

**Universitatea de Științe Vieții “Regele Mihai I”  
din Timișoara**



**Școala doctorală Medicină Veterinară Timișoara**

**BULUCEA V. ALEXANDRINA VIRGINIA**

# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**CERCETĂRI PRIVIND EFECTUL ANTIMICROBIAN ȘI  
IMUNOMODULATOR  
AL UNOR PLANTE DIN FAMILIA *APIACEAE***

**Conducător Științific  
Prof. Dr. TÎRZIU EMIL**

**Timișoara  
2023  
Rezumatul tezei de doctorat**

## CERCETĂRI PRIVIND EFECTUL ANTIMICROBIAN ȘI IMUNOMODULATOR AL UNOR PLANTE DIN FAMILIA APIACEAE

### Prezenta teză conține:

*Rezumatele în limba Română și Engleză*

*Introducere*

*Partea I-a - Studiu bibliografic:* 35 de pagini

*Partea a II-a - Cercetări proprii:* 95 de pagini

*Tabele:* 42

*Figuri:* 94

*Surse bibliografice:* 337

*Lista lucrărilor științifice publicate*

### Scopul și obiectivele cercetării

Utilizarea fără discernământ a antibioticelor a avut ca rezultat apariția rezistenței la numeroase specii bacteriene și fungice, ceea ce reprezintă o problemă importantă care afectează sănătatea omului și animalelor. În prezent, rezistența la substanțele antimicrobiene reprezintă, o adevărată "criză globală", în sănătatea publică, și una dintre cele mai grave amenințări cu care se confruntă omenirea astăzi. Dintre germenii microbieni, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* coagulazo-negativ, *Shigella* spp., *Enterococcus* spp. și *Escherichia coli*, sunt doar câteva dintre bacteriile la care se întâlnește frecvent fenomenul de rezistență.

Aceste aspecte au dus la o cerere masivă, de noi antibiotice, de către medicii veterinari și umani, împotriva germenilor patogeni rezistenți, și s-a dezvoltat un interes deosebit, de către comunitatea științifică, pentru utilizarea compușilor biologici cu proprietăți antimicrobiene.

După cum se cunoaște, încă din antichitate, plantele cultivate sau crescute spontan au constituit, pe lângă sursa principală de hrană pentru om și animale, și „farmacia verde”, acestea conținând o bogăție de compuși biologic activi, folosiți în medicina tradițională pentru tratamentul unui număr mare de boli infecțioase. Și în evul mediu, sunt relatări privind proprietățile antibacteriene și antihelmintice ale unor plante, amestecate adesea cu săruri minerale sau cu diverse lichide biologice, pentru a forma amestecuri destul de bizare, și adesea periculoase, atât pentru microorganismele, cât și pentru organismul gazdă.

Interesul pentru plantele medicinale a crescut odată cu perfecționarea tehnicilor de extracție și prelucrare a produșilor activi ai acestora și în special al demonstrării eficienței lor în combaterea unor maladii, mai mult sau mai puțin grave. În ultimii ani, cercetători din lumea întreagă, din diferite domenii de activitate, dar mai ales din medicina umană și veterinară, au investigat diverse plante pentru depistarea efectelor antibacteriene.

Cercetările conjugate, din ultimii ani, realizate de botaniști, biochimisti, microbiologici și farmacologi s-au materializat prin rezultate de-a dreptul spectaculoase, ceea ce a contribuit la tratamentul, cu succes, al multor boli infecțioase, parazitare, medicale, inclusiv al unor boli autoimune, iar în viitor se așteaptă descoperirea unor noi componente, cu parametri biologici superiori, care să permită obținerea de noi formule medicamentoase.

Pe baza acestor considerente, se poate menționa că, la ora actuală, remediile naturiste au devenit o ramură extrem de importantă în medicina modernă, atât umană cât și veterinară.

În prezent, majoritatea specialiștilor, inclusiv OMS, afirmă că aproximativ 70-80% din populația țărilor în curs de dezvoltare se bazează încă pe medicina tradițională, mai ales pe folosirea plantelor, ca un veritabil instrument, extrem de eficient, în lupta împotriva bolilor cronice, dar și împotriva unor boli infecțioase sau a unor imunopatii. Având în vedere evoluțiile importante realizate în ultima perioadă în domeniul științific, proprietățile medicinale ale plantelor suscită un interes tot mai mare, în primul rând datorită toxicității lor reduse, dar mai ales a activităților farmacologice, imunologice și a viabilității economice.

Pe teritoriul țării noastre există un număr mare de plante medicinale, majoritatea crescând în mod spontan, neavând nevoie de o îngrijire specială. România deține o floră extrem de diversificată, cu peste 3.600 de specii de plante, dintre care peste 10% sunt utilizate în medicină. Prin calitatea și cantitatea acestora, România se situează între primele cinci țări din lume, asigurând cerințele interne și realizând un volum mare de export în peste 20 de țări.

În ultimii ani, în medicina umană și veterinară, se dorește utilizarea fitoterapiei în cât mai multe cazuri, limitând folosirea excesivă a medicamentelor sintetizate chimic. Pe baza acestor considerente s-a ajuns la descoperirea și folosirea unor noi forme de utilizare a plantelor medicinale, dintre care putem menționa: uleiuri, extracte, siropuri, granule, ceaiuri, unguente ș.a. Folosirea tradițională a fiecărei plante este, de obicei, ghidată de disponibilitatea sa și de ușurința metodei de extracție. Există o varietate de metode de extracție, folosind solvenți adecvați, iar succesul extracției este influențat de perioada procesului de extragere, solvențul folosit, pH-ul și temperatura.

În ceea ce privește utilizarea plantelor medicinale, sub formă de uleiuri sau extracte, trebuie precizat că pentru valorificarea terapeutică și farmaceutică a acestora este necesară o cunoaștere aprofundată a principiilor active, în vederea alegerii corecte a tehnicii de extracție. Lichidele uleioase, denumite și uleiuri esențiale sau uleiuri volatile, sunt obținute din majoritatea componentelor unei plante (frunze, muguri, fructe, flori etc.) prin metoda hidro-distilării. Această metodă a fost dezvoltată pentru prima dată, în evul mediu, de către arabi, și este cea mai utilizată metodă de obținere comercială a uleiurilor esențiale. Având o densitate, în general, mai mică decât cea a apei, uleiurile esențiale sunt volatile, lipedezi, lipido-solubile, rareori colorate și solubile în solvenți organici. Fiind amestecuri naturale, de natură foarte complexă, uleiurile esențiale pot fi compuse din aproximativ 20-60 de componente, la concentrații destul de diferite.

Deși mecanismele de acțiune ale unora dintre componentele uleiurilor esențiale au fost elucidate în cercetări efectuate în trecut, cunoașterea detaliată a majorității compușilor, inclusiv mecanismul lor de acțiune, este încă incomplet elucidat. Această cunoaștere este deosebit de importantă pentru determinarea efectului uleiurilor esențiale asupra diferitelor microorganisme, modul de acțiune în combinație cu alți compuși antimicrobieni și interacțiunea lor cu componentele matricei alimentare.

Cercetările privind proprietățile antimicrobiene și imunomodulatoare ale extractelor, uleiurilor esențiale și ale constituenților acestora, reprezintă, în actualul context al apariției tot mai frecvente a fenomenului de rezistență la substanțele antimicrobiene, a numeroase specii bacteriene și fungice, unul dintre cele mai importante domenii de studiu în medicină. Pentru a depăși aceste probleme, folosirea uleiurilor esențiale, a constituenților și posibilelor amestecuri de antibiotice cu uleiuri esențiale au fost recomandate ca și metodă alternativă de rezolvare parțială a acestei probleme. Cu toate acestea, se cunosc puține lucruri despre interacțiunile care duc la efecte aditive, sinergice sau antagoniste.

