

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"CAROL DAVILA" BUCUREȘTI**

TEZĂ DE DOCTORAT

**CERCETAREA ȘI DEZVOLTAREA UNOR SISTEME FARMACEUTICE
SEMISOLIDE BAZATE PE RESURSE DIN MEDIU MARIN**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
PROF. UNIV. DR. CONSTANTIN MIRCIOIU**

**DOCTORAND
FARM. EMIN CADÂR**

BUCUREȘTI

2017

MULȚUMIRI

Adresez alese mulțumiri coordonatorului meu științific, Dl-ului Prof. Univ. Dr. Constantin Mircioiu care m-a îndrumat să realizez și să suțin această Teză de Doctorat.

Mulțumesc tuturor cadrelor didactice universitare din Facultatea de Farmacie - Universitatea "Carol Davila" București, care m-au ajutat și sprijinit pe tot parcursul derulării stagiului de doctorat în realizarea Tezei de Doctorat

Mulțumesc tuturor membrilor comisiei de doctorat, pentru răbdarea cu care au analizat lucrarea de față precum și pentru sugestii făcute.

Mulțumesc familiei mele care m-a susținut pe tot parcursul elaborării acestei lucrări.

CUPRINS

ABREVIERI INTRODUCERE

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I. FORME SEMISOLIDE CU APLICAȚIE TOPICĂ

- I.1 ABSORBȚIA TRANSDERMICĂ A SUBȘTANȚELOR MEDICAMENTOASE
- I.2 PERMEAȚIA TRANSEPIDERMICĂ A MOLECULELOR BIOACTIVE
- I.3 PERMEAȚIA MOLECULELOR BIOACTIVE PRIN STRATUL CORNOS
- I.4 PERMEAȚIA MOLECULELOR BIOACTIVE PRIN DERM
- I.5 FACTORII CARE INFLUENȚEAZĂ ABSORBȚIA TRANSDERMICĂ

CAPITOLUL II. PARAMETRI ȘI MODELE REOLOGICE PENTRU CARACTERIZAREA FORMELOR FARMACEUTICE

- II.1 DATE GENERALE PRIVIND REOLOGIA
- ppII.2 CARACTERIZAREA REOLOGICĂ A FORMELOR FARMACEUTICE SEMISOLIDE CU APLICAȚIE TOPICĂ
- II.3 MODELE REOLOGICE CARE DESCRIU COMPORTAREA FORMELOR FARMACEUTICE SEMISOLIDE TOPICE
- II.4 FACTORI CARE INFLUENȚEAZĂ COMPORTAREA REOLOGICĂ A FORMELOR FARMACEUTICE SEMISOLIDE CU APLICAȚIE TOPICĂ

CAPITOLUL III. CARACTERIZAREA ALGELOR ȘI IDENTIFICAREA COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN ALGE MARINE

- III.1 DATE GENERALE
- III.2 CLASIFICAREA ALGELOR
- III.3. CARACTERIZAREA ALGELOR
- III.4 IDENTIFICAREA ALGELOR
- III.5 VALORIFICAREA ALGELOR MARINE

CONTRIBUȚII PERSONALE

CAPITOLUL IV. CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A ALGELOR MARINE DIN MAREA NEAGRĂ

- IV.1 STUDIUL PRIVIND CARACTERIZAREA MACROSCOPICĂ ȘI MICROSCOPICĂ A ALGELOR MARINE RECOLTATE DIN MAREA NEAGRĂ
- IV.2 STUDII PRIVIND CONTAMINAREA CU AGENȚI POLUANȚI A ALGELOR MARINE DIN MAREA NEAGRĂ
- IV.3 IDENTIFICAREA COMPUȘILOR DE INTERES FARMACEUTIC
- IV.4 CONCLUZIILE CAPITOLULUI

CAPITOLUL V. STUDIUL COMPORTĂRII REOLOGICE A UNOR FORMULĂRI FARMACEUTICE CU ALGE MARINE DIN MAREA NEAGRĂ CU DESTINAȚIE TOPICĂ

- V.1 STUDIAREA INTERACȚIUNILOR DINTRE HIDROLIZATUL DE COLAGEN FIBRILAR TIP I ȘI EXTRACTELE DIN ALGE MARINE DESTINATE UTILIZĂRII ÎN CAVITATEA ORALĂ
- V.2 OBTINEREA UNOR FORMULĂRI CU APLICAȚIE TOPICĂ PE BAZĂ DE ALGE VERZI: *ENTEREOMORFA INTESTINALIS* ȘI *CLADOPHORA VAGABUNDA*
- V.3 CARACTERIZARI REOLOGICE A UNOR FORMULĂRI DE ALGE MARINE CU APLICAȚII COSMETICE
- V4. PREPARAREA MEMBRANELOR CE CONȚIN COLAGEN NEDENATURAT FIBRILAR TIP I ȘI EXTRACTELE DIN ALGE MARINE
- V.5 PREPARAREA MATRICILOR POROASE DE COLAGEN CE CONȚIN EXTRACTE DIN ALGE
- V.6 CONCLUZIILE CAPITOLULUI

CAPITOLUL VI. CERCETĂRI PRIVIND CAPACITATEA ANTIOXIDANTĂ ȘI ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A UNOR FORME FARMACEUTICE SEMISOLIDE PE BAZĂ DE ALGE MARINE DIN MAREA NEAGRĂ

- VI.1 STUDII PRIVIND CONȚINUTUL DE COMPUȘI CU ACTIVITATE ANTIOXIDANTĂ ÎN ALGE MARINE

- VI.2 STUDII PRIVIND DETERMINAREA CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE TOTALE PRIN CHEMILUMINESCENȚĂ
- VI.3 CAPACITATEA ANTIMICROBIANĂ
- VI.4 CONCLUZIILE CAPITOLULUI

CAPITOLUL VII. MODELAREA CEDĂRII *IN VITRO* ȘI *IN VIVO* A SUBSTANȚELOR ACTIVE DIN FORME FARMACEUTICE APLICATE LOCAL

- VII.1 ECUAȚIA GENERALĂ A FENOMENELOR DE TRANSFER
- VII.2 TRANSFERUL LA INTERFEȚE AL MEDICAMENTELOR
- VII.3 DIFUZIA
- VII.4 REZOLVAREA ECUAȚIILOR DE TRANSFER DE MASĂ PRIN DIFUZIE
- VII.5 MODELE DE ELIBERARE A SUBSTANȚELOR ACTIVE DIN FORME FARMACEUTICE
- VII.6 CINETICI DE DIZOLVARE DIN SUBSTANȚE SOLIDE
- VII.7 CORELĂRI *IN VITRO* - *IN VIVO*, NIVEL A ȘI B
- VII.8 REZOLVAREA ECUAȚIEI DIFUZIEI PENTRU CEDAREA DINTR-UN REZERVOR ÎNTR-UN MEDIU DE VOLUM MARE ȘI CONCENTRAȚIE MICĂ A SUBSTANȚEI CEDATE

- VII.9 APLICAREA MODELULUI LA MODELAREA FARMACOCINETICII ASPIRINEI ȘI PARACETAMOLULUI
- VII.10 REZULTATE PRIVIND TRANSFERUL PRIN MEMBRANE A GELURILOR CU ALGE, CARBOPOL ȘI ACICLOVIR
- VII. 11 CONCLUZIILE CAPITOLULUI

CAPITOLUL VIII. CONCLUZII GENERALE

- VIII.1 FORME SEMISOLIDE CU APLICAȚIE TOPICĂ
- VIII.2 STUDIUL COMPORTĂRII REOLOGICE A UNOR FORMULĂRI FARMACEUTICE CU ALGE MARINE DIN MAREA NEAGRĂ CU DESTINAȚIE TOPICĂ
- VIII.3 CERCETĂRI PRIVIND CAPACITATEA ANTIOXIDANTĂ ȘI ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A UNOR FORME FARMACEUTICE SEMISOLIDE PE BAZĂ DE ALGE MARINE DIN MAREA NEAGRĂ
- VIII.4 MODELAREA CEDĂRII *IN VITRO* ȘI *IN VIVO* A SUBSTANȚELOR ACTIVE DIN FORME FARMACEUTICE APLICATE LOCAL

BIBLIOGRAFIE

ANEXĂ - LISTA DE LUCRĂRI

INTRODUCERE

La nivel mondial există un interes crescut al specialiștilor din medicină și farmacie, în prevenirea și tratarea afecțiunilor cu aplicație topică, cu produse farmaceutice semisolidă preparate din compuși naturali. Ecosistemul marin reprezintă o parte a celui mai mare sistem acvatic de pe planetă, acoperind cca 70% din suprafața Terrei. Diversitatea și productivitatea ecosistemelor marine sunt foarte importante în păstrarea sănătății mediului marin și terestru și furnizează importante surse de hrană pentru om și animale, pentru industria farmaceutică, alimentară și cosmetică, etc. Literatura de specialitate este bogată în a prezenta medicamente din resurse marine, dar este modestă în ce privește valorificarea în domeniul farmaceutic a resurselor marine din Marea Neagră.

Pe plan mondial orientările și direcțiile actuale ale cercetării în domeniul produselor farmaceutice considerate *medicamente ale mării* se pot sistematiza în felul următor:

- de mare actualitate este valorificarea superioară a resurselor naturale în scop terapeutic;
- în ultima perioadă de timp s-a constatat că organismele marine reprezintă o valoroasă sursă de principii active, complexe, ceea ce a dus la dezvoltarea unui adevărat domeniu de investigație acela al substanțelor biologice din organisme marine;
- în medicină sunt foarte căutate, pentru a fi utilizate, terapii noi bazate pe medicamente ce au încorporate principii active provenite din surse oferite de natură, evitându-se pe cât posibil medicamentul oferit de chimia de sinteză.

Aceste orientări sunt motivate prin materia primă accesibilă, biotehnologia relativ ieftină și obținerea produsului util cu randament optim. Teza de doctorat își propune ca **obiectiv general**, studierea în vederea obținerii unor noi formule farmaceutice semisolidă sub formă de gel, matrice și de membrană bioresorbabilă, bazate pe asocierea unor principii bioactive de origine marină extrase din alge cu diverse alte substanțe, cum ar fi colagenul (proteină naturală), chitosanul (polizaharid provenit din chitină), carbopolul 971P (o altă structură polimerică) etc, cu proprietăți antibacteriene, antioxidante, antiinflamatoare, cicatrizante, fotoprotectoare și nutritive, cu aplicații la nivelul tegumentelor, mucoaselor și țesuturilor. Aceste formulări farmaceutice semisolidă, stabile și biocompatibile, sunt destinate a fi aplicate în tratamentul afecțiunilor dermice și transdermice, de diferite grade, cu localizare cutaneo-mucoasă și în plăgile sângeroase. Pentru realizarea acestui deziderat sunt necesare **obiective specifice**, cum sunt: realizarea de studii pe biomasa algală, pentru identificarea compușilor bioactivi, caracterizarea proprietăților lor, precum și studii pe noile formulări propuse pentru a stabili:

- comportarea reologică a formei semisolidă în ideea de a studia stabilitatea formei;
- proprietățile specifice (cum ar fi capacitatea antioxidantă sau activitatea antibacteriană);
- eliberarea controlată a compușilor bioactivi din substanța medicamentoasă. Eliberarea controlată este impusă de necesitatea de a oferi agent terapeutic la locul acțiunii în intervalul terapeutic, adică între eficacitate și niveluri toxice.

Pentru Mărea Neagră importanța florei macrobentale – alge și fanerogame – în bioproductivitatea generală a mediului marin, în special în apele de mică adâncime, devine din ce în ce mai evidentă atât din punct de vedere ecologic, cât și economic. Macroflora algală a Mării Negre totalizează 277 de specii, dintre care 74 Clorophyte, 3 Xantophyte, 71 Feophyte și 129 Rodophyte. Eutrofizarea generală a apelor Mării Negre, în special de-a lungul coastelor românești, ca o consecință directă a aportului crescut de nutrienți aduși de fluviul Dunărea și a curentului circular principal cu direcție N – S, este într-o continuă creștere, a favorizat un număr redus de genuri, mai tolerante, precum *Enteromorpha*, *Cladophora*, *Ceramium*, *Cystoseira barbata*, care au profitat de existența nișelor libere pe care le-au ocupat. Cele mai frecvente specii au aparținut genurilor *Enteromorpha* și *Ceramium*, dar și *Cladophora vagabunda* și *Ulva Lacuca*(syn. *Rigida*). Evoluția biomaselor algelor dominante verzi și roșii a fost evidențiată pentru ultimii 10 ani. Este evident că algele verzi au predominat permanent, cantitățile de alge roșii și brune fiind întotdeauna mai scăzute. Prezenta Teză de doctorat se poate încadra prin obiectivul general propus, în cercetările marine pentru valorificarea resurselor oferite de Marea Neagră. Noutatea temei acestei teze constă în cercetările efectuate care au la bază valorificarea compușilor bioactivi identificați în algele marine din Marea Neagră și obținerea de noi formulări farmaceutice semisolidă cu destinație topică în tratarea diferitelor afecțiuni dermice și transdermice. Dezvoltarea formelor semisolidă s-a bazat mai întâi pe identificarea și dozarea compușilor bioactivi de interes farmaceutic, realizarea formelor semisolidă și cel mai important, caracterizarea și testarea acestor formulări prin multiple tipuri de teste. Ca obiective specifice formulările s-au testat în ce privește comportarea reologică, capacitatea antioxidantă și activitatea antimicrobiană. S-au realizat de asemenea studii de cedare din forme semisolidă a principiilor bioactive. Modelarea farmacocinetică a cedării compușilor activi din forma farmaceutică prin transfer de

masă prin difuziune, a constituit o parte importantă din teză, fiind bazată pe analiza matematică a fenomenelor de transfer prin difuziune, descrierea modelelor ce pot reda cedarea din forme farmaceutice, corelările *in vitro in vivo*, și realizarea testelor de dizolvare. Evaluarea *in vitro și in vivo* a cineticii de eliberare de substanțe bioactive din sistemele de medicamente joacă un rol important în precizarea și managementul atât al eficacității cât și al siguranței medicamentului. Identificarea parametrilor de transfer pornind de la datele experimentale, este o sarcină extrem de dificilă matematic. O abordare mult mai simplă, mai empirică, dar mai ușor de rezolvat matematic, este să se renunțe la semnificația fizică a coeficienților ecuațiilor și să se ia în considerare transferurile liniare între trei compartimente: lipidic, apos și mediul extern. Modelele matematice au avantajul că pot fi cuplate cu modelele compartimentale farmacocinetice, pentru estimarea eliberării *in vivo* și absorbției substanțelor active. Utilizarea modelelor matematice a avut un impact semnificativ în dezvoltarea medicamentelor în ultimii ani. Beneficiile s-au manifestat, în special, în două domenii: înțelegerea mecanismului de interacțiune la nivel molecular dintre medicament și receptor, lucru care a permis explicarea unor fenomene experimentale observate și neînțelese până în acest moment și prevederea activității biologice pentru compuși nesintetizați încă, orientând astfel rațional sinteza chimică cu optimizarea structurilor ghid în drumul lor spre stadiul de medicament. Proiectul tezei este inclus într-un proiect de cercetare mai amplu depus la competiția PCCDI – 2017 Proiecte Complexe cu Domeniul de Specializare Inteligentă, Tehnologii Noi și Emergente cu titlul proiectului: *Valorificare superioară, complexă a biomasei marine prezentă de-a lungul coastei românești a Mării Negre prin realizarea unor tehnologii inovatoare și emergente*. De asemenea subiectul tezei de doctorat a fost inclus în grandul de cercetare intitulat "Cercetare doctorală de top cu finanțare europeană TOP-DOC", cu numărul de identificare al contractului: POSDRU/187/1.5/S/156040.

CONTRIBUȚII PERSONALE

CAPITOLUL IV CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A ALGELOR MARINE DIN MAREA NEAGRĂ

Din bogata bioresursă oferită de mediul marin din Marea Neagră, cercetarea dezvoltată în prezenta teză tratează algele marine existente în apele teritoriale ale litoralului românesc. Resursele marine oferite de Marea Neagră au fost valorificate în scop terapeutic datorită calității habitatelor marine de-a lungul litoralului românesc [Zaharia T., 2007]. O importanță deosebită o reprezintă valorificarea algelor marine, fiind o importantă resursă pentru domeniul medico-farmaceutic.

Scopul cercetărilor cuprinse în acest capitol constă în:

- studierea existenței agenților de poluare în algele marine studiate;
- caracterizarea algelor luate în studiu din punct de vedere fitobotanic și farmacognostic;
- identificarea principiilor de interes farmaceutic existente în algele luate în studiu prin diferite metode fizico-chimice.

Material și metode

Produsul vegetal algal a fost compus din: algele marine de la litoralul românesc al Mării Negre și anume:

- *Cystoseira barbata*, care face parte din grupul algelor brune (Încregătura Phaeophyta);
- *Ceramium rubrum* care face parte din grupul algelor roșii (Încregătura Rhodophyta);
- alge verzi: - *Ulva lactuca* (syn. *Ulva rigida*) care aparține clasei *Chlorophyceae*, *Cladophora vagabunda* și *Enteromorpha intestinalis*.

Perioada de recoltare. Algele au fost recoltate în intervalul dintre lunile mai-octombrie, în trei ani consecutivi: 2015, 2016 și 2017 în funcție de existența lor cantitativă în apa marină. Flora algală a fost recoltată de pe linia litoralului Mării Negre, din apă la o distanță de 5-20 m de țărm, din zonele Năvodari, Cazino - Constanța, Eforie Nord, Eforie Sud, Tuzla, Costinești, Mangalia, 2 Mai și Vama Veche.

