

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

**Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara**



**CHIRILĂ A. ANDREIA BIANCA**

# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**STUDII FITOTERAPEUTICE ÎN  
NEOPLASME EPITELIALE LA ANIMALE**

Conducător științific  
**Prof. Dr. CRISTINA ROMEO TEODOR**

**Timișoara  
2022**

Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary  
Medicine "*King Michael I of Romania*" from Timișoara

**Faculty of Veterinary Medicine Timișoara**



**CHIRILĂ A. ANDREIA BIANCA**

# **DOCTORAL THESIS**

**PHYTOTHERAPEUTIC STUDIES IN  
EPITHELIAL NEOPLASMS IN ANIMALS**

Scientific advisor

**Prof. Dr. CRISTINA ROMEO TEODOR**

**Timișoara  
2022**

## Rezumatul tezei de doctorat

### Studii fitoterapeutice în neoplasmale epiteliale la animale

#### Prezenta teză conține:

*Lista de abrevieri*

*Rezumatele în limba română și engleză*

*Partea de cercetări bibliografice:* 40 pagini

*Partea de cercetări proprii:* 101 pagini

*Tabele:* 27

*Figuri:* 81

*Surse bibliografice:* 249 titluri

*Anexe*

#### **Motivația alegerii temei de doctorat**

Extractele de plante au servit ca o sursă importantă de compuși bioactivi pentru multe cercetări în descoperirea de noi medicamente, și de asemenea mai multe substanțe active importante au fost izolate și identificate din plante.

În orice studiu de izolare al unui compus trebuie să fie utilizat un anumit tip de analiză biologică sau evaluare farmacologică pentru a ghida procesul către componenta bioactivă.

Extractele de plante folosite în fitoterapie sunt adesea slab standardizate și controlate. Conținutul lor de substanță activă variază în funcție de genetica plantei, precum și de factorii climatici, de calitatea solului, de momentul recoltării și de metodele de extracție. Flavonoidele pot fi parțial responsabile pentru efectele farmacologice ale plantelor, dar ar putea avea activitate și alte glicozide.

Alegerea testului care urmează a fi efectuat depinde de obicei de boala care urmează a fi tratată, precum și de informațiile disponibile despre planta care urmează a fi utilizată. Dacă o plantă are un istoric etnofarmacologic împotriva unei anumite boli, atunci s-ar utiliza o tehnică de testare specifică, care poate prezice activitatea terapeutică presupusă, pentru a izola compusul responsabil pentru acea activitate biologică.

Prezenta teză propune abordarea etapizată a unui studiu fitoterapeutic asupra unor plante medicinale cu activitate antiinflamatoare, antitumorală și antivirală, prima etapă fiind determinarea compoziției de polifenoli, a doua realizarea unui unguent corespunzător aplicației topice, următoarele etape fiind studiul clinic al eficienței topice prin aplicarea pe papiloame ecvine și bovine, deoarece papilomatoza nu se poate reproduce *in vitro*.

Melanoamele sunt tumori cu frecvență ridicată la indivizii hipopigmențați, existând posibilitatea de cultivare *in vitro* a diverselor linii celulare de melanom, eficacitatea amestecului de extracte se va face *in vitro*.

#### **Importanța și actualitatea temei**

Considerăm că plantele alese pentru studiu sunt descrise temeinic în literatura de specialitate și se cunosc majoritatea activităților farmacologice sistemice ale acestora, dar nu există date suficiente despre posibilele efecte produse în aplicații topice.

Tumorile care apar spontan sau natural la animalele domestice prezintă un interes deosebit pentru studiile comparative - aceste tumori apar în populații heterogene de animale care împart îndeaproape mediul omului, astfel încât rezultatele obținute în urma

studierii eficacității extractelor asupra papilomatozei și melanomului pot fi comune atât animalelor, cât și oamenilor..

Atât turmericul cât și ghimbirul au efecte antineoplazice și antivirale sistemice dovedite prin literatura de specialitate, cât și de către colectivul disciplinei, dar din cunoștințele noastre nu s-a încercat aplicarea topică a acestora pentru a încerca terapia unor formațiuni neoplazice virale (papiloame) la animale.