În ultimii ani, din cauza percepțiilor din ce în ce mai negative ale consumatorilor, legate de conservanții sintetici, interesul pentru extractele și uleiurile esențiale și aplicarea acestora, în diferite produse, în scopul conservării, a fost amplificat. Mai mult, dezvoltarea rezistenței bacteriilor și fungilor, la diferiți agenți antimicrobieni, reprezintă o mare provocare pentru domeniul medical, pentru tratarea infecțiilor cauzate de aceștia și, prin urmare, există o nevoie stringentă de a căuta noi alternative antimicrobiene.

Obiectivul fundamental al acestei cercetări constă în testarea eficacității antimicrobiene și imunomodulatoare a unor uleiuri esențiale obținute din plante, cunoscute pentru importanța lor în industria alimentară, respectiv *Anethum sowa*, *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare*, *Pimpinella anisum* și *Cuminum cyminum*, toate încadrate în familia *Apiaceae*.

Ca obiective secundare doctoranda și-a propus: determinarea și caracterizarea compoziției chimice și a activității antioxidante a fiecăruia dintre uleiurile luate în studiu; testarea susceptibilității antimicrobiene a unor bacterii Gram pozitive, Gram negative și a două specii de *Candida*, la acțiunea celor cinci uleiuri; determinarea capacității antiinflamatorii a celor cinci uleiuri, cu ajutorul a două metode, respectiv inhibarea hemolizei induse de căldură și inhibarea denaturării proteinelor; determinarea efectului imunomodulator, asupra imunității specifice și nespecifice, cu ajutorul unui extract apos, obținut din plante de *Foeniculum vulgare*.

## **Partea I**

### **Stadiul actual al cunoașterii**

Este extinsă pe 35 de pagini (26,92% din teză), fiind structurată pe patru capitole.

#### **Capitolul 1. Caracterizarea generală a unor plante din familia *Apiaceae***

Cuprinde informații generale și specifice despre cele cinci plante, încadrate în familia *Apiaceae*, cunoscută și sub denumirea de familia *Umbelliferae*. Unele dintre cele mai cunoscute plante, din această familie, cum ar fi: chimionul,

mărarul (european și indian), feniculul și anasonul, sunt cunoscute ca și condimente, apreciate în întreaga lume, atât pentru proprietățile lor culinare, cât și pentru beneficiile lor terapeutice. Condimentele sunt părți uscate și aromate ale plantelor, utilizate pe scară largă în pregătirea și conservarea alimentelor, încă din antichitate, utilizate frecvent pentru a da gust, culoare și a prelungi durata de valabilitate a produselor alimentare. De asemenea, sunt o sursă bogată de compuși bioactivi terapeutici, cum ar fi: proteine, taninuri, saponine, terpeni, flavonoide, alcaloizi, acizi tanici, antocianine, cumarine, glucozide etc. Pe lângă efectele benefice asupra sănătății, în diabet, afecțiuni cardiovasculare, tulburări neurodegenerative, anomalii reproductive, cancer, și altele, unele dintre aceste plante au și importante efecte antimicrobiene și imunomodulatoare.

Acțiunea antimicrobiană a unora dintre plantele încadrate în familia *Apiaceae* este atribuită în principal uleiurilor esențiale pe care acestea le conțin. Aceste uleiuri prezintă proprietăți antibacteriene, antifungice și antivirale importante, care pot contribui la inhibarea creșterii și dezvoltării microorganismelor patogene, dar sunt, de asemenea, recomandate și pentru tratarea durerilor de stomac, răcelii, tusei, pierderii poftei de mâncare, durerilor reumatice, tulburărilor cognitive, convulsiilor, inflamației etc.

Conform datelor din literatura de specialitate, semințele de chimion sunt binecunoscute pentru potențialul lor antioxidant, antibacterian, insecticid, antiinflamator, calmant al durerii, antitumoral, de dezagregare a plachetelor sanguine, antialergic, de prevenire a tensiunii, hiperglicemic, hipoglicemic, antihiperlipidemic, bronhodilatator, imunomodulator, contraceptiv, anti-amiloidogenic, anti-osteoporotic, antifungic, inclusiv pentru proprietățile de protecție a sistemului nervos. Studiile, efectuate până în prezent, au arătat că și mărarul are efecte antimicrobiene, antiinflamatorii, analgezice, protectoare ale mucoasei gastrice și antisecretorii, efecte relaxante asupra mușchilor netezi, hiperlipidemie, creșterea concentrației de progesteron și multe alte efecte. De asemenea, extractul metanolic al fructelor de fenicul a fost raportat că prezintă o importantă activitate antioxidantă. Proprietățile bine-cunoscute ale *Anethum sowa* (mărar indian), ca medicament tradițional, sub formă de ulei esențial, și diferite extracte, includ promițătoare efecte antibacteriene, antifungice, antioxidante, insecticide, antiinflamatoare, antidiabetice, antispasmodice, hipolipidemice, digestive, diuretice și anticancerose.

## **Capitolul 2. Aspecte privind activitatea antimicrobiană a unor plante**

La ora actuală, rezistența la substanțele antimicrobiene constituie o problemă extrem de gravă. În medicina veterinară, fenomenul de rezistență antimicrobiană reprezintă o amenințare serioasă, atât pentru animale cât și pentru produsele și subprodusele obținute de la acestea, iar principala cauză a identificării, tot mai frecvent, a unor gene de rezistență, în sectorul animal, o reprezintă cantitatea mare de antibiotice folosite în producție, care sunt utilizate fie ca promotori de creștere fie, inadecvat, ca înlocuitori cu costuri reduse pentru măsurile de igienă care ar putea preveni apariția infecțiilor la animale.

În subcapitolul "*Plante cu acțiune antimicrobiană*" sunt prezentate principalele plante, folosite ca și condimente care, prin efectul lor, s-au dovedit a fi resurse valoroase de compuși antimicrobieni naturali, utilizate pentru tratarea infecțiilor cauzate de bacterii și alți agenți patogeni. Pentru prevenirea apariției acestor patologii, ierburile aromatice și condimentele pot fi utilizate pentru a împiedica dezvoltarea microorganismelor nedorite în produsele și subprodusele alimentare.

În următorul subcapitol "*Principali compuși din plante cu efect antimicrobian*" este menționat faptul că există o varietate de substanțe antimicrobiene, derivate din plante și condimente, care sunt utilizate pentru acțiunea lor bacteriostatică și bactericidă sau pentru a îmbunătăți calitatea generală a produselor alimentare. În continuare, sunt prezentați principalii compuși sintetizați de plante cu o importanță deosebită în competiția cu microorganismele patogene, respectiv: alcaloizii, flavonoidele, uleiurile esențiale și terpenoidele, acizii organici, polizaharidele, cumarinele și lignanii.

## **Capitolul 3. Activitatea antimicrobiană a unor plante din familia *Apiaceae***

În cele cinci subcapitole este prezentată capacitatea antimicrobiană a speciilor luate în studiu, după cum urmează: activitatea antimicrobiană a speciei *Cuminum cyminum*, susținută de un număr mare de cercetări care confirmă că uleiul esențial de chimion prezintă proprietăți antimicrobiene semnificative, împotriva mai multor tulpini bacteriene și fungice; asemănător și uleiul esențial și diferitele extracte din semințele de *Anethum graveolens* prezintă o activitate antimicrobiană semnificativă, împotriva unei game extrem de variate de microorganisme; uleiul esențial, extras din fructele de *Foeniculum vulgare*, a prezentat efect antibacterian împotriva patogenilor transmiși prin alimente cum ar

fi *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* ș.a.; extractele de acetat de etil, diclorometan, n-hexan, apoase și metanolice obținute din semințele și tulpinile de *Anethum sowa* au demonstrat o activitate antimicrobiană importantă împotriva unor microorganisme patogene, cum ar fi: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, stafilococi coagulazo-pozitivi, stafilococi coagulazo-negativi, specii de *Enterococcus*, *Candida albicans* și *Candida parapsilosis*; de asemenea, și uleiul de anason a inhibat complet creșterea fungilor *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* și *Fusarium moniliforme*, la o concentrație mai mică sau egală cu 500 ppm.

