

RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL
Proiect nr. PN-III-P1-1.1-TE-2019-1894, Contract nr. TE151/2020
Compuși de origine vegetală cu potențială utilizare în onicomicoze: strategii bazate pe sinergisme și nanoformulări (PLANTSYNAN)

Proiectul PLANTSYNAN a avut ca obiectiv general identificarea de compuși de origine vegetală capabili să potențeze activitatea antidermatofitică a antimicoticelor convenționale, urmată de încorporarea combinației sinergice într-un sistem terapeutic cu eventuală utilizare în tratamentul topic al onicomicozelor.

Activitățile proiectului au fost organizate în trei etape de cercetare, pentru fiecare etapă întocmindu-se un raport științific și tehnic pentru evaluarea progresului și gradului de atingere a obiectivelor propuse. Cele trei etape de cercetare sunt:

Etapa 1 - Caracterizarea fitochimică a materialului vegetal

Etapa 2 - Activitatea biologică a compușilor vegetali și identificarea unor combinații sinergice compus vegetal-antifungic convențional asupra *Trichophyton rubrum*

Etapa 3 - Dezvoltarea și caracterizarea unui sistem terapeutic cu încărcare duală (compus vegetal-antifungic convențional) cu potențială utilizare în tratamentul topic al onicomicozelor

Rezultatele realizate au fost grupate în patru componente majore: profilul chimic calitativ și cantitativ al materialului vegetal, activitatea biologică a compușilor vegetali (efecte antioxidante, antifungice, citotoxice) și efecte combinatoriale compus vegetal-antifungic convențional cu eficacitate antifungică asupra *Trichophyton rubrum*, obținerea și caracterizarea unei formulări cu încărcare duală compus vegetal-antifungic convențional (conform schemei de mai jos).

I. Profilul chimic calitativ și cantitativ al materialului vegetal
II. Activitatea biologică a compușilor vegetali <ul style="list-style-type: none">• Activitatea antioxidantă• Activitatea antifungică și mecanismul de acțiune specific• Acțiunea citotoxică
III. Efecte combinatoriale compus vegetal-antifungic convențional cu eficacitate antifungică asupra <i>Trichophyton rubrum</i> <ul style="list-style-type: none">• Mecanism de acțiune specific
IV. Obținerea și caracterizarea unui sistem terapeutic cu încărcare duală compus vegetal-antifungic convențional <ul style="list-style-type: none">• Dezvoltarea și optimizarea sistemului terapeutic• Caracteristicile morfo-structurale ale sistemului terapeutic• Acțiunea antifungică a sistemului terapeutic• Studii de eliberare și permeație a substanțelor active din sistemului terapeutic• Acțiunea citotoxică <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i> a sistemului terapeutic

Principalele rezultate obținute în urma implementării proiectului PLANTSYNAN

I. Profilul fitochimic calitativ și cantitativ al materialului vegetal

În această etapă materialul vegetal a fost achiziționat și caracterizat din punct de vedere calitativ și cantitativ, folosind tehnici cromatografice. Studiul fitochimic a permis identificarea și determinarea cantitativă a componentelor majore (marker). Astfel, extractele vegetale obținute și compușii marker ai acestora au fost utilizați în experimentele ulterioare.

II. Activitatea biologică a compușilor vegetali

Activitatea biologică a extractele vegetale și compușilor marker a fost evaluată prin teste care au vizat determinarea acțiunii antioxidante, antifungice și citotoxice. Probele au fost investigate prin prisma potențialului antioxidant, folosind trei metode *in vitro* (capacitatea de scavenger a radicalilor liberi DPPH și ABTS, capacitatea reducătoare). De asemenea, a fost testată susceptibilitatea tulpinilor de *Trichophyton rubrum* (tulpini de referință și izolate clinice) conform normelor EUCAST-AFST, fiind determinate

concentrațiile minime inhibitorii și concentrațiile minime fungicide ale probelor investigate. Mecanismul de acțiune antifungic a fost determinat prin evaluarea influenței asupra morfologiei *T. rubrum* și biosintezei ergosterolului. Citotoxicitatea probelor a fost evaluată *in vitro* pe linii de fibroblaști dermici pentru a stabili profilul de siguranță la administrare. Probele investigate au dovedit potențial antioxidant și antifungic semnificativ, fiind lipsite de toxicitate asupra liniilor de fibroblaști dermici.