IV.2 STUDII PRIVIND CONTAMINAREA CU AGENȚI POLUANȚI A ALGELOR MARINE DIN MAREA NEAGRĂ

A fost determinat conținutul de metale grele.

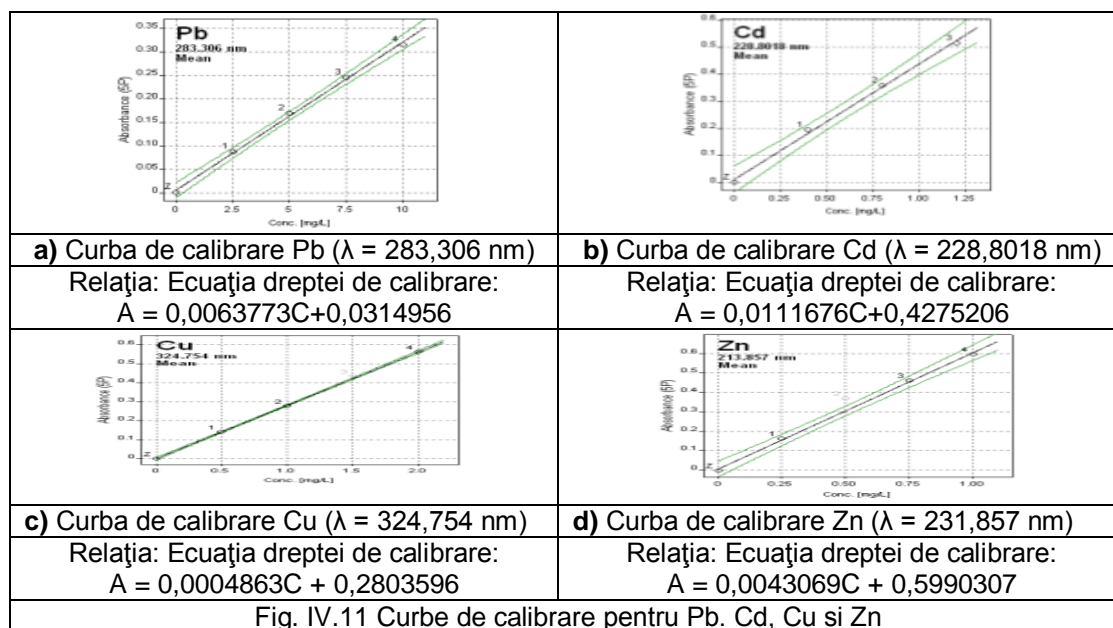
Metoda de analiză Spectrometrie de absorbție atomică - Tehnica în flacără de acetilenă (HR-CS AAS-Flame) - pentru analiza probelor în care concentrațiile de analit sunt de ordinul mg/L (ppm).

Echipamentele de lucru Aparatul folosit: Spectrometrul de absorbție atomică de mare rezoluție ContrAA-700, Analytik Jena AG, Germania (Fig. 10), cu autosampler pentru eșantion de diluție, pe tehnica flacării cu acetilenă, analiză secvențială la lungimi de undă specifice Pb (283.306 nm), Cd

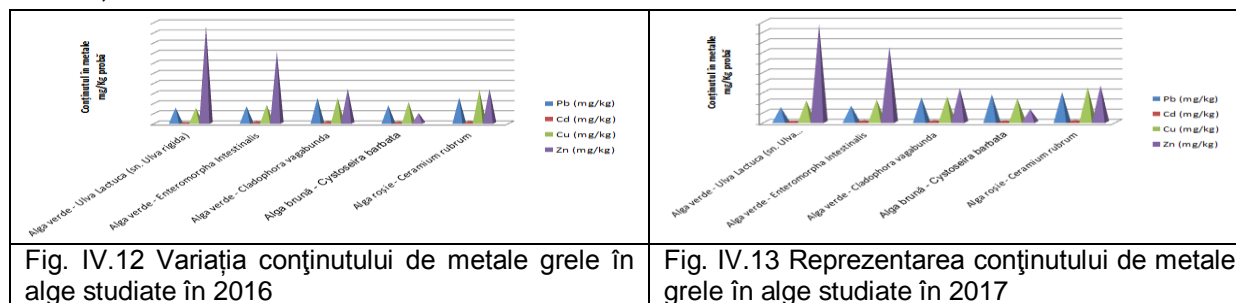
(228.8018 nm), Cu (324,754 nm) și Zn (213,857 nm). • balanță analitică Mettler Toledo; • baie de apă electrică termoreglabilă cu domeniu de temperatură 100 °C; • etuvă termoreglabilă.

Rezultate și Discuții

În Fig. IV.11 a, b, c, d se prezintă curbele de calibrare înregistrate pentru metalele Pb, Cd, Cu, Zn și limitele de detecție ale aparatului AAS, în cazul celor patru metale analizate.



Rezultatele obținute pentru conținutul în metale grele sunt prezentate în figurile VI.12, VI.13.



Concluziile studiului

Conținutul de metale grele analizat prin spectroscopie de absorbție atomică este sub limitele admise de reglementările în vigoare, fiind comparativ cu datele prezentate în literatură [Negreanu-Pîrjol T., 2008].

- Datele experimentale demonstrează că zona de recoltare a biomasei algale este un factor care influențează conținutul de metale grele.
- Algele marine pot constitui un valoros rezervor de materie primă natural, curat, necontaminat cu factori de poluare pentru industria farmaceutică sau cosmetică.

IV.3 IDENTIFICAREA COMPUȘILOR DE INTERES FARMACEUTIC

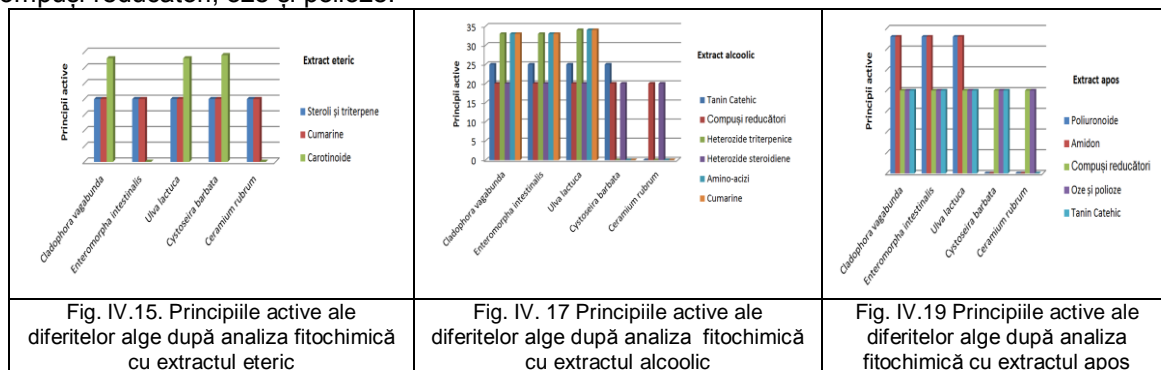
În scopul efectuării analizei chimice globale se realizează mai întâi extracția principiilor active. Din produsul vegetal (alge marine) pulverizat cu un solvent nepolar (eter etilic, eter de petrol, cloroform, hexan, benzen etc), apoi cu un solvent de polaritate medie (metanol, etanol), în cele din urmă, se obțin următoarele:

1. soluție extractivă eterică;
2. soluție extractivă alcoolică;
3. soluție extractivă apoasă.

Rezultate și discuții

În extractul eteric se observă compuși chimici lipofili, iar în celelalte două, compuși chimici hidrofilii. Pentru identificarea compușilor chimici din cele trei extracte acestea sunt analizate separat, folosind

metode corespunzătoare proprietăților fizico-chimice ale fiecărui grup de principii active. În urma efectuării reacțiilor de identificare pentru fiecare extract s-au obținut rezultatele prezentate în Fig.IV.15, Fig.IV.17, Fig.IV.19. Se constată că în extractul alcoolic au fost regăsite cele mai multe principii active comparativ cu celelalte extracte. Aminoacizii, taninul catehic, cumarinele și heterozidele triterpenice nu se regăsesc în algele studiate. Ele apar numai în compoziția algelor verzi, fiind inexistente în cele brune și roșii (Fig. IV.17). În extractul apos s-au regăsit poliuronoide și amidon numai în algele verzi. În algele brune se regăsesc oze și polioze, compuși reducători și tanin catehic. Cele mai puține principii active atractive în soluție apoasă le prezintă algele roșii la care s-au regăsit compuși reducători, oze și polioze.



Concluzia studiului fitochimic

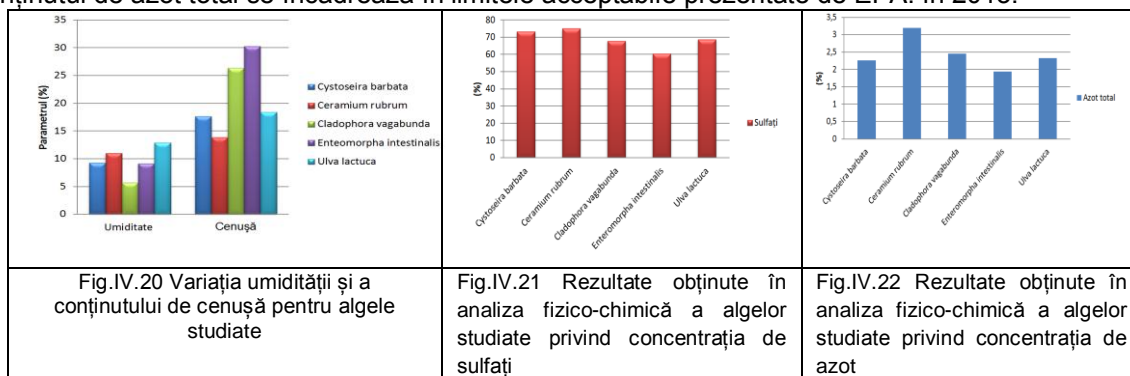
Din studiul realizat se poate trage concluzia că din cele trei extracte realizate, eterice, alcoolice și apoase, s-au evidențiat o serie de compuși bioactivi deosebit de importanți din punct de vedere farmaceutic.

STUDIUL FIZICO-CHIMIC ALE BIOMASEI ALGALE

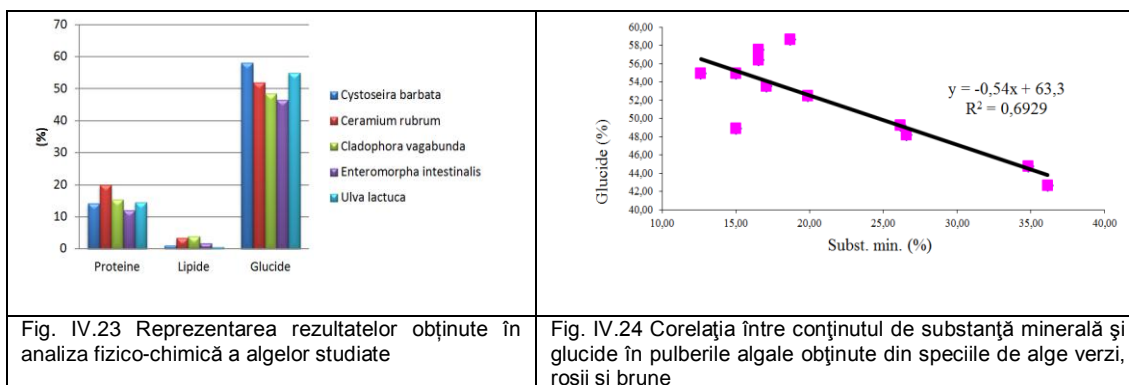
Metodele fizico-chimice inițiale au permis o serie de determinări cum sunt: umiditatea, conținutul de cenușă, conținutul de sulfat, de azot total, de substanță proteică, de lipide și de glucide.

Rezultate și discuții

În Fig.VI. 20 se evidențiază alături de variația umidității și variația conținutului de cenușă la toate algele studiate. Cea mai mare cantitate de cenușă o prezintă algele verzi (*Enteromorpha intestinalis* și *Cladophora vagabunda*). Ionul sulfat este în general considerat a fi netoxic. În comparație cu standardele în vigoare, toate valorile sulfatului (Fig. IV.21) sunt sub limita de 250 mg/L, admisă pentru apa potabilă, [STAS 3069-87]. Variația azotului total în funcție de tipul algei este redată în Fig. IV.22. Conținutul de azot total se încadrează în limitele acceptabile prezentate de EPA. în 2013.



Valorile medii ale conținutului de lipide, proteine, glucide și substanță minerală în pulberile alge obținute din speciile *Cladophora spp.*, *Enteromorpha spp.*, *Ulva spp.*, *Cystoseira barbata*, *Ceramium spp.* sunt prezentate în figura IV.23.



După calculul rezultatelor s-a aplicat **testul Student** pentru compararea valorilor medii de glucide, substanță minerală, lipide și proteine la speciile de alge verzi, și roșii/ brune. Concluzia testului, pentru un nivel de încredere de 95% valorile medii ale substanței minerale au prezentat diferențe semnificative din punct de vedere statistic la speciile de alge verzi (*Cladophora spp.*, *Enteromorpha spp.*, *Ulva spp.*) ($24 \pm 8,25$) % și alge roșii/brune (*Cystoseira barbata*, *Ceramium spp.*) ($15,73 \pm 1,28$) %. Conținutul proteic al pulberilor algale obținut din speciile de alge verzi ($13,91 \pm 1,77$)% diferă statistic semnificativ de cel al algelor roșii/brune ($17,03 \pm 3,87$)%. Valorile medii ale conținutului de lipide au prezentat diferențe nesemnificative statistic la speciile de alge verzi ($1,81 \pm 1,29$) % și alge roșii/brune ($2,20 \pm 1,38$)%.

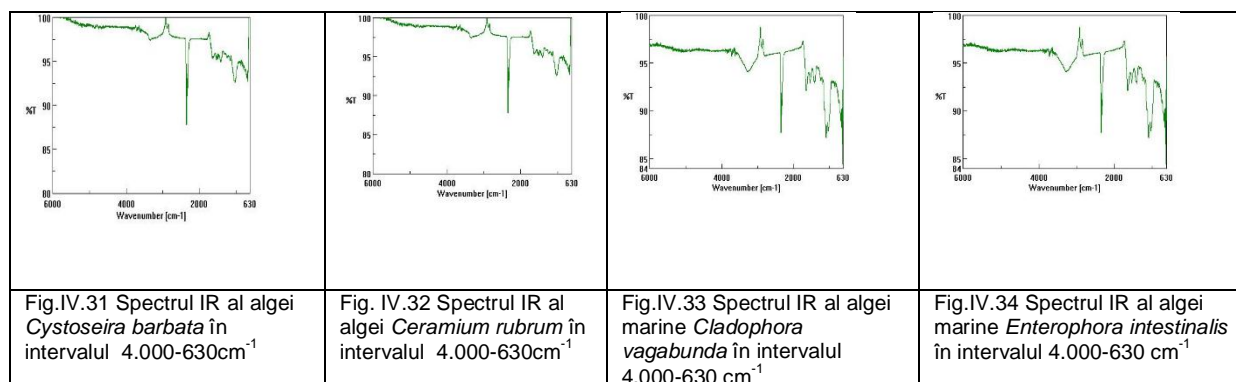
STUDIUL PRIVIND CONȚINUTUL DE VITAMINE ÎN ALGELE STUDIAȚE DIN MAREA NEGRĂ

Conținutul crește o dată cu dezvoltarea plantei și atinge valoarea maximă la maturitate. Studiul realizat confirmă existența vitaminelor în algele marine studiate.

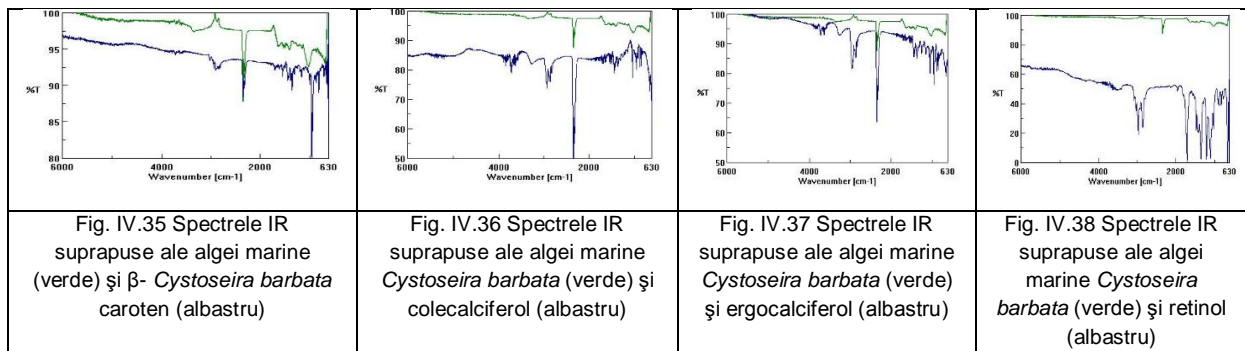
Material și metodă. Au fost supuse analizelor alga brună *Cystoseira barbata* și alga roșie *Ceramium rubrum*, iar din algele verzi au fost analizate *Cladophora vagabunda* și *Enteromorpha intestinalis*. Metoda pentru identificarea vitaminelor a fost metoda FT-IR de analiză spectroscopică în IR. Pentru identificare au fost folosite următoarele substanțe etalon: β -caroten, coelcalciferol (vitamina D₃), ergocalciferol (vitamina D₂) și retinol (vitamina A). Etaloanele au fost substanțe uscate. Pentru determinările cantitative s-au folosit spectroscopia de absorbție moleculară.