#### **Capitolul 4. Modularea răspunsului imunitar**

Conceptul de manipulare nespecifică a răspunsului imun își are rădăcinile în unele observații empirice, din medicina populară, observații referitoare la efectul binefăcător pe care o serie de compuși organici sau anorganici, de diferite origini, le-ar exercita asupra capacității de apărare și de vindecare a organismului. Termenul de imunomodulator denumeste un preparat sau o substanță care exercită o influență nespecifică asupra elementelor și a mecanismelor de apărare a organismului, făcându-se astfel diferențierea față de imunogene, care lasă o amprentă precisă, specifică, asupra sistemului și a răspunsului imun. Uzual, denumirea de imunomodulator se atribuie produselor care exercită o influență nespecifică asupra elementelor și a mecanismelor de apărare a organismului, făcându-se astfel diferențierea față de imunogene, care lasă o amprentă precisă, specifică, asupra sistemului și a răspunsului imunitar.

### **Partea a II-a. Cercetări proprii**

Această parte se extinde pe 95 de pagini (73,64% din teză) și include patru capitole mari, la care se adaugă concluziile generale și elementele de originalitate.

Cercetările proprii au fost cuprinse în patru capitole, după cum urmează:

5. Compoziția chimică și activitatea antioxidantă a unor uleiuri esențiale obținute din plante încadrate în familia *Apiaceae*.

6. Cercetări privind activitatea antimicrobiană a uleiurilor esențiale luate în studiu.

7. Cercetări privind efectul antiinflamator al unor plante din familia *Apiaceae*

8. Cercetări privind efectul imunomodulator al unui extract de *Foeniculum vulgare*

Fiecare capitol este structurat în patru subcapitole: Scop și obiective; Materiale și metode; Rezultate și discuții; Concluzii.

#### **Capitolul 5. Compoziția chimică și activitatea antioxidantă a unor uleiuri esențiale obținute din plante încadrate în familia *Apiaceae***

##### ***Obiectivul studiului***

Cercetările au vizat caracterizarea chimică a celor cinci uleiuri esențiale luate în studiu, inclusiv efectul principalilor compuși izolați, precum și o evaluare a capacității antioxidante.

##### ***Materiale și metode***

Uleiurile esențiale luate în studiu au provenit de la următoarele plante, încadrate în familia *Apiaceae*: *Anethum sowa* (mărar indian), *Anethum graveolens* (mărar european), *Foeniculum vulgare* (fenicul), *Pimpinella anisum* (anason) și *Cuminum cyminum* (chimion).

Pentru caracterizarea chimică a celor cinci uleiuri esențiale s-a utilizat metoda de cromatografie în fază gazoasă - spectroscopie de masă (GC/MS). Pentru compoziția chimică a uleiurilor, analizată prin GC-MS, s-a folosit aparatul Shimadzu QP 2010 Plus (Columbia, SC, SUA) echipat cu o coloană capilară AT WAX 30 m 0,32 mm.

Activitatea antioxidantă a fost determinată prin metoda DPPH. Metodă are la bază decolorarea radicalului stabil DPPH (2,2 difenil-picril-hidrazil), colorat intens în roșu-purpuriu și având absorbția de către substanțele cu caracter antioxidant la 515 nm. Echipamentele utilizate au fost următoarele: balanța analitică Kern cu domeniul de măsurare de la 0,0001g la 120 g, baia de ultrasonare Telsonic-Ultrasonics TPC-25, Vortex Scientific Industries Genie 2, centrifuga Sorvall GLC-1 și un spectrofotometru multidetecție Analytik Jena Specord 210, cu domeniul de măsurare între 190 – 1.100 nm.

### **Rezultate obținute**

La analiza cromatografică a uleiului esențial de *Anethum sowa*, principalii compuși detectați au fost D-limonen (41,491%), 18 carvonă (23,074%), apiolul (16,218%), D-dihidrocarvonă (8,228%) și trans-dihidrocarvonă (6,586%), ceilalți 16 compuși identificați având concentrații sub 1%. Menționăm că, compoziția chimică a uleiului esențial de *Anethum sowa* este descrisă într-un număr mic de studii de specialitate, aceasta fiind cea mai amplă descriere.

În urma efectuării analizei cromatografice a uleiului de *Anethum graveolens*, principalii compuși identificați au fost: D-limonenul, ca și compus principal (46,3%), urmat de D-carvonă (40,84%), Dihidrocarvonă (4,35%), Benzil Benzoatul (2,67%) și Oxidul de limonen (1,69%). Ceilalți șapte compuși, cu excepția Caran,4,5-epoxi-,trans (1,05%), au fost prezenți în cantități foarte mici, sub 1,00%.

Rezultatele obținute de noi au fost confirmate și de alți cercetători care susțin că, atât cantitatea, cât și compoziția chimică a uleiului esențial de mărar (european sau indian), variază în funcție de părțile plantei și de stadiul de dezvoltare al acesteia la momentul recoltării. Compoziția chimică a uleiului esențial al celor două chemotipuri, mărar european (*A. graveolens*) și mărar indian (*A. sowa*), sunt diferențiate, în special pentru monoterpena conținută. Astfel, *Anethum sowa* conține cantități mari de apiol, în timp ce *Anethum graveolens* este bogată în carvonă. În ceea ce privește concentrația de apiol, conținută în uleiurile esențiale de *Anethum sowa*, aceasta variază de la un ulei esențial la altul, ceea ce subliniază că zona geografică și clima pot influența semnificativ compoziția chimică.

Analizând rezultatele privind compoziția chimică a uleiului esențial de *Foeniculum vulgare*, constatăm că din cei șase constituenți chimici, principalii compuși identificați au fost: anetolul (52,74%), urmat de alfa-pinen (18,34%) și D-limonen (12,76%), ceilalți trei compuși, identificați într-un procent mai mic, sub 10%, fiind fenhone, izoanetona și anisaldehida. Comparativ cu rezultatele altor cercetători, compoziția chimică obținută de noi este diferită, aspect ce poate fi explicat prin diferențele climatice, diferite de la o țară la alta și chiar de la o zonă la alta, de sezonul de recoltare, inclusiv de partea plantei recoltată.

În uleiul esențial de *Pimpinella anisum* principalii compuși identificați au fost, în ordinea concentrației: propenilanol, identificat într-o concentrație foarte mare (72,49%), urmat de limonen (10,01%), anisal (5,00%), alfa-pinen (3,26%), betaterpinen (2,51%), linalool (1,96%), alfa-fellandrene (1,82%) și 3-Caren (1,32%). Ceilalți cinci compuși, respectiv, 1-Pentanon,1-(4-metilfenil)-, anisaldehydă, p-(Pentiloxi) acetofenon, Thimolul și 1-(3-Metil-2-butenoxi) -4-(1-propenil) benzel au fost identificați într-un procent mult mai mic, sub 1,00%.

