

Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului  
“Regele Mihai I al României” din Timișoara



Facultatea de Agricultură

**GURIȚĂ (CIOBOTARU) M. VALENTINA GABRIELA**

# **Rezumat**

# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**EXTRACTE OBTINUTE DIN PLANTE MEDICINALE: STUDIUL**  
**EFFECTELOR *IN VITRO* ȘI *IN VIVO***

**Conducători Științifici**

**PROF. UNIV. DR. POP GEORGETA**

**PROF. UNIV. DR. DUMITRAȘCU VICTOR**

**Timișoara**

**2019**

## INTRODUCERE

**Motivația alegerii temei de cercetare.** Plantele medicinale și soluțiile extractive obținute din acestea, se utilizează în profilaxia sau tratamentul diferitelor patologii, încă din vremuri străvechi. Există numeroase resurse de origine naturală pentru uz medicinal, multe dintre acestea, nefiind încă exploatare pentru o posibilă aplicabilitate în industria medicală. Plantele reprezintă o sursă promițătoare pentru noi terapii datorită accesibilității și abundenței acestora. Uleiurile esențiale se întâlnesc într-un număr limitat de specii și posedă diferite activități biologice. Multe specii din familia *Lamiaceae* sunt raportate ca având uleiuri esențiale în componență și sunt studiate pentru efecte precum: acțiune antiinflamatoare, antioxidantă, antitumorală, sedativă, imunomodulatoare etc.

**Importanța și actualitatea temei.** Aspectele prezentate anterior, evidențiază faptul că, studiile cu privire la variabilitatea speciilor, sunt necesare și de actualitate pentru prezentarea cât mai amplă, a unor plante medicinale mai puțin studiate sau a unor uleiuri esențiale. În această lucrare sunt prezentate și efecte ale unor specii spontane, recoltate din România, mai puțin studiate, oferind astfel informații valoroase despre potențialul medicinal al florei. Se remarcă în ultimii ani o pondere tot mai mare a cercetărilor referitoare la compoziția chimică și efectele terapeutice ale uleiurilor esențiale, în special la plantele medicinale cultivate. Ca urmare, uleiurile esențiale prezentate în această lucrare sunt caracterizate atât din punctul de vedere al compoziției chimice cât și al proprietăților biologice. Mai mult, au fost prezentate și relațiile plantelor cultivate testate, cu factorii de vegetație și tehnologia de cultivare a acestora, cu impact direct asupra conținutului de principii active.

**Prezentarea pe scurt a conținutului.** Această lucrare este structurată în două părți.

În *prima parte* a tezei sunt prezentate date preluate din literatura de specialitate cu privire la variabilitatea speciilor cultivate și spontane studiate, compoziția chimică a uleiurilor esențiale, efectele terapeutice, particularitățile biologice, relațiile cu factorii de vegetație și tehnologia de cultivare.

În *partea a doua* sunt prezentate cercetările proprii cu referire la plantele medicinale aparținând familiei *Lamiaceae*, cultivate în condițiile pedoclimatice de la Stațiunea Didactică Experimentală a USAMVBT, urmând elementele din tehnologie, de la semănat până la recoltare. În laboratorul din cadrul disciplinei de Plante medicinale și aromatice, s-a realizat atât condiționarea materialului vegetal cât și extracția, analiza calitativă și cantitativă a uleiului esențial. În ceea ce privește uleiurile esențiale obținute din cultură, au fost analizate sub aspectul compoziției chimice și al efectelor biologice: capacitatea antioxidantă, activitatea citotoxică și antimigratoare, proprietățile antimicrobiene, efectul antiangiogenic și toxicologic.

De asemena, sunt abordate și aspecte privind rezultatele analizelor realizate la plantele medicinale spontane, recoltate din partea de vest a țării (Județul Caraș-Severin). Pentru toate speciile recoltate din zona de vest, au fost obținute soluții extractive hidroalcoolice determinându-se și activitatea antioxidantă.

**Gradul de încadrare a temei în preocupările internaționale, naționale, regionale, ale colectivului de cercetare.** În literatura de specialitate sunt prezentate speciile studiate, dar acestea sunt recoltate din alte zone ale Europei sau Asiei. În ultimii ani, un număr crescut de persoane au utilizat uleiuri esențiale pentru ameliorarea sau tratarea diferitelor afecțiuni. Acest fapt este susținut și de numărul în creștere al studiilor cu privire la compoziția chimică și proprietățile biologice ale uleiurilor esențiale.

Compușii naturali bioactivi, sunt studiați intens pentru evaluarea efectelor lor asupra sănătății. Utilizarea compușilor pe bază de plante fără efecte secundare nocive, pe piața UE a fost reglementată de către Parlamentului European prin Legea nr. 1107/2009. Compușii derivați din plante medicinale se dovedesc a fi o sursă inestimabilă de terapii, reprezentând alternative atractive și în cazul diferitelor afecțiuni.

**Obiectivele științifice propuse pentru rezolvare în cadrul cercetării științifice.**

**Scopul** cercetărilor a fost evaluarea potențialului terapeutic al unor specii medicinale cultivate în Stațiunea Didactică Experimentală a USAMVBT, precum și identificarea unor specii de interes medicinal, mai puțin cunoscute, întâlnite în flora spontană.

**Obiectivele** cercetării au urmat două direcții.

Principalul obiectiv a vizat studiul efectelor *in vitro* și *in vivo* a extractelor vegetale din plante medicinale (capacitate antioxidantă, proprietăți antibacteriene și antifungice, efecte citotoxice și antimigratoare, efecte antiangiogenice și evaluare toxicologică).

