile vitezei de forfecare obținute pentru probele analizate, la aplicarea unei tensiuni de forfecare variabile, s-au trasat curbele de histereză, care permit caracterizarea tipului de curgere (newtoniană sau non-newtoniană) a unguentului respectiv (Figura 6.9.; Figura 6.10.; Figura 6.11.; Figura 6.12.).

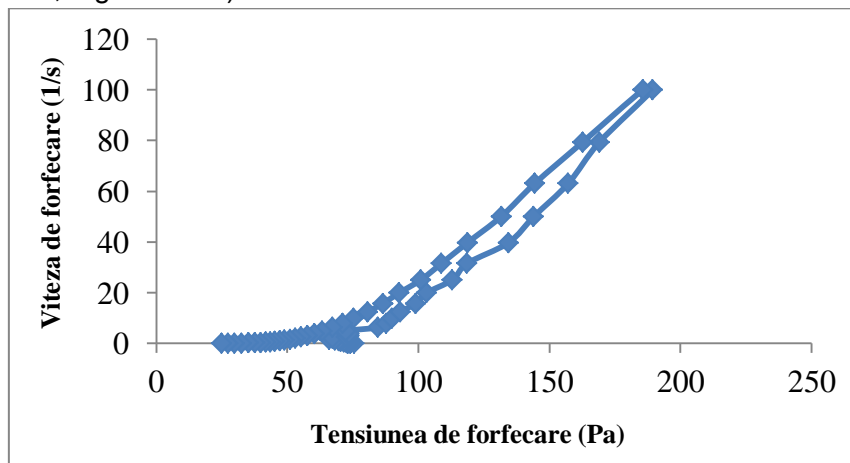


Figura 6.9. Curba de curgere în cazul unguentului obținut cu mediul fermentat varianta 5'

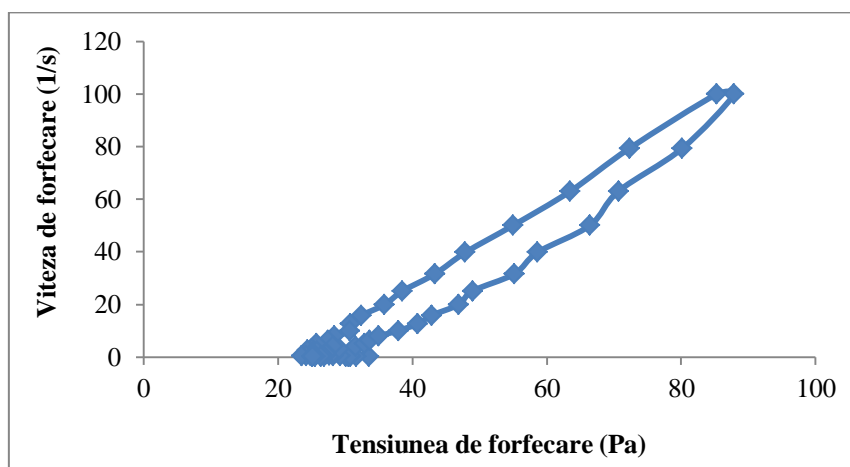


Figura 6.10. Curba de curgere în cazul unguentului obținut cu mediul fermentat varianta 7'

Se observă că cele două curbe reologice, cea ascendentă și cea descendentă nu se suprapun, ceea ce înseamnă că unguentul hidrofili experimental nu se restructurează imediat după îndepărtarea tensiunii de forfecare. Este cunoscut faptul că gelurile pe bază de polietilenglicoli cu masă moleculară mare se încadrează în categoria fluidelor reopexe și cu o marcată tixotropie, mai ales la asociere cu un poliol – glicerol – în baza de unguent.

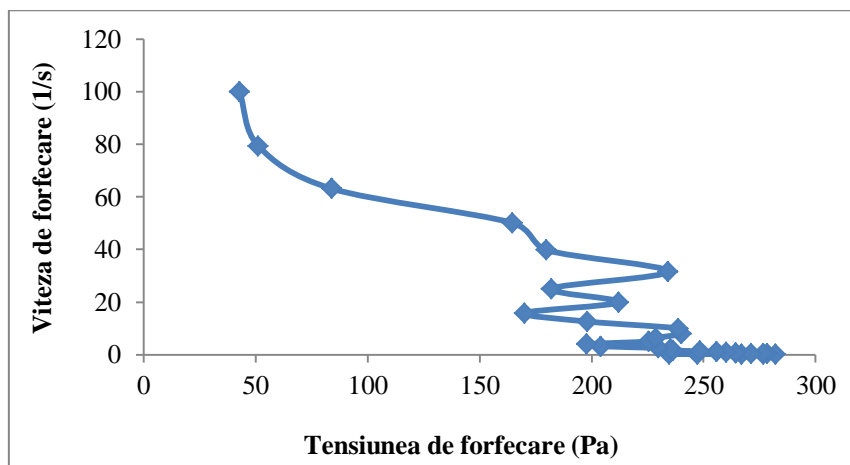


Figura 6.11. Curba de curgere în cazul unguentului obținut cu mediul fermentat varianta 11