Dintre constituenții identificați în compoziția uleiului de *Cuminum cyminum*, menționăm, în principal, ocimenul (24,48%), care alături de beta-pinen (24,09%), constituie principalii constituenți. Alături de aceștia au mai fost detectați gama-terpinenul (20,50%) și cuminaldehida (21,24%), cu valori destul de apropiate, urmați de 2-Carenă-10-al (3,44%), alfa-Pinen (2,69%), D-Limonen (1,29%) și beta-Mircen (1,12%). Ultimii doi constituenți au înregistrat valori sub 1,00%. Dintre constituenții identificați, menționăm prezența D-limonenului și alfa-pinenului prezenți în concentrații relativ mici, însă suficiente pentru a susține activitatea antimicrobiană.

Activitatea antioxidantă a celor cinci uleiuri esențiale a fost diferită de la un ulei la altul, fiind influențată și de concentrația luată în studiu. Astfel, pentru activitatea antioxidantă a uleiului esențial de *Anethum sowa*, procentul activității de eliminare a radicalilor liberi a variat între 15,3286%, valoare înregistrată la concentrația uleiului de 12,50 μl/ml, și 28,6043%, la concentrația maximă a uleiului, respectiv 200,00 μl/ml.

În ceea ce privește activitatea antioxidantă a uleiului de *Anethum graveolens*, comparativ cu uleiul de *Anethum sowa*, activitatea antioxidantă este mult mai intensă, procentul activității antioxidante are o valoare pozitivă încă de la concentrația de 12,5 μl/ml, respectiv de 24,1365%, cu mențiunea că la concentrația maximă (20 μl/ml), valoarea activității antioxidante ajunge aproape la o valoare dublă, de 45,8580%. În schimb, uleiul esențial de *Foeniculum vulgare* are o activitate antioxidantă mult mai redusă, cu valori cuprinse între 0,5665% și 19,5025%. Ultimele două uleiuri testate, uleiul de *Pimpinella anisum* și uleiul de *Cuminum cyminum* au înregistrat valori negative ale procentului activității de eliminare a radicalilor liberi.

În concluzie, comparând activitatea antioxidantă a celor cinci uleiuri esențiale, se observă că cea mai crescută activitate antioxidantă este întâlnită la uleiurile esențiale aparținând speciilor *Anethum sowa* și *Anethum graveolens*.

## **Capitolul 6. Cercetări privind activitatea antimicrobiană a uleiurilor esențiale luate în studiu**

### **Obiectivul studiului**

Obiectivul fundamental al cercetărilor, din cadrul acestui capitol, a constat în determinarea activității antimicrobiene, a celor cinci uleiuri esențiale, obținute din plante încadrate în familia *Apiaceae*.

#### **Materiale și metode**

Tulpinile microbiene de referință (ATCC) au provenit din colecția de culturi bacteriene a Laboratorului de Microbiologie al Platformei de cercetare interdisciplinară din cadrul USVT. Au fost luate în studiu următoarele specii: *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Haemophilus influenzae* tip B (ATCC 10211), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19114), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Candida parapsilopsis* (ATCC 22019) și *Candida albicans* (ATCC 10231).

Au fost supuse testării cinci uleiuri esențiale, obținute din: *Anethum graveolens*, *Anethum sowa*, *Foeniculum vulgare*, *Pimpinella anisum* și *Cuminum cyminum*, toate încadrate în familia *Apiaceae* și obținute de la Oleya (Cream Apothecary, România).

Testarea susceptibilității antimicrobiene a tulpinilor bacteriene și fungice s-a realizat prin metoda microdiluțiilor, metoda standardizată de CLSI pentru testarea bacteriilor care cresc în condiții de aerobioză, inclusiv a drojdiilor și ciupercilor filamentoase.

#### **Rezultate obținute**

Analizând activitatea antimicrobiană a uleiului de *Anethum sowa*, față de tulpinile G+, putem afirma că cea mai semnificativă creștere a fost constatată în cazul speciilor *C. perfringens* și *B. cereus*, ai căror coeficienți de creștere au variat între 97,42% și 67,65%. Comparativ cu acestea, cea mai mică creștere a fost obținută în cazul speciei *S. aureus*, cu valori ale ratei de creștere de 68,01% în cazul primei concentrații și de 46,31% în cazul concentrației de 20 μl/ml.

În ceea ce privește coeficientul de creștere, în cazul tulpinilor G-, se poate constata că utilizarea uleiului de *Anethum sowa* a determinat o evoluție cu un trend descrescător, cu o creștere mai accentuată în cazul tulpinilor de *P. aeruginosa* (114,57%) și *E. coli* (106,00%), obținută la concentrațiile cele mai mici, pe când la *H. influenzae* și *S. flexneri* creșterea a fost de 82,67%, respectiv de 86,98%, la aceiași concentrație, pe când la 20 μl/ml, rata de creștere a variat între 84,99% la *E. coli* și 62,97% la *H. influenzae*.

Rata de creștere a tulpinilor de *Candida* a prezentat, de asemenea, un tablou evolutiv pozitiv, cu descreșterea ratei de creștere, comparativ cu creșterea concentrației testate. În cazul speciei *C. parapsilopsis* valorile ratei de creștere au variat între 98,19% și 76,20%, iar în cazul speciei *C. albicans* creșterea a fost mai intensă, cu valori între 114,61% și 86,85%.

În ceea ce privește capacitatea de inhibare a creșterii bacteriene, a uleiului de *Anethum sowa*, se constată diferențe, uneori semnificative, de la o probă la alta, dependent atât de specia bacteriană, cât și de concentrația uleiului testat. Astfel, în cazul tulpinilor G+, este evidentă eficacitatea uleiului asupra speciilor *S. aureus* și *L. monocytogenes*. Din analiza rezultatelor se constată că cea mai mare rată de inhibare a creșterii se constată la concentrația de 20 μl/ml, valoarea maximă (53,69%), fiind constatată la *S. aureus*, iar valoarea minimă (23,17%), la *S. pyogenes*. În cazul speciilor G-, cea mai sensibilă s-a dovedit *H. influenzae*, la care s-au înregistrat valori cuprinse între 17,33%, la 1,25 μl/ml și 37,03% la 20 μl/ml. Dintre cele două specii de *Candida*, uleiul de *Anethum sowa* a afectat semnificativ tulpina de *C. parapsilopsis*, cu o valoare maximă de inhibare de 23%.

În cazul uleiului de *Foeniculum vulgare*, cea mai mare rată de creștere s-a constatat la tulpinile de *C. perfringens* și *B. cereus*, unde coeficienți de creștere au variat între 99,63% și 74,75%, respectiv 97,66% și 78,07%, cu mențiunea că la *S. aureus* s-a înregistrat cea mai mică creștere, respectiv 60,22% la 1,25 μl și 41,26% la 20 μl/ml. La speciile G-s-a înregistrat tot un trend descrescător, cu o creștere mai accentuată în cazul tulpinilor de *P. aeruginosa* (91,25 – 125,53%), *E. coli* (81,05 – 109,14%) și *S. typhimurium* (76,05 – 104,11%). Dintre speciile de *Candida*, la *C. parapsilopsis* valorile ratei de creștere au variat între 98,14% până la 77,21%, iar în cazul speciei *C. albicans* între 99,89% și 76,69%.

În ceea ce privește rata de inhibare a uleiului de fenicul se constată că cea mai mare rată de inhibare a creșterii se înregistrează la concentrația de 20 μl/ml, indiferent de natura speciilor microbiene testate.

Experimentele efectuate au demonstrat că uleiul esențial de *Foeniculum vulgare* a avut activitate antimicrobiană, începând cu concentrația de 1,25 μl/ml, iar împotriva speciei *S. aureus*, uleiul esențial de *Foeniculum vulgare* a avut o activitate antimicrobiană excelentă.