[Type text]

Un alt obiectiv important a urmărit identificarea de noi resurse fitofarmaceutice în flora spontană din zona de vest, areal caracterizat printr-o biodiversitate floristică remarcabilă.

**Comentarii sintetice privind noutatea/gradul de inovare a metodei/metodologiei de cercetare.** Noutatea studiilor constă în: (I) investigarea unor specii din flora spontană a României pentru determinarea activității antioxidante, (II) obținerea uleiurilor esențiale din culturi medicinale obținute în câmpul experimental propriu, (III) determinarea compoziției chimice a uleiurilor esențiale și efectuarea unui număr mare de determinări pentru stabilirea potențialului bioactiv, (IV) încorporarea extractelor vegetale în hidroxipropil-gama-ciclodextrine în vederea evaluării toxicologice la nivel cutanat.

## B. CONȚINUTUL TEZEI DE DOCTORAT

### I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIUL VARIABILITĂȚII SPECILOR STUDIAȚE

#### Capitolul 1. Aspecte generale privind plantele medicinale studiate pentru obținerea uleiurilor esențiale

##### 1.1. *Lavandula angustifolia* Mill. – LAVANDA & *Lavandula hybrida* Balb. ex Ging – LAVANDINUL

Lavanda se cultivă pentru inflorescențe (*Lavandulae flos*, *Lavandulae angustifoliae flos*, *Flores Spicae*), utilizate în stare proaspătă sau uscată, iar de la lavandin se folosesc inflorescențele proaspete (*Lavandulae hybridae flos*). Componentul principal al uleiului volatil din florile de lavandă este linaloolul, liber sau esterificat (mai ales ca acetat). Se utilizează pentru efectul sedativ la nivelul sistemului nervos central, antiseptic-cicatrizant, carminativ, coleretic-cologog. Are cerințe deosebite față de căldură, plantele tinere rezistă la înghețuri târzii de -8, -10°C, cele mature rezistă până la -15°C în iernile fără zăpadă și până la -30°C sub strat de zăpadă permanent. Este rezistentă la secetă, necesitând totuși suficientă umiditate la răsărire și în perioada până la formarea tufelor. Din anul al doilea de cultură se recoltează inflorescențele, în zile însorite, după ce s-a ridicat roua, prin tăiere cu secera sau cu aparate de tuns (cu 10 cm de tijă, sub ultimul verticil), se așează în coșuri (fără să se îndese) și se transportă la locul de uscare sau distilare. Lavandinul este cu 10-15 zile mai tardiv decât lavanda, putându-se prelungi perioada de utilizare a instalațiilor de prelucrare (distilare).

##### 1.2. *Mentha x piperita* L. și *Mentha smithiana* L. – MENTA

Materia primă vegetală constă în *Herba Menthae piperitae*, *Folia Menthae piperitae*. Principalii componenți ai uleiului volatil sunt: mentolul (45-70%) mentonă (8-24%) și mentofuranul. La *Mentha crispa* conținutul de ulei volatil al herbei proaspete este 0,15-0,45% iar principalul component este carvona. Este stimulent al funcției digestive, antiseptic, antidiareic, antivomitiv, se folosește în dischinezie, balonări, litiază biliară, afecțiunii renale, astenii, urticare etc. Uleiul volatil se folosește în industria pastelor de dinți, a medicamentelor, băuturilor răcoritoare, licheorurilor, bomboanelor, etc. Menta este o plantă care rezistă în perioada repausului relativ până la -10°C, iar dacă solul este acoperit cu zăpadă, chiar și la -25°C. Totuși, cele mai bune recolte și cu cel mai ridicat conținut de ulei volatil se realizează în lunile călduroase. Necesită umiditate potrivită în toată perioada de vegetație. Umiditatea atmosferică ridicată favorizează atacul de boli. În funcție de destinația producției, se recoltează herba (cosire în faza de înflorit 50 - 75% a plantelor), respectiv frunzele, când au 5 - 6 cm lungime (în mai multe etape, primele două cu mâna, iar a treia prin uscarea plantelor cosite la începutul înfloririi), pe timp însorit, călduros, între orele 10 - 14.

##### 1.3. *Majorana hortensis* MUNCH (SIN. *Origanum majorana* L.) – MĂGHIRANUL

Materia primă vegetală constă în *Herba Majoranae*. Planta proaspătă conține 0,3-0,9 % ulei volatil pe când în produsul uscat cantitatea de ulei volatil poate ajunge până la 3-3,5 %. Are acțiune bactericidă, antiseptică, antimicrobiană, antispasmodică, diuretică, tonică și imunostimulantă. Uleiul volatil se utilizează în industria parfumurilor. La fel ca și *Origanum vulgare* L., *Origanum majorana* L. este o specie cu temperament de lumină, puțin pretențioasă față de sol și umiditate. Este rezistentă atât la temperaturi scăzute în timpul iernii cât și la călduri extreme. În primul an de vegetație necesită o cantitate mai mare de apă până la dezvoltarea rădăcinilor. Se recoltează în timpul înfloririi (iunie-august) prin tăiere cu o foarfecă specială sub locul de ramificare, cuprinzând ramuri, cu frunze și inflorescențe.