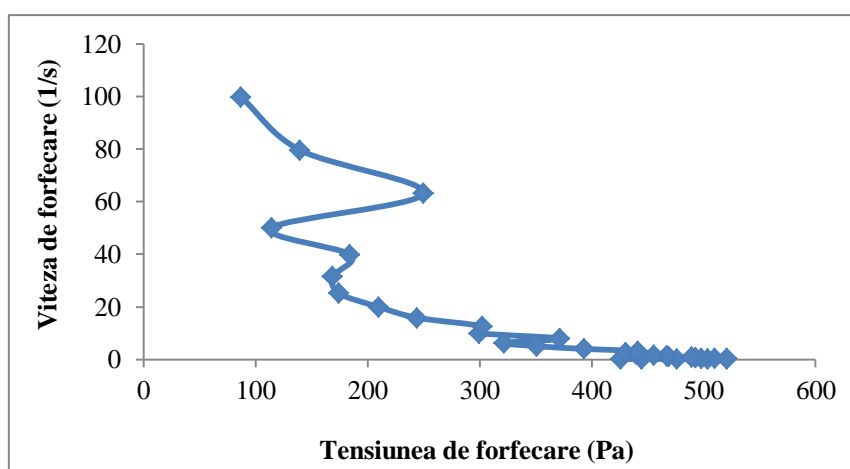


Figura 6.12. Curba de curgere în cazul unguentului obținut cu mediul fermentat varianta 12

Unguentele cu obținute cu medii fermentate variantele 5' și 7' prezintă proprietăți tixotrope asemănătoare, specifice gelurilor și formelor vâsco-elastice. Proprietățile tixotrope ale gelurilor studiate s-au pus în evidență prin apariția unei curbe histerezis la reprezentarea grafică a vitezei de forfecare în funcție de tensiunea de forfecare (Figura 6.9.; Figura 6.10.).

Datorită prezenței inoculului apos în formularea unguentului, polietilenglicol 4000, cu masă moleculară mare, prezintă un comportament pseudoplastic. Când aplicăm o tensiune de forfecare mare asupra unguentelor formulate cu această bază anhidră, se observă apariția unui fenomen reopex, urmat de o ușoară tixotropie, asociată cu structură moleculară polimerică, ca rezultat al unor legături încrucișate temporare.

Unguentele obținute cu medii fermentate, variantele 11 și 12 au o curgere necontrolată, probabil datorită ruperii temporare a legăturilor polimerice, care destructurează coerența gelului (Figura 6.11.; Figura 6.12.), după repaus se observă revenirea la vâscozitatea inițială.

Organoleptic, nu s-au observat diferențe de curgere ale preparatelor, iar la etalarea pe piele toate unguentele s-au comportat similar.

6.3.2.5. Reograme cu histerezis

În funcție de curgerea prezentată în cazul fiecărei probe testate și observând variația vâscozității, s-au realizat curbele de histerezis (Figura 6.15.; Figura 6.16.; Figura 6.17.; Figura 6.18.).

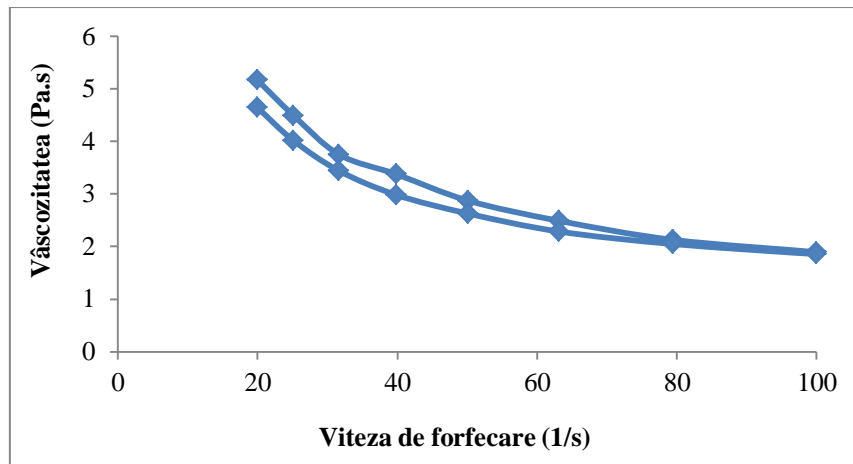


Figura 6.15. Curba de histeresis a unguentului bioactiv în formula 5'

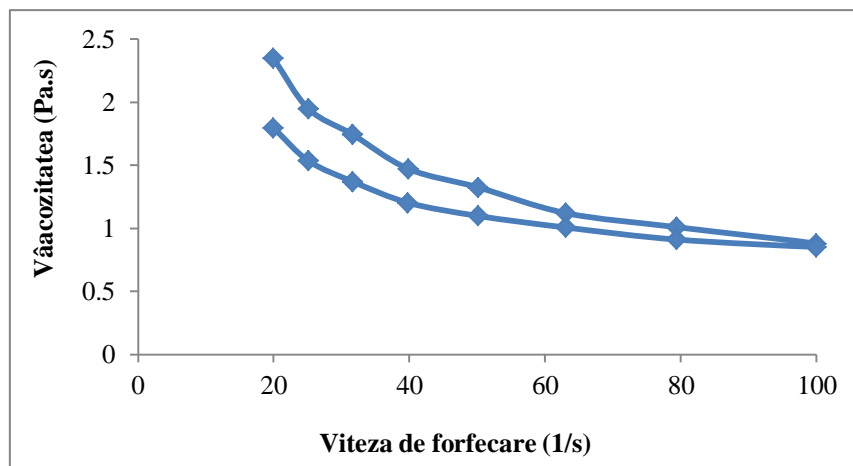


Figura 6.16. Curba de histeresis a unguentului bioactiv în formula 7'