Analizând activitatea antimicrobiană a uleiului de *Anethum graveolens*, comparativ cu cele două uleiuri de mai sus, putem afirma că nu influențează, decât într-o mică măsură creșterea bacteriană și micotică, chiar și la diluția de 20,00 μl/ml. Putem menționa, dintre speciile mai sensibile la acțiunea acesteia, *S. aureus*, dintre G+, *E. coli*, dintre G- și *Candida albicans*, dintre fungi. Mai mult s-a dovedit că în cazul acestui ulei, cantitatea testată s-a dovedit insuficientă pentru a opri din dezvoltare tulpina, chiar dovedind astfel un efect de "strain-boosting".

Uleiul de *Pimpinella anisum* a avut o activitatea inhibitorie foarte bună, în cazul tulpinilor G+, cu valori, în cazul tulpinii de *S. aureus*, care pornesc de la 28,38% și ajung până la 46,15%, procent de inhibare, în cazul concentrației maxime testate de 20 μl/ml. O activitate medie regăsim, consecutiv utilizării uleiului de anason, și în dreptul tulpinilor de *S. pyogenes* și *L. monocytogenes* pe când tulpina de *C. perfringens* demonstrează o rezistență deosebită. *Pimpinella anisum* a avut o activitate puternică și împotriva bacteriilor G-, cea mai evidentă fiind inhibarea tulpinii de *S. typhimurium*, urmată de *H. influenzae*, *S. flexneri* și *P. aeruginosa*, cu mențiunea că *E. coli* a fost cea mai rezistentă tulpină.

Activitatea inhibitorie a uleiului esențial de *Cuminum cyminum*, asupra tulpinilor bacteriene G-, este slabă spre medie, cu valori care pornesc de la 1,53% și ajung la 13,45%, în cazul tulpinii de *S. aureus*, la concentrația de 20 μl/ml.

## **Capitolul 7. Cercetări privind efectul antiinflamator al unor plante din familia *Apiaceae***

### ***Obiectivul studiului***

Principalul obiectiv a constat în evidențierea capacității antiinflamatorii a celor cinci uleiuri, prin două metode: inhibarea hemolizei induse de căldură și inhibarea denaturării proteinelor.

### ***Materiale și metode***

Pentru obținerea suspensiei eritrocitare s-a utilizat metoda descrisă de Okoli și colab. (2007), cu mici modificări. Astfel, pentru a induce hemoliza la căldură s-a realizat un amestec din 5 ml PBS (10 mM) la un pH de 7.4, conținând concentrațiile testate de ulei esențial și 100 μl de suspensie eritrocitară. Absorbanța supernatantului obținut a fost măsurată cu ajutorul spectofotometrului UV-VIS Specord la o lungime de undă de 540 nm. Toate probele au fost realizate în triplicat.

Pentru inhibarea denaturării proteinelor, metoda de lucru a fost cea descrisă de Dharmadeva și colab. (2018), cu mici modificări. Absorbanța a fost măsurată tot cu ajutorul spectofotometrului UV-VIS Specord 205, la o lungime de undă de 660 nm.

### ***Rezultate obținute***

Activitatea antiinflamatoare a uleiurilor testate a fost confirmată prin valori pozitive ale procentului de inhibare a lizei eritrocitare, valori diferite dependent de concentrația folosită.

Pentru *Anethum sowa*, procentul de inhibare a fost cuprins între 4,933% și 37,551%, activitatea antiinflamatoare fiind demonstrată încă de la concentrația de 12,5 μl/ml. Asemănător, și activitatea uleiului de *Anethum graveolens* a fost constatată tot de la prima concentrație testată, respectiv de 12,5 μl/ml. În cazul acestei specii procentul de inhibare a hemolizei a fost de 3,975%, la concentrația minimă, după care a urmat o creștere constantă la următoarele concentrații, respectiv 6,460% la 25 μl/ml, 10,772% la 50 μl, 22,538% la 100 μl, pentru ca, la 200 μl/ml, procentul de inhibare să fie de aproximativ zece ori mai mare, comparativ cu prima diluție, ajungând la 40,142%.

Comparativ cu cele două uleiuri de mai sus, în cazul uleiului esențial de *Foeniculum vulgare*, rezultatele sunt mai variate, procentul de inhibare având o valoare negativă, la primele două concentrații, -11,535 și -0,852%, iar rezultatele pozitive au fost cuprinse între 6,655% și 34,463%

În ceea ce privește capacitatea antiinflamatoare a uleiului de *Pimpinella anisum*, se observă că procentul de inhibare are o valoare negativă, doar la prima concentrație (12.5 μl/ml), respectiv -12,050%, apoi, începând cu concentrația de 25 μl/ml, reacția de inhibare se pozitivează, cu valori cuprinse între 0,248% și 26.744%.

În concluzie putem menționa că rezultatele privind capacitatea antiinflamatoare a celor cinci uleiuri testate, este demonstrată și confirmată pentru *Anethum sowa* și *Anethum graveolens*, începând de la concentrațiile cele mai mici, pentru *Pimpinella anisum* de la 25 μl/ml, iar pentru *Foeniculum vulgare* și *Cuminum cyminum* de la 50 μl/ml.



Activitatea antiinflamatoare a uleiului de *Anethum sowa*, determinată prin metoda inhibării denaturării proteinelor, a fost influențată, în proporție de 100%, de concentrația uleiului. Astfel, procentele de inhibare au variat între 6,262% și 57,381%, cu mențiunea că între concentrația minimă (12,5 μl/ml) și concentrația maximă (200 μl/ml), s-a înregistrat o diferență de 51,12%.

Rezultate asemănătoare au fost constatate și în cazul uleiului de *Anethum graveolens*, unde procentul de inhibare a fost cuprins între 17,495% și 42,277%, ceea ce ne permite să afirmăm că cele două uleiuri de *Anethum* spp., și-au demonstrat efectul antiinflamator, atât prin reacția de inhibare a hemolizei, cât și prin reacția de inhibare a denaturării proteinelor.

## **Capitolul 8. Cercetări privind efectul imunomodulator al unui extract de *Foeniculum vulgare***

### ***Obiectivul studiului***

Obiectivul studiului a vizat evaluarea efectului imunomodulator al unui extract apos de *Foeniculum vulgare*, asupra răspunsului imun umoral și celular la suine, consecutiv imunizării cu un imunogen contra agalaxiei contagioase a oilor și caprelor.

### ***Materiale și metode***

Cercetările s-au efectuat în perioada iulie - noiembrie 2021, pe 30 de purcei, în vârstă de 40 de zile, din rasa Landrace, grupați în trei loturi experimentale. Imunogenul, a fost reprezentat de un vaccin animal, respectiv Agalaxin Forte, vaccin utilizat pentru imunizarea activă contra agalaxiei contagioase ovine și caprine, iar preparatul imunomodulator, a fost constituit de un extract apos de *Foeniculum vulgare*.

Titru de anticorpi s-a determinat cu ajutorul testului imunoenzimatic (ELISA), varianta indirectă. Concentrația lizozimului seric a fost determinată prin metoda difuzimetrică, preluată de la S.N. Institutul Pasteur S.A., iar concentrația properdinei serice a fost stabilită cu ajutorul metodei colorimetrice. Leucocitele totale s-au determinat direct în hemocitometru, iar formula leucocitară pe frotiuri colorate prin metoda May - Grünwald - Giemsa.