##### 1.4. *Rosmarinus officinalis* L. – ROZMARIN

[Type text]

Materia primă vegetală constă în *Rosmarini Folium* (frunze) sau *Rosmarini Herba* (partea aeriană). Conținutul în ulei volatil diferă în funcție de organul plantei, fiind în herba proaspătă și frunze 0,22-1,2%, în cele uscate 1-2%, iar în flori cca 1,4%. Planta mai conține: acid rosmarinic; flavonoide; acidul carnosic, o diterpenoidă derivat al feruginolului (care imprimă acțiunea antioxidantă a frunzelor); rosmarinic acid; izorosmarinic acid; o serie de triterpene; tanin; vitamine, etc. Frunzele de rozmarin sunt folosite în boli de stomac și intestin, stimulent aromatic, diuretic, vermifug, condiment, etc. Extern se utilizează ca parazitocid (îndepărtarea moliiilor), în obținerea spiritului camforat, ca analgezic în dureri reumatice și nevralgii. Azi este confirmată acțiunea colagogă-coleretică, stimulent aromatic, bacteriostatic, având însă utilizări terapeutice mai reduse. Plantă de origine mediteraneană, rozmarinul are cerințe foarte ridicate față de căldură. Este plantă perenă însă nu suportă iernarea decât în condițiile în care temperatura nu scade sub -2°C, -3°C, protejată de zăpadă și de un strat de mulci. Planta are pretenții și față de lumină. Față de umiditate nu are cerințe ridicate, suportând bine și perioadele secetoase. Recoltarea începe în anul III de cultură, tăindu-se (cu secera sau foarfeca de vie) vârfulurile florale, când plantele sunt în plină floare. Anual se fac două recoltări. Imediat după recoltare produsul vegetal se transportă la stațiile de distilare, pentru extragerea uleiului. Livrarea materialului vegetal se face în stare proaspătă.

#### 1.5. *Salvia officinalis* L. – JALEȘUL

Materia primă vegetală constă în *Folia Salviae* (frunze) sau *Herba Salviae* (partea aeriană). Conținutul de ulei volatil în frunzele proaspete este de cca. 0,38 %, iar în frunzele uscate, variază între 1 - 2,5 %. Componentul principal al uleiului volatil de salvie este tuiona (tuiona, salvinol, absintol), ce ajunge până la 50 % din total. Frunzele mai au în componență: taninuri, acid rosmarinic (acid labiatic), picrosalvină (carnosol) cca. 1,8 %, flavone (1 - 3 %), steroli, vitamine etc. Uleiul volatil și celelalte componente din frunzele de salvie au efect coleretic, carminativ, antispastic, ușor hipoglicemiant, astringent și acțiune antisudorifică pronunțată. *Salvia* are utilizări în afecțiuni bucale (gingivite, stomatite), ca stimulent în tulburări digestive, antisudorific, în afecțiunile căilor respiratorii superioare, în disfuncții ovariene, ca anti-diareic. *Salvia* este o plantă de origine sudică, având cerințe ridicate față de temperatură. Plantele pier în zonele cu ierni aspre și zăpadă puțină. La germinație are nevoie de cca 10°C. În timpul vegetației pretinde căldură multă; din anul doi de vegetație plantele suportă bine seceta. Culturile bine întreținute pot da o recoltă (în septembrie) încă din primul an. Din anul doi de vegetație, se obțin 2 - 4 recolte de frunze anual. Recoltarea frunzelor se face cu manual. Se începe recoltarea în prima parte a lunii iunie, înaintea înfloririi, când frunzele au ajuns la maturitate tehnică, până în septembrie.

#### 1.6. *Salvia sclarea* L. – ȘERLAIUL

Materia primă vegetală constă în *Herba Salviae sclareae*. Florile conțin ulei volatil (0,1-0,3%) al cărui component principal este acetatul de linalil (50-70%) și linalol, o diterpenă caracteristică (sclareolul), substanțe amare, pigmenți fenolici și chinoidici, derivați triterpenici, zaharuri, săruri minerale. Din inflorescențe prin distilare, uleiul volatil este folosit la fabricarea parfumurilor și aromatizarea lichiorurilor, berii, vinurilor. Fiind o plantă termofilă, creșterea cea mai intensă se realizează la temperaturi medii zilnice de 20-25°C. Are pretenții, lipsa umidității determină reducerea stadiului de lumină, din care cauză un număr de plante nu înfloresc în primul an de cultură. Inflorescențele se recoltează la sfârșitul înfloririi (când semințele din primele 2 - 3 verticele bazale încep să se coloreze în brun), pe timp frumos, tăindu-le deasupra ultimei perechi de frunze, cu secera, foarfecele de vie sau mecanic cu cositori, apoi se transportă imediat la locul de distilare.

#### 1.7. *Satureja montana* L. – CIMBRUL DE MUNTE

Materia primă vegetală constă în *Herba Thymi*. Se folosește herba uscată ce conține circa 0,3%- 0,5% ulei volatil ( $\alpha$  și  $\beta$ - pinen,  $\alpha$ -tuien, sabinen, mircen,  $\gamma$ -terpinen, limonen, p-cimen, terpinolen,  $\beta$ -felandren, cis și trans-ocimen,  $\beta$ -cariofilen, bisabolen,  $\gamma$ -cadinen, cis și trans-4-tuianol, linalool, camforă, borneol, geraniol, carvonă, alcool cuminic, timol, carvacrol). Are acțiune bactericidă, antiseptică, antimicrobiană, antispasmodică, diuretică, antiinflamator intestinal, antispastic bronhic, tonic și imunostimulantă. Cimbrul de munte nu este foarte pretențios, dar preferă să se dezvolte într-un sol cu conținut scăzut de calciu și un loc cald și însorit. Se începe recoltarea în luna iulie în cazul culturilor cu o vârstă de minim un an, în momentul înfloririi a 50 % din plante. Lăstarii se recoltează prin tăiere (manual sau mecanizat) la 15 cm de sol. Seminceriile se recoltează din anul doi de vegetație, când începe uscarea caliciului florilor de pe ramurile inferioare, iar o parte din semințe au culoarea închisă. Dacă se întârzie există pericolul scuturării semințelor.