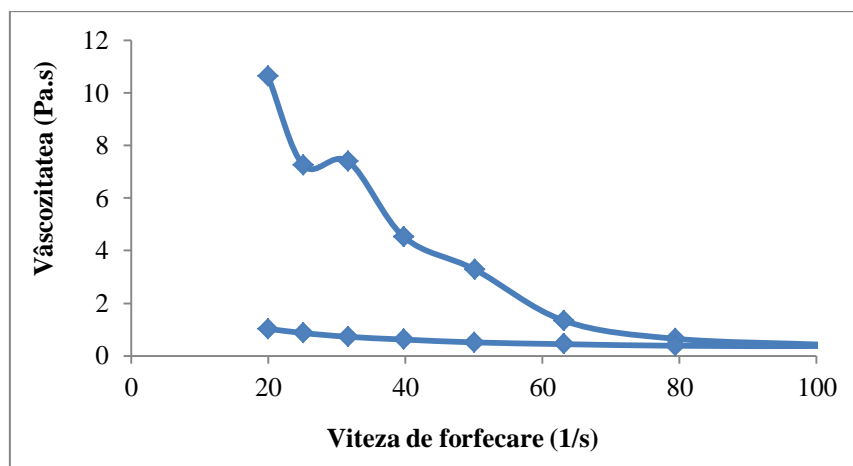


Figura 6.17. Curba de histeresis a unguentului bioactiv în formula 11

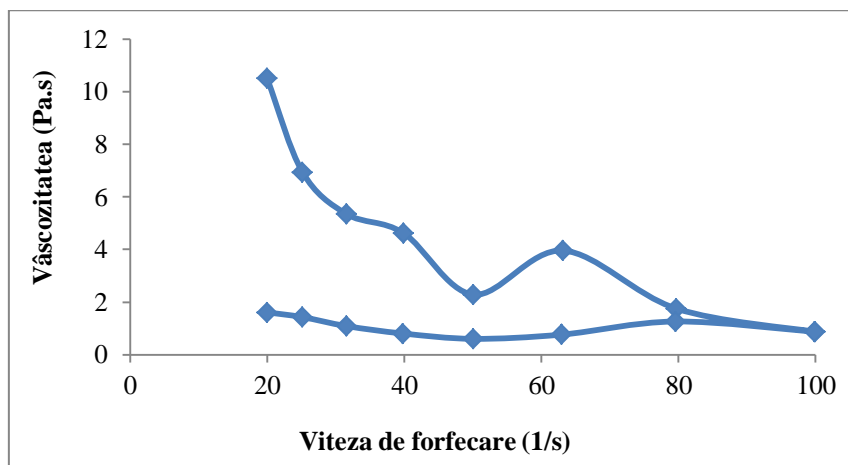


Figura 6.18. Curba de histerezis a unguentului bioactiv în formula 12

S-a studiat variația vâscozității la creșterea și scăderea vitezei de forfecare. S-a observat că probele P5 și P7 prezintă un fenomen de histereză, datorat variației în timp a vâscozității. La probele 11 și 12, histereza este foarte mare și neregulată, datorată structurării neuniforme a gelului și a unei curgeri pseudo-plastice a bazei de unguent. Gelurile care au în componență polietilenglicoli cu masă moleculară mare, prezintă un specific caracter reopex.

De obicei, prezența unor cantități de electroliți determină o scădere a vâscozității absolute a dispersiei substanțelor în PEG, însă prezența unor polioli, de exemplu glicerol, îi conferă o creștere continuă a vâscozității până la un punct unde prezintă o configurație similară cu a moleculelor de PEG.

În concluzie, se consideră formulele de unguente 11 și 12 formulate pe bază de medii fermentate, derivate din mediile MRS lichid sau mediul pe bază de soluție de electroliți (ME), cu proporții egale de inocul (1:1) de *Lactobacillus plantarum* și *Lactobacillus casei* ca fiind cele recomandate pentru obținere și utilizare în tratamentul dermatologic.

6.3.3. Evaluarea proprietăților funcționale ale unguentelor bioactive formulate

6.3.3.1. Studiul viabilității bacteriilor lactice în unguente

Unguentul bioactiv formulat prezintă ca element de noutate utilizarea a două tulpini de bacterii lactice *Lactobacillus casei* și *Lactobacillus plantarum*, în proporție de 1:1, menținute în fermentare 48 de ore, la 37°C, la incubator Binder cu circulație de aer forțată BF 4000, în medii de cultură diferite: unul clasic, de creștere selectivă pentru lactobacili, de Man Rogosa and Sharp (MRS), altul experimental, un amestec inovativ de electroliți (ME), ambele prezentând un pH apropiat, $6,5 \pm 0,2$ pentru MRS lichid, respectiv $6,7 \pm 0,2$, pentru soluția de electroliți.

Probele de unguent au fost realizate în aceleași condiții, în zonă sterilă și cu ustensile sterile, utilizând ambele tulpini de bacterii lactice, după 48 de ore de fermentare la 37°C, în mediu MRS lichid, respectiv mediu de soluție electrolitică.

Noutatea și originalitatea experimentului a constat nu doar în co-cultivarea a două tulpini de bacterii lactice într-un mediu de cultură neconvențional pentru acestea, ci și în îmbogățirea mediilor de cultura cu extract alcoolic (10%) din pulbere liofilizată obținută din frunze de *Aloe vera* adaos benefic atât pentru creșterea capacității nutritive a substratului, cât și pentru valorificarea proprietăților terapeutice benefice ale acestei plante, cunoscute încă din antichitate.

Suspensiile de lactobacili co-cultivați, fermentate 48 de ore la 37°C, în cele două medii de cultură diferite, au avut titrul inițial $N_{ufc/mL} = 6,9 \times 10^7$ și $\log_{ufc/mL} = 7,84$, pentru tulpinile cultivate

în MRS lichid, respectiv de $N_{ufc/mL} = 1,5 \times 10^7$ și $\log_{ufc/mL} = 7,18$, pentru tulpinile cultivate în soluție electrolică.