### ***Rezultate obținute***

Concentrația de properdina a înregistrat valori destul de apropiate, la cele două loturi experimentale, la care vaccinul s-a administrat în asociere cu extractul de *Foeniculum vulgare*, valorile cele mai mari fiind constatate la 21 de zile de la prima vaccinare (29,20 mg/100 ml ser) la lotul experimental 1, la care preparatul imunomodulator s-a administrat doar la prima vaccinare. Concentrația în properdină, la lotul la care imunogenul s-a administrat concomitent cu extractul de *Foeniculum vulgare*, la ambele vaccinări, a fost semnificativ mai mare față de valorile înregistrate la animalele din lotul martor, dar apropiate de cele înregistrate la lotul experimental 1.

Evoluția lizozimului a fost asemănătoare cu cea constatată la properdină, cu mențiunea că valorile medii au fost semnificativ mai mici, comparativ cu cele de la properdină, la toate cele trei loturi luate în studiu. Indicele fagocitar a prezentat o dinamică asemănătoare cu cea a lizozimului, valorile cele mai ridicate fiind înregistrate la animalele din lotul E2, la care extractul de *fenicul* s-a inoculat în două reprize. Concentrația de anticorpi a crescut la toate cele trei loturi luate în studiu, între momentul inițial și recoltarea a doua și a treia existând diferențe mari care au variat de la un lot la altul. Aceste rezultate ne permit să afirmăm că extractul apos de *Foeniculum vulgare* stimulează mai intens factorii de apărare specifici și într-o măsură mai mică factorii nespecifici.

Ultima parte a tezei include, în **capitolul 9**, „Concluziile generale”, aspectele practice care se deduc din cercetările efectuate, recomandările pentru practicieni și relevarea aspectelor de noutate, dintre care menționăm:

✚ Limonenul are o importantă activitate antibacteriană, putând fi utilizat în conservarea alimentelor datorită activității sale bactericide cu spectru larg, siguranței și toxicității scăzute.

✚ D-limonenul poate inhiba semnificativ bacteriile gram-negative și gram-pozitive, precum și activitatea fungică.

✚ Apiolul și D-carvona, identificate într-o concentrație semnificativă în uleiurile de *Anethum sowa* și *Anethum graveolens*, au acțiune antimicrobiană, dar și antioxidantă, antifungică, anticancerigenă și antiproliferativă.

✚ Activitatea antioxidantă a uleiului de *Anethum sowa* a înregistrat valori pozitive, încă de la cea mai mică concentrație testată (12,5 μl/ml), fapt ce ne permite să afirmăm că activitatea antioxidantă este în strânsă corelație cu concentrația uleiului testat.

✚ Comparativ cu uleiul de *Anethum sowa*, activitatea antioxidantă a uleiului de *Anethum graveolens* este mult mai intensă, procentul activității antioxidante având o valoare aproape dublă, respectiv 45,86%, valoare înregistrată la concentrația de 20 μl/ml.

✚ Uleiul esențial de *Foeniculum vulgare* are o activitate antioxidantă mult mai redusă, comparativ cu cele două uleiuri de *Anethum* spp., cu valori cuprinse între 0,57% și 19,50%.

✚ Comparând activitatea antioxidantă a celor cinci uleiuri testate putem afirma că cea mai intensă activitate antioxidantă este prezentă la uleiurile aparținând speciilor *Anethum sowa* și *Anethum graveolens*, urmate de *Foeniculum vulgare*, *Cuminum cyminum* și *Pimpinella anisum*.

✚ Pe baza acestor rezultate, recomandăm utilizarea acestor condimente în prepararea și compoziția unor produse de origine alimentară, atât pentru calitățile gustative cât și pentru capacitatea antioxidantă.

✚ Activitatea antimicrobiană a celor cinci uleiuri luate în studiu a prezentat diferențe semnificative, dependent atât de concentrația uleiului cât și de specia microbiană supusă testării.

✚ Uleiul esențial de *Anethum sowa* a demonstrat o activitate antimicrobiană semnificativă în cazul speciilor bacteriene G+, în special asupra tulpinilor de *S. aureus* și *L. monocytogenes*.

✚ Eficiența uleiului de *Anethum sowa* a fost mai redusă în cazul speciilor *C. perfringens* și *B. cereus*, coeficienți de creștere fiind cuprinși între 67,65% și 97,42%.

✚ Dintre speciile G-, uleiul de *Anethum sowa* a afectat, într-o măsură mai mare, creșterea lui *H. influenzae* și *S. flexneri*, mai puțin afectate fiind *P. aeruginosa*, *E. coli* și *S. typhimurium*.

✚ Rata de creștere a speciilor de *Candida*, în prezența uleiului de *Anethum sowa*, prezintă un tablou evolutiv pozitiv, cu scăderea ratei de creștere, în corelație cu creșterea concentrației.

✚ Rată de inhibare a creșterii bacteriilor G+, în prezența uleiului de *Anethum sowa*, la concentrația de 20 μl/ml, a fost de 53,69% la *S. aureus* și de numai 23,17% la *S. pyogenes*.

✚ Capacitatea de inhibare a uleiului de *Anethum sowa*, împotriva tulpinilor G-, a fost nesemnificativă, cea mai sensibilă fiind *H. influenzae*, cu valori între 17,33% și 37,03%.

✚ Consecutiv acțiunii uleiului de *Foeniculum vulgare*, asupra speciilor G+, cea mai mare rată de creștere a fost înregistrată la *C. perfringens* (99,63%) și *B. cereus* (97,6%), la diluția de 1,25 μl/ml, iar cea mai mică la *S. aureus* (37,19%) la diluția de 20,0 μl/ml.

✚ Rata de creștere a tulpinilor G- a fost influențată de concentrația uleiului de *Foeniculum vulgare*, înregistrându-se un trend descrescător, de la prima la ultima diluție, cu o creștere mai accentuată în cazul speciilor *P. aeruginosa*, *E. coli* și *S. typhimurium*.

✚ Capacitatea de inhibare a creșterii bacteriene, consecutiv acțiunii uleiului de *Foeniculum vulgare*, în cazul tulpinilor G+, este semnificativă asupra speciei *S. aureus* (39,78% - 62,81%), urmată de *S. pyogenes* și *B. cereus*.

✚ Având în vedere rata de inhibare a uleiului de *Foeniculum vulgare*, împotriva speciei *S. aureus*, se poate concluziona că uleiul de fenicul are o activitate antimicrobiană excelentă împotriva acestei specii.

✚ Cea mai slabă activitate antimicrobiană, dintre cele cinci uleiuri testate, a fost constatată la uleiul de *Anethum graveolens*, urmat de uleiul de *Pimpinella anisum* și *Cuminum cyminum*.

✚ Efectul antiinflamator al celor cinci uleiuri, evidențiat prin reacția de inhibare a hemolizei induse de căldură și inhibarea denaturării proteinelor, a fost prezent, diferențiat, la toate uleiurile testate.

✚ Dintre cele cinci uleiuri luate în studiu, uleiurile de *Anethum sowa* și *Anethum graveolens* par a avea cel mai puternic efect antiinflamator, manifestat încă de la concentrația minimă testată.

✚ La concentrația maximă testată, respectiv 200 μl/ml, cele două uleiuri de *Anethum sowa* și *Anethum graveolens* au înregistrat valori ale procentului de inhibare semnificative, aproape jumătate din cele obținute prin utilizarea martorului pozitiv.

✚ Extractul de *Foeniculum vulgare*, utilizat ca preparat imunomodulator și administrat în asociere cu un imunogen, reprezentat de un vaccin anti-*Mycoplasma*, potențează atât răspunsul imun umoral cât și răspunsul imun celular.

✚ Pe baza datelor obținute se recomandă utilizarea extractului apos de *Foeniculum vulgare* în stimularea reactivității imunologice la animale, în asociere cu un imunogen.