[Type text]

#### 1.8. *Thymus vulgaris* L. – CIMBRUL DE CULTURĂ

Materia primă vegetală constă în *Herba Thymi*. Herba uscată conține 1-2,5% ulei volatil format din timol (20-45%) și în cantități mai mici carvacrol, cimen, pinen. Mai conține tanin, substanțe flavonoide, principii amare, etc. Se utilizează datorită proprietăților bactericide, antiseptice, antifungice, antimicrobiene, astringente, antispasmodice, diuretice, tonice și imunostimulante. De asemenea, este un energizant natural, îmbunătățește memoria și ajută la menținerea unui tonus ridicat al organismului. Cimbrul de cultură este în general rezistent la secetă, dar în perioada de răsărire are nevoie de multă apă. Cimbrul crește pe aproape orice tip de sol, nu este pretențios dar pentru o productivitate cât mai bună, se cultivă pe soluri fertile, bogate în calciu, permeabile. Prima înflorire a plantelor ce depășesc un an de la plantare este în luna mai când se începe și recoltarea, în momentul înfloririi a 50 % din plante. Lăstarii se recoltează prin tăiere (manual sau mecanizat) la 15 cm de sol. Seminceriile se recoltează din anul doi de vegetație, când începe uscarea caliciului florilor de pe ramurile inferioare, iar o parte din semințe au culoarea închisă. Dacă se întârzie există pericolul scuturării semințelor.

#### 1.9. *Thymus serpyllum* L. – CIMBRIȘOR

Materia primă vegetală constă în *Herba Serpylli*. Uleiul volatil - Oleum Serpylli conține mult cimol, 1-5% timol, carvacrol (70%), borneol, linalool, terpineol, geraniol, pinen, p-cimen, cineol. Produsul vegetal mai conține un principiu amar, serpilină, acid ursolic și oleanolic, acid cafeic și rozmarinic, tanin, flavone, formate din glicozide ale apigenolului, luteolului, diosmetolului și scutelarolului, antociani și rezine. Are acțiune bactericidă, antiseptică, antimicrobiană, antispasmodică, diuretică, tonică și imunostimulantă. Uleiul volatil are efect antibacterian, antifungic, cicatrizant slab, rubefiant, stimulează circulația și este un bun echilibrant al tenului gras, reglând secreția de sebum. La fel ca și *Thymus vulgaris* L., *Thymus serpyllum* L. este o specie cu cerințe deosebite față de căldură și de lumină. Cimbrișorul este în general rezistent la secetă, dar în perioada de răsărire are nevoie de multă apă. Se începe recoltarea în luna mai, în momentul înfloririi a 50 % din plante. Lăstarii se recoltează prin tăiere (manual sau mecanizat) la 15 cm de sol. Seminceriile se recoltează din anul doi de vegetație, când începe uscarea caliciului florilor de pe ramurile inferioare, iar o parte din semințe au culoarea închisă. Dacă se întârzie există pericolul scuturării semințelor.

## Capitolul 2. Stadiul aspecte generale privind plantele medicinale spontane studiate pentru obținerea soluțiilor extractive etanolice

### 2.1. Familia *Rosaceae*

Din cadrul acestei familii sunt prezentate speciile *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim – crețușcă (materia primă vegetală constă în *Ulmariae herba*, *Ulmariae flos* și *Ulmariae radix*); *Filipendula vulgaris* Moench (*F. hexapetala* Gilib.) – aglică (materia primă vegetală constă în *Filipendulae flos*); *Potentilla recta* L. – buruiiană de cinci degete (materia primă vegetală constă în *Potentillae rectae herba*); *Agrimonia eupatoria* L. – turiță mare (materia primă vegetală constă în *Agrimoniae herba*).

### 2.2. Familia *Lamiaceae* (*Labiatae*)

Din cadrul acestei familii sunt prezentate speciile *Thymus sp.* – cimbru, cimbișor (materia primă vegetală constă în *herba*); *Stachys officinalis* L. (syn. *Betonica officinalis* L.) – vindecea (materia primă vegetală constă în *Stachysi herba*); *Stachys germanica* L. – jaleș, pavăză (materia primă vegetală constă în *herba*).

În teza au fost analizate următoarele specii spontane de *Thymus sp.*: *Thymus pulegioides*, *Thymus pannonicus* și *Thymus glabrescens*. Uleiul volatil are compoziție diferită în funcție de specie (compusul principal este carvacrolul pentru *T. pulegioides*, geraniolul pentru *T. glabrescens*, geraniolul și neralul pentru *Th. pannonicus*).

### 2.3. Familia *Hypericaceae* (*Guttiferae*, *Clusiaceae*)

Din cadrul acestei familii este prezentată specia *Hypericum perforatum* L. - pojarniță, sunătoare (materia primă vegetală constă în *Hyperici herba*). Specia are în compoziție ulei volatil, hipericină, taninuri, flavonozide (rutozidă).