III. Efecte combinatoriale compus vegetal-antifungic convențional cu eficacitate asupra *Trichophyton rubrum*

Studiul nostru a urmărit identificarea unor combinații sinergice între compușii de origine vegetală și antifungicele convenționale cu eficacitate asupra agentului etiologic major din onicomicoză, *Trichophyton rubrum*, în acest sens fiind utilizată metoda tablei de șah (*checkerboard*). Metoda timpului optim de contact (*time-kill*) a fost folosită pentru confirmarea sinergismului de acțiune a combinației identificate. Totodată, mecanismul de acțiune al combinației sinergice compus vegetal-terbinafină a fost determinat prin evaluarea modificărilor morfologice asupra *T. rubrum* și influența asupra sintezei ergosterolului. În concluzie, a fost identificată o combinație sinergică compus vegetal-antifungic convențional activă asupra tulpinilor de *T. rubrum*, care acționează prin inhibarea sintezei ergosterolului în celulele fungice, care ulterior a fost utilizată pentru realizarea unei forme farmaceutice cu potențială utilizare în tratamentul onicomicozelor.

IV. Dezvoltarea și caracterizarea unui sistem terapeutic cu încărcare duală (compus vegetal-antifungic convențional) cu potențială utilizare în tratamentul topic al onicomicozelor

Studiul a constatat în obținerea unui sistem terapeutic cu încărcare duală, care a fost caracterizat din punct de vedere morfo-tehnic, a permeației și eliberării substanțelor active. De asemenea, a fost evaluată activitatea antifungică a acestuia asupra *T. rubrum* (determinarea concentrației inhibitorii minime și a timpului optim de contact), citotoxicitatea prin teste *in vitro* (metoda MTT) și *in vivo* (metoda *Triticum aestivum*). Considerând eficacitatea antifungică, gradul ridicat de permeație prin patul unghial și remanența la acest nivel, sistemul terapeutic cu încărcare duală (compus vegetal-antifungic convențional) poate reprezenta o opțiune viabilă în tratamentul topic al onicomicozelor.

Principalul rezultat generat prin implementarea proiectului PLANTSYNAN îl constituie obținerea unui sistem terapeutic cu încărcare duală (compus vegetal-antifungic convențional), ce prezintă efecte antifungice semnificative și profil de siguranță acceptabil, cu potențială utilizare în tratamentul topic al onicomicozelor. Sistemul terapeutic dezvoltat în cadrul proiectului prezintă o serie de avantaje, și anume utilizarea unor doze mai mici de antifungic convențional, cu diminuarea riscului de efecte adverse și de dezvoltare a rezistenței fungice (o reală problemă la nivel global), precum și asigurarea permeației și remanenței unei concentrații eficiente de antifungic convențional în patul unghial.

Indicatori propuși în proiect privind diseminarea rezultatelor: 2 articole publicate în reviste cotate ISI, 4 comunicări științifice la congrese și conferințe naționale/internaționale.

Pe parcursul celor trei etape, diseminare pe scară largă a rezultatelor a fost prin realizată prin publicarea a **4 articole în reviste cotate ISI cu factor de impact**, precum prin participarea la conferințe naționale și internaționale, **cu 4 comunicări orale și 4 comunicări tip poster**. De asemenea, proiectul și rezultatele generate au fost diseminate prin intermediul site-ului web dedicat proiectului, ce a fost actualizat conform gradului de realizare a etapelor (**Link Site proiect:** <https://plantsynan.grant.umfiasi.ro/>).

Diseminarea rezultatelor:

4 Articole publicate în reviste cotate ISI:

1. Sebaaly C, Trifan A, Sieniawska E, Greige-Gerges H. Chitosan-Coating Effect on the Characteristics of Liposomes: A Focus on Bioactive Compounds and Essential Oils: A Review. **Processes** 2021, 9(3), 445; <https://doi.org/10.3390/pr9030445>. (FI = 2.847)
2. Trifan A, Bostănar AC, Luca SV, Temml V, Akram M, Herdlinger S, Kulinowski Ł, Skalicka-Woźniak K, Granica S, Czerwińska ME, Kruk A, Greige-Gerges H, Mareș M, Schuster D. Honokiol and Magnolol: Insights into Their Antidermatophytic Effects. **Plants (Basel)**. 2021, 10(11), 2522; <https://doi.org/10.3390/plants10112522>. (FI = 3.935)

3. Trifan A, Zengin G, Brebu M, Skalicka-Woźniak K, Luca SV. Phytochemical Characterization and Evaluation of the Antioxidant and Anti-Enzymatic Activity of Five Common Spices: Focus on Their Essential Oils and Spent Material Extractives. **Plants (Basel)**. 2021, 10(12), 2692. <https://doi.org/10.3390/plants10122692>. (FI = 3.935)