Elementele de originalitate ale tezei reies din faptul că aceasta este prima cercetare mai amplă privind activitatea antibacteriană și antifungică a unor plante, cunoscute în special pentru calitățile lor de condimente.

Este prima cercetare mai amplă, efectuată în țară noastră, care demonstrează activitatea antioxidantă, antiinflamatoare și imunomodulatoare a unor plante din familia *Apiaceae*.

Este prima cercetare, efectuată la noi în țară care recomandă utilizarea unor condimente ca potențiali candidați în tratamentul unor boli cu etiologie bacteriană sau fungică.

Demonstrarea activității antimicrobiene față de unele tulpini, cunoscute ca fiind cu risc major în siguranța alimentelor, subliniază posibilitatea utilizării acestor uleiuri, ca noi alternative de aditivi care fie să prelungească termenul de valabilitate la raft al produselor fie să le asigure un grad de contaminare redus în timpul procesării.

Este prima cercetare care prezintă compoziția chimică a uleiului esențial de *Anethum sowa* și rplul unora dintre compușii chimici identificați.

Metodele și coeficienții utilizați pentru evaluarea acțiunii antimicrobiene și antiinflamatoare sunt corelați cu normele europene actuale ale metodologiilor utilizate în cadrul unui laborator de cercetare, metode care succed tehnicile uzuale utilizate până acum din punct de vedere al eficacității, sensibilității și repetabilității.

**PhD Thesis Summary**  
**Research on antimicrobial effect and immunomodulator**  
**of some plants of the *Apiaceae* family**

**This thesis contains:**

*Abstracts in Romanian and English*

*Introduction*

*Part I - Bibliographic research:* 35 pages

*Part II - Own research:* 95 pages

*Tables:* 42

*Figures:* 94

*Bibliography sources:* 337

*List of published scientific papers*

**Purpose and objectives of the research**

The indiscriminate use of antibiotics has resulted in the emergence of resistance in numerous bacterial and fungal species, which is a major problem affecting human and animal health. Currently, resistance to antimicrobial substances represents a real "global crisis" in public health, and one of the most serious threats facing humanity today. Among the microbial germs, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., coagulase-negative *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp., *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli*, are just some of the bacteria to which the phenomenon of resistance is frequently encountered.

These aspects have led to a massive demand for new antibiotics by veterinarians and humans against resistant pathogens, and a particular interest has developed in the scientific community for the use of biological compounds with antimicrobial properties.

As is known, since ancient times, cultivated or spontaneously grown plants constituted, in addition to the main source of food for humans and animals, the "green pharmacy", containing a wealth of biologically active compounds, used in traditional medicine for the treatment of a large number of infectious diseases. And in the Middle Ages, there are accounts of the antibacterial and anthelmintic properties of some plants, often mixed with mineral salts or various biological liquids, to form quite bizarre mixtures, and often dangerous, both for microorganisms and for the host organism.

The interest in medicinal plants grew with the improvement of the extraction and processing techniques of their active products and especially the demonstration of their effectiveness in combating more or less serious diseases. In recent years, researchers from all over the world, from different fields of activity, but especially from human and veterinary medicine, have investigated various plants to detect antibacterial effects.

In recent years, the joint research carried out by botanists, biochemists, microbiologists and pharmacologists has materialized through truly spectacular results, which has contributed to the successful treatment of many infectious, parasitic, medical diseases, including some autoimmune diseases, and in the future we expect the discovery of new components, with superior biological parameters, which will allow obtaining new medicinal formulas.

Based on these considerations, it can be mentioned that, at the present time, natural remedies have become an extremely important branch of modern medicine, both human and veterinary.

Currently, most specialists, including the WHO, state that approximately 70-80% of the population of developing countries still rely on traditional medicine, especially the use of plants, as a true, highly effective tool in the fight against chronic diseases, but also against infectious diseases or immunopathies. Considering the recent important developments in the scientific field, the medicinal properties of plants are of increasing interest, primarily due to their low toxicity, but especially their pharmacological, immunological activities and economic viability.

On the territory of our country there is a large number of medicinal plants, most of them growing spontaneously, not needing special care. Romania has an extremely diverse flora, with over 3,600 plant species, of which over 10% are used in medicine. By their quality and quantity, Romania ranks among the top five countries in the world, ensuring domestic requirements and achieving a large export volume in over 20 countries.

In recent years, in human and veterinary medicine, it is desired to use phytotherapy in as many cases as possible, limiting the excessive use of chemically synthesized drugs. On the basis of these considerations, we have reached the discovery and use of new forms of use of medicinal plants, among which we can mention: oils, extracts, syrups, granules, teas, ointments, etc. The traditional use of each plant is usually guided by its availability and ease of extraction method. There are a variety of extraction methods, using suitable solvents, and the success of the extraction is influenced by the duration of the extraction process, the solvent used, pH and temperature.

With regard to the use of medicinal plants, in the form of oils or extracts, it must be stated that for their therapeutic and pharmaceutical use a thorough knowledge of the active principles is necessary, in order to choose the correct extraction technique. Oily liquids, also called essential oils or volatile oils, are obtained from most components of a plant (leaves, buds, fruits, flowers, etc.) by the hydro-distillation method.

This method was first developed in the Middle Ages by the Arabs and is the most widely used method of commercial extraction of essential oils. Generally less dense than water, essential oils are volatile, clear, lipid-soluble, rarely colored, and soluble in organic solvents. Being natural mixtures of a very complex nature, essential oils can be composed of approximately 20-60 components, at quite different concentrations.

Although the mechanisms of action of some essential oil components have been elucidated in past research, detailed knowledge of most compounds, including their mechanism of action, is still incompletely elucidated. This knowledge is particularly important for determining the effect of essential oils on different microorganisms, the mode of action in combination with other antimicrobial compounds and their interaction with food matrix components.

Research on the antimicrobial and immunomodulatory properties of extracts, essential oils and their constituents, represents, in the current context of the increasingly frequent occurrence of the phenomenon of resistance to antimicrobial substances, of numerous bacterial and fungal species, one of the most important fields of study in medicine. To overcome these problems, the use of essential oils, constituents and possible mixtures of antibiotics with essential oils have been recommended as an alternative method to partially solve this problem. However, little is known about the interactions leading to additive, synergistic or antagonistic effects.

In recent years, due to increasingly negative consumer perceptions related to synthetic preservatives, interest in extracts and essential oils and their application in various products for preservation purposes has been amplified. Moreover, the development of resistance of bacteria and fungi to different antimicrobial agents represents a great challenge for the medical field to treat infections caused by them, and therefore there is an urgent need to search for new antimicrobial alternatives.

The fundamental objective of this research consists in testing the antimicrobial and immunomodulatory efficacy of some essential oils obtained from plants, known for their importance in the food industry, namely *Anethum sowa*, *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare*, *Pimpinella anisum* and *Cuminum cyminum*, all belonging to the *Apiaceae* family.

As secondary objectives, the PhD student proposed: the determination and characterization of the chemical composition and antioxidant activity of each of the oils studied; testing the antimicrobial susceptibility of some Gram-positive, Gram-negative bacteria and two species of *Candida*, to the action of the five oils; determination of the anti-inflammatory capacity of the five oils, using two methods, namely inhibition of heat-induced hemolysis and inhibition of protein denaturation; determination of the immunomodulatory effect, on specific and non-specific immunity, with the help of an aqueous extract obtained from *Foeniculum vulgare* plants.

## **Part I**

### **Current state of knowledge**

It is extended over 35 pages (26.92% of the thesis), being structured in four chapters.