### 2.4. Familia *Asteraceae* (*Compositae*)

Din cadrul acestei familii sunt prezentate speciile *Achillea millefolium* L. – coada șoricelului (materia primă vegetală constă în *Millefolli herba* și *Millefolli flos*); *Carthamus lanatus* L. – pintenoagă (materia primă vegetală constă în *flos* și *herba*); *Telekia speciosa* (Schreb.) Baumg. - lăptucul oii (materia primă vegetală constă în *herba*).

[Type text]

## II. CERCETĂRI PROPRII

### Capitolul 3. Analiza unor specii vegetale medicinale spontane recoltate din zona de vest a României

Scopul acestui studiu este obținerea unor extracte etanolice din diferite produse vegetale recoltate din zona de vest a țării. Obiectivele studiului au constat în recoltarea speciilor vegetale medicinale, obținerea soluțiilor extractive etanolice și utilizarea acestora pentru determinarea unor activități biologice.

Plantele au fost recoltate în timpul perioadei de înflorire la prânz, în anul 2016, din diferite localități din zona de vest a țării. Materialul proaspăt a fost procesat în aceeași zi. S-au introdus în recipiente de sticlă închisă la culoare peste care s-a adăugat soluția hidroalcoolică. La 5 g de material am folosit 50 ml de soluție. Soluția hidroalcoolică s-a preparat astfel: la 45 ml alcool etilic 96% s-au adăugat 55 ml H<sub>2</sub>O distilată. Probele astfel obținute, s-au lăsat la întuneric 14 zile după care s-au decantat, prin hartie de filtru, s-au trecut în recipiente de sticlă și s-au depozitat la rece

### Capitolul 4. Analiza unor uleiuri esențiale din plante medicinale cultivate aparținând familiei *Lamiaceae*

Scopul acestui studiu este obținerea unor uleiuri volatile din diferite specii medicinale cultivate aparținând familiei *Lamiaceae*. Obiectivele studiului au constat în: recoltarea plantelor medicinale cultivate, analiza condițiilor pedoclimatice, obținerea uleiurilor esențiale și determinarea compoziției chimice prin metoda GC-MS.

Plantele au fost recoltate în timpul perioadei de înflorire, la prânz, în perioada 2013-2016 din diferite localități din România și Spania. Materialul proaspăt sau uscat a fost procesat în aceeași zi. Uleiurile esențiale au fost obținute prin extracția Soxhlet și apoi au fost determinate componentele uleiurilor utilizând un aparat de cromatografie în fază gazoasă cuplat cu spectrometru de masă triplu cvadrupol. De asemenea, s-a determinat greutatea de herba proaspătă, greutatea de herba uscată și randamentul de uscare a speciilor vegetale medicinale cultivate. Tot în cadrul acestui studiu a fost determinată cantitatea de ulei volatil obținută. La finalul studiului au fost prezentate și condițiile pedoclimatice (temperatura și nivelul precipitațiilor) din anii 2014, 2015, 2016.

### Capitolul 5. Evaluarea activității antioxidante prin metoda DPPH

Studiul 5 are drept scop evaluarea activității antioxidante (AAO) a unor extracte etanolice, respectiv a 14 uleiuri esențiale. Pentru realizarea acestui scop au fost stabilite următoarele obiective: utilizarea extractelor etanolice obținute din specii medicinale din zona de Vest a României, utilizarea uleiurilor esențiale obținute din specii medicinale aparținând familiei *Lamiaceae*, realizarea analizei în vederea determinării activității antioxidante, utilizarea unei soluții de acid ascorbic ca etalon pozitiv pentru activitatea antioxidantă.

Au fost utilizate cele 21 de extracte etanolice și cele 14 uleiuri esențiale. AAO a fost evaluată prin metoda DPPH (s-a folosit o soluție de concentrație 1 mM în alcool etilic 96% (v/v), soluție utilizată drept antioxidant standard). Rezultatele obținute au fost comparate cu o soluție de acid ascorbic de concentrație 2 mM în etanol 96% folosită ca etalon. Rezultatele obținute au indicat că atât soluțiile extractive etanolice cât și uleiurile esențiale au o AAO semnificativă, multe probe având valori apropiate de cele ale acidului ascorbic.

### Capitolul 6. Analiza proprietăților antimicrobiene ale uleiurilor esențiale obținute din specii vegetale medicinale cultivate aparținând familiei *Lamiaceae*

Scopul acestui studiu constă în determinarea activității antimicrobiene a uleiurilor volatile obținute din specii provenind din familia *Lamiaceae*. Pentru realizarea acestui scop au fost stabilite următoarele obiective: cultivarea tulpinilor microbiene în plăci de cultură, evaluarea diametrelor zonelor de inhibiție obținute după aplicarea uleiurilor esențiale, utilizarea gentamicinei și respectiv a fluconazolului ca substanțe de referință, determinarea concentrației minime inhibitorii după aplicarea uleiurilor esențiale, determinarea concentrației minime bactericide după aplicarea uleiurilor esențiale.