Rezultate și discuții

Spectrele IR obținute pentru algele marine sunt prezentate în figurile IV.31, IV.32, IV.33 și IV.34. Spectrele au fost efectuate pe pulberi uscate de algă la 105 °C [Cadâr E., 2016].

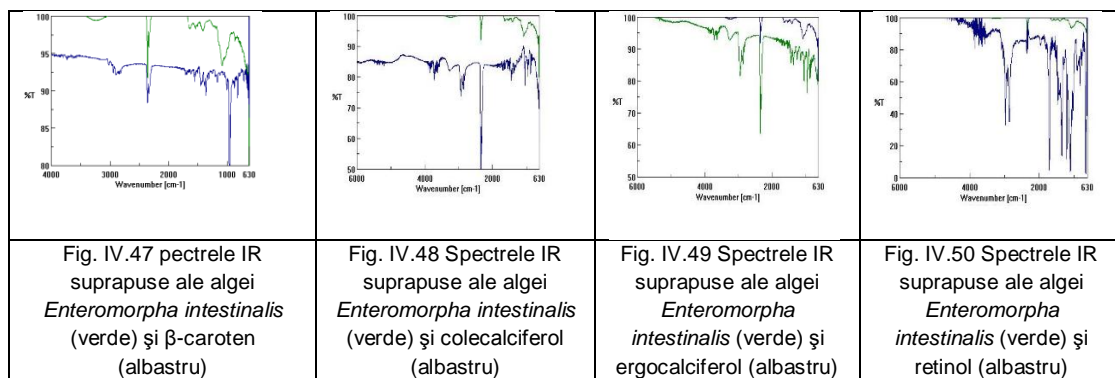


Prin suprapunerea de spectre IR a algei cu a substanței etalon se confirmă existența sau lipsa vitaminelor analizate în compoziția algei respective. Domeniul IR de lungimi de undă analizat este intervalul 4.000-630 cm⁻¹. Astfel, pentru *alga brună Cystoseira barbata*, pulbere uscată (colorată în verde) s-au obținut spectrele din figurile IV.35, IV.36, IV.37 și IV.38.

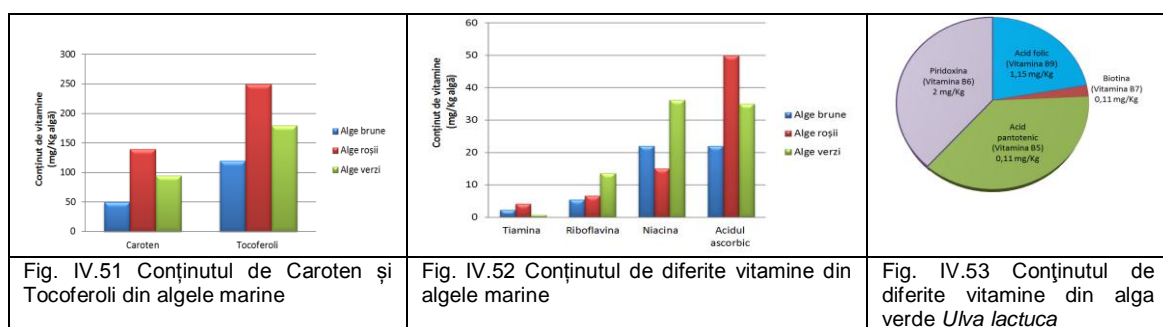


Pentru alga roșie *Ceramium rubrum* prin suprapunerea spectrelor IR obținute se prezintă rezultatele în figurile IV.47, IV.48, IV.49 și IV.50.

Din analizele FT-IR se poate localiza lungimea de undă la care se regăsesc legăturile specifice dintre atomi. Ne-a fost mai ușor să suprapunem spectrele de absorbție în IR ale algei cu etaloanele de vitamine. Din toate figurile în care avem spectrul unei alge suprapus cu cel al β -caotenului se constată că în domeniul $2000-2500\text{ cm}^{-1}$ avem suprapunere de picuri. Tragem concluzia că dintre algele analizate: *Cystoseira barbata* (Fig. IV 35) , și *Enteromorpha intestinalis* (Fig. IV.47), conțin β -caroten. Pentru calciferol și ergocalciferol în intervalul $630-2500\text{ cm}^{-1}$ avem suprapunere de mai multe picuri. Practic toate algele conțin calciferol și ergocalciferol.



Variația conținutului de vitamine pe tipuri de alge se poate evidenția în Fig. IV.51 și Fig. IV.52. Pentru algele verzi a fost selectată *Ulva lactuca* la care s-au regăsit în urma analizelor de laborator un conținut variabil de Piroxidină (B_6 - 2 mg/kg probă de algă), Acid pantotenic (B_5 - 1,51 mg/kg probă de algă), Acid folic (B_9 - 1,15 mg/kg probă de algă) și Biotină (B_7 - 0,11 mg/kg probă de algă). Aceste rezultate sunt prezentate în Fig. IV.53.



Concluziile Studiului

- A fost studiat conținutul de vitamine din alge prin spectre FTIR confirmându-se existența unor vitamine. S-au regăsit β -caroten, colecalfiferol, ergocalciferol în toate algele analizate.
- Pentru speciile din clasa *Clorophyta* (alge verzi) s-a obținut o largă gamă de vitamine din complexul de vitamine B: B_1 , B_2 , B_3 , B_5 , B_7 , B_9 . La algele brune și roșii, s-au regăsit atât vitamine hidrosolubile B_2 , B_3 , B_{12} , C, cât și liposolubile, vitaminele E și provitaminele A.

CAPITOLUL V STUDIUL COMPORTĂRII REOLOGICE A UNOR FORMULĂRI FARMACEUTICE CU ALGE MARINE DIN MAREA NEAGRĂ CU DESTINAȚIE TOPICĂ

Ne propunem să obținem noi formulări farmaceutice din resurse naturale pe bază de colagen fibrilar tip I din piele de vițel și extracte din alge marine din Marea Neagră.

În acest capitol sunt descrise cercetări dezvoltate pe direcții diferite în funcție de destinația topică pe care urmează să o aibă preparatul studiat. Astfel, descriem cercetări ale caracteristicilor comportării reologice studiate pentru:

- hidrogeluri colagenice cu extracte de alge brune, verzi și roșii destinate a fi utilizate în cavitatea orală;
- geluri colagenice cu extracte de alge verzi *Entereomorpha intestinalis* și *Cladophora vagabunda* destinate aplicării pe piele;
- preparate cosmetice bazate pe amestecarea unei faze semisolide (lanolină, unt de cacao, ceruri) lipofilă cu extracte apoase și alcoolice de alge marine;
- membrane de colagen nedenaturat fibrilar tip I care conțin o cantitate mare de extracte hidroalcoolice (10 % raportat la întreaga cantitate de gel) din patru alge marine;
- matrici poroase de colagen nedenaturat fibrilar tip I care conțin extracte hidroalcoolice de alge marine.

PREPARAREA GELURILOR DE COLAGEN FIBRILAR NEDENATURAT TIP I CU EXTRACTE DE ALGE

Pe baza unor măsurători reologice prealabile efectuate cu gelurile de colagen fibrilar nedenaturat tip I, care nu conțin și care conțin alcool etilic la pH 3, pentru prepararea gelurilor ce conțin extracte hidroalcoolice de alge marine s-au selectat concentrația de colagen de 0,6 % și concentrațiile de extracte de alge de 5 % și 10 % în procente de masă. Nu s-au utilizat concentrații mai mari de extracte de alge și nici concentrație mai mare de alcool etilic pentru extracția componentelor din acestea, deoarece alcoolul etilic are proprietatea de a micșora vâscozitatea gelului de colagen, cantitățile mari putând conduce chiar la distrugerea sa (la separarea sa în două faze, una bogată în apă și cealaltă bogată în colagen).

Extractele hidroalcoolice de alge marine s-au utilizat așa cum au fost obținute, fără a fi diluate sau concentrate în prealabil pentru a fi aduse la aceeași concentrație, ceea ce înseamnă că gelurile ce conțin extracte de alge preparate nu au aceeași concentrație de substanțe uscate.

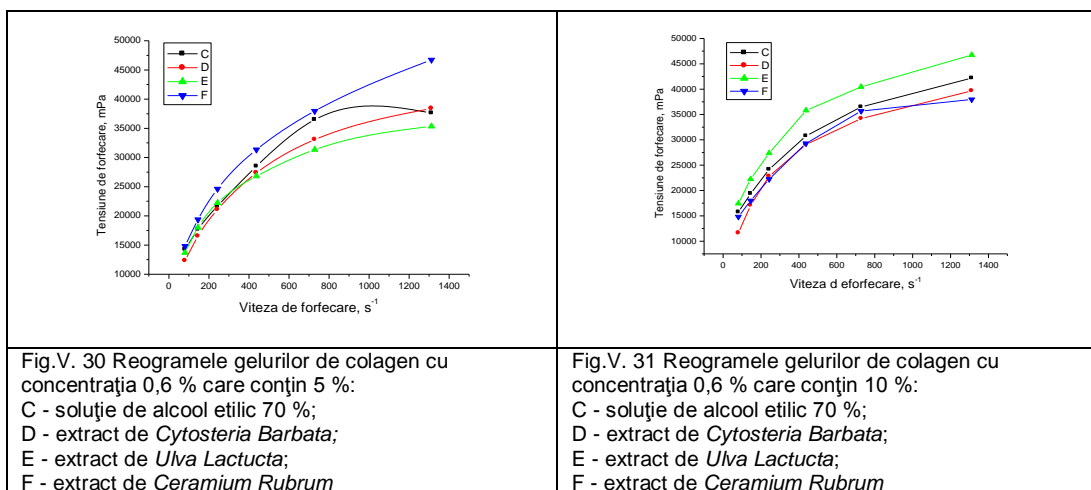
Gelurile cu concentrația de 0,6 % colagen și 5 %, respectiv 10 % în procente de masă extracte hidroalcoolice din alge s-au preparat la temperatura camerei din gelul inițial de colagen cu concentrația de 1,64 % (g colagen la 100 g gel) prin adăugarea cantităților corespunzătoare de apă distilată și extracte hidroalcoolice de alge marine sub agitare.

S-au preparat atât geluri cu pH acid (3), cât și cu pH neutru. Concentrațiile în soluție de alcool etilic 70 %, respectiv în extracte din alge în soluție de alcool etilic cu aceeași concentrație, ale gelurilor de colagen 0,6 % care au pH-ul 3 și aspectul acestora sunt prezentate în tabelul V.2. Trebuie specificat faptul că, într-adevăr, diluarea de la concentrația 1,64 % la 0,6 % cu apă distilată și prezența extractelor din cele trei alge nu a modificat practic pH-ul gelului de colagen inițial, așa încât valoarea pH-urilor a fost 3 la toate gelurile cuprinse în tabelul V.2.

Tabelul V.2 Gelurile de colagen cu și extracte de alge preparate, concentrația și aspectul acestora

Extract din algă	Concentrația extractului, %	Aspectul gelului
Gel fără extract de algă	0%	Incolor, transparent
	5 % sol. alcoolică 70 %	Incolor, transparent
	10 % sol. alcoolică 70 %	Incolor, foarte puțin opalescent
Gel colagenic cu extract din <i>Cystoseira Barbata</i>	5 %	Opalescent, verde gălbui
	10 %	Mai opalescent, verde maroniu
Gel cu <i>Ulva Lactuca</i>	5 %	Transparent, foarte slab verde
	10 %	F. puțin opac, foarte slab verde
Gel cu <i>Ceramium Rubrum</i>	5 %	Slab opalescent, verde gălbui
	10 %	Puțin mai opalescent, verde maroniu

S-au preparat și gelurile cu aceleași cantități de soluție de alcool etilic 70 %/extracte hidroalcoolice din alge cu pH neutru prin introducerea de cantități foarte mici de soluție de hidroxid de sodiu foarte concentrat, pentru a nu le modifica (micșora) concentrația (cantitățile introduse au fost de ordinul 0,03-0,04 mL deci, diluarea poate fi neglijată).



V.2 OBTINEREA UNOR FORMULĂRI CU APLICAȚIE TOPICĂ PE BAZĂ DE ALGE VERZI: *ENTEROMORPHA INTESTINALIS* ȘI *CLADOPHORA VAGABUNDA*

Interacțiunea dintre diferiții factori antropogenici asupra vegetației a indus diferite rezultate, de la simplificarea structurală până la dispariția completă. În urma lucrărilor realizate pentru amenajări hidrotehnice, covorul algal a fost acoperit cu măr și/sau nisip. În aceste condiții, comunitățile de *Cystoseira Ag.* s-au împușinat [Bologa A. S., 2006]. Cele mai frecvente specii au aparținut genurilor *Enteromorpha* și *Ceranium*, dar și *Cladophora*. De obicei, speciile de *Enteromorpha* sunt amestecate în această centură de alge verzi cu specii de *Cladophora*, în special *Cladophora sericea* și uneori *Cladophora albida* și *Cladophora laetevirens* [Khataee A.R., 2011]. Deși reduse ca număr (calitativ), speciile rămase au dezvoltat productivități apreciabile pe substraturile pietroase disponibile; populațiile algale comune, constând mai ales în specii de *Enteromorpha* și *Ceranium*, acoperind acest substrat în proporție de 80%. Prezentul studiu evaluează obținerea de noi formulări farmaceutice pe bază de alge marine collagen și acid hialuronic. Fiecare din aceste componente au proprietățile lor individuale. Ceea ce interesează este obținerea unor preparate stabile în timp care să aibă efecte benefice pentru diferite afecțiuni ale pielii.

Material și metodă

Materialele folosite sunt algele marine verzi din categoria *Enteromorpha intestinalis* și *Cladophora vagabunda*. Algele folosite au fost sub formă de pudră. Aceasta a fost obținută din alge uscate, mărunțite și apoi trecute prin sita de 0,3 mm/mm. Collagenul fibrilar tip I se regăsește în hidrolizatul collagenic care a fost obținut din piele de bovină. Din algele verzi din Marea Neagră, sub formă de pudră, au fost realizate amestecuri cu compoziții diferite de collagen notate cu P1 și P2.

S-au făcut studii reologice pentru a alege preparatul cu stabilitatea cea mai bună. Pentru măsurătorile reologice s-a folosit vâscozimetru rotațional Reo-vâsco-star R. S-au măsurat vâscozitățile la viteze diferite de rotație pentru creșterea și descreșterea tensiunilor de forfecare. Timpii de citire au fost aceiași, din 10 în 10 secunde, pentru rotații începând de la 4 la 200 rpm., crescătoare și descrescătoare. Toate valorile vâscozității înregistrate sub 15% au fost eliminate.

Rezultate și discuții

Realizarea studiului comparativ al comportării reologice a noilor preparate semisolide a constatat în aprecierea interacțiunii între componentele din algele verzi: *Enteromorpha intestinalis* și *Cladophora vagabunda* și gelul de collagen. La cele de mai sus s-a adăugat și aspectul gelului – opalescent – care poate constitui dovada de miscibilitate sau de compatibilitate între componente. Din prelucrarea datelor experimentele s-au putut obține parametrii reologici pentru fiecare preparat realizat.

Preparatul P1, cu 4,76 % alge verzi în hidrolizat de collagen are valori cuprinse între intervalele prezentate în tabelul V.7;

Tabelul V.7 parametrii reologici pentru preparatul P1

Vâscozitatea η (cP)	Viteza de forfecare D (s ⁻¹)	Tensiune de forfecare τ (Pa)
Intervalul dintre	Intervalul dintre	Intervalul dintre

19700 cP și 3800 cP,

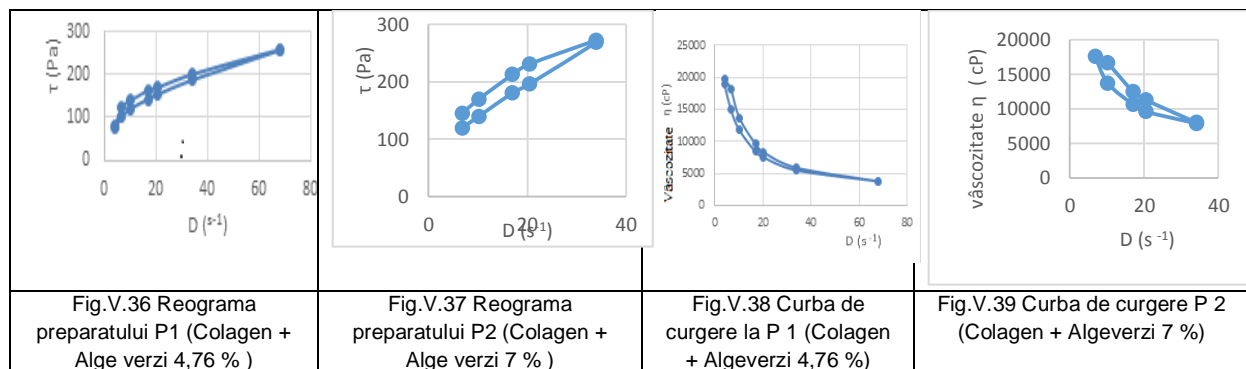
4,8 (s⁻¹) și 68 (s⁻¹)

80,37 Pa și 258,4 Pa.