Probele de unguent bioactiv s-au formulat cu următoarea compoziție:

Macrogol(PEG 4000)	20 g
Glicerol	3 mL
Mediu fermentat cu bacterii lactice și Aloe vera	7 mL

Mediile fermentate utilizate pentru formularea unguentelor au fost după cum urmează:

- **Proba I** – 0,5 mL inocul *L. casei* + 0,5 mL inocul *L. plantarum* + 2 mL extract etanolic 10% din pulbere de *Aloe vera* în 50 mL MRS lichid.

- **Proba II** – 0,5 mL inocul *L. casei* + 0,5 mL inocul *L. plantarum* + 2 mL extract etanolic 10% din pulbere de *Aloe vera* în 50 mL soluție de electroliți (ME)

Condițiile de obținere a inoculului, de fermentare și de formulare a unguentului sunt descrise în capitolul 6.2.

Pentru a demonstra funcționalitatea unguentelor formulate s-a analizat viabilitatea bacteriilor lactice în unguente pe o perioadă de 28 de zile de păstrare în condiții de refrigerare (2-8°C).

Utilizarea unei baze hidrofile pe bază de polietilenglicol 4000 și glicerol în formularea unguentelor a prezentat avantajul dispersării omogene în soluție de ser fiziologic a 1 g de probă din unguentul experimental, pentru a realiza diluții decimale succesive.

S-a determinat numărul de unități formatoare de colonii imediat după preparare, apoi la intervale de 24 de ore, până la 96 de ore (Figura 6.20.) Următoarele probe s-au verificat la 7, 14, 21 și 28 de zile, pentru a vedea care este procentul de scădere a viabilității bacteriilor lactice probiotice în unguent (Figura 6.21.). În funcție de acest parametru, se poate stabili termenul de valabilitate al unguentelor.

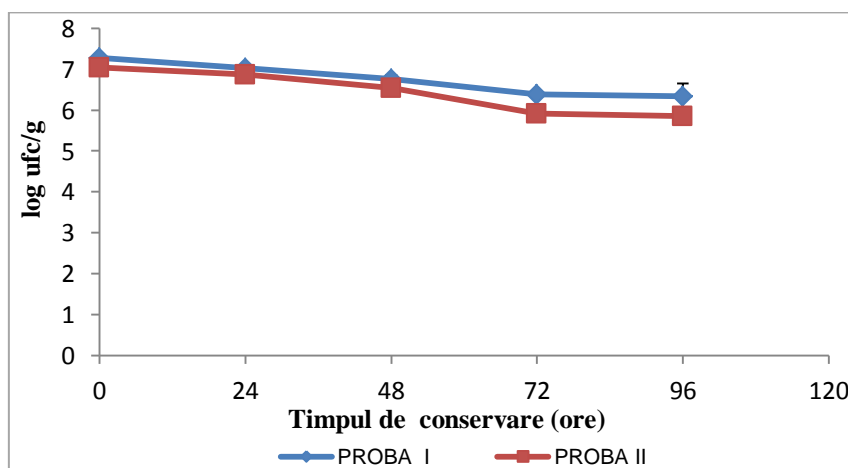


Figura 6.20. Menținerea viabilității *L. casei* și *L. plantarum* în unguent

Viabilitatea bacteriilor lactice în unguentul hidrofil este influențată de mediul de cultivare utilizat, MRS lichid (P I) sau mediul pe bază de amestec de electroliți (P II), de concentrația inițială de lactobacili din suspensia bacteriană utilizată ca inocul și de menținerea produsului finit la temperatură scăzută, 2-8°C. După 72 de ore de menținere la rece, ambele probe de unguent prezentau un conținut de lactobacili viabili 6 log ufc/g, cu o reducere de 0,89 log ufc/g a viabilității comparativ cu momentul T_0 al preparării unguentului, ceea ce determină capacitatea acestora de a influența pozitiv efectul terapeutic.

Urmărind viabilitatea bacteriilor lactice din cele 2 probe de unguent, putem observa că după 72 de ore, se produce o pierdere mai mare (9,63%), a viabilității în unguentul conținând

bacterii cultivate pe mediul cu soluție de electroliți, comparativ cu bacteriile cultivate în mediul MRS (5,47%).

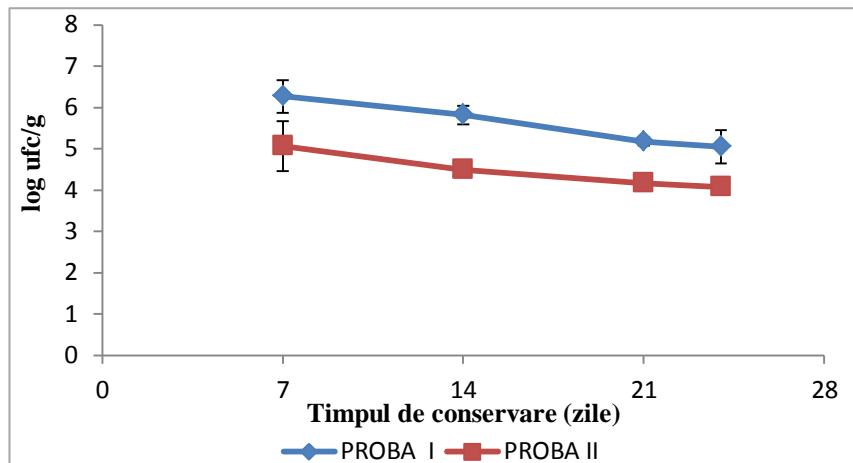


Figura 6.21. Menținerea viabilității *L. casei* și *L. plantarum* în unguent

Se observă din datele prezentate în figura 6.21, că mediul de cultivare influențează menținerea viabilității bacteriilor lactice pe o perioadă mai îndelungată. Trebuie menționat faptul că inoculul de bacterii lactice utilizat în prepararea celor două probe de unguent a prezentat la T_0 un $\log \text{ufc/mL} = 7,84$, pentru bacteriile lactice cultivate în MRS, respectiv $\log \text{ufc/mL} = 7,18$, pentru bacteriile lactice cultivate în aceleași proporții în mediul pe bază de electroliți (ME).