Au fost utilizate cele 14 uleiuri esențiale obținute din specii aparținând familiei *Lamiaceae*. Activitatea antimicrobiană a fost testată pe șapte tulpini bacteriene (*Salmonella enterica* serotip *typhimurium*, *Shigella flexneri* serotip *2b*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*,

[Type text]

*Staphylococcus aureus*) și pe două tipuri de *Candida* (*Candida albicans* și *Candida parapsilosis*). Stabilirea activității antibacteriene s-a realizat atât prin metoda difuzimetrică pe subcultură standardizată, cât și prin metoda diluțiilor cu determinarea CMI (concentrației minime inhibitorii) și CMB (concentrației minime bactericide). Pentru fiecare ulei a fost utilizată o placă pe care s-a depus microcomprimatul cu uleiul și 2 microcomprimate martor. Martorul pozitiv a constatat dintr-un microcomprimat de Gentamicina de 10 μg și respectiv de 120 μg pentru tulpina de *Enterococcus faecalis*. Pentru tulpinile de *Candida* martorul pozitiv a fost reprezentat de un microcomprimat de Fluconazol 10 μg. Uleiurile la care am obținut un diametru al zonei de inhibiție mai mare de 15 mm au fost considerate ca având activitate antibacteriană și testate în continuare prin metoda diluțiilor.

### **Capitolul 7. Evaluarea activităților citotoxice și antimigratorii ale uleiurilor esențiale obținute din specii vegetale medicinale aparținând familiei *Lamiaceae***

Prezentul studiu are drept obiectiv determinarea activității citotoxice și antimigratoare a uleiurilor volatile obținute din specii din familia *Lamiaceae*. În acest scop, uleiurile volatile au fost testate pe două linii celulare de melanom (A375 - uman și B164A5 - murinic) și pe o linie sănătoasă de keratinocite (HaCaT). Pentru realizarea acestui scop au fost stabilite următoarele obiective: cultivare liniilor celulare în plăci de cultură specific, realizarea analizei MTT în vederea determinării viabilității celulare ulterior stimulării cu uleiurile esențiale, realizarea analizei Scratch în vederea determinării efectului antimigrator al uleiurilor esențiale, realizarea analizei statistice utilizând One-way ANOVA.

Pentru determinarea viabilității celulare ulterior stimulării cu uleiurile esențiale (două concentrații -50 și 150 μg/ml; timp de incubare de 24 ore cu celulele) s-a utilizat metoda MTT. Soluția de dimetilsulfoxid (DMSO) a fost utilizată pentru prepararea soluțiilor stoc din probele testate. Metoda Scratch a pus în evidență capacitatea antimigratorie a uleiurilor esențiale la nivelul liniilor tumorale (A375 și B164A5), respectiv la nivelul celei non-tumorale (HaCaT). Celulele au fost apoi stimulate cu cea mai mică concentrație a probelor (50 μg/ml). Imaginile celulelor în cultură au fost efectuate la începutul experimentului (0 ore după stimulare) și la 12 și 24 de ore utilizând microscopul inversat Olympus IX73. În ceea ce privește viabilitatea celulară, uleiurile esențiale au produs un efect citotoxic dependent de doză, cea mai mare reducere a viabilității fiind înregistrată la doza mare testată (150 μg/ml). Unele uleiuri esențiale au indus și o reducere a capacității de migrare a celulelor tumorale.

### **Capitolul 8. Determinarea efectelor antiangiogenice ale uleiurilor esențiale obținute din specii vegetale medicinale aparținând familiei *Lamiaceae***

Studiul de față are drept scop evaluarea efectului antiangiogenic al unor uleiuri volatile obținute din specii din familia *Lamiaceae*. În acest scop, 6 uleiurile volatile au fost testate pe membrana corioalantoidă inoculată cu celule de melanom murin B164A5. Pentru realizarea acestui scop au fost stabilite următoarele obiective: cultivarea liniei celulare B164A5 în plăci de cultură specific, pregătirea ouălelor fertilizate de găină *Gallus gallus domesticus*, inocularea celulelor tumorale la nivelul membranei corioalantoide (CAM), aplicarea uleiurilor esențiale la nivelul membranei CAM, efectuarea metodei CAM cu angiogeneză tumorală în vederea determinării efectului antitumoral al uleiurilor esențiale.

Au fost utilizate 6 uleiuri esențiale din total de 14 uleiuri obținute din specii aparținând familiei *Lamiaceae*. Celule B164A5 au fost inoculate la nivelul membranei corioalantoide în interiorul unui inel din plastic anterior aplicat pe suprafața vascularizată a membranei în ziua a 10-a a dezvoltării embrionare. Uleiurile volatile au fost aplicate imediat după inocularea celulelor, în același loc în inel, în concentrații de 150 μg/ml în DMSO 0.5%. Efectele asupra procesului de formare al vaselor de sânge pe modelul angiogenezei tumorale cu celule de melanom murin inoculate la nivelul membranei corioalantoide au fost evaluate pentru *O. majorana* (P23, P31), *R. officinalis* (P57), *T. vulgaris* (P24), *T. serpyllum* (P59) și *S. montana* (P42). Uleiurile au fost administrate în fiecare zi timp de 4 zile, iar rata de supraviețuire a specimenelor tratate a fost ridicată, majoritatea putând fi evaluate până la finalul experimentului, timp de 96 de ore.

### **Capitolul 9. Evaluarea toxicologică a unor uleiuri esențiale obținute din specii vegetale medicinale aparținând familiei *Lamiaceae* ulterior încapsulării în hidroxipropil-gama-ciclodextrine**

[Type text]

Acest studiu are drept scop evaluarea toxicității unor uleiuri volatile aparținând familiei *Lamiaceae*. A fost testată activitatea atât a uleiurilor neîncapsulate cât și a celor încapsulate în ciclodextrine. În acest scop, au fost evaluate 6 uleiuri volatile obținute de la specii de lavandă, salvie și mentă.