Melanomul, cunoscut și sub numele de melanom malign, este un tip de cancer de piele care se dezvoltă din celulele producătoare de pigment cunoscute sub numele de melancite. Melanoamele apar de obicei la nivelul pielii, dar în cazuri excepționale pot avea localizare internă s-au chiar oculară. În cazul cailor suri acestea apar prin determinism genetic la unii indivizi. La cazurile ușoare se constată apariția unor noduli în coadă, în jurul vulvei, rectului s-au pe piele. Melanoamele pot afecta calitatea vieții animalelor, sau pot duce la moartea acestora. Testarea *in vitro* a extractelor pentru stabilirea efectului citopatic al acestora este un prim pas spre o posibilă descoperire în ceea ce privește terapia complementară a acestora.

#### **Locul desfășurării experimentelor**

- Complexul de laboratoare de cercetare „Horia Cernescu” (CLCCH). Laboratorul de cercetări toxico-farmacologice (B.12), infrastructură finanțată prin proiectul RO 05. Cod SMIS-CSNR 2669 (USAMVBT).
- Laboratorul disciplinei de Farmacologie FMV Timișoara
- Laboratorul disciplinei de Biologie celulară, histologie și embriologie FMV Timișoara
- Laboratorul de Biologie celulară și moleculară UMF „Victor Babeș” Timișoara
- Laboratorul de Farmacie UMF „Victor Babeș” Timișoara
- Studiile clinice au fost efectuate pe teren

#### **Metodologia aplicată**

- Tehnica de realizare a extractelor vegetale alcoolice conform Farmacopeei Române
- Analiza LC-MS: sistem analitic 6120 LC-MS de la Agilent (Santa Clara, CA, USA), controlat de software-ul OpenLAB CDS ChemStation Workstation, program care, de asemenea, achiziționează și procesează toate datele LC-MS.
- Tehnica de realizare a unguentelor conform Farmacopeei Române
- Determinarea pH - pH-metrul Consort Multi-analyser
- Testul de curgere în stare staționară: reometru cu control al tensiunii RheoStress 1, Haake, Franța, la temperatura camerei (23°C). S-a utilizat o geometrie placă-placă (PP60/1 Ti, diametru 60 mm), care a operat în modulul de rotație, cu deschiderea 1mm.
- Determinarea consistenței: conform protocolului de lucru și în condițiile prevazute de farmacopee, folosind un penetrometru PNR 12, Petrolab.
- Capacitatea de etalare a preparatelor experimentale a fost evaluată prin metoda plăcii paralele, folosind extensiometrul Pozo Ojeda-SuneArbussa.
- Examenul histopatologic: tehnica histologică clasică, metodă de colorare Hematoxilină-Eozină.
- Analiza statistică: Bartlett's test for equal variances, Bonferroni's Multiple Comparison Test, Kruskal-Wallis test.

Lucrarea este împărțită în două părți majore:

*I. Stadiul actual al cunoașterii și II. Cercetări proprii;*

### **Partea generală Stadiul actual al cunoașterii**

Această parte se extinde pe 40 de pagini și reprezintă 28,36% din teză, este structurată în 4 capitole care sunt dedicate prezentării aspectelor legate de:

**1. Histologia sistemului tegumentar** este o prezentare sumativă a caracteristicilor generale și a dezvoltării embrionare. Cuprinde noțiuni de structură histologică, vascularizație, inervație, circulație limfatică și anexele pielii. Deasemenea face o scurtă recapitulare asupra funcțiilor și regenerării sistemului tegumentar

**2. Introducerea în patogeneza tumorală** descrie pe scurt fenomenele asociate malignității, proliferării, invaziei și metastazei tumorale, cu descrierea pe scurt a virusului oncogen *Papillomavirus* și a două linii celulare de melanom B164A și A374.

**3. Unguente și soluții extractive** este o sinteză asupra unor noțiuni generale despre alegerea bazei de unguent și procesul de preparare al unguentelor și soluțiilor apoase și alcoolice.

**4. Activitatea fitoterapeutică** a unor plante medicinale prezintă informații legate despre cele trei plante medicinale utilizate în acest studiu, cu privire la descrierea plantei și activitatea lor farmacoterapeutică cunoscută până în prezent.