4. Trifan A, Czerwińska ME, Mardari C, Zengin G, Sinan KI, Korona-Głowniak I, Skalicka-Woźniak K, Luca SV. Exploring the *Artemisia* Genus: An Insight into the Phytochemical and Multi-Biological Potential of *A. campestris* subsp. *lednicensis* (Spreng.) Greuter & Raab-Straube. **Plants (Basel)**. 2022, 11, 2874. <https://doi.org/10.3390/plants11212874> (FI = 4.658)

8 Participări la conferințe naționale/internaționale:

1. Trifan A, Bostanaru AC, Luca SV, Jitoreanu A, Mares M. Antifungal Activity of Honokiol against Dermatophytes: Insights into Mechanism of Action and Combinatorial Effects with Terbinafine. Trends in Medical Mycology, 8-11 Octombrie 2021, Aberdeen, United Kingdom (**Prezentare tip Poster**). <https://timm2021.navus.io/presentation/84325>

2. Trifan A, Luca SV, Bostănaru AC, Brebu M, Skalicka-Woźniak K, Jitoreanu A, Granica S, Czerwińska ME, Kruk A, Mares M. Natural compounds as boosters of terbinafine activity against dermatophytes. 5th International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food, 25 August- 1 Septembrie 2021, Nanchang, China (**Prezentare orală**). https://1913e438-571f-4a3e-b128-e99f446ca80b.filesusr.com/ugd/0d5b9b_83cb97c4865f4b07bb854b91b3e8c840.pdf; https://1913e438-571f-4a3e-b128-e99f446ca80b.filesusr.com/ugd/0d5b9b_d04e8867d5f546b39080446eb7fd536e.pdf

3. Trifan A, Bostănaru AC, Jitoreanu A, Ștefanache CP, Mareș M. Essential Oils: Boosters of Conventional Antifungals Activity Against Dermatophytes. Alternative And Complementary Therapies (Homeopathy/Phytotherapy), 4th edition, 26-27 March 2021, Constanta, Romania (**Prezentare tip Poster**).

4. Trifan A. Plant metabolites: boosters of terbinafine activity against dermatophytes. 5th Alumni-Symposium: Traditional knowledge and medicinal plants in the „Omics“ era – will defined standards (good/best practices) provide harmonization of scientific practice and lead to high quality standards of the publication practice? 29 August – 2 Septembrie 2021, Dresden, Germania (**Prezentare Orală**).

5. Trifan A, Luca SV, Bostănaru AC, Mareș M, Korona-Głowniak I, Skaliska-Woźniak K, Temml V, Schuster D, Greige-Gerges H. Natural compounds in dermatophytosis: the case of honokiol and magnolol. 6th International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food, 5-12 August 2022, Hangzhou, China (**Prezentare Orală – Invited Lecture**). https://2112fff9-f820-4802-8510-1a4efaac695e.filesusr.com/ugd/0d5b9b_e2c2a0156e4547408acc5f8818ba67d7.pdf

6. Trifan A, Bostănaru AC, Luca SV, Skaliska-Woźniak K, Czerwińska ME, Granica S, Mareș M. Natural products against dermatophytes: boosters of terbinafine activity and anti-inflammatory effectors. Phytochemical Society of Europe Meeting, 19-22 Septembrie 2022 (**Prezentare Orală – Invited Lecture**). https://psemeetingiasi2022.eu/wp-content/uploads/2022/09/PSE-Meeting_program.pdf

7. Jitoreanu A, Luca SV, Bostănaru AC, Mareș M, Czerwińska ME, Ochiuz L, Iurciuc (Tincu) CE, Ștefanache C, Cioancă O, Trifan A. Natural products in dermatophytosis: The case of honokiol and magnolol. Phytochemical Society of Europe Meeting, 19-22 Septembrie 2022 (**Prezentare tip Poster**). https://psemeetingiasi2022.eu/wp-content/uploads/2022/09/PSE-Meeting_program.pdf

8. Trifan A, Jitoreanu A, Bostănaru AC, Luca SV, Ochiuz L, Iurciuc (Tincu) CE, Ștefanache C, Mareș M. Natural products in dermatophytosis. Simpozionul cu participare internațională terapii alternative și complementare (homeopatie/fitoterapie), 28-29 Octombrie 2022, Constanța, România (**Prezentare Orală**).