Pentru realizarea acestui scop au fost stabilite următoarele obiective:

- încapsularea uleiurilor esențiale în hidroxipropil-gama-ciclodextrine
- realizarea analizei în vederea determinării pierderii de apă transepidermice ulterior aplicării uleiurilor neîncapsulate respectiv a celor încapsulate în hidroxipropil-gama-ciclodextrine
- realizarea analizei în vederea determinării eritemului ulterior aplicării uleiurilor neîncapsulate respectiv a celor încapsulate în hidroxipropil-gama-ciclodextrine
- realizarea analizei în vederea determinării hidratării cutanate ulterior aplicării uleiurilor neîncapsulate respectiv a celor încapsulate în hidroxipropil-gama-ciclodextrine

Protocolul utilizat pentru obținerea complexului cu ciclodextrine, este cunoscut sub denumirea de procedeu de frământare. Substanța activă și hidroxipropil-gama-ciclodextrina substanța activă și hidroxipropil-gama-ciclodextrina au fost triturate cu mojar și pistil în raport molar 1:2. Voluntarii au fost 9 subiecți umani sănătoși (2 bărbați și 7 femei), fără leziuni cutanate, cu vârste cuprinse între 19 și 23 de ani. Măsurătorile au fost efectuate prin intermediul unui sistem multisondă (MPA6) de la Courage-Khazaka (Germania), echipat cu o sondă Tewameter<sup>®</sup>TM300, o sondă Mexameter<sup>®</sup>MX18 și o sondă Corneometer<sup>®</sup>CM825. O probă de lauril-sulfat de sodiu 2% (SLS), cunoscut drept iritant pentru piele, a fost utilizată drept control folosind aceeași procedură. Efectul celor șase uleiuri esențiale a fost determinat înainte și după încapsulare în hidroxipropil-gama-ciclodextrine.

### III. CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

#### *Concluzii generale ale tezei:*

1. Speciile medicinale spontane recoltate din zona de vest a României, au fost supuse extracției în vederea obținerii unor soluții hidroalcoolice, ce au fost studiate pentru evaluarea potențialului antioxidant. Metoda extractivă aleasă este simplă, nu a implicat costuri ridicate și este ușor de reprodus.

2. În urma extracției continue prin intermediul aparatului Soxhlet s-au obținut uleiurile volatile de la cele 14 specii medicinale cultivate studiate. Pentru uleiurile esențiale s-au luat în calcul principalii trei compuși chimici în procent cel mai ridicat din totalul de compuși. În uleiurile analizate, principalii compuși chimici au fost: Linalool, 4-Terpeneol, Linalyl acetate, D-Limonene, Beta-Thujone, Alpha-Thujone, Eucalyptol, Gamma-Terpinene, Benzene, 2-methoxy-1,3,4-trimethyl-, Carvacrol, Endo-Borneol, Thymol, Germacrene D, Carvacrol methyl ether, Alpha-Pinene, Camphene, P-Cymene, D-Carvone, Lavandulyl acetate, B-caryophyllene.

3. Extractele etanolice obținute de la specii colectate din arealul județului Caras-Severin, au indus o activitate antioxidantă semnificativă, rezultatele fiind apropiate de valoarea acidului ascorbic, utilizat ca standard. Rezultatele cercetării indică faptul că, cea mai mare activitate antioxidantă, a fost înregistrată pentru specia *Hypericum perforatum* L. recoltată din Munții Almăjului – Prilipeț, respectiv din Munții Locvei – Baziaș. Rezultatele acestui studiu confirmă utilizarea tradițională a acestor specii ca antioxidanți și sugerează faptul că, speciile din zona de vest a României posedă o capacitate antioxidantă ridicată, datorită polifenolilor conținuți de plante.

Uleiurile volatile extrase din plantele cultivate aparținând familiei *Lamiaceae*, prezintă activitate antioxidantă, cele mai semnificative rezultate fiind obținute pentru speciile: *Origanum majorana* L., *Thymus vulgaris* L și *Satureja montana* L.

4. Pentru uleiurile extrase din cele două specii de *Thymus serpyllum* L. (P59) și *Salvia officinalis* L. (P22), nu s-a înregistrat activitate antibacteriană, în timp ce uleiurile obținute din: *Lavandula angustifolia* Mill. (P20), *Perovskia atriplicifolia* Benth. (P45), *Lavandula hybrida* Balb. ex Ging (P30), *Rosmarinus officinalis* L. (P57), *Thymus vulgaris*



[Type text]

L. (P24), *Lavandula angustifolia* Mill. (P21) și *Salvia sclarea* L. (P34) au fost active numai pe cocii Gram-pozitivi și fungi. Celelalte uleiuri de: *Origanum majorana* L. (P23), *Mentha smithiana* L. (P38), *Origanum majorana* L. (P31), *Mentha x piperita* L. (P68) și *Satureja montana* L. (P42) au avut activitate inhibitorie asupra tuturor tulpinilor de referință testate.

5. Rezultatele obținute ne indică faptul că, probele cu cea mai ridicată activitate citotoxică sunt: uleiuri volatile obținute din: salvie P22, măghiran P23, cimbru P24, oregano P31, cimbrisor P42, perovskia P45 și rozmarin P57. Uleiurile volatile analizate prezintă un efect citotoxic doza-dependent, cele mai semnificative date fiind obținute după stimularea celulelor timp de 24h cu doza de 150 μg/ml. Aceste probe nu prezintă selectivitate față de celulele tumorale, deoarece, la doză crescută au redus și viabilitatea keratinocitelor.