Preparatul P2, cu 7 % alge verzi în hidrolizat de collagen are valori cuprinse între intervalele prezentate în tabelul V.8. Măsurătorile au fost făcute atât la creșterea cât și la scăderea vitezei de rotație; viteza de rotație a fost cuprinsă între 12 rpm și 200 rpm pentru preparatul P1 și 12 rpm și 100 rpm pentru preparatul P2.

Tabelul V.8 Parametrii reologici pentru preparatul P2

Vâscozitatea η (cP)	Viteza de forfecare D (s ⁻¹)	Tensiune de forfecare τ (Pa)
Intervalul dintre 21323 cP și 8000 cP,	Intervalul dintre 6,8 (sec ⁻¹) și 34 (sec ⁻¹)	Intervalul dintre 145 Pa și 268,6 Pa.



Pentru analiza reologică s-au realizat grafice pentru a urmări reogramele (Fig.V.36 și Fig.V.37), variația tensiunii de forfecare cu gradientul de viteză. Curbele de curgere sunt prezentate în Fig.V.38 și Fig.V.39. Așa cum se poate vedea din comportarea reologică, preparatele P1 și P2 au o comportare pseudoplastică.

Concluziile studiului

S-au realizat preparate cu conținut variabil de alge verzi în hidrolizat collagenic din piele de bovină. Din prezentul studiu se pot trage următoarele concluzii:

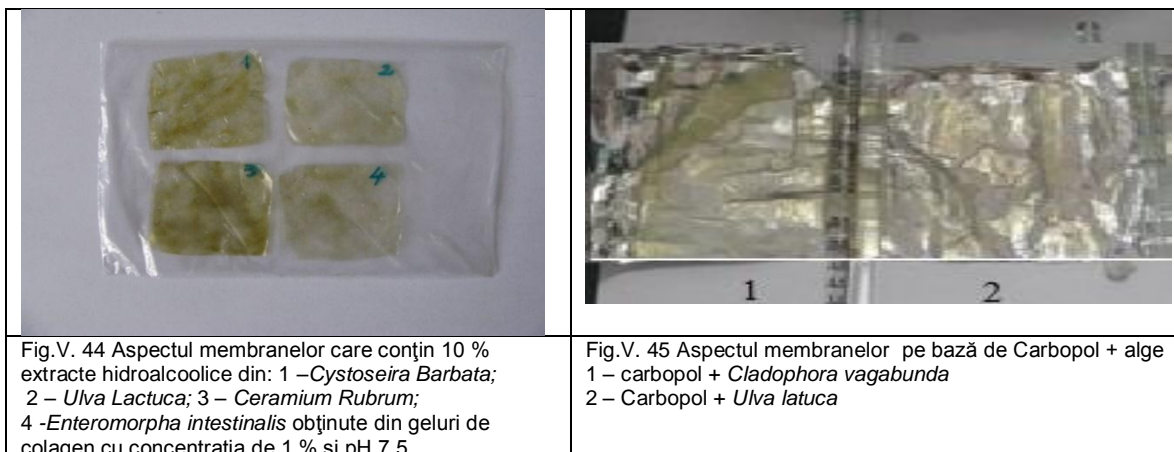
- preparatele cu alge marine în același tip de hidrolizat collagenic au comportare reologică pseudoplastică, iar din curbele de curgere se constată scăderea vâscozităților aparente cu mărirea vitezelor de forfecare;
- pe baza valorilor parametrilor reologici se constată însă o stabilitate mai bună la preparatul P2 cu conținut mai mare de alge în același tip de hidrolizat collagenic.

V.4. PREPARAREA MEMBRANELOR CE CONȚIN COLAGEN NEDENATURAT FIBRILAR TIP I ȘI EXTRACTE DIN ALGE MARINE

Membranele de collagen neddenaturat fibrilar tip I s-au preparat numai din gelurile care conțin cantitatea mare de extracte hidroalcoolice (10 % raportat la întreaga cantitate de gel) din patru alge, considerate cele mai valoroase din punctul de vedere al tratării unor boli cum sunt afecțiunile parodontale, și anume: *Cystoseira Barbata* (1), *Ulva Lactuca* (2), *Ceramium Rubrum* (3) și *Enteromorpha* (4).

Gelul final a avut următoarele concentrații de componente: collagen - 1,00 %, extracte hidroalcoolice de alge - 10,00 %, ceea ce a condus la o concentrație a alcoolului etilic de 7,00 %, glicerină - 0,35 %. Nu s-a introdus în compoziție agent pentru reticularea collagenului și nici agent de conservare, ținând seama de faptul că extractele din alge au compoziție complexă și pot furniza ambele tipuri de componente.

Membranele de collagen fiind foarte rigide și casante, acestea trebuie plastificate pentru a putea fi utilizate. Plastifierea s-a realizat prin adăugare de glicerină, ceea ce permite obținerea unor membrane moi, ușor de tăiat. Aspectul membranelor obținute se poate vedea în Fig.V. V.44. Acestea sunt colorate diferit, în funcție de culoarea extractului de algă. Astfel, membranele 1 și 3 au culoare maroniu-verde, în timp ce 2 și 4 sunt slab verzi. În Fig.V.45 sunt prezentate membrane pe bază de Carbopol + alge (1 – carbopol + *Cladophora vagabunda* și 2 – Carbopol + *Ulva lactuca*). Și acest tip de membrane poate fi utilizat în terapeutică.



Concluziile studiului

S-a reușit să se obțină membrane colagenice cu alge marine cu elasticitate foarte bună dar și cu o bioadezivitate corespunzătoare. Membranele obținute prezintă elasticitate și rezistență mecanică, astfel încât pot fi tăiate ușor la dimensiunea și în forma dorită.

CAPITOLUL VI CERCETĂRI PRIVIND CAPACITATEA ANTIOXIDANTĂ ȘI ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A UNOR FORME FARMACEUTICE SEMISOLIDE PE BAZĂ DE ALGE MARINE DIN MAREA NEAGRĂ

Formele farmaceutice semisolide realizate pe bază de extracte de alge marine luate în studiu au fost hidrogeluri realizate din hidrogeluri colagenice, geluri cu chitosan, colagen și extract de alge și membrane cu extract de alge. Obiectivul este studiul existenței compușilor cu activitate antioxidantă sau antimicrobiană în algele marine și evidențierea capacității antioxidante și antimicrobiene a formelor farmaceutice realizate.

VI.2 STUDII PRIVIND DETERMINAREA CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE TOTALE PRIN CHEMILUMINESCENȚĂ

Obiectivul studiului. Obiectivul principal îl reprezintă studiul capacității anitoxidante totale realizat mai întâi pe extracte de alge marine și apoi pe diferite formulări farmaceutice semisolide cu destinație topică. Determinările practice le-am realizat pe diferite geluri ce conțin extracte de alge marine.

VI.2.1 DETERMINAREA CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE TOTALE A EXTRACTELOR DE ALGE MARINE

Determinarea cantitativă a eficienței antioxidantilor este într-o continuă cercetare datorită importanței ei. Antioxidanții sunt acum folosiți în diverse domenii mai ales în industria farmaceutică, alimentară, și cosmetică, pentru conservarea și protecția produselor. Multe din tehnicile cunoscute pentru determinarea antioxidantilor sunt greu aplicabile datorită modului laborios de preparare a probelor, timpuri mari de analiză sau necesitatea solubilității probelor pentru analiză. [Meenakshi S. D., 2009]

Metoda prin fotochemiluminescență se bazează pe tehnica de fotochemiluminescență încorporată în sistemul Photochem.

Rezultate și discuții

Pentru a evidenția capacitatea antioxidantă totală a gelurilor colagenice cu extracte de alge am evaluat mai întâi capacitatea antioxidantă a extractelor de alge. Această manieră ne-a permis să alegem și ce tip de algă să luăm în considerare în compoziția ulterioară a formelor semisolide. Pentru obținerea cantitativă a capacității antioxidante totale a fost necesară stabilirea curbelor etalon realizată pe baza standardelor specifice metodei (Fig. VI. 15).

În figura VI.16 sunt prezentate curbele înregistrate pe probe cu extracte de alge. Capacitatea Antioxidantă Totală (CAT) a probelor de alge raportată la timpul de extracție și volumul de probă utilizat în lucru, conform metodei ACL, s-a cuantificat prin comparare cu substanța standard Trolox, iar rezultatele sunt exprimate în nmol/probă, unități echivalente de Trolox, conform tabelului VI.4. Metoda de extracție utilizată pentru obținerea extractelor fluide, macerarea la rece în alcool etilic de concentrație 70%, timp de 12 zile, la întuneric, a generat o bună capacitate antioxidantă totală.

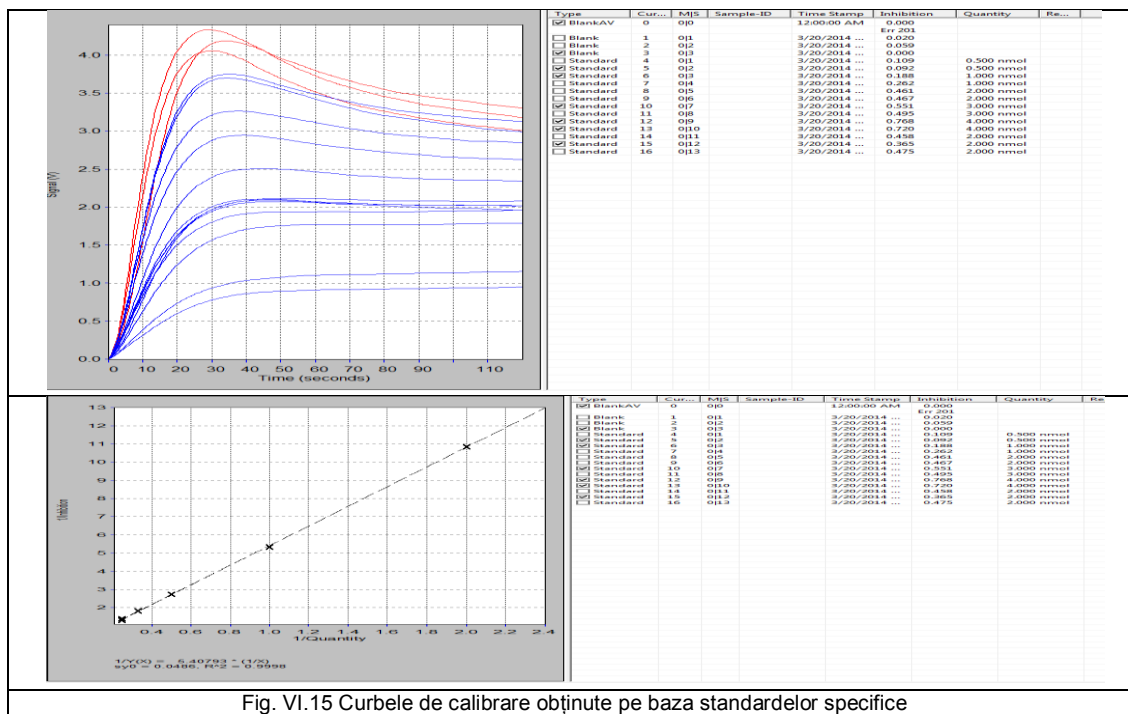


Fig. VI.15 Curbele de calibrare obținute pe baza standardelor specifice

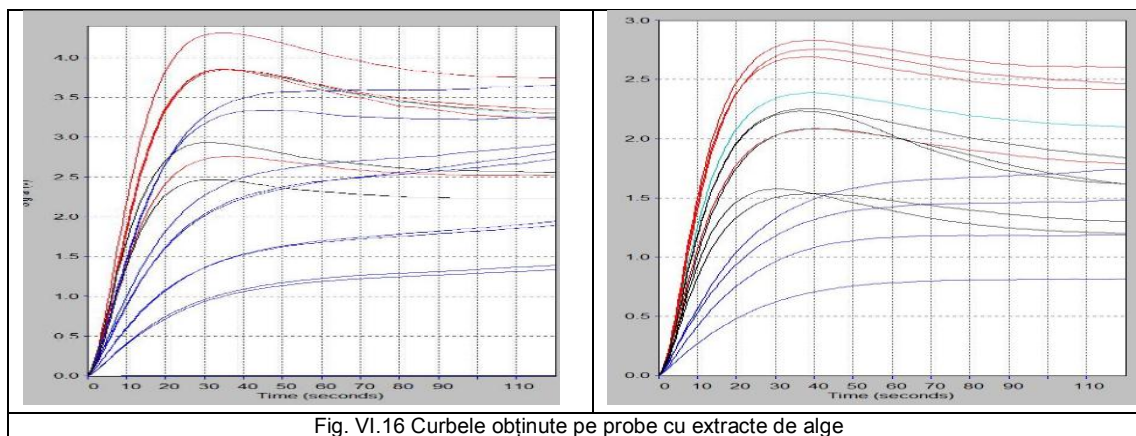


Fig. VI.16 Curbele obținute pe probe cu extracte de alge

Tabelul VI.4 Rezultate obținute pentru capacitatea antioxidantă totală pe extracte de alge

Proba (tip de algă)	Timp de extracție (ore)	Echivalent unități Trolox (nmol/volum probă)	Echivalent unități Trolox (nmol/ g probă uscată)
<i>Cystoseira barbata</i>	24	1,058	52,9
<i>Ceramium rubrum</i>	24	1,042	52,1
<i>Ulvae lactuca</i>	24	0,681	34,05
<i>Cystoseira barbata</i>	72	2,83	141,5
<i>Ceramium rubrum</i>	72	2,64	132

<i>Ulvae lactuca</i>	72	1.24	62
----------------------	----	------	----

Se constată că, cea mai scăzută capacitate antioxidantă o prezintă alga *Ulvae lactuca*, atât la 24 ore, cât și la 72 ore. Comparativ cu valorile obținute pentru algele *Ceramium rubrum* și *Cystoseira barbata*, cea mai ridicată capacitate antioxidantă a fost înregistrată în cazul algei *Cystoseira barbata*, atât la 24 ore cât și 72 ore, activitate ce ar putea fi utilizată în scopul valorificării acestor specii în terapia bolilor degenerative.

VI.2.2 STUDII PRIVIND LIMITA CONCENTRAȚIILOR COMPONENTILOR UNOR GELURI FARMACEUTICE CU ALGE LA CARE SE POATE APRECIA CAPACITATEA ANTIOXIDANTĂ TOTALĂ

Pentru a obține forme farmaceutice semisolide topice care să prezinte capacitate antioxidantă este important să cunoaștem dacă principiile active din componența gelului respectiv prezintă activitate antioxidantă. Determinarea capacității antioxidante totale a fost folosită pentru a stabili limita minimă a concentrației extractului de algă care prezintă capacitate antioxidantă totală pentru a putea fi înglobat în formă farmaceutică semisolidă (gel farmaceutic).

Material și metodă

Obținerea extractelor hidroalcoolice vegetale s-a realizat prin metoda macerării la rece a produsului vegetal uscat în alcool etilic 70%, timp de 12 zile, la întuneric, cu agitare zilnică. Soluția stoc a fost preparată din cantitățile 1 g și respectiv 5g produs vegetal uscat (biomasă algală), care s-a introdus în 3 baloane cotate de 100 mL, peste care s-a completat până la semn cu alcool etilic de concentrație 70%.

Determinarea capacității antioxidante totale s-a făcut prin metoda ACL. S-au analizat extractele hidroalcoolice din produsul vegetal de algă, uscat, de concentrație 1% și 5% (denumite soluții stoc) în alcool etilic de concentrație 40% și 70% și au fost repetate în triplicate, iar rezultatele prezentate figurează ca valori medii ale măsurătorilor. Înainte de măsurare, probele s-au omogenizat rapid cu ajutorul unui agitator magnetic Vortex Velp Scientifica, Italy, în faza de metanol, iar din supernatant s-au luat volume de 10 μL probă pentru măsurători. Evaluarea capacității antioxidante totale a extractelor hidroalcoolice vegetale s-a realizat cu ajutorul aparatului fotochemiluminometru PHOTOCHEM, Analytik Jena AG, Germany, cuplat la PC prevăzut cu soft pentru interpretarea datelor. Fiecare determinare a durat câte 120 secunde (Fig. VI.17). În memoria aparatului au fost menținute aceleași curbe de calibrare. De asemenea, metoda de lucru a fost menținută, pentru a putea face comparații. Au fost luate în lucru alge care au prezentat capacitate antioxidantă moderată și mică la studiile anterioare, și anume *Ceramium rubrum*, *Ulva Lactuca* și *Cladophora vagabunda*.