În unguent, la T_0 , cele două probe au prezentat $\log \text{ufc/g} = 7,28$, pentru bacteriile lactice probiotice cultivate în MRS, respectiv $\log \text{ufc/g} = 7,04$, pentru bacteriile lactice cultivate în soluția de electroliți.

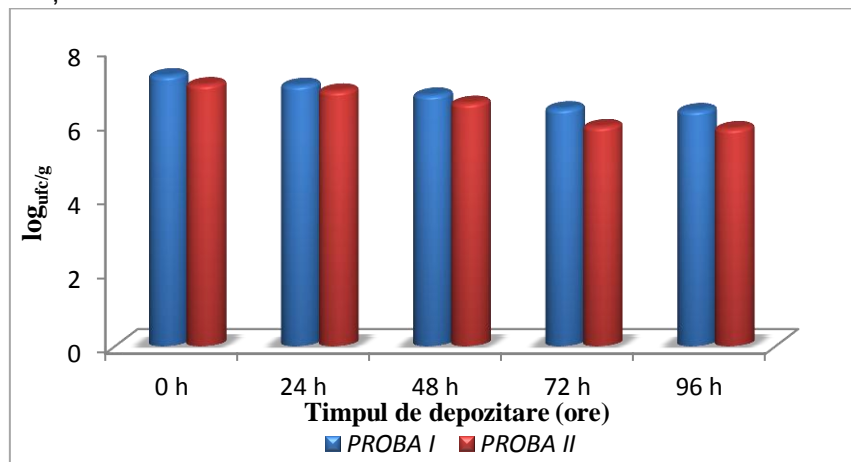


Figura 6.22. Gradul de menținere a viabilității bacteriilor lactice în unguente

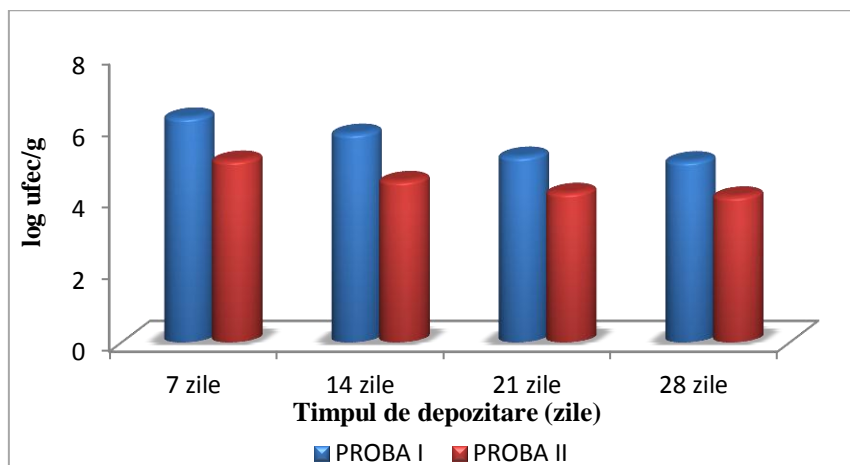


Figura 6.23. Gradul de menținere a viabilității bacteriilor lactice în unguente

Bacteriile lactice prezintă o menținere a viabilității timp de 28 de zile, cu scădere marcată a numărului de unități formatoare de colonii la 14, respectiv 21 de zile, înregistrată pentru proba II (Figura 6.22.), datorită epuizării mai rapide a substratului nutritiv compus din electroliți.

Pe perioada conservării celor două probe de unguent la frigider, 2-8°C, timp de 28 de zile, numărul de unități formatoare de colonii a înregistrat o scădere de 30,63% - proba I și 42,18% - proba II, față de proba inițială.

Scăderea concentrației de tulpini lactice probiotice din unguent, după 28 de zile, a înregistrat valori între 2,23 log_{UFC/g}, în proba de unguent unde bacteriile lactice au fost cultivate în MRS, și 2,97 log_{UFC/g}, în proba unde s-a folosit soluția de electroliți ca mediu de cultură experimental.

Unguentele experimentale bioactive au în formulare *L. casei* și *L. plantarum*, ceea ce determină o menținere a viabilității mai îndelungată, de 21 de zile.

6.3.3.2. Activitatea antimicrobiană a unguentelor bioactive

Unguentele formulate nu au prezentat activitate antimicrobiană relevantă. În cazul unguentului formulat cu mediu fermentat pe bază de soluție de electroliți (proba II) s-a observat o zonă de inhibare cu diametru de inhibare de 10 mm numai în cazul tulpinii *Staphylococcus aureus* izolată din clinic.

Nici una dintre cele două formule de unguente bioactive nu au prezentat activitate de inhibare a tulpinilor drojdiei patogene *Candida albicans*.

Tulpinile fungice utilizate în acest experiment sunt cele mai adaptabile la tratamentele antimicotice uzuale și cel mai greu de tratat.

Din aceste considerente în studiile viitoare este imperios necesară optimizarea compoziției unguentelor prin creșterea adaosului de mediu fermentat și totodată a condițiilor de fermentație pentru biosinteza de compuși cu acțiune antimicrobiană.