În ceea ce privește capacitatea antimigratorie, datele obținute indică faptul că, numeroase probe au redus capacitatea de migrare a liniilor celulare de melanom. Prin evaluarea comparativă a rezultatelor obținute pe linia de melanom uman și pe keratinocitele umane s-a constatat că: probele P20 (*Lavandula angustifolia* Mill.), P59 (*Thymus serpyllum* L.) și P68 (*Mentha x piperita* L.) prezintă selectivitate crescută, acestea au stimulat migrarea celulelor sănătoase, respectiv au inhibat capacitatea de migrare a celor tumorale.

6. Uleiurile volatile nu au fost studiate frecvent prin metoda CAM, evaluarea acestora aduce o contribuție esențială în acest domeniu. Cele mai active uleiuri în reducerea angiogenezei tumorale au fost probele P24 și P57 (uleiuri esențiale obținute din speciile *Thymus vulgaris* și respectiv *Rosmarinus officinalis* L) urmate de o reducere mai moderată a angiogenezei tumorale în cazul probelor obținute din măghiran (*Origanum majorana* L).

7. Atât uleiurile simple testate, cât și cele încapsulate în hidroxipropil-gama-ciclodextrine, nu au indus efecte iritative sau toxice la nivel cutanat, putând fi considerate sigure pentru aplicarea topică.

#### ***Măsura în care au fost atinse obiectivele cercetării;***

Obiectivele cercetării au fost atinse atât în ceea ce studiu efectelor *in vitro* și *in vivo* a extractelor vegetale din plante medicinale cultivate (capacitate antioxidantă, proprietăți antibacteriene și antifungice, efecte citotoxice și antimigratoare, efecte antiangiogenice și evaluare toxicologică), cât și identificarea de noi resurse fitofarmaceutice din flora spontană.

Mai mult, în cazul uleiurilor esențiale a fost determinat și gradul de toxicitate ulterior aplicării cutanate pentru 6 dintre acestea.

#### ***Direcțiile în care trebuie continuată cercetarea;***

Corelația dintre factorii de mediu, principiile active și efectele terapeutice a extractelor obținute din plante medicinale cultivate și spontane provenite din diferite areale.

Studiile viitoare vor avea în vedere determinarea efectelor *in vitro* și *in vivo* și a soluțiilor extractive etanolice singure sau încorporate în diferite formulări farmaceutice.

Mai mult, un aspect de interes îl constituie utilizarea unor mixuri de uleiuri volatile pentru determinarea unui potențial efect sinergic. De asemenea, avem în vedere evaluarea selectivității mixurilor de uleiuri esențiale în ceea ce privește proprietăților anti-tumorale.

#### ***Avantajele și dezavantajele înregistrate:***

Experimentele realizate în cadrul acestei teze oferă informații valoroase cu privire la specii medicinale cultivate și spontane din zona de vest a României cu potențial terapeutic ridicat. Speciile testate au prezentat activitate antioxidantă semnificativă, fapt ce le promovează pentru următoare studii experimentale. Studiile efectuate pe uleiurile esențiale au dovedit faptul că, prezintă numeroase efecte terapeutice, având acțiuni antioxidantă și antimicrobiană și modulând angiogeneza tumorală. Nu s-au întâmpinat dificultăți în realizarea soluțiilor extractive sau a uleiurilor esențiale. De asemenea, experimentele au decurs fără probleme.

#### ***Contribuțiile proprii ale autorului***

[Type text]

Cercetările efectuate au implicat un studiu amănunțit al literaturii în vederea stabilirii speciilor vegetale medicinale de interes din această parte a României. Totodată, toate speciile utilizate pentru obținerea soluțiilor extractive au fost recoltate personal din flora spontană a zonei de vest și pregătite pentru analize viitoare.

Speciile utilizate pentru obținerea uleiurilor esențiale au fost cultivate și monitorizate pe parcursul întregii perioade de vegetație. De asemenea, au fost monitorizați factorii climatici și de sol care pot influența compoziția chimică a uleiurilor obținute. După obținerea uleiurilor esențiale a fost determinată prin analiză GC-MS, compoziția chimică a acestora și comparată cu alte specii din zone diferite.

Pentru uleiurile esențiale a fost realizat un studiu amănunțit cu privire la activitatea antioxidantă, antibacteriană, antifungică și capacitatea citotoxică pe linii celulare tumorale de melanom și comparată cu o linie non-tumorală. O parte din uleiurile esențiale au fost evaluate pe modelul de membrană corioalantoidă tumorală în vederea determinării proprietăților antiangiogenice și, de asemenea, a fost testat efectul *in vivo* al unor uleiuri la nivel cutanat înainte și după încorporarea în ciclodextrine.

#### **IV.ELEMENTE DE ORIGINALITATE**

Cercetările efectuate în cadrul acestei teze reprezintă studii interdisciplinare de originalitate datorită mai multor aspecte:

- Studierea unui număr mare de specii medicinale cultivate și spontane din zona de vest a României, unele dintre acestea fiind puțin studiate până în prezent;
- Obținerea uleiurilor esențiale atât din specii medicinale cultivate și spontane, comparativ cu alte date din literatura de specialitate;
- Realizarea unor analize *in vitro* amănunțite și complexe pe uleiurile esențiale, pentru determinarea multiplelor efecte benefice cu potențial terapeutic;
- Determinarea pe voluntari sănătoși a toxicității unor uleiuri esențiale singure sau complexate cu hidroxipropil-gama –ciclodextrine, ulterior aplicării la nivel cutanat.

#### **Bibliografie**

Bibliografia cuprinde 135 titluri bibliografice