### **Cercetările proprii**

Partea a II-a *Cercetări proprii* se extinde pe 101 de pagini și reprezintă 71,63% din teză. Este structurat în 5 capitole în care sunt prezentate realizarea extractelor alcoolice de turmeric și ghimbir, analiza LC-MS a acestora, prepararea unguentului și utilizarea acestui în terapia papiloamelor la ecvine și bovine, și efectul antiproliferativ al extractelor asupra două linii celulare de melanom.

#### **5. Determinarea unor polifenoli individuali din extractele alcoolice de ghimbir și turmeric prin metoda LC-MS**

*Scopul* studiului a fost realizarea unor extracte alcoolice de turmeric și ghimbir conform tehnicii de realizare a tincturilor din FR X și determinarea unor polifenoli individuali ai acestora cu posibile efecte benefice asupra sănătății.

*Obiectivele* studiului au fost realizarea extractelor alcoolice de turmeric și ghimbir, analiza LC-MS a acestora și identificarea unor compuși cu posibile efecte antitumorale și / sau antivirale.

*Metode utilizate:* extractele s-au realizat conform tehnicii descrise în Farmacopeea Română X. După filtrare s-au păstrat în sticle brune în condiții optime și au fost trimise pentru analiza LC-MS către laboratorul de Farmacie a UMF „Victor Babeș” Timișoara.

*Rezultate:* analiza extractelor prin metoda LC-MS a relevat prezența unor polifenoli cu efecte antioxidante, antiinflamatoare, antineoplazice și antivirale, care au variat față de

compoziția fitochimică amintită de literatura de specialitate. În cele mai mari cantități s-au determinat: *acidul ferulic, p-cumaric, hiperozidul și isoquercitrina*.

## **6. Caracterizarea reologică și evaluarea fizică a unguentului cu extract alcoolice de turmeric și ghimbir**

*Scopul* studiului a fost realizarea unui unguent care conține extractele alcoolice de turmeric și ghimbir analizate în capitolul anterior. Prepararea acestuia s-a făcut conform tehnicii de realizare a unguentelor din FR X, urmat de evaluarea fizică și caracterizarea reologică a acestuia.

*Obiectivele* studiului au fost realizarea unguentului cu extractele alcoolice de turmeric și ghimbir, evaluarea fizică și caracterizarea reologică a acestuia pentru a se determina dacă este conform utilizării în terapie.

*Metode utilizate:* unguentul s-a preparat conform instrucțiunilor din Farmacopeea Română X, în cadrul laboratorului de Farmacie al FMV Timișoara, unde s-a realizat și caracterizarea organoleptică a acestuia. O cantitate de unguent a fost predat laboratorului de Farmacie al UMF „Victor Babeș” Timișoara pentru analiza reologică a acestuia.

*Rezultate:* în urma încorporării extractului de turmeric și ghimbir într-un unguent de gălbenele cu compoziție cunoscută și supunerea acestuia la analiza reologică și caracterizării fizice, am constata că unguentul preparat de noi corespunde pentru a fi aplicat topic, pentru a studia efectele clinice ale acestuia.

Unguentul GGT s-a comportat ca un corp pseudoplastic-tixotrop și a prezentat consistență și vâscozitate ușor mai scăzute decât martorul; acesta a prezentat capacitate de întindere adecvată, specifică preparatelor semisolide.

Determinarea pH-ului unguentului a arătat valori între 6,8-7,00, ceea ce se apropie de pH-ul ușor alcalin al tegumentului ecvin și bovin.

## **7. Studiu asupra eficacității unguentului GGT asupra papilomatozei virale ecvine**

*Scopul* studiului a fost de a evalua eficacitatea clinică a unguentului cu gălbenele-ghimbir-turmeric, pentru tratamentul papilomatozei ecvine, indiferent de forma sau localizarea acesteia.

*Obiectivele* studiului au fost crearea unui mijloc terapeutic ușor de administrat de proprietari, urmărirea periodică a efectelor acestuia asupra papiloamelor și asupra pielii adiacente și a eventualelor efecte secundare, urmărirea recurenței papiloamelor tratate și duratei tratamentului.