6.4. Concluzii parțiale

1. Unguentele bioactive formulate pe bază de mediu fermentat cu bacterii lactice în prezență de extract din *Aloe vera* prezintă proprietăți reologice specifice corpurilor pseudo-plactice, cu o vâscozitate și o curgere nenenwtoniană, ceea ce îi imprimă un comportament tixotrop, reopex, putând trece reversibil de la fază semisolidă la cea lichidă.

2. Din punct de vedere reologic, unguentele propuse au prezentat o culoare plăcută, de la alb până la alb-gălbui, sidefat, nu au miros specific, nu oxidează, se etalează ușor pe piele, formând un film pelicular ce se poate îndepărta cu ușurință prin spălare cu apă.

3. Unguentele au ca excipient polietilenglicol 4000, o bază anhidră și hidrosolubilă de unguent, cu capacitate redusă de a încorpora apa, ceea ce determină o bună conservare a probelor, la rece (2-8°C) sau la temperatura camerei (20±5°C), unguentul fiind stabil față de contaminarea cu microorganisme. Datorită includerii în ingredientele active a tulpinilor probiotice *L. casei* și *L. plantarum*, se recomandă păstrarea acestor probe în condiții de refrigerare la rece, pentru a crește perioada de depozitare.

4. Adaosul de glicerol în formularea unguentului este benefică, întrucât s-a eliminat polietilenglicolul 400 din formularea oficială, excipient lichid, glicerolul având în acest caz dublă funcție, de plastifiant și de conservant, în scopul prelungirii viabilității tulpinilor de bacterii lactice probiotice.

5. Tulpinile de bacterii lactice probiotice, *Lactobacillus casei* și *Lactobacillus plantarum*, cultivate în două medii de cultură diferite, suplimentate cu extract alcoolic 10% din frunze liofilizate de *Aloe vera*, și-au păstrat un grad superior de viabilitate, după o perioadă de 28 de zile de menținere în condiții de refrigerare pierderea viabilității a fost de 10² ufc/g în cazul unguentului cu mediu fermentat derivat din MRS lichid și de 10³ ufc/g în cazul unguentului cu adaos de mediu fermentat derivat din mediul pe bază de electroliți.

6. Unguentul formulat cu mediu fermentat pe bază de soluție de electroliți, conținând bacteriile lactice *Lactobacillus plantarum* și *Lactobacillus casei* și extract de *Aloe vera* a prezentat acțiune de inhibare a tulpinii *Staphylococcus aureus* (izolată din clinic). Nici una din cele două formule testate nu a prezentat efect de inhibare a tulpinilor de *Candida albicans*.

7. Concluzii generale

Teza de doctorat intitulată „**Formularea și caracterizarea chimică și funcțională a unor produse farmaceutice pentru uz extern, pe bază de compuși naturali bioactivi și bacterii lactice**”, a vizat obținerea unui unguent funcțional cu o formulă inovativă bazată pe încorporarea bacteriilor lactice vii, împreună cu un produs fermentat conținând extract sau pulbere liofilizată de *Aloe vera* într-o bază care să asigure menținerea viabilității bacteriilor lactice pe perioada termenului de valabilitate. Ingredientele funcționale, mediul fermentat cu bacterii lactice și extractele din frunze de *Aloe vera* (varietatea *Barbadensis* Miller) au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic și microbiologic, în vederea demonstrării rolului funcțional. Pe baza rezultatelor experimentale obținute și a concluziilor parțiale prezentate la finalul fiecărui capitol al părții experimentale, sunt sintetizate următoarele concluzii generale, după cum urmează:

- *Aloe vera* reprezintă o materie primă excelentă pentru formularea unor produse funcționale farmaceutice sau cosmetice, datorită concentrației crescute de compuși polifenolici, cu predominantă activitate antioxidantă, precum și datorită proprietăților dovedite de hidratare și de adsorbție a grăsimilor.
- Prelucrarea materialului vegetal de *Aloe vera* prin liofilizare s-a dovedit a fi tehnica de procesare cu cel mai mare randament în ceea ce privește concentrația de compuși biologici activi.
- Compușii biologic activi extrași din planta *Aloe vera* (varietatea *barbadensis* Miller) pot constitui substraturi funcționale pentru dezvoltarea și activitatea metabolică a bacteriilor lactice, speciile *Lactobacillus casei* și *Lactobacillus plantarum*.
- Speciile *Lactobacillus casei* și *Lactobacillus plantarum* au demonstrat o capacitate crescută de adaptare și stabilitate în mediu minimal, pe bază de electroliți, iar

suplimentarea substratului nutritiv cu extract etanolic din pulbere liofilizată de *Aloe vera* are efecte benefice asupra metabolismului și viabilității bacteriilor lactice.