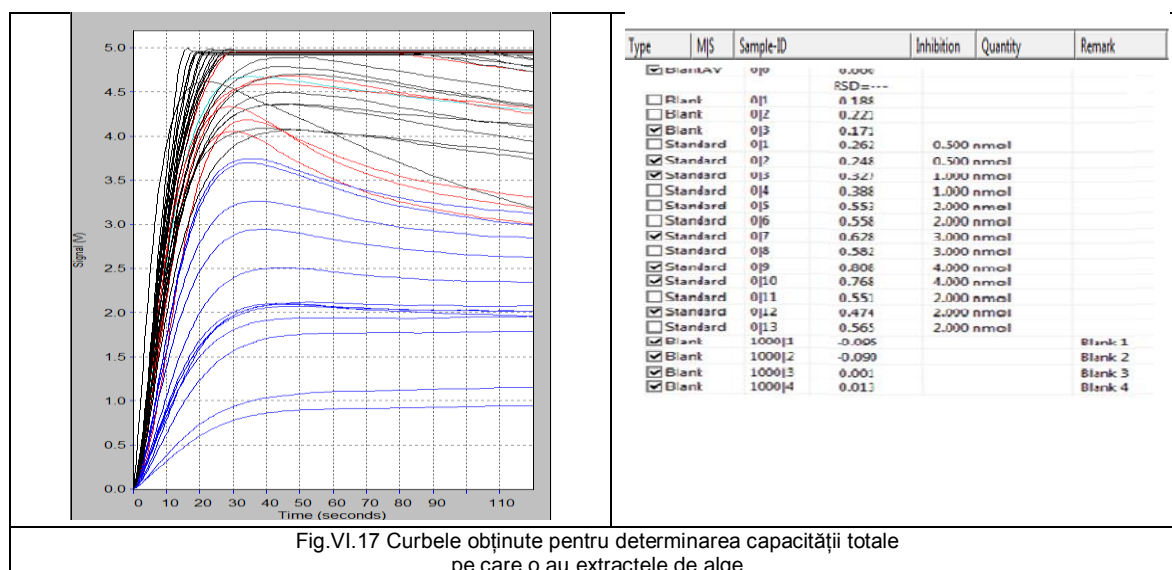


Fig.VI.17 Curbele obținute pentru determinarea capacității totale pe care o au extractele de alge

Rezultatele obținute prin metoda ACL sunt prezentate în Fig. VI.17

Din analiza rezultatelor prezentate în Tabelul VI.5 se constată că, în condiții de concentrații mici, o bună activitate antioxidantă este prezentă în toate algele luate în studiu care au fost extrase în alcool etilic 70%. Dintre algele studiate, alga roșie *Ceramium rubrum* cu concentrația 5% în alcool etilic 70% prezintă cea mai mare valoare (0.338 nmol/volum probă). Apoi urmează alga verde *Cladophora vagabunda* 5% în alcool etilic 70% cu 0.249 nmol/volum probă și *Ulva Lactuca* 5% în alcool etilic 70% cu 0.169 nmol/volum probă.

Tabelul VI.5 Rezultate obținute pentru capacitatea antioxidantă pentru soluții diluate de extracte de alge marine

Proba (tip de algă)	Inhibiția	Echivalent unități Trolox (nmol/ volum probă)	Constatări
<i>Ceramium rubrum</i> 5% în alcool etilic 40%	0.051	0.125	Ara CA
<i>Ceramium rubrum</i> 1% în alcool etilic 40%	0.060	0.145	Are CA
<i>Ceramium rubrum</i> 5% în alcool etilic 70%	0.139	0.338	Are CA cea mai mare
<i>Ceramium rubrum</i> 1% în alcool etilic 70%	-0.038	-0.47	Nu are CA Inhibiția negativă
<i>Ulva Lactuca</i> 5% în alcool etilic 40%	-0.094	-0.229	Nu are CA Inhibiția negativă
<i>Ulva Lactuca</i> 1% în alcool etilic 40%	-0.109	-0.266	Nu are CA Inhibiția negativă
<i>Ulva Lactuca</i> 5% în alcool etilic 70%	0.070	0.169	Are CA
<i>Ulva Lactuca</i> 1% în alcool etilic 70%	-0.115	-0.279	Nu are CA Inhibiția negativă
<i>Cladophora vagabunda</i> 5% în alcool etilic 40%	-0.111	-0.269	Nu are CA Inhibiția negativă
<i>Cladophora vagabunda</i> 1% în alcool etilic 40%	-0.097	-2.36	Nu are CA Inhibiția negativă
<i>Cladophora vagabunda</i> 5% în alcool etilic 70%	0.102	0.249	Are CA
<i>Cladophora vagabunda</i> 1% în alcool etilic 70%	-0.093	-0.226	Nu are CA Inhibiția negativă

Pentru extractele în alcool etilic 40% numai *Ceramium rubrum* prezintă activitate antioxidantă. Interesant este faptul că această algă roșie nu a prezentat activitate antioxidantă la concentrația de 1 g algă în alcool etilic concentrat 70%. Restul algelor verzi nu au prezentat activitate antioxidantă nici pentru concentrații de 1 g algă în alcool concentrat (70%) și nici pentru concentrații de 5 g în alcool etilic mai diluat (40%). În ce privește capacitatea de inhibiție, aceasta prezintă valori negative pentru toate cazurile în care extractul hidroalcoolic de algă nu are activitate antioxidantă.

Concluzia studiului

- Pentru a prepara formulări farmaceutice cu activitate antioxidantă remarcabile este recomandat să fie utilizat extractul alcoolic de algă brună.
- Poate fi folosită și alga roșie, *Ceramium rubrum*, deoarece a prezentat activitate antioxidantă chiar și în condiții de utilizare a unei cantități mai mici de algă.
- Algele verzi însă, prezintă activitate antioxidantă mai slabă și se recomandă a fi utilizate pentru alte proprietăți pe care le au.

VI.2.3 STUDII PRIVIND CAPACITATEA ANTIOXIDANTĂ TOTALĂ A UNUI GEL COMPOZIT PE BAZĂ DE CHITOSAN – COLAGEN - EXTRACTE DE ALGE MARINE

Scopul acestui studiu a fost elaborarea și caracterizarea hidrogelurilor și membranelor de chitosan-colagen cu încorporarea extractelor de alge marine folosind metoda de incluziune în gel la care să evaluăm activitatea antioxidantă.

Material și metodă

Compozitul nou preparat este format din chitosan și colagen de origine marină, la care s-a adăugat un extract hidroalcoolic din alge marine. Extractele hidroalcoolice de alge au fost obținute pe baza unui amestec de extracte de alge cu 10% și respectiv 20% concentrație din următoarele alge: *Ulva lactuca*, *Syn. Ulva rigida* (alge verzi) *Cystoseira barbata* (alge brune) și *Ceramium rubrum* (alge roșii).

Extractele hidroalcoolice au fost realizate prin metoda macerării la rece a produsului vegetal uscat în alcool etilic 70%, timp de 12 zile, la întuneric, cu agitare zilnică.

Colagenul utilizat a fost obținut printr-un proces de extracție din resurse naturale, fiind reticulat în rapoarte diferite cu acid tanic. Colagenul este o proteină cu structură de tripluhelix elicoidal formată din multiple secvențe de aminoacizi. [Muyonga J.H.,2004]

Chitosanul este un polizaharid natural cu structură de carbohidrat modificat. El este un homopolimer format din resturi β -(1→4) legate de N-acetyl-D-glucozamină. El poate fi considerat ca un derivat de chitină provenind din aceasta prin dezacetilare cu NaOH. Chitosanul a fost obținut printr-o biotehnologie modernă din carapace de crab de piatră (*Pachygrapsus marmoratus*) din Marea Neagră. Chitina, substanța de bază este constituită dintr-un lanț liniar de grupari acetilglucozaminice și este o substanță insolubilă în apă.

Rezultate și discuții

Probele de lucru din cele trei componente au fost realizate pe hidrogeluri preparate cu următoarele compoziții:

- chitosan CT1 + colagen 1:1 w/w (AT) + extract alge 10%
- chitosan CT1 + colagen 1:1 w/w (AT) + extract alge 20%
- chitosan CT2 + colagen 1:1 w/w (AT) + extract alge 10%
- chitosan CT2 + colagen 1:1 w/w (AT) + extract alge 20%.

Pentru toate cele patru compoziții a fost măsurată capacitatea antioxidantă totală pe câte trei diluții. Astfel la fiecare compoziție de 5, 10 și 20 μ L curbele obținute pentru determinarea capacității antioxidante totale pe compozitul chitosan-colagen-alge sunt prezentate în Fig. VI.18. În Fig. VI.19 este redată curba de calibrare folosită pentru citirea capacităților antioxidante ale compozitului.

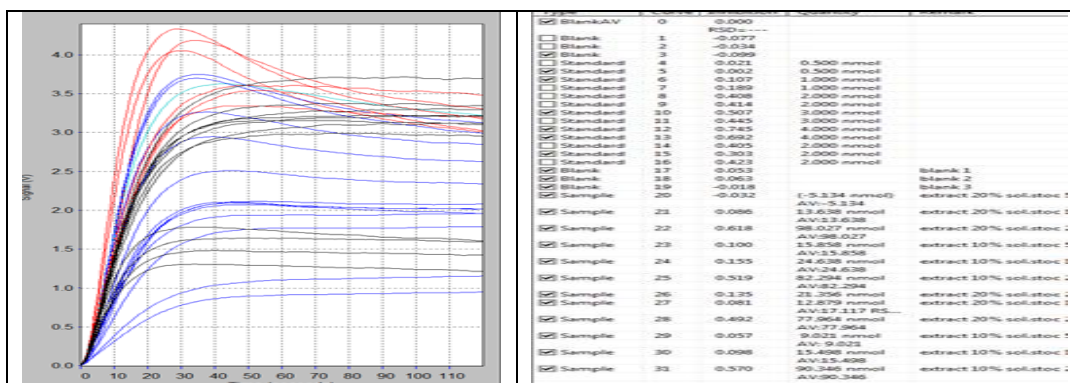


Fig.VI.18 Curbele obținute pentru determinarea capacității totale pe care o prezintă compozitul cu chitosan-colagen-alge

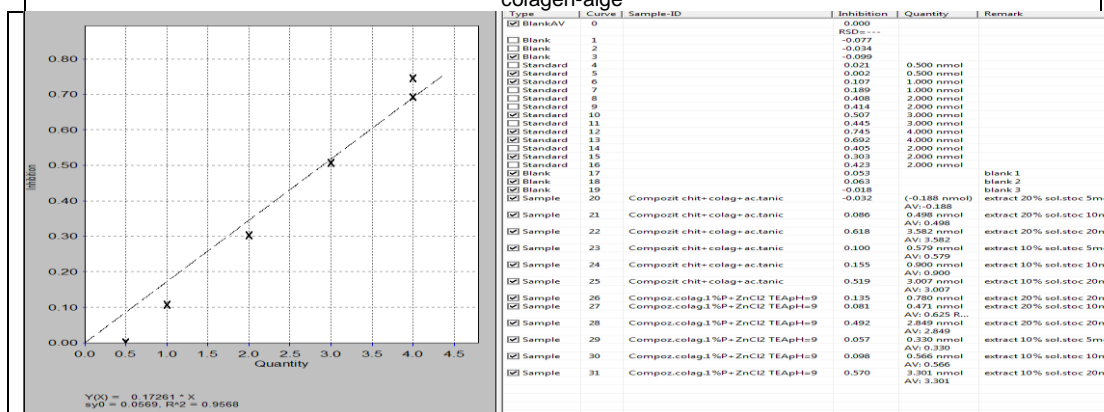


Fig.VI.19 Curbele de calibrare pentru obținute pentru determinarea capacității totale pe care o prezintă compozitul cu chitosan-colagen-alge

Rezultate obținute pentru Capacitatea Antioxidantă Totală (CAT) realizată de compozitul chitosan-colagen-alge sunt prezentate în Tabelul VI.6

Se pot discuta câteva aspecte.

- Din analiza rezultatelor se constată o creștere constantă a valorii capacității antioxidante totale (CTA) cu concentrația compozitului.
- Se constată că cea mai mare capacitate antioxidantă totală (CTA) o prezintă gelurile de compozit cu concentrația cea mai mare (de 20 μ L). Cele mai mari valori pentru capacitatea antioxidantă

totală (CTA) o au gelurile care au chitosanul cu masa moleculară medie (3.582 și respectiv 3.301 nmol/volum probă echivalent unități Trolox). Cea mai mare capacitate antioxidantă totală (CTA) o prezintă gelul 1 CHIT-COL-ALG 20% (Chitosanul CHIT cu masă moleculară medie).

- Ceea ce interesează însă, sunt condițiile limită de concentrații pentru care gelurile mai prezintă capacitate antioxidantă totală (CTA), adică gelurile cu concentrația 5 μ L.

Tabelul VI.6 Rezultate obținute pentru Capacitatea Antioxidantă Totală (CAT) realizată de compozitul chitosan-colagen-alge

Nr. probă/compoziția compozitului gelic	Concentrații ale compozitului obținute prin diluție	Inhibiția	Echivalent unități Trolox (nmol/ volum probă)	Constatări
Compozit CHIT-COL-ALG 20% (CHIT cu masă moleculară medie)	5mcL	-0.032	-0.188	Nu prezintă activitate antioxidantă
	10mcL	0.086	0.498	prezintă activitate antioxidantă
	20mcL	0.618	3.582	prezintă activitate antioxidantă mare
2.Compozit CHIT-COL-ALG 10% (CHIT cu masa moleculară mică)	5mcL	0.100	0.579	prezintă activitate antioxidantă
	10mcL	0.155	0.900	prezintă activitate antioxidantă bună
	20mcL	0.519	3.007	prezintă activitate antioxidantă mare
3.Compozit CHIT-COL-ALG 20% (CHIT cu masa moleculară mică)	5mcL	0.081	0.471	prezintă activitate antioxidantă
	10mcL	0.135	0.780	prezintă activitate antioxidantă bună
	20mcL	0.492	2.849	prezintă activitate antioxidantă mare
4. Compozit CHIT-COL-ALG 10% (CHIT cu masă moleculară medie)	5mcL	0.057	0.330	prezintă activitate antioxidantă
	10mcL	0.098	0.566	prezintă activitate antioxidantă bună
	20mcL	0.570	3.301	prezintă activitate antioxidantă mare

VI.3 CAPACITATEA ANTIMICROBIANĂ

V1.3.1 STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIBACTERIENE A UNOR ALGE MARINE

Am realizat un studiu bacteriologic privind acțiunea antibacteriană a cinci alge marine, după cum urmează:

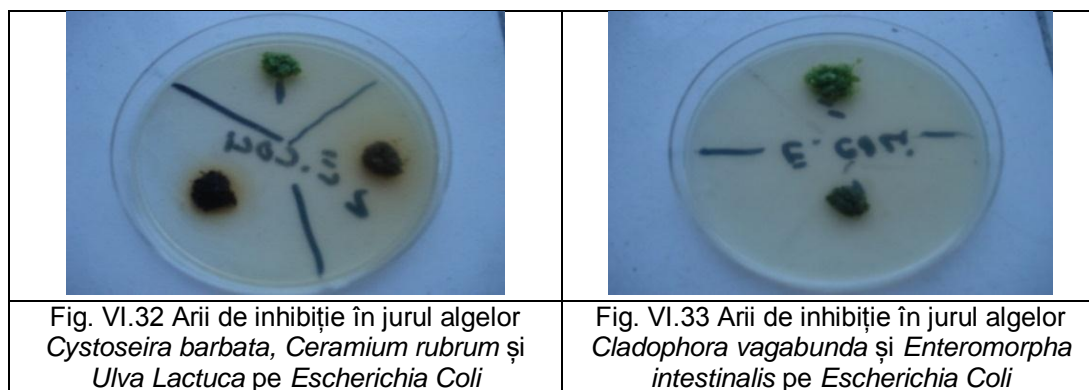
- *Ulva Lactuca* și *Rigida*;
- *Ceramium Rubrum*;
- *Cystoseira Barbata*;
- *Cladophora*;
- *Enteromorfa intestinalis*.

Material și metodă

Am efectuat izolarea în cultura pură a două tulpini de coci gram pozitivi, respectiv, *Streptococcus beta hemolytic* și *Staphylococcus aureus* și patru tulpini de bacilli gram negativ respectiv *Escherichia Coli*, *Proteus*, *Klebsiella* și *Piocianic*. Motivația pentru care am ales tulpini diferite de bacterii gram pozitive și gram negative au fost diferențele cunoscute privind structura peretelui bacterian la bacteriile gram pozitive și gram negative. Dat fiind cunoscut că în structura acestor alge există steroli am urmărit o potențială activitate antibacteriană a acestor alge.

Rezultate obținute

Sunt prezentate etapele de lucru cele mai importante, realizate pentru identificarea speciilor bacteriene folosite pentru studiu. În cele două figuri (Fig.VI.32 și Fig.VI.33) se constată existența ariilor de inhibiție moderată (d = 2 mm) pentru toate cele 5 specii de alge.