*Metode utilizate:* studiul realizat asupra eficacității unguentului a fost unul clinic, realizat pe teren, în 3 județe: Arad, Timiș și Caraș-Severin.

După o evaluare clinică inițială a animalelor, proprietarilor li s-a explicat despre evoluția normală a bolii, posibile complicații și despre posibile metode de tratament, iar cei care au și-au dat acordul pentru a încerca tratamentul prin aplicarea unguentului au fost luați în studiu. Aplicarea unguentului s-a realizat de către proprietari. Cazurile au fost urmărite periodic, papiloamele au fost măsurate și evaluate la fiecare vizită pe teren.

*Rezultate:* aplicarea topică a unguentului realizat și prezentat în capitolul anterior pe papiloame ecvine de tipul epitelial miliar sau nodular hipercheratinizat, fibropapilom ulcerat, placă auriculară, placă hipercheratozică a dus la reducerea hipercheratozei, a

consistenței, a sensibilității locale și la remisia acestora în timp în funcție de dimensiunea și tipul papilomului fără apariția de efecte nedorite sau cicatric.

Urmărirea indivizilor luați în studiu timp de 1-3 ani a demonstrat faptul că acestea nu au mai reapărut, și nu s-au dezvoltat nici altele noi. Diferențe statistice semnificative s-au constatat în evoluția tratamentului între T1 și TF ( $p < 0.05$ ) și T0 și TF ( $p < 0.001$ ).

## 8. Studiu Asupra Eficacității Unguentului GGT Asupra Papilomatozei Virale Bovine

*Scopul* studiului a fost de a evalua eficacitatea clinică a unguentului cu gălbenele-ghimbir-turmeric, pentru tratamentul papilomatozei bovine cu localizare mamară.

*Obiectivele* studiului au fost crearea unui mijloc terapeutic ușor de administrat de proprietari, urmărirea periodică a efectelor acestuia asupra papiloamelor și asupra pielii adiacente, urmărirea posibilelor efecte nedorite, a recurenței și duratei tratamentului.

*Metode* utilizate: studiul realizat asupra eficacității unguentului a fost unul clinic, realizat pe teren, în 2 județe: Arad, Timiș.

După o evaluare clinică inițială a animalelor, proprietarilor li s-a explicat despre evoluția normală a bolii, posibile complicații și despre posibile metode de tratament, iar cei care au și-au dat acordul pentru a încerca tratamentul prin aplicarea unguentului au fost luați în studiu. Aplicarea unguentului s-a realizat de către proprietari timp de 28 de zile.

Cazurile au fost urmărite periodic, papiloamele au fost măsurate și evaluate la fiecare vizită pe teren. După 28 de zile s-au recoltat câteva formațiuni și s-au trimis pentru analiză histologică.

*Rezultate:* aplicarea unguentului realizat pe papiloame miliare și nodulare mamare la bovine timp de 28 de zile a dus la modificarea consistenței, a sensibilității și a dimensiunii acestora, cele de dimensiuni mici (miliare) regresând în totalitate. Aplicarea s-a realizat de două ori pe zi de către proprietari după muls, dimineața și seara.

Eficacitatea terapeutică a unguentului asupra papiloamelor mamare la bovine a fost demonstrată statistic prin valori semnificative  $p < 0.05$  între T0 / T2, T1 / T3 și puternic semnificative  $p < 0.001$  între T0 / T3, T0 / T4, T1 / T4.

## 9. Studiul efectului antiproliferativ al extractului alcoolic de turmeric și ghimbir asupra unor linii celulare de melanom

*Scopul* studiului a fost de a evalua proprietățile antiproliferative ale extractelor alcoolice de turmeric și ghimbir pe modele de studiu *in vitro* folosind linii celulare de melanom.

*Obiectivul* studiului a fost evaluarea *in vitro* a efectelor celulare și analiza efectului terapeutic al extractelor alcoolice de turmeric și ghimbir pe liniile celulare B164A4 (melanom murinic) și A375 (melanom uman).

*Metode* utilizate: extractul de turmeric și de ghimbir a fost păstrat în eprubete de 50 ml în termostat pentru evaporare.