- Co-cultivarea speciilor *Lactobacillus casei* și *Lactobacillus plantarum* s-a dovedit benefică pentru obținerea produsului fermentat, în ceea ce privește gradul de multiplicare a bacteriilor și stabilitatea celulelor viabile pe perioada de conservare, comparativ cu culturile singulare.
- Culturile testate, *Lactobacillus casei* și *Lactobacillus plantarum* au demonstrat o capacitate crescută de aderență la monostratul celular HeLa-2, ceea ce dovedește proprietatea de adeziune la nivelul celulelor epidermale.
- Produsele fermentate cu culturi combinate de *Lactobacillus casei* și *Lactobacillus plantarum*, prin cultivare timp de 48 ore, la temperatura de 37°C, în mediul minimal pe bază de electroliți, suplimentat cu extract etanolic de *Aloe vera*, au demonstrat capacitatea de a inhiba competitiv aderența la monostratul celular HeLa-2 (celule epiteliale) a tulpinilor patogene *Staphylococcus aureus* și *Candida albicans*, de referință și izolate din exudat tegumentar sau vaginal, prin ocuparea situsurilor de legare de la nivelul membranei celulare.
- Mediile fermentate obținute în variantele testate cu culturi combinate de *Lactobacillus casei* și *Lactobacillus plantarum* prezintă activitate antimicrobiană, antibacteriană și moderat antifungică. Pentru intensificarea acțiunii antimicrobiene sunt necesare studii suplimentare pentru optimizarea condițiilor fermentative.
- Unguentele hidrofile formulate cu ingrediente naturale, conținând medii fermentate cu bacterii lactice probiotice și extract etanolic de *Aloe vera* reprezintă produse farmaceutice inovative, cu rol benefic în prevenirea, tratarea și vindecarea unor afecțiuni ale pielii.
- Utilizarea bazei de unguent cu polietilenglicol 4000 și glicerol prezintă avantajul imprimării unui caracter tixotrop și reopex al curgerii, specifice gelurilor și formelor vâsco-elastice, precum și al unui caracter hidrofili, ceea ce conferă posibilitatea îndepărtării filmului pelicular de pe piele prin spălare cu apă.
- Selectarea compusului PEG 4000 ca bază de unguent anhidră crește stabilitatea microbiologică a produsului finit, iar glicerolul îndeplinește atât rol de plastifiant, cât și de protector pentru bacteriile lactice, menținând indicele de activitate al apei în produs la valori optime pentru menținerea viabilității bacteriilor lactice în unguent.
- Unguentul hidrofili conținând produs fermentat cu *Lactobacillus casei* și *Lactobacillus plantarum* (1:1) prin cultivare pe mediul de electroliți suplimentat cu 6% extract etanolic (10%) de *Aloe vera*, timp de 24 h la temperatura de 30°C, a demonstrat activitate antimicrobiană împotriva tulpinii *Staphylococcus aureus* izolată din plagă tegumentară și o activitate antifungică redusă față de tulpinile de *Candida albicans*.
- Produsul farmaceutic funcțional propus se pretează a fi utilizat în dermatită atopică, răni minore, arsuri de gradul I sau gradul II necomplicate, psoriazis și eczeme, după completarea testelor cu studii *in vivo*.
- Aceste studii oferă perspectiva unor noi cercetări privind extinderea utilizării bacteriilor lactice în compoziția produselor farmaceutice pentru prevenirea și tratamentul bolilor de piele, având în vedere diversitatea metabolică și funcțională a acestora și capacitatea de adaptare și rezistență în medii minimale, în prezența compușilor biologic activi din surse vegetale, în special a compușilor polifenolici.

8. Contribuții la dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspective

Domeniul farmaceutic deschide noi perspective cunoașterii și cercetării științifice, întrucât tehnologia farmaceutică este într-o continuă dinamică, răspunzând permanent nevoilor pacienților, cu scopul eficientizării și creșterii complianței tratamentului. Pe de altă parte, consumatorii sunt interesați tot mai mult de utilizarea produselor naturale bioactive pentru a le înlocui pe cele de sinteză chimică.

Găsirea unor soluții eficiente prin valorificarea resurselor naturale este o preocupare continuă a omenirii, unele remedii fiind utilizate înainte de a se cunoaște sursa. Este cazul bacteriilor lactice, considerate în prezent soluția pentru multe probleme legate de sănătate, funcționalitate metabolică și conservabilitate. Microbiomul natural asociat ființelor vii, un multiconglomerat de microorganisme utile asociate pe criterii de simbioză, sinergism, este considerat principalul responsabil pentru starea de sănătate a acestora. Dezvoltarea pe care omenirea o parcurge în prezent crează grave dezechilibre la nivelul acestui microbiom cu consecințe dezastruoase asupra sănătății și calității vieții. Astfel, cercetarea, dezvoltarea tehnologică și inovarea au ca principale ținte crearea de produse care să completeze microbiota utilă, fie ca este vorba de alimente, cosmetice sau produse de uz farmaceutic.

În acest sens, teza de doctorat, prin obiectivele științifice propuse și rezultatele obținute, oferă o alternativă inovativă de produs pentru sănătatea epidermei, a cărei eficiență a fost demonstrată prin studii *in vitro*. Astfel, originalitatea tezei de doctorat se bazează pe următoarele aspecte de inovație în cercetare:

- S-au studiat și selecționat tulpini de bacterii lactice capabile să se înmulțească și să supraviețuiască în medii minimale, neconvenționale, pe bază de electroliți, suplimentate cu compuși bioactivi din *Aloe vera* cu rol de prebiotic. Acest tip de mediu de fermentare nu a mai fost studiat până în prezent, iar rezultatele obținute oferă perspective multiple de cercetare fundamentală și aplicativă.
- S-a demonstrat funcționalitatea mediilor fermentate cu bacterii din genul *Lactobacillus* spp., în prezență de *Aloe vera*, privind capacitatea de aderare la celulele epiteliale și activitatea antimicrobiană de inhibare a patogenilor care pot contamina epiderma (*Staphylococcus aureus* și *Candida albicans*)
- S-a propus și testat formula unui unguent funcțional, cu o compoziție simplă, cu conținut tribiotic (prebiotic, probiotic și postbiotic), pentru care s-a dovedit păstrarea viabilității bacteriilor lactice timp de 21 de zile la temperaturi de refrigerare. Unguentul este eficient împotriva tulpinilor de *Staphylococcus aureus* și *Candida albicans* (tulpini izolate prin studii clinice).
- Studiile realizate în integralitatea lor sunt originale prin abordare și rezultatele obținute, fiind unicat în România și chiar în lume, fapt certificat de literatura științifică care oferă foarte puține date în acest sens.