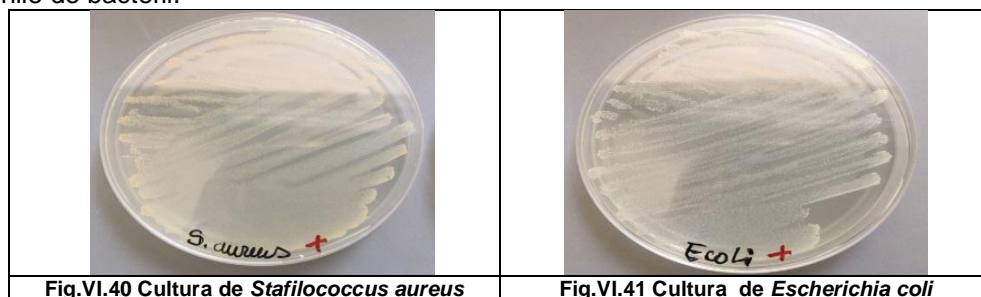


Concluziile studiului

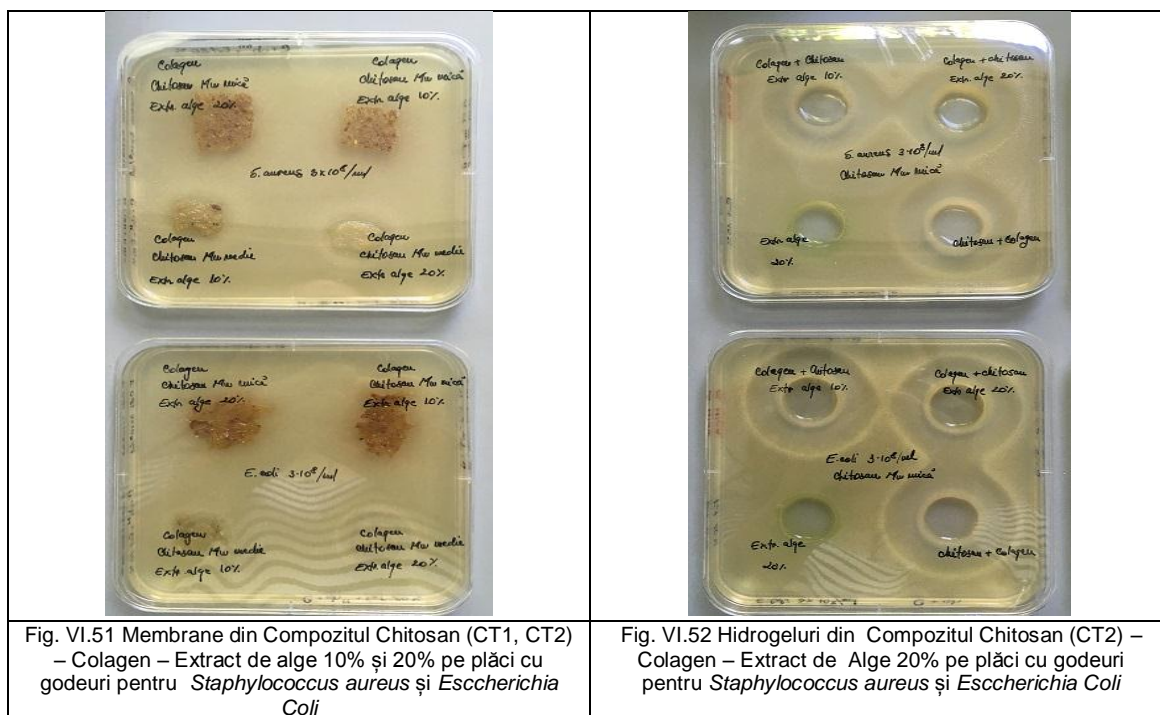
1. Bacteriile gram pozitive (*streptococcus*, *staphylococcus aureus*) sunt moderat inhibitate de algele studiate.
 2. Bacteriile gram negative sunt de asemenea influențate de algele studiate.
- Se poate trage concluzia că dacă s-ar putea concentra extractul algal, principiile active responsabile de această activitate antibacteriană s-ar putea exploata. Potențialul algelor studiate este de inhibiție moderată asupra bacteriilor gram pozitive și gram negative.

VI.3.2 STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIBACTERIENE A UNUI COMPOZIT CHITOSAN - COLAGEN - EXTRACT DE ALGE MARINE

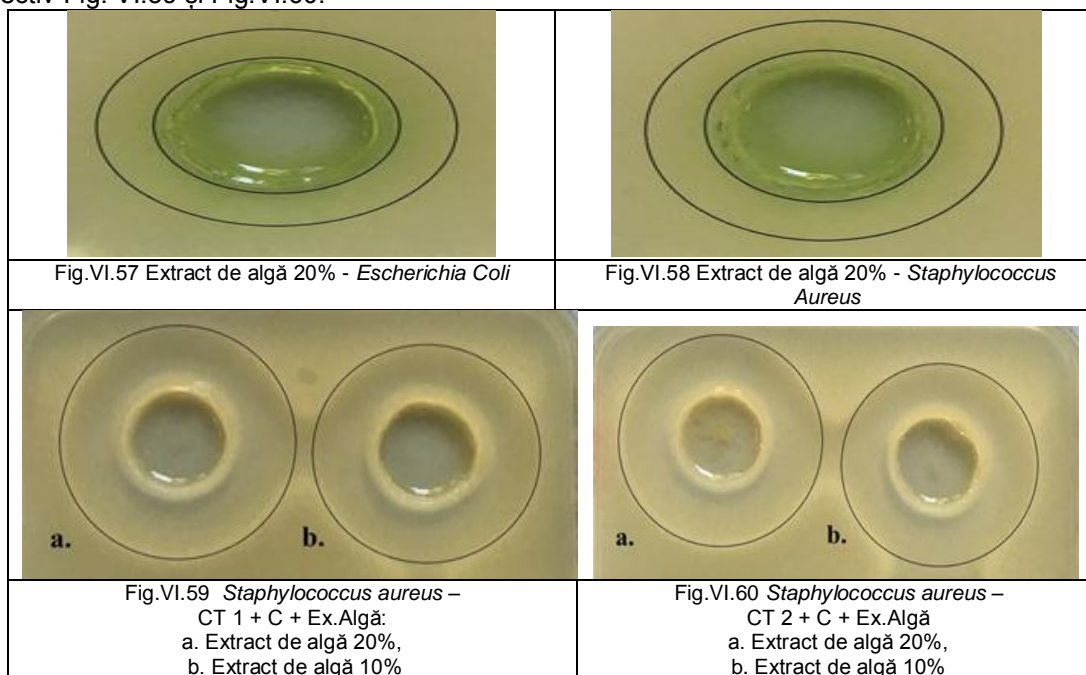
Compozitul nou preparat este format din chitosan și collagen de origine marină, la care s-a adăugat un extract hidroalcoolic din alge marine. Extractele hidroalcoolice de alge au fost obținute pe baza unui amestec de extracte de alge cu 10% și respectiv 20% concentrație din următoarele alge: *Ulva lactuca*, *Syn. Ulva rigida* (alge verzi) *Cystoseira barbata* (alge brune) și *Ceramium rubrum* (alge roșii). Am folosit cutii Petri pentru a pregăti plăcile de agar nutritiv pe care le-am contaminat cu tulpinile de bacterii. Au fost selectate bacterii reprezentative, gram pozitive - *Staphylococcus aureus* și gram negative - *Escherichia Coli*. În figurile Fig.VI.40, Fig.VI.41 și Fig.VI.42 sunt prezentate cutiile Petri cu tulpinile de bacterii.



În Fig.VI.51 sunt prezentate membranele analizate pe cele 2 tulpini de bacterii. Membranele de compozit au fost obținute din hidrogelurile de compozit prezentate în Fig.VI.52.



Rezultate pentru analiza ariilor de inhibiție se pot analiza ușor din figurile Fig. VI.57, Fig. VI.58 și respectiv Fig. VI.59 și Fig.VI.60.



Se poate face un comentariu pentru *Escherichia Coli*.

Din analiza Fig.VI.63 și Fig.VI.64 se constată cea mai mare arie de inhibiție (aproape 24 mm) la compozitul CT 2 – C - Extr. alge 20%.. Deci, acest compozit are cea mai bună activitate antimicrobiană. Cea mai mică inhibiție, deci cea mai slabă activitate antimicrobiană, o prezintă compozitul CT 1 – C - Extr. alge 20%.

Pentru *Staphylococcus aureus* se pot face de asemenea unele constatări.

Tot compozitul CT 2 – C - Extr. alge 20% prezintă cu cea mai mare arie de inhibiție (peste 22,5 mm), deci cea mai bună activitate antimicrobiană. Cea mai mică arie de inhibiție o prezintă CT 1- C - Extr. Alge 10% (sub 19,5 mm).

**VII. MODELAREA CEDĂRII IN VITRO ȘI IN VIVO A SUBSTANȚELOR ACTIVE DIN
FORME FARMACEUTICE APLICATE LOCAL
VII.1 ECUAȚIA GENERALĂ A FENOMENELOR DE TRANSFER**

Sistemele de medicamente sunt sisteme disperse multicomponente reprezentate printr-un concept foarte larg. Chimia fizică a sistemelor disperse poate cuprinde entități de foarte mare complexitate, care rezultă din asocierea a două sau mai multe specii chimice prin forțe intermoleculare precum și entități polimerice care rezultă prin asocierea spontană a unui număr mare de componente cu caracteristici microscopice și macroscopice specifice.

Fenomenele de transfer se referă la transferul de masă, de căldură sau de impuls și pot fi explicate cu ajutorul unor ecuații matematice. În funcție de mărimea transferată se admite următoarea clasificare [Polyanin A. D., 2004], [Precup R., 2004]:

- fenomene de difuzie – atunci când mărimea transferată este reprezentată de molecule în cadrul mișcării lor browniene;
- fenomene de transport convectiv când este vorba de curenți globali ai unui fluid, din care fac parte și molecule, iar descrierea cea mai adecvată este dată de mecanica fluidelor;
- fenomene de transport radiativ - mărimea transferată fiind particule elementare care se deplasează pe traiectorii drepte.

**VII.10 REZULTATE PRIVIND TRANSFERUL PRIN MEMBRANE A GELURILOR CU
ALGE CARBOPOL ȘI ACICLOVIR**

Au fost realizate geluri cu extracte de alge marine, carbopol 971 și aciclovir. Compozițiile probelor luate în studiu sunt prezentate pentru fiecare din cele opt produse în Tabelul VII.3. S-au realizat studii de transfer prin membrană pentru a urmări cedarea controlată a substanței active din fiecare produs cu compoziții diferite. Ceea ce a fost menținut constant a fost concentrația aciclovirului.

Tabel VII.3 Rezultate privind transferul prin membrane a gelurilor cu alge carbopol și aciclovir

Produs 1	Produs 2
Carbopol 2 % - 8,31 g Aciclovir - 0,5 g Alga <i>Ceramium rubrum</i> în 70% - 0,48 g TEA - 7 pic pH 7	Glicerină - 1,63 g Carbopol 2 % - 7,59 g Aciclovir - 0,5 g Alga <i>Ceramium rubrum</i> în 70% - 0,45 g TEA - 5 pic pH 6,5 – 7
Produs 3	Produs 4
Glicerină - 1,5 g Aciclovir - 0,5 g Carbopol 2% - 7g Alga <i>Ceramium rubrum</i> în 70% - 0,5 g Alga <i>Ulva lactuca</i> în 70% - 0,5 g TEA - 9 pic pH 6,5 – 7	Glicerină - 1,45 g Aciclovir - 0,5 g Alga <i>Ulva lactuca</i> în 70% - 0,45 g Carbopol 2 % - 6,7 g TEA - 5 pic pH 6,5 – 7
Produs 5 (fără alge)	Produs 6
Glicerină - 1,39 g Aciclovir - 0,5 g Carbopol 2 % - 8,19 g TEA 7 - pic pH 7,5 – 8	Glicerină - 2,7 g Aciclovir - 0,5 g Carbopol 3 % - 7 g Alga <i>Ulva lactuca</i> în 70 % - 0,5 g Alga <i>Ceramium rubrum</i> în 70 % - 0,5 g TEA - 3 pic pH 6 – 6,5
Produs 7	Produs 8
Carbopol 3 % - 8,66 g Aciclovir - 0,5 g Alga <i>Ceramium rubrum</i> în 70 % - 0,5 g TEA - 9 pic pH 7,5 g	Glicerină - 5,5 g Aciclovir - 0,5 g Carbopol 3 % - 7,5 g Alga <i>Ceramium rubrum</i> în 70 % - 0,5 g Alga <i>Ulva lactuca</i> în 70 % - 0,5 g TEA - 7 pic pH 6,5 – 7

Este de menționat faptul că celulele 1 – 3 reprezintă: Produsul 1, cod P1 (Cr.48, Cp2), iar celulele 4-6 reprezintă: Produsul 2, cod P2 (C.45, G1.63, Cp2).

- În tabelul VII.4 sunt prezentate concentrațiile aciclovirului în probele prelevate ($\mu\text{g/mL}$),
- În tabelul VII.5 sunt prezentate cantitățile totale cedate / unitatea de suprafață ($\mu\text{g/cm}^2$),
- În tabelul VII.6 sunt prezentate cantitățile totale cedate / unitatea de suprafață ($\mu\text{g/cm}^2$), valori medii, deviațiile standard și coeficienții de variație.

Tabel VII.4 Concentrațiile aciclovirului în probele prelevate ($\mu\text{g/mL}$)

Timpul (min)	Cell 1	Cell 2	Cell 3	Cell 4	Cell 5	Cell 6
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
30	49.82	56.06	54.85	44.99	63.48	79.29
60	96.47	93.26	74.28	82.62	115.31	115.04
90	153.19	128.02	113.47	111.55	136.64	129.20
120	155.90	144.81	125.13	126.50	155.86	166.55
180	195.60	202.81	178.72	191.22	208.74	217.79
240	238.87	230.28	218.73	233.35	270.45	266.27

Tabel VII.5 Cantitățile totale cedate / unitatea de suprafață ($\mu\text{g/cm}^2$)

Timpul (min)	Cell 1	Cell 2	Cell 3	Cell 4	Cell 5	Cell 6
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
30	285.44	312.43	308.82	255.48	362.44	436.60
60	580.91	551.50	449.27	494.65	694.34	678.34
90	960.52	797.98	712.01	705.70	881.40	821.42
120	1062.74	964.00	841.88	853.73	1068.47	1100.20
180	1378.44	1369.19	1214.45	1292.86	1458.62	1476.61
240	1737.06	1637.06	1540.88	1640.34	1929.12	1866.82

Tabel VII.6 Cantitățile totale cedate / unitatea de suprafață ($\mu\text{g/cm}^2$), valori medii, deviațiile standard și coeficienții de variație

Timpul (min)	P1 (Cr. 48, Cp2)	SD	CV (%)	P2 (C.45, G1.63, Cp2)	SD	CV (%)
0	0.00	0.00	-	0.00	0.00	-
30	302.23	14.66	4.85	351.51	91.05	25.90
60	527.23	69.09	13.10	622.44	110.96	17.83
90	823.50	126.21	15.33	802.84	89.31	11.12
120	956.21	110.64	11.57	1007.47	134.08	13.31
180	1320.69	92.13	6.98	1409.37	101.29	7.19
240	1638.34	98.10	5.99	1812.09	151.97	8.39

Se precizează faptul că celulele 1-3 conțin: Produsul 1, cod P1 (Cr.48, Cp2) și celulele 4-6 reprezintă: Produsul 2, cod P2 (C.45, G1.63, Cp2). În Fig. VII.14 sunt redate curbele de cedare în funcție de probe luate în studiu.

Curbele de cedare nu diferă prea mult pentru cele două formulări, nici calitativ și nici cantitativ. Ca model, după cum se vede în ultimele două grafice, cantitatea cedată este proporțională, după un time-lag mai mic de 30 minute, cu radicalul timpului. Ar putea fi cazul legii Higuchi.

$$M(t) = k\sqrt{c_0}\sqrt{t}$$

sau de legea radicalului dedusă mai sus, în cazul cedării dintr-un rezervor foarte mare:

$$Q(t) = c_0 \frac{2A}{\sqrt{\pi}} \sqrt{Dt}$$

Observăm ca o diferență între cele două modele este aceea că într-un model apare c_0 iar în celalalt model $\sqrt{c_0}$. Dat fiind însă, că în experimentele noastre concentrația de aciclovir a fost păstrată constantă, nu putem să susținem o concluzie clară, pornind de la dependența între cantitatea cedată și cantitatea inițială de aciclovir înglobată în formulare. O diferență semnificativă între cele două modele apare însă la condițiile inițiale și pe frontieră. Modelul Higuchi consideră că solventul de dizolvare pătrunde treptat în formulare și o „spală” de substanțe active strat cu strat, în timp ce modelul dezvoltat în teză presupune o concentrație constantă la suprafața de transfer. Întrucât gelul de carbopol este un mediu hidrofil iar un transfer invers, de la compartimentul receptor al celei spre cel donator este puțin probabil, modelul cel mai adecvat pare să fie modelul de difuzie din rezervor. Time-lag-ul observat ar putea fi legat mai curând de o echilibrare între membrane și mediile din cele două compartimente. Din grafice, din intersecția dreptei de regresie cu axa Ox, se vede că acest time-lag este de ordinul a 15 minute.