Eprubetele au fost cântărite înainte de umplere și după evaporare, diferența rezultată fiind substanța uscată rezultată care a fost resuspendată în DMSO și utilizată apoi în două

concentrații diferite 15 mg/ml (C1) și 7,5 mg/ml (C2) pentru turmeric, respectiv 7,5 mg/ml (C1) și 3,75 mg/ml (C2) pentru ghimbir.

Celulele de melanom au fost cultivate conform protocolului, apoi au fost expuse timp de 48 de ore la concentrații diferite de amestec de extract de turmeric și ghimbir. După 48 de ore s-au realizat citirile și s-a calculat indicele de viabilitate și inhibiția celulară.

*Rezultate:* în urma expunerii timp de 48 h a celulelor de melanom murinic și uman la mixtura de extract alcoolic de turmeric și ghimbir la două concentrații diferite (C1-15 mg/ml +7,5 mg/ml, C2-7, 5 mg+3,75 mg/ml) s-a constatat că IC50 pentru linia celulară A375 a fost de 54,98%, iar pentru linia celulară B164A5 de 52,52% pentru concentrația C1, iar pentru C2 IC50 a fost de 49,89%, pentru linia celulară A375 și de 48,09%, pentru linia celulară B164A5.

Ultima parte a lucrării este dedicată Concluziilor finale, relevării aspectelor de originalitate / noutate și îndrumărilor pentru practicieni.

Cele mai importante aspecte de noutate care au reieșit din cercetările noastre au fost:

1. S-a obținut regresia papiloamelor de tip epitelial ocult, miliar și nodular hipercheratozic, a fibropapiloamelor ulcerate și a plăcilor hipercheratozice epiteliale la ecvine, dependent de timpul de aplicare și de dimensiunea papiloamelor.
2. S-a obținut regresia papiloamelor auriculare la ecvine.
3. În urma aplicării unguentului GGT asupra papiloamelor mamare la bovine regresia și dispariția acestora este în funcție de dimensiune și durata aplicării, cele de sub 5 mm pot regresa în 28 zile, iar cele de peste 5 mm prezintă modificări clinice și histologice cu tendință spre regresie.
4. Regresiei papiloamelor nu a dus la formarea de cicatrici sau depigmentări, nu a produs efecte secundare, nu a afectat pielea sănătoasă, nu s-a constatat reapariția papiloamelor tratate sau apariția altora noi.
5. Unguentul preparat a avut efecte clinice benefice în ceea ce privește tratamentul papilomatozei ecvine și bovine (cu localizare mamară).
6. Amestecul de extract de turmeric și ghimbir produce apoptoza celulelor de melanom A375 și B164A5 într-o manieră dependentă de concentrație.



## PhD Thesis Summary

### Phytotherapeutic studies in epithelial neoplasms in animals

#### **This thesis contains:**

List of abbreviations	
Abstracts in Romanian and English	
Part of bibliographic research:	40 pages
Own research part:	101 pages
Tables:	27
Figures:	81
Bibliographical sources:	249 titles
Annexes	

#### ***The motivation for choosing the doctoral topic***

Plant extracts have served as an important source of bioactive compounds for many researches in the discovery of new drugs, and several important active substances have also been isolated and identified from plants. In any isolation study of a compound, a specific type of biological analysis or pharmacological evaluation should be used to guide the process to the bioactive component.

Plant extracts used in phytotherapy are often poorly standardized and controlled. Their active substance content varies according to the genetics of the plant, as well as climatic factors, soil quality, timing of harvesting and extraction methods. Flavonoids may be partly responsible for the pharmacological effects of plants, but other glycosides may also be active.

The choice of the test to be performed usually depends on the disease to be treated, as well as the information available about the plant to be used. If a plant has an ethanopharmacological history against a particular disease, then a specific testing technique, which can predict the presumed therapeutic activity, would be used to isolate the compound responsible for that biological activity.

This thesis proposes a staged approach of a phytotherapeutic study on medicinal plants with anti-inflammatory, antitumoral and antiviral activity, the first stage being the determination of polyphenol composition, the second making an ointment corresponding to topical application, the next steps being the clinical study of topical efficacy by applying ointment on equine and bovine papillomas, because papillomatosis cannot be reproduced *in vitro*. Melanomas are tumors with high frequency in hypopigmented individuals, there is the possibility of *in vitro* culture of various melanoma cell lines, the effectiveness of the mixture of extracts will be done *in vitro*.