În perspectivă se are în vedere optimizarea condițiilor fermentative, a compoziției unguentului pentru a crește eficiența și funcționalitatea și brevetarea rezultatelor obținute.

9. Diseminarea rezultatelor cercetării

Diseminarea rezultatelor cercetării s-a realizat prin publicarea de articole în reviste cotate ISI și în reviste BDI+ sau prin prezentări în cadrul unor conferințe științifice reprezentative în domeniu, din străinătate și din țară, după cum urmează:

A. Articole publicate în reviste cotate ISI (factor de impact)

1. NICOLETA MAFTEI ARON, **MONICA (GĂUREANU) BOEV**, GABRIELA BAHRIM, *Probiotics and therapeutic effect in clinical practice – review*, Revista Romanian Biotechnological Letters, vol 20, nr1/2015, pg. 10162-10175, Articol ISI – IF 0,412–.
2. **MONICA (GĂUREANU) BOEV**, NICOLETA MAFTEI, GABRIELA BAHRIM, *The biotechnological behaviour evaluation of some lactic bacteria in Aloe vera enriched medium*, Journal of Biotechnology, 2015, 208: pg. 102, ISI – IF 2,75.

B. Articol acceptat spre publicare în revistă indexată în baze de date internaționale

1. **GĂUREANU (BOEV) MONICA**, MAFTEI NICOLETA-MARICICA, BAHRIM GABRIELA-ELENA, *Formularea unui unguent bioactiv cu Aloe vera și bacterii lactice - Topical formulation with bioactive components from Aloe vera and lactic acid bacteria*, Revista Jurnal Medical Brașovean, nr. 2/2018.

C. Cărți/capitole publicate în edituri internaționale

1. MAFTEI, NM; COTARLET, M; **BOEV (GAUREANU) M**; BAHRIM GE, 2017, *Probiotics in health promotion and their therapeutic effect*, LAP LAMBERT Academic Publishing, International Book Market Service Ltd, member of Omniscryptum Publishing Group, ISBN 978-613-4-90751.

D. Lucrări comunicate la manifestări științifice internaționale

1. **MONICA (GĂUREANU) BOEV**, NICOLETA MAFTEI, GABRIELA BAHRIM, *The biotechnological behaviour evaluation of some lactic bacteria in Aloe vera enriched medium*, European Biotechnology Congress, 7-9 mai, 2015, București, România.
2. **BOEV GAUREANU MONICA**, NICOLETA M. MAFTEI, GABRIELA BAHRIM, 2017, *Sustain of the Metabolic Activity and Stability of Lactic Acid Bacteria by Bioactive Compounds from Aloe*, 8th International Euroalimnt Symposium Mutatis Mutandis in Foods, 7-8 September, Galați, România (poster).
3. MAFTEI NICOLETA M., RAMOS-VILLARROEL ANA Y., **GĂUREANU (BOEV) MONICA**, Chesaru Bianca I., Iancu Alina V, Paltenea Elpida, Nicolau Anca I., 2017, *The Inactivation Effect on Pulsed Light on Aspergillus spores*, 8th International Euroalimnt Symposium Mutatis Mutandis in Foods, 7 – 8 September 2017, Galați, România.

E. Lucrări comunicate la manifestări științifice naționale

1. **MONICA (BOEV) GĂUREANU**, NICOLETA MAFTEI-ARON, GABRIELA BAHRIM, ***Microbiological quality evaluation of some commercial nutraceuticals containing probiotic bacteria***, Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ – Galați CSSD-UDJG, 15-16 mai 2014, Galați, România.
2. **MONICA (BOEV) GĂUREANU**, NICOLETA MAFTEI-ARON, GABRIELA BAHRIM, ***Cultivation and Preservation of Lactic Bacteria in Aloe Vera Enriched Medium, for Topic Use in Pharmaceuticals Formulation***, Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ – Galați CSSD-UDJG, 4-5 iunie 2015, Galați, România.
3. **MONICA (BOEV) GĂUREANU**, GABRIELA BAHRIM, LIA MARA DIȚU, ***The evaluation of antimicrobial activity of fermented products contains lactic acid bacteria and Aloe vera extract based of cellular adherence capacity***, Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ – Galați CSSD-UDJG, 2-3 iunie 2016, Galați, România.

F. Proiect național

TITLUL: „Development of a versatile fingerprinting system with applications in bitterness analysis of pharmaceuticals” SURSA DE FINANȚARE: PN-II-RU-TE-2014-4-1093, Contract: 40/01.10.2015

PERIOADA: 1.10.2015 - 30.09.2017 – membru cercetător

1. IRINA MIRELA APETREI, ADRIANA AURORA BEJINARU, **MONICA BOEV**, CONSTANTIN APETREI, OLIMPIA DUMITRIU BUZIA, ***Determination of ibuprofen based on screen-printed electrodes modified with carbon nanofibers***, Revista Farmacia, 65, nr. 5/2017, pg. 790-795, Articol ISI –IF 0,918 .
2. C. APETREI, **M. BOEV**, A. DUMITRACHE, I. M. APETREI, ***Novel biosensor based on L-amino-acid oxidase and polypyrrole for detection of L-Tyrosine in pharmaceuticals***, International Conference of Physical Chemistry – ROMPHYSICHEM 2016, Galati, September 21-23, poster. Abstract published in: Book of abstracts, ISSN 2286-1327, ISSN-L 2286-1327, page 60, <http://gw-chimie.math.unibuc.ro/romphyschem16/ROMPHYSICHEM16-AbstractBook.pdf>