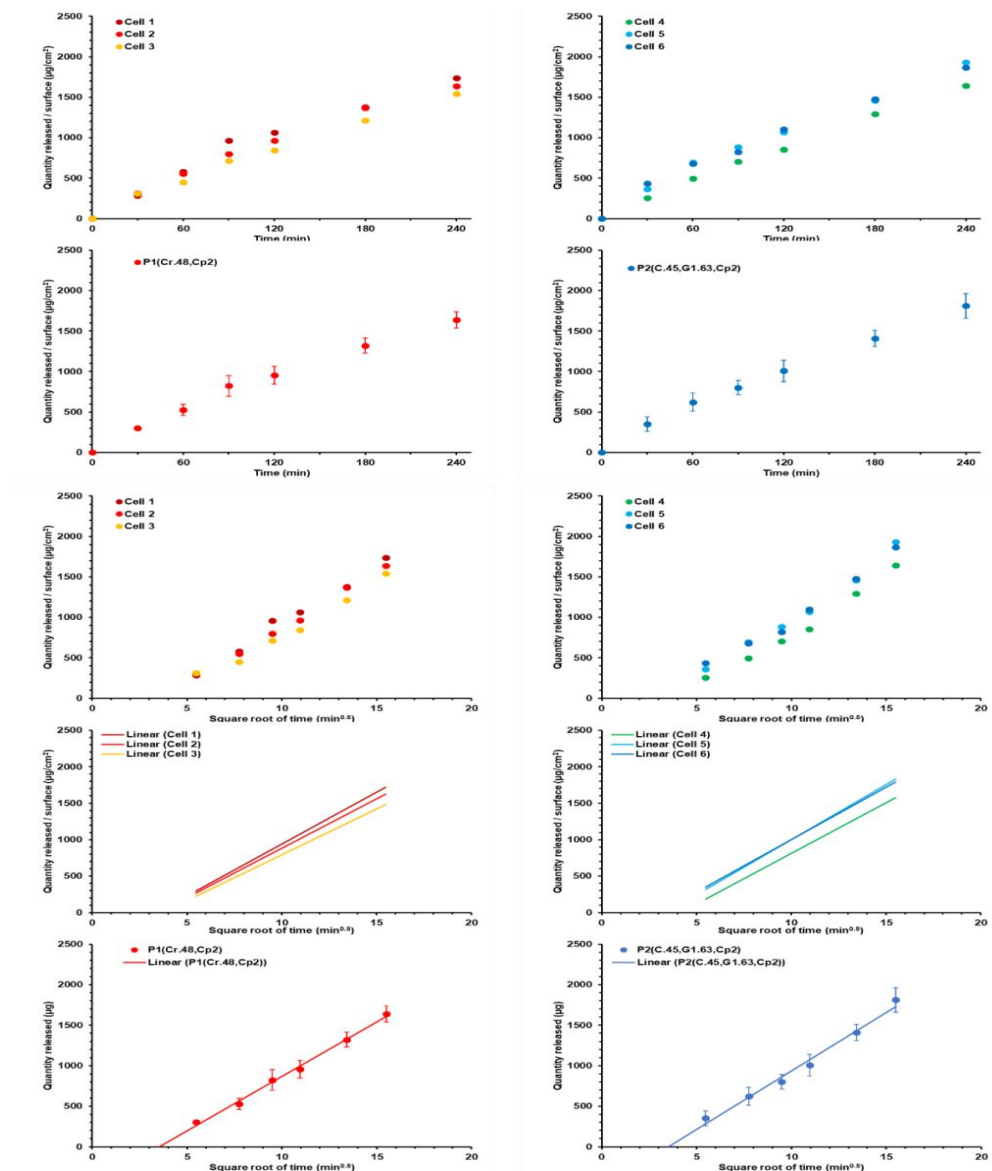


Fig. VII.14 Curbele de cedare în funcție de probe

CAPITOLUL VIII. CONCLUZII GENERALE

VIII.1 FORME SEMISOLIDE CU APLICAȚIE TOPICĂ

Algele marine constituie, prin compoziția lor, o bioresursă naturală deosebit de valoroasă. Se pot trage următoarele concluzii:

- Capitolul conține un studiu farmaco-botanic pentru încadrarea corectă a algelor luate în studiu. Acest lucru s-a realizat prin analiză macroscopică și microscopică corelate cu datele din literatură.
- S-a investigat influența agenților de contaminare asupra biomasei de alge prin determinarea conținutului de pesticide.
 - Contaminarea algelor marine cu pesticide este dependentă de cantitatea și de modul de utilizare al acestor produse chimice în zonele litorale.
 - Algele studiate nu au prezentat la analiza cromatografică niciun conținut de pesticide organoflorurate.
- Conținutul de metale grele în algele marine brune, roșii și verzi a fost determinat prin metode spectrale de absorbție atomică. S-a constatat încadrarea în limitele legale prestabilite de reglementările în vigoare și concordanța cu alte date de literatură pentru conținutul de substanțe organoclorurate și pentru conținutul de metale grele plumb, cadmiu, cupru și zinc.
 - Datele experimentale demonstrează că zona de recoltare a biomasei algale este un factor care influențează conținutul de metale grele.
 - Algele marine pot constitui un valoros rezervor de materie primă natural, curat, necontaminat cu factori de poluare pentru industria farmaceutică sau cosmetică.
- A fost realizat studiul fitochimic din care a rezultat un bogat conținut în steroli și triterpene, cumarine, compuși reducători, oze și polioze, tanin catehic, heterozide stereoidiene, aminoacizi.
 - În extractul eteric s-au regăsit steroli și triterpene, cumarine și carotinoide în toate algele (cu excepția algei *Ceramium rubrum*)
 - În extractul alcoolic s-au regăsit tanin catehic, compuși reducători, heterozide triterpenice și stereoidiene, aminoacizi și cumarine în toate algele verzi. În algele brune s-au regăsit tanin catehic, compuși reducători și heterozide triterpenice. În algele roșii s-au regăsit compuși reducători și heterozide triterpenice.
- A fost determinat și analizat conținutul de sulfat, de azot total, de proteine, glucide și lipide.
 - A fost analizată statistic corelația între conținutul de substanță minerală și glucide în pulberile algale obținute din speciile de alge verzi, roșii și brune. S-a aplicat **testul Student** pentru compararea valorilor medii de glucide, substanță minerală, lipide și proteine la speciile de alge verzi, și roșii/ brune. Concluzia testului, pentru un nivel de încredere de 95%, a fost că: diferența între valorile medii ale proteinelor și substanței minerale la speciile de alge verzi și roșii/brune este statistic semnificativă (proteine - $P = 0,0385$; $n = 11$; $t = 1,97$; substanță minerală - $P = 0,0416$; $n = 11$; $t = 1,92$) în timp ce valorile medii ale lipidelor și glucidelor nu diferă statistic semnificativ.
- A fost identificat conținutul de oligoelemente, minerale (metale și nemetale) prin metode spectrale de absorbție atomică sau moleculară în UV-VIS. S-a determinat concentrația ionilor unor metale cum sunt cromul și fierul pe algele brune și roșii. Din comparația rezultatelor obținute în decursul anilor de analiză, concentrația cromului la algele brune a scăzut, iar la algele roșii a crescut (vezi Fig.IV.27).
 - Conținutul de Fe scade în concentrație pentru alga brună *Cystoseira barbata* dar crește pentru *Ceramium rubrum*. Pentru alga verde *Ulva lactuca* studiul a fost extins regăsindu-se și alte elemente cum sunt: potasiu, calciu, magneziu, mangan, alături de nemetale cum sunt clor, brom, iod.
- A fost studiat conținutul de vitamine din alge prin spectre FTIR confirmându-se existența unor vitamine. S-au regăsit β -caroten, colecalciferol, ergocalciferol în toate algele analizate.
- Pentru speciile din clasa *Chlorophyta* (alge verzi) s-a obținut o largă gamă de vitamine din complexul de vitamine B: B₁, B₂, B₃, B₅, B₇, B₉. La algele brune și roșii, s-au regăsit atât vitamine hidrosolubile B₂, B₃, B₁₂, C, cât și liposolubile, vitaminele E și provitaminele A.

VIII.2 STUDIUL COMPORTĂRII REOLOGICE A UNOR FORMULĂRI FARMACEUTICE CU ALGE MARINE DIN MAREA NEAGRĂ CU DESTINAȚIE TOPICĂ

Au fost dezvoltate cercetări pentru obținerea unor forme semisolide obținute din constituenți naturali pe bază de alge din Marea Neagră. Algele folosite au fost selectate din toate speciile reprezentative

existente pe litoralul românesc, și anume alga brună - *Cystoseira Barbata*, alga roșie - *Ceramium Rubrum*; și algele verzi - *Ulva Lactuca*, *Cladophora vagabunda* și *Enteromorpha intestinalis*. Ele au fost folosite ca extracte alcoolice în alcool etilic 70 % și 90 %. Au fost încorporate în geluri hidroalcoolice de collagen fibrilar tip I, extras din piele de bovine. S-au obținut următoarele formulări:

- **geluri colagenice cu alge marine** (brune, roșii și verzi). Acestea au fost testate pentru aplicații topice în cavitatea orală.
 - Au fost studiate caracteristicile reologice ale acestor geluri la pH-uri diferite și interacțiunile cu mediul.
 - Cea mai mare vâscozitate, deci cea mai puternică interacțiune în mediu acid există între collagen și componentele din algă (atât pentru concentrația de 5 % cât și de 10 % extract de algă) pentru alga verde *Ulva Lactuca*.
 - Cea mai redusă interacțiune se stabilește între collagen și componentele din alga *Cystoseira Barbata* pentru concentrația de 5 % și între collagen și componentele din alga *Ceramium Rubrum* (pentru concentrația de 10 %.)
 - La pH neutru nu s-au putut obține geluri cu stabilitate bună în timp. Se produce separarea fazelor și dispărea starea gelică.
- **geluri colagenice cu extracte de alge verzi** *Enteromorpha intestinalis* și *Cladophora vagabunda* destinate aplicării pe piele.
 - Preparatele au comportare reologică pseudoplastică, sunt stabile și prezintă aspect opalescent. Din analiza reologică rezultă că peste o anumită viteză de forfecare, se realizează liniarizarea curbelor de curgere, preparatele sunt stabile și nu își mai modifică structura.
 - Pe baza valorilor parametrilor reologici se constată însă o stabilitate mai bună la preparatul P2 cu conținut mai mare de algă în același tip de hidrolizat colagenic.
- **preparate cosmetice** bazate pe amestecarea unei faze semisolide (lanolină, unt de cacao, ceruri) lipofilă cu extracte apoase și alcoolice de alge marine. Emulsiile E2 cu lanolină și alge marine prezintă o comportare mai stabilă reologic comparativ cu emulsiile E1 cu trietanolamină și alge.
- **membrane colagenice cu alge marine** (cu patru alge marine) care prezintă elasticitate foarte bună dar și o biodezgradabilitate corespunzătoare. Membranele obținute prezintă pe lângă elasticitate și rezistență mecanică bună, astfel încât pot fi tăiate ușor la dimensiunea și în forma dorită, au dimensiunile adecvate pentru tratamente destinate cicatrizării sau refacerii țesuturilor.
- Au fost obținute și membrane pe bază de Carbopol + alge (1 – carbopol + *Cladophora vagabunda* și 2 – Carbopol + *Ulva lactuca*). Și acest tip de membrane poate fi utilizat în terapeutică.
- **matricile poroase** care prezintă rezistență mecanică și elasticitate, dacă se comprimă, ele revin la dimensiunea inițială instantaneu.
- Ele se îmbibă practic instantaneu în apă. Se pot tăia bucățele având dimensiuni convenabile pentru utilizare medicală în tratamentul arsurilor și refacerea pielii.

VIII.3 CERCETĂRI PRIVIND CAPACITATEA ANTIOXIDANTĂ ȘI ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A UNOR FORME FARMACEUTICE SEMISOLIDE PE BAZĂ DE ALGE MARINE DIN MAREA NEAGRĂ

- Din studierea compușilor cu activitate antioxidantă conținuți în algele marine, cum sunt clorofilele a și b și β -carotenul s-au contat următoarele:
 - analizele spectrale în UV-VIS pe pulberile de alge brune (*Cystoseira barbata*) și alge verzi (*Cladophora vagabunda* și *Enteromorpha intestinalis*) au arătat că fiecare substanță etalon (de clorofilă a sau b sau β -caroten) s-a regăsit prin picurile specifice în soluțiile de algă.
 - analiza cromatografică a extractelor din alga brună *Cystoseira barbata*, a pus în evidență prezența unui singur peak major cu același profil spectral și timp de retenție ca și peak-ul I al clorofilei a. De asemenea, s-a evidențiat și existența clorofilei b și a și a β -carotenului.
- Capacitatea antioxidantă a algelor marine a fost pusă în evidență prin metoda chemiluminescentei, și s-a dovedit că:
 - Cea mai bună activitate antioxidantă o prezintă extractul alcoolic 70% de algă brună. Este recomandat să fie utilizat pentru a prepara formulări farmaceutice cu activitate antioxidantă.

- Alga roșie, *Ceramium rubrum*, deoarece a prezentat activitate antioxidantă mai mare, poate fi folosită în formulări farmaceutice chiar și în condiții de utilizare a unei cantități mai mici de algă.
- Algele verzi prezintă activitate antioxidantă mai slabă și se recomandă a fi utilizate pentru alte proprietăți pe care le au.
- Din studiul capacității antioxidante totale a compozitelor pe bază de chitosan, collagen și alge se constată următoarele:
 - Din analiza rezultatelor se constată o creștere constantă a valorii capacității antioxidante totale (CTA) cu concentrația compozitului.
 - Se constată că cea mai mare capacitate antioxidantă totală (CTA) o prezintă gelurile de compozit cu concentrația cea mai mare (de 20 μL). Cele mai mari valori pentru capacitatea antioxidantă totală (CTA) o au gelurile care au chitosanul cu masa moleculară medie (3.582 și respectiv 3.301 nmol/volum probă echivalent unitați Trolox). Cea mai mare capacitate antioxidantă totală (CTA) o prezintă gelul 1 CHIT-COL-ALG 20% (Chitosanul CHIT cu masă moleculară medie).
 - Ceea ce interesează însă, sunt condițiile limită de concentrații pentru care gelurile mai prezintă capacitate antioxidantă totală (CTA), adică gelurile cu concentrația 5μL.
 - La diluție mică (5 μL), gelul care prezintă cea mai mare capacitate antioxidantă totală (CTA) este gelul Compozit CHIT-COL-ALG 10% (CHIT cu Masa moleculară mică) 0.579 nmol/volum probă echivalent unitați Trolox.
- Din studiul activității antimicrobiene se pot evidenția următoarele:
 - Dacă se folosesc extracte de alge cu concentrație crescută, s-ar putea exploata principiile active reponsabile de activitate antibacteriană.
 - Potențialul algelor studiate este de inhibiție moderată asupra bacteriilor gram pozitivi, respectiv, *Streptococcus beta hemolytic* și *Staphylococcus aureus* și asupra a patru tulpini de bacilli gram negativ respectiv *Escherichia Coli*, *Proteus*, *Klebsiella* și *Piocianic*.
 - Activitatea antimicrobiană poate mult crescută prin folosirea extractelor alcoolice de alge marine în combinație cu alte componente, așa cum s-au realizat hidrogelurile compozit de CT1-C-Ex ALGE 10%, CT2-C-Ex ALGE 10%, CT1-C-Ex ALGE 20%, și CT2-C-Ex ALGE 20%. Se constată că ariile de inhibiție sunt mai mult decât dublate pentru fiecare component în parte. Mai mult se constată că cea mai mare activitate antioxidantă o are compozitul CT 2-C-Ex. ALGE 20% cu chitosanul cu masa moleculară mică și extractul de alge cel mai concentrat (20%).
 - Și membranele de compozit au prezentat activitate antimicrobiană marcantă putând fi recomandate să fie utilizate în scopuri terapeutice.

VIII.4 MODELAREA CEDĂRII IN VITRO ȘI IN VIVO A SUBSTANȚELOR ACTIVE DIN FORME FARMACEUTICE APLICATE LOCAL

- Indiferent de forma lor fizico-chimică și farmaceutică, sistemele de medicamente ar trebui să aibă două caracteristici esențiale: biocompatibilitate și capacitatea de eliberare controlată.
 - Evaluarea *in vitro* și *in vivo* a cineticii de eliberare de substanțe bioactive din sistemele de medicamente joacă un rol important în precizarea și managementul atât al eficacității cât și al siguranței medicamentului.
 - Stabilirea cantității de substanță medicamentoasă eliberată din forma farmaceutică se realizează prin determinări *in vivo* și *in vitro* care permit obținerea cantității de substanță cedată și viteza de cedare.
 - Transferul medicamentelor în organism este un transfer prin membrane lipidice care separă două medii apoase. Procesul este de fapt o combinație de trei procese succesive în timp și spațiu: transferul la prima interfață apă/lipide, difuzia în fază lipidică și transferul la a doua interfață.
- Concret putem susține:
1. Cazul transferului căldurii dintr-un rezervor infinit într-un mediu semifinit. Este un caz clasic în teoria ecuațiilor cu derivate parțiale, poate fi aplicat la transferul de masă dintr-un rezervor unde substanța activă se află în concentrație mare, într-un mediu receptor de volum mare, în care concentrația este foarte mică. În ambele cazuri ecuația difuziei trebuie rezolvată în condițiile inițiale și pe frontieră.
 2. Rezolvarea ecuației se poate face utilizând transformata Laplace.