#### **The importance and relevance of the topic**

We consider that the two plants chosen for the study are thoroughly described in the literature and most of their systemic pharmacological activities are known, but there are insufficient data on the possible effects produced in topical applications.

Tumors that occur spontaneously or naturally in domestic animals are of particular interest for comparative studies - these tumors occur in heterogeneous populations of animals that closely share the human environment, so the results obtained from studying the efficacy of the extracts on papillomatosis and melanoma may be common to both animals and humans.

Both turmeric and ginger have systemic antineoplastic and antiviral effects proven by the literature, as well as by the team of the discipline, but to our knowledge no topical application has been attempted to try the therapy of viral neoplastic formations (papillomas) in animals.

Melanoma, also known as malignant melanoma, is a type of skin cancer that develops from pigment-producing cells known as melanocytes. Melanomas usually occur on the skin, but in exceptional cases may have internal localization or even ocular. In the case of gray horses, they occur through genetic determinism in some individuals. In mild cases, the appearance of nodules is found on the tail, around the vulva, the rectum, on the skin. Melanomas can affect the animal's quality of life, or they can lead to their death. *In vitro* testing of extracts to establish their cytopathic effect is a first step towards a possible discovery in terms of their complementary therapy.

#### **Location of the experiments**

- "Horia Cernescu" research laboratory complex (CLCCH) - Toxicopharmacological research laboratory (B.12), infrastructure financed by project RO 05. Cod SMIS-CSNR 2669 (USAMVBT).
- Laboratory of the Pharmacology discipline – FVM Timișoara
- Laboratory of Cell Biology, Histology and Embryology – FVM Timișoara
- Laboratory of Cellular and Molecular Biology – UMF „Victor Babeș” Timișoara
- Laboratory of the Pharmacology – UMF „Victor Babeș” Timișoara
- Clinical trials were conducted in the field

#### **Applied methodology**

- The technique of making alcoholic plant extracts according to the Romanian Pharmacopoeia
- LC-MS analysis: 6120 LC-MS analytical system from Agilent (Santa Clara, CA, USA), controlled by OpenLAB CDS ChemStation Workstation software, which also acquires and processes all LC-MS data.
- The technique of making ointments according to the Romanian Pharmacopoeia
- Determination of pH - Consort Multi-analyzer pH meter
- Steady flow test: RheoStress 1 voltage control rheometer, HAAKE, France, at room temperature (23 ° C). A plate-to-plate geometry (PP60 / 1 Ti, diameter 60 mm) was used, which operated in the rotation module with an opening of 1 mm..
- Determination of consistency: according to the working protocol and under the conditions provided by the pharmacopoeia, using a PNR 12 penetrometer, Petrolab
- The tensile capacity of the experimental preparations was evaluated by the parallel plate method, using the Pozo Ojeda-SuneArbussa extensiometer

- Histopathological examination: classical histological technique, Hematoxylin-Eosin staining method
- Statistical analysis: Bartlett's test for equal variances, Bonferroni's Multiple Comparison Test, Kruskal-Wallis test

The paper is divided into two major parts:

*The current state of knowledge and Own research;*

### **General part**

#### **The current state of knowledge**

This part extends over 40 pages and represents 28.36% of the thesis; it is structured in 4 chapters that are dedicated to the presentation of the aspects related to:

**1. Histology of the skin system** is a summative presentation of the general characteristics and embryonic development. It includes notions of histological structure, vascularization, innervation, lymphatic circulation and skin appendages. It also makes a brief recap on the functions and regeneration of the integumentary system

**2. Introduction to tumor pathogenesis** briefly describes the phenomena associated with malignancy, proliferation, invasion and tumor metastasis, with a brief description of the oncogenic Papillomavirus virus and two melanoma cell lines B164A and A374.

**3. Ointments and extractive solutions** is a synthesis of some general notions about the choice of ointment base and the process of preparing ointments and aqueous and alcoholic solutions.

**4. The phytotherapeutic activity of some medicinal plants** presents information related to the medicinal plants used in this study, regarding the description of the plant and their pharmacotherapeutic activity known to date.