3. Calculând fluxul prin interfață și integrând apoi fluxul în raport cu timpul, se obține cantitatea transferată ca funcție de timp. Deci, s-a obținut următoarea lege: „Cantitatea de substanță eliberată din forma farmaceutică este proporțională cu radicalul timpului”, lege similară cu foarte cunoscuta lege a lui Higuchi, dar în condiții inițiale și pe frontieră deci, în condiții fenomenologice mult diferite, ceea ce înseamnă că este o altă lege, chiar dacă rezultatul este similar.
4. În cazul formulărilor studiate s-a considerat că se produce o acumulare a aspirinei și paracetamolului la nivelul mucoasei intestinale care se comportă ca un „rezervor” iar transferul spre circuitul sanguin se face prin difuzie prin epiteliu, care este pe postul interfeței din modelul considerat mai sus.
5. S-a testat legea reformulată pentru absorbția aspirinei și anume: „fracția absorbită este proporțională cu radicalul timpului”. De menționat este că legea se aplică numai la prima oră, când absorbția depășește eliminarea.
6. S-a testat legea reformulată pentru eliminarea din sânge ca rezervor spre urină a sumei aspirină + paracetamol și anume: „fracția eliminată este proporțională cu radicalul timpului”.
7. Legea ar putea fi generalizată la majoritatea substanțelor active cu cedare imediată și cu eliminare preponderent urinară.
8. În cazurile formulărilor gelice cu extract de alge marine, carbopol 971 și aciclovir, din studile de cedare la transferul prin membrane, s-a constatat că:
 - pentru cele două formulări, curbele de cedare nu diferă prea mult, nici calitativ și nici cantitativ. Ca model farmacocinetic de cedare, cantitatea cedată este proporțională cu radicalul timpului, după un time-lag mai mic de 30 minute. Ar putea fi cazul legii Higuchi sau legea radicalului dedusă mai sus, ca în cazul cedării dintr-un rezervor foarte mare.
 - o diferență semnificativă între cele două modele (modelul Higuchi și cel dezvoltat în teza) apare însă la condițiile inițiale și pe frontieră. Modelul Higuchi consideră că solventul de dizolvare pătrunde treptat în formulare și o „spală” de substanțe active strat cu strat, în timp ce modelul dezvoltat în teză presupune o concentrație constantă la suprafața de transfer.
 - Întrucât gelul de carbopol este un mediu hidrofil iar un transfer invers, de la compartimentul receptor al celulei spre cel donor este puțin probabil, modelul cel mai adecvat pare să fie modelul de difuzie din rezervor.
 - Time-lag-ul observat ar putea fi legat mai curând de o echilibrare între membrane și mediile din cele două compartimente.
 - Din evaluarea comparativă a profilului cinetic al hidrogelurilor testate pe baza valorilor coeficienților de difuziune, utilizând testul Tukey pentru comparații multiple, ($p < 0,05$) se constată că au semnificații statistice numai în șase situații din cele 29 posibile. Două prezintă chiar semnificație statistică remarcabilă.
9. Eliberarea controlată este impusă de necesitatea de a oferi agent terapeutic la locul acțiunii în intervalul terapeutic, adică între eficacitate și niveluri toxice. Situsul activ este, în general, necunoscut, dar este acceptat faptul că substanța bioactivă este transportată la receptor prin sânge.

BIBLIOGRAFIE

- Alekseyenko TV., Zhanayave SY., Venediktova AA., Kuznetsova TA., Besednova NN., Korolenko TA., Antitumor and antimetastatic activity of fucoidan, a sulfated polysaccharide isolated from the Okhotsk Sea *Fucus evanescens* brown alga, *Bull Exp Biol Med.*, 2007, Jun, 143 (6): 730-2
- Amidon GL, Lennernas H., Shah VP, Crison JR. 1995, A theoretical basis for a biopharmaceutics Drug Classification: The correlation of In vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 12: 413-420
- Aulton M.J., *Pharmaceutics. The science of dosage form design*, ELBS with Churchill Livingstone Edinburgh, Medical Division of Longman Group, 1988, 17-37, 381-411.
- Balboa E.M., Soto M.L., Nogueira D.R., Gonzalez-Lopez N., Conde E., Moure A., Vinardell M.P., Mitjans M., Dominguez H., Potential of antioxidant extracts produced by aqueous processing of renewable resources for the formulation of cosmetics, *Industrial Crops and Products*, 2014, Volume 58, Pages 104-110
- Benson H. A. E., Transdermal drug delivery: Penetration enhancement techniques, *Curr. Drug. Deliv.*, 2, 2005, pp. 23-33.
- Bologa A.S., Sava D., Progressive decline and present trend of Romanian Black Sea macroalgal flora, *Cercetari Marine v. 36*: 15-30, 2006.
- Bologa A.S., Sava D., Progressive decline and present trend of Romanian Black Sea macroalgal flora. *Recherches marines*, 2006, NIMRD Constanța, 36: 31– 60.
- Borundel C., *Internal Medicine Manual*, Editura All, București, pp. 511 – 552, 2002.
- Bruner L, Tolloczko S., U"ber die Auflo"sungsgeschwindigkeit Fester K"orper. *Z Phys Chem.* 1900;35:283–290.
- Brunner, E., 1904. *Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen*, *Z.Phys. Chem.* 43, 56-102.
- Chhabra R.P., *Non-newtonian flow in the process industries*, 1999, Fundamentals and Engineering Applications, Ed.

Butterworth-Heinemann, Pages 1-28, 37-72.

Chirilă P., *Medicină Naturistă*, Editura Medicală, București, (pp. 5, 12 – 13, 472 – 473), 1987.

Chou T.C., Anti-inflammatory and analgesic effects of paenol in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia, *British Journal of Pharmacology*, 2003, 1146-115

Courtois A., Simon-Colin C., Boisset C., Berthou C., Deslandes E., Guézennec J., Bordron A., Floridoside extracted from the red alga *Mastocarpus stellatus* is a potent activator of the classical complement pathway, *Mar Drugs*, 2008, Pages 407-417.

Dolz Planas M., Gonzáles Rodriguez F., Herráez Dominguez M., The influence of neutralizer concentration on the rheological behavior of a 0.1% carbopol hydrogel, *Pharmazie*, 1992, 47 (5), 351-355.

Evans L.C. *Partial Differential Equations*, Providence: American Mathematical Society, 1998.

Faassen F., Vromans H., 2004, Biowaiver for oral immediate-release products: implications of linear pharmacokinetics, *Clin. Pharmacokinetics*. 43, 1117-1126.

Farmacopeea Română (ediția X) – Editura Medicală, București 2000, (pag. 1035 – 1038, 1043 – 1046, 1053 – 1055, 1057 – 1058, 1063).

Farmacopeea Română, ediția a X a, Ed. Medicală, București, 2008.

Farmacopeea Română, ediția a X a, Supliment 2004, Ed. Medicală, București.

FDA. Guidance for Industry on Food-Effect Bioavailability and Fed Bioequivalence Studies; availability. FDA; 2002

FDA. Guidance for Industry, Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms based on a Biopharmaceutics Classification System. FDA/CDER; 2000.

Flynn G.L., Yalkowsky S.H., Roseman T.J., Mass transport phenomena and models: theoretical concepts, *J Pharm Sci*. 1974 Apr; 63(4), 479-510.

Food and Drug Administration (FDA) Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry. Modified Release Solid Oral Dosage Forms: Scale up and Post Approval Changes (SUPAC): Chemistry, Manufacturing and Controls, In Vitro Dissolution Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation. Rockville, MD:FDA; 1997.

Ghica M.V., Albu M.G., Popa L., Leca M., Brăzdaru L., Cotruț C., Trandafir V., Drug delivery systems based on collagentannic acid matrices, *Rev. Roumaine Chim.*, 54, 1103-1110, 2009.

Ghica M.V., Popa L., Moisescu Șt., Evaluation of the flow rheological properties of anti-inflammatory topical hydrogels, 5th International Conference of PhD Students Medical Science, Miskolc, Ungaria, 2005, 49-57.

Gould A.L., Discussion of individual bioequivalence by M.-L. Chen, *J Biopharm Stat* 1997 Mar;7(1):23-9.

Hassan S., Abd El-Twab S., Hetta M., Mahmoud B., Improvement of lipid profile and antioxidant of hypercholesterolemic albino rats by polysaccharides extracted from the green alga *Ulva lactuca* Linnaeus, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2011.

Hernan V., Sandra O.G., Elkin G., Alejandro M.M., Maria M., Juan B.L., Chemical compounds of antimutagenic fraction in ethanol extract from seaweed *Digenia simplex*, *Vitae* 15, 2008, Pages 141-149.

HIGUCHI T., Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices, *J Pharm Sci*. 1963 Dec; 52, 1145-1149.

Higuchi T., Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments, *J. Soc. Cosmet.Chem.*, 1960, 11, pp. 85-97.

Istudor V. – *Pharmacognosis, Phytochemistry, Phytotherapy* – Editura Medicală, București vol. I pag. 45 – 52, 105, 107, 110, 112 – 113, 118 – 127, 135 – 141, 145 – 156, 163 – 164, 170 – 175, 187 – 196, 212 – 220– 254, 280 – 286); 1998, vol. II, (pag. 2– 4, 97 – 99, 303), 2001.

Jaganath N., The Application of rheological techniques in the characterization of semisolids in the pharmaceutical industry, dissertation for magister scientiae in the Faculty of Health Sciences at the Nelson Mandela Metropolitan University, University of Port Elizabeth, 2004.

Jaulneau V., Lafitte C., Jacquet C., Fournier S., Salamagne S., Briand X., Esquerre-Tugaye M-T., Dumas B., Ulvan, a Sulfated Polysaccharide from Green Algae, Activates Plant Immunity through the Jasmonic Acid Signaling Pathway, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, Volume 2010.

Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart S., Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae, *Mar. Drugs*, 2011, Pages 196-223.

Jones D.S., Brown A.F., Woolfson A.D., Rheological characterization of bioadhesive antimicrobial, semisolid designed for the treatment of periodontal diseases; transient and dynamic viscoelastic and continuous shear analysis, *J. Pharm Sci.*, 2001, 90, (12), 1978-1989.

Khataee A.R., Dehghan G., Optimization of biological treatment of a dye solution by macroalgae *Cladophora* sp. using response surface methodology, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2011, 42, 26–33.

Lardy F., Vennat B., Pouget M.P., Pourrat A., Funcționalization of hydrocolloids principal component analysis applied to the study of correlations between parameters describing the consistency of hydrogels, *Drug Dev. Ind., Pharm.*, 2000, 26 (7), 715-721.

Leca M., *Chimia fizică a macromoleculilor*, Editura Universității București, 1998, 249-266.

Leca M., Trandafir V., Staicu T., Micuț M., Florescu S., Mechanism of interaction of non-denatured type I fibrillar collagen with surfactants, *Jorn. Com. Esp. Deterg.*, 2000, 30, pp.275-281.

Leucuța S., *Tehnologie farmaceutică industrială*, 2001, Rd. Dacia, Cluj-Napoca, pp. 513-530.

Macheras P., Dokoumetzidis A., On the Heterogeneity of Drug Dissolution and Release, *Pharmaceutical Research*, Volume 17, Number 2, February 2000, pp. 108-112(5).

Martin A., *Physical Pharmacy*, 4th ed., Lea&Febiger, Philadelphia, 1993.

Mattio L., Anderson R.J., Bolton J.J., A revision of the genus *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) in South Africa, *South African Journal of Botany*, 2015, Volume 95; Pages 95-107.

Meenakshi S., Manicka Gnanambigai D., Tamil Mozhi S., Arumugam M., Balasubramanian T., Total Flavanoid and in vitro Antioxidant Activity of Two Seaweeds of Rameshwaram Coast, *Global Journal of Pharmacology*, 2009, 3 (2): 59-62.

Miller I.J., Manufacture of and uses for low molecular weight agars and agaroids, United State Patent, 2001.

Mircioiu C., Perju A., Neagu A., Pharmacokinetics of progesterone in postmenopausal women: 1. Pharmacokinetics following intravaginal administration, *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 1998; 23(3): 391-396.

Mircioiu C., Voicu A.V., Ionescu M., Miron S.D., Radulescu S.F., Nicolescu C.A., Evaluation of in vitro absorption, decontamination and desorption of organophosphorous compounds from skin and synthetic membranes, *Toxicology Letters*, 2013; 219: 99- 106.

Negreanu-Pirjol B.S., Negreanu-Pirjol T., Paraschiv G., Bratu M., Sirbu R., Roncea F., Meghea A., Physical-chemical characterization of some green and red macrophyte algae from Romanian Black Sea littoral, *Scientific Study & Research-Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food industry*, 2011, 12 (2), pp.173-184.

OECD (2004a), Guidance document for the conduct of skin absorption studies No. 28.

Peterfi S., Ionescu Al., *Tratat de algologie*, 1976-1981, Vol. I-IV, Editura Didactică și Pedagogică, București.

Polyanin A.D., Zaitsev V.F. *Handbook of nonlinear partial differential equations*, Boca Raton: Chapman & Hall/CRC Press, 2004.

Popovici A., *Reologia formelor farmaceutice*, Editura Medicala, 1985 B,ucuresti.

Popovici I., Lupuleasa D., *Tehnică farmaceutică*, editura Polirom, București, 2009, vol II.

Potts R. O., Guy R. H., Predicting skin permeability, *Phar. Res.*, 1992, 9, pp. 663-669.

Qi H., Zhang Q., Zhao T., Chen R., Zhang H., Niu X., Li Z., Antioxidant activity of different sulphate context derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005, Volume 37, Issue 4, Pages 195-199.

Robic A., Bertrand D., Sassi J.F., Leray Y., Lahaye M., Determination of the chemical composition of ulvan, a cell wall polysaccharide from *Ulva* spp. (Ulvales, Chlorophyta) by FT-IR and chemometrics, *Journal of Applied Phycology*, 2009, Volume 21, Issue 4, Pages 451-456.

Rostami-Hodjegan A., Jackson P.R., Tucker G.T., Sensitivity of indirect metrics for assessing "rate" in bioequivalence studies--moving the "goalposts" or changing the "game", *J Pharm Sci* 1994 Nov;83(11):1554-7.

Roșoiu N., Șerban M., *Substanțe biologice active din organisme marine*, Ed. Academiei Române, 1992.

Rudraraju V.S., Wyandt C.M., Rheological characterization of microcrystalline cellulose sodium carboxymethyl cellulose hydrogels using a controlled stress rheometer: part I, *Int. J. Pharm.* 2005, 292, (1-2) 53-61.

Rupérez P., Mineral content of edible marine seaweeds, *Food Chemistry*, 2002, Volume 79, No.1, Pages 23-26

Schaeffer D.J., Krylov V.S., Anti-HIV Activity of Extracts and Compounds from Algae and Cyanobacteria, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, Volume 45, Issue 3, Pages 208-227

Schafer-Korting M., Mehnert W., Korting H-C., Lipid nanoparticles for improved topical application of drug for skin diseases, 2007, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59, pp. 427-443.

Shanmugam M., Mody K.H., Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents, *Current Science*, 2000, Volume 79, No. 12, Pages 1672-1683

Shawesh A., Kallioinen S., Hellen L, Antikainen O., Yliruuse J., Pluronic F-127 gels as a vehicle for topical formulation of indometacin and rheological behavior of these formulations, *Pharmazie*, 2002, 57 (3), 186-90.

Sintov A.C., Botner A., Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems:Influence of skin storage conditions on in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems, *Int. J.Pharm*, 2006, 311, pp. 55-62.

Sirbu R., Negreanu-Pirjol T., Paris S., Negreanu-Pirjol B.S., Jurja S., Tomescu A., Important bioactive compounds from marine algae – potential source of pharmaceutical industry, 14th International - SGEM Conference Proceedings, Bulgaria, 2014, I, pp. 381-388.

Sirbu R., Zaharia T., Bechir A. M., Liliș G., Nicolaev S., Roncea F., Important Characteristics of the Marine Environment of the Romanian Littoral Coast –Favourable for Pharmaceutical Utilisations, *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 2012, 13, No 3A, pp. 842–1855.

Skelly J. P., Amidon G. L., Barr W. H., Benet L. Z., Carter J. E., Robinson J. R., (1990). In Vitro and In Vivo testing and correlation for oral controlled/modified-release dosage forms. *Pharmaceutical Research*. 7(9), 975-982.

Smit A.J., Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review, *Journal of Applied Phycology*, 2004, 16: 245

Trail P.A., Bianchi A.B., Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer, *Curr. Opin. Immunol.*, 1999, 11(5), 584-8.

Tudose R.Z., Volintiru T., Asandei N., Lungu M., Merică E., și Ivan Gh., *Reologia compusilor macromoleculari*, Introducere în reologie, 1982, vol.1, Ed. Tehnică, Bucuresti.

Vecchia B. E., Bunge A. L., Skin absorption data bases and predictive equation. In *Transdermal drug delivery*, 2nd, Ed. Gui, R., Hadgraft J., Marcel Dekker, 2003, pp. 57-141.

Vidyashree Nandini V., Venkatesh Vijay K.,Chandrasekharan Nair K., Alginate impressions: A practical perspective, *J. Conserv. Dent.*, 2008, Pages 37-41.

Voicu V, Mircioiu C – Mecanisme farmacologice la interfete membranare. Interactiuni finite medicamente – interfete biologice, Ed. Academiei Romane, Bucuresti, 1994.

Voicu V.A., Mircioiu C., Jiquidi M., Gref R., Olteanu M., Studies concerning some effects of drugs, colloid vectors for drugs and decorporators on some physicochemical parameters of blood, in T. Sohns, V. Voicu (eds): *NBC Risks. Current Capabilities and Future Perspectives for Protection*, Kluwer Academic, Amsterdam, 1999, p. 311-330.

Zaharia T., Sirbu R., Nicolaev S., Micu D., The Inventory of the Marine Habitats on the Romanian Littoral with Significance in Marine Conservation and Exploitation, *OCEANS – IEEE Conference Proceedings*, 2007, 1-5, pp. 147-152.

Zhang Q., Yu P., Li Z., Zhang H., Xu Z., Li P., Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra*

haitanesis, Journal of Applied Phycology July, 2003, Volume 15, Issue 4, Pages 305-310.
Zwillinger D. Handbook of differential equations (3rd ed.), Boston: Academic Press, 1997.