#### **Own research**

Part II *Own research* extends over 101 pages and represents 71.63% of the thesis. It is structured in 5 chapters in which are presented the preparation of turmeric and ginger alcoholic extracts, their LC-MS analysis, ointment preparation and use in the therapy of equine and bovine papillomas, and the antiproliferative effect of the extracts on two melanoma cell lines.

#### **5. Determination of individual polyphenols in ginger and turmeric alcoholic extracts by the LC-MS method**

*The aim* of the study was to make alcoholic extracts of turmeric and ginger according to the technique of making tinctures from FR X and to determine their individual polyphenols with possible beneficial effects on health.

*The objectives* of the study were the production of alcoholic extracts of turmeric and ginger, their LC-MS analysis and the identification of compounds with possible antitumor and / or antiviral effects.

*Methods used:* the extracts were made according to the technique described in the Romanian Pharmacopoeia X. After filtration, they were kept in brown bottles in optimal conditions and were sent for LC-MS analysis to the Pharmacy laboratory of UMF "Victor Babeş" Timișoara.

*Results:* the analysis of the extracts by the LC-MS method revealed the presence of polyphenols with antioxidant, anti-inflammatory, antineoplastic and antiviral effects, which varied compared to the phytochemical composition mentioned in the literature.

*Ferulic, p-coumaric acid, hyperoside and isoquercitrine were determined in the highest amounts.*

## **6. Rheological characterization and physical evaluation of the ointment with alcoholic extract of turmeric and ginger**

*The aim* of the study was to make an ointment containing alcoholic extracts of turmeric and ginger analyzed in the previous chapter. Its preparation was done according to the technique of making FR X ointments, followed by its physical evaluation and rheological characterization.

*The objectives* of the study were to make the ointment with alcoholic extracts of turmeric and ginger, its physical evaluation and its rheological characterization to determine whether it is suitable for use in therapy.

*Methods used:* the ointment was prepared according to the instructions from the Romanian Pharmacopoeia X, within the Pharmacy laboratory of FMV Timișoara, where its organoleptic characterization was performed. A quantity of ointment was handed over to the Pharmacy laboratory of UMF „Victor Babeş” Timișoara for its rheological analysis.

*Results:* after incorporating the turmeric and ginger extract in a marigold ointment of known composition and subjecting it to rheological analysis and physical characterization, we found that the ointment prepared by us is suitable for topical application, to study its clinical effects.

The GGT ointment behaved like a pseudoplastic-thixotropic body and had a slightly lower consistency and viscosity than the control; it showed adequate tensile capacity, specific to semi-solid preparations.

The determination of the pH of the ointment showed values between 6.8-7.00, which is close to the slightly alkaline pH of the equine and bovine skin.

## **7. Study on the Efficacy of GGT Ointment on Equine Viral Papillomatosis**

The aim of the study was to evaluate the clinical efficacy of marigold-ginger-turmeric ointment for the treatment of equine papillomatosis, regardless of its form or location.

*The objectives* of the study were to create an easy-to-use therapeutic method for owners, to regularly monitor its effects on papillomas and adjacent skin and possible side effects, and to monitor the recurrence of treated papillomas and the duration of treatment.

*Methods used:* the study performed on the effectiveness of the ointment was a clinical one, performed in the field, in 3 counties: Arad, Timiș and Caraș-Severin.

After an initial clinical evaluation of the animals, the owners were told about the normal course of the disease, possible complications and possible treatment methods, and those who agreed to try the treatment by applying the ointment were included in the study.

The ointment was applied by the owners. Cases were monitored periodically, papillomas were measured and evaluated at each field visit.

*Results:* topical application of the ointment made and presented in the previous chapter on equine papillomas of the following type: epithelial miliary, hyperkeratinized nodular, ulcerated fibropapilloma, auricular plaque, hyperkeratotic plaque; led to a reduction in hyperkeratosis, consistency, local sensitivity and their remission over time, depending on the size and type of papilloma, without the appearance of side effects or scarring.

The follow-up of the individuals studied for 1-3 years showed that the papillomas did not reappear, and no new ones have developed.

Statistically significant differences were found in the evolution of the treatment between T1 and TF ( $p < 0.05$ ) and T0 and TF ( $p < 0.001$ ).

### **8. Study on the Efficacy of GGT Ointment on Bovine Viral Papillomatosis**

*The aim* of the study was to evaluate the clinical efficacy of marigold-ginger-turmeric ointment for the treatment of bovine papillomatosis with mammary localization.

*The objectives* of the study were to create an easy-to-use therapeutic method for owners, to regularly monitor its effects on papillomas and adjacent skin, and to monitor for possible side effects, recurrence and duration of treatment.

*Methods used:* the study performed on the effectiveness of the ointment was a clinical one, performed in the field, in 2 counties: Arad and Timiș.

After an initial clinical evaluation of the animals, the owners were told about the normal course of the disease, possible complications and possible treatment methods, and those who agreed to try the treatment by applying the ointment were included in the study.

The ointment was applied by the owners for 28 days. Cases were monitored periodically, papillomas were measured and evaluated at each field visit. After 28 days, several formations were harvested and sent for histological analysis.

*Results:* the application of the ointment made on miliary and nodular mammary papillomas of cattle for 28 days led to a change in their consistency, sensitivity and size, those of small size (miliary) regressing completely. The application was done twice a day by the owners after milking, in the morning and in the evening.

The therapeutic efficacy of the ointment on mammary papillomas in cattle was statistically demonstrated by significant values  $p < 0.05$  between T0 / T2, T1 / T3 and strongly significant values  $p < 0.001$  between T0 / T3, T0 / T4, T1 / T4.

### **9. Study of the Antiproliferative effect of turmeric and ginger alcohol extract on melanoma cell lines**

The aim of the study was to evaluate the antiproliferative properties of turmeric and ginger alcoholic extracts in *in vitro* study models using melanoma cell lines.

The aim of the study was to evaluate the *in vitro* cellular effects and analyze the therapeutic effect of turmeric and ginger alcoholic extracts on B164A4 (murine melanoma) and A375 (human melanoma) cell lines.

Methods used: The turmeric and ginger extract was stored in 50 ml test tubes in a thermostat for evaporation. The tubes were weighed before filling and after evaporation, the resulting difference being the resulting dry matter which was resuspended in DMSO and then used in two different concentrations 15 mg/ml (C1) and 7.5 mg/ml (C2) for turmeric, respectively 7.5 mg/ml (C1) and 3.75 mg/ml (C2) for ginger.

Melanoma cells were cultured according to the protocol, then exposed for 48 hours to different concentrations of turmeric and ginger extract mixture. After 48 hours the readings were taken and the viability index and cell inhibition were calculated.

*Results:* after exposure for 48h of the murine and human melanoma cells to the mixture of turmeric and ginger alcoholic extract in two different concentrations (C1-15 mg/ml +7.5 mg/ml, C2-7, 5 mg + 3.75 mg/ml) IC50 was found to be 54.98% for A375 cell line, and 52.52% for B164A5 cell line for C1 concentration, and for C2 it was 49.89% for A375 cell line and 48.09% for B164A5 cell line.

The last part of the thesis is dedicated to the Final Conclusions, the guidelines for practitioners and the revelation of the originality / novelty aspects of this thesis.

The most important aspects of the novelty that emerged from our research were:

1. *Regression of occult, miliary and nodular hyperkeratotic epithelial papillomas, ulcerated fibropapillomas and epithelial hyperkeratotic plaques in equines was obtained, depending on the time of application and the size of the papillomas.*
2. *Regression of equine auricular papillomas was obtained.*
3. *Following the application of GGT ointment on udder papillomas in cattle, their regression was depending on the size and duration of application, those under 5 mm may regress in 28 days, and those over 5 mm show clinical and histological changes with a tendency to regress.*
4. *The regression of papillomas did not lead to the formation of scars or depigmentation, did not produce side effects, did not affect healthy skin, there was no recurrence of treated papillomas or appearance of new ones.*
5. *The prepared ointment had beneficial clinical effects on the treatment of equine and bovine papillomatosis (with mamary localization).*
6. *The mixture of turmeric and ginger extract causes apoptosis of A375 and B164A5 melanoma cells in a concentration-dependent manner.*