#### **Chapter 1. General characterization of some plants from the *Apiaceae* family**

It contains general and specific information about the five plants, belonging to the *Apiaceae* family, also known as the *Umbelliferae* family. Some of the most well-known plants in this family, such as: cumin, dill (European and Indian), fennel and anise, are known as spices, valued throughout the world, both for their culinary properties and for

their benefits therapeutic. Spices are dry, aromatic parts of plants widely used in food preparation and preservation since ancient times, frequently used to give taste, color and extend the shelf life of food products.

They are also a rich source of therapeutic bioactive compounds such as: proteins, tannins, saponins, terpenes, flavonoids, alkaloids, tannic acids, anthocyanins, coumarins, glucosides, etc. In addition to the beneficial effects on health, in diabetes, cardiovascular diseases, neurodegenerative disorders, reproductive anomalies, cancer, and others, some of these plants also have important antimicrobial and immunomodulatory effects.

The antimicrobial action of some of the plants belonging to the *Apiaceae* family is mainly attributed to the essential oils they contain. These oils have important antibacterial, antifungal and antiviral properties that can help inhibit the growth and development of pathogenic microorganisms, but are also recommended for treating stomach aches, colds, coughs, loss of appetite, rheumatic pains, cognitive disorders, convulsions, inflammation etc.

According to literature data, cumin seeds are well-known for their antioxidant, antibacterial, insecticidal, anti-inflammatory, pain-relieving, anti-tumor, blood platelet disaggregation, anti-allergic, tension-preventing, hyperglycemic, hypoglycemic, antihyperlipidemic, bronchodilator, immunomodulatory, contraceptive, anti-amyloidogenic, anti-osteoporotic, antifungal, including for the protective properties of the nervous system.

The studies carried out so far have shown that dill also has antimicrobial, anti-inflammatory, analgesic, protective effects of the gastric mucosa and antisecretory, relaxing effects on smooth muscles, hyperlipidemia, increasing the concentration of progesterone and many other effects. Also, the methanolic extract of fennel fruit has been reported to exhibit significant antioxidant activity. The well-known properties of *Anethum sowa* (Indian dill) as a traditional medicine in the form of essential oil and various extracts include promising antibacterial, antifungal, antioxidant, insecticidal, anti-inflammatory, antidiabetic, antispasmodic, hypolipidemic, digestive, diuretic and anticancer effects.

## **Chapter 2. Aspects regarding the antimicrobial activity of some plants**

At present, resistance to antimicrobial substances is an extremely serious problem. In veterinary medicine, the phenomenon of antimicrobial resistance represents a serious threat, both for animals and for the products and by-products obtained from them, and the main reason for the increasingly frequent identification of resistance genes in the animal sector is the quantity of antibiotics used in production, which are used either as growth promoters or, inadequately, as low-cost substitutes for hygiene measures that could prevent infections in animals.

In the sub-chapter "Plants with antimicrobial action" are presented the main plants, used as spices, which, by their effect, have proven to be valuable resources of natural antimicrobial compounds, used to treat infections caused by bacteria and other pathogens. To prevent the occurrence of these pathologies, aromatic herbs and spices can be used to prevent the development of undesirable microorganisms in food products and by-products.

In the following sub-chapter "Main plant compounds with antimicrobial effect" it is mentioned that there are a variety of antimicrobial substances, derived from plants and spices, which are used for their bacteriostatic and bactericidal action or to improve the general quality of food products. Next, the main compounds synthesized by plants with particular importance in the competition with pathogenic microorganisms are presented, respectively: alkaloids, flavonoids, essential oils and terpenoids, organic acids, polysaccharides, coumarins and lignans.

## **Chapter 3. Antimicrobial activity of some plants from the *Apiaceae* family**

In the five subchapters, the antimicrobial capacity of the species under study is presented, as follows: the antimicrobial activity of the *Cuminum cyminum* species, supported by a large number of researches that confirm that cumin essential oil has significant antimicrobial properties, against several bacterial strains and fungi; similarly, the essential oil and various extracts from the seeds of *Anethum graveolens* show significant antimicrobial activity against an extremely varied range of microorganisms; the essential oil, extracted from the fruits of *Foeniculum vulgare*, showed antibacterial effect against food-borne pathogens such as *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* etc.; ethyl acetate, dichloromethane, n-hexane, aqueous and methanolic extracts obtained from the seeds and stems of *Anethum sowa* have demonstrated important antimicrobial activity against pathogenic microorganisms such as: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, coagulase-positive staphylococci, staphylococci coagulase-negative, species of *Enterococcus*, *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*; also, anise oil completely inhibited the growth of the fungi *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* and *Fusarium moniliforme*, at a concentration less than or equal to 500 ppm.

## **Chapter 4. Modulation of the immune response**

The concept of non-specific manipulation of the immune response has its roots in some empirical observations, from folk medicine, observations regarding the beneficial effect that a series of organic or inorganic compounds, of different origins, would exert on the defense and healing capacity of the organism.

The term immunomodulator refers to a preparation or a substance that exerts a non-specific influence on the elements and defense mechanisms of the body, thus differentiating it from immunogens, which leave a precise, specific imprint on the system and the immune response. Usually, the name immunomodulator is attributed to products that exert a non-specific influence on the elements and defense mechanisms of the body, thus differentiating them from immunogens, which leave a precise, specific imprint on the system and the immune response.

## **Part II. Own research**

This part extends over 95 pages (73.64% of the thesis) and includes four large chapters, to which general conclusions and original elements are added.

The own research was included in four chapters:

5. Chemical composition and antioxidant activity of some oils obtained from plants belonging to the Apiaceae family.

6. Research on the antimicrobial activity of the essential oils studied.

7. Research on the anti-inflammatory effect of some plants from the Apiaceae family

8. Research on the immunomodulatory effect of an extract of *Foeniculum vulgare*

Each chapter is structured in four subchapters: Purpose and objectives; Materials and methods; Results and discussion; Conclusions.

### **Chapter 5. Chemical composition and antioxidant activity of some oils obtained from plants belonging to the Apiaceae family**

#### ***The objective of the study***

The research focused on the chemical characterization of the five essential oils studied, including the effect of the main isolated compounds, as well as an assessment of the antioxidant capacity.

#### ***Materials and methods***

The essential oils studied came from the following plants, belonging to the *Apiaceae* family: *Anethum sowa* (Indian dill), *Anethum graveolens* (European dill), *Foeniculum vulgare* (fennel), *Pimpinella anisum* (anise) and *Cuminum cyminum* (cumin).

For the chemical characterization of the five essential oils, the gas chromatography-mass spectroscopy (GC/MS) method was used. For the chemical composition of the oils, analyzed by GC-MS, a Shimadzu QP 2010 Plus (Columbia, SC, USA) equipped with an AT WAX 30 m 0.32 mm capillary column was used.

The antioxidant activity was determined by the DPPH method. The method is based on the discoloration of the stable radical DPPH (2,2 diphenyl-picryl-hydrazyl), intensely colored in red-purple and having absorption by the antioxidant substances at 515 nm.

The equipment used was the following: Kern analytical balance with measuring range from 0.0001g to 120g, Telsonic-Ultrasonics TPC-25 ultrasonic bath, Vortex Scientific Industries Genie 2, Sorvall GLC-1 centrifuge and an Analytik Jena Specord multi-detection spectrophotometer 210, with the measurement range between 190 – 1,100 nm.

#### ***Obtained results***

In the chromatographic analysis of *Anethum sowa* essential oil, the main compounds detected were D-limonene (41.491%), 18 carvone (23.074%), apiol (16.218%), D-dihydrocarvone (8.228%) and trans-dihydrocarvone (6.586%), the other 16 compounds identified having concentrations below 1%. We mention that the chemical composition of the essential oil of *Anethum sowa* is described in a small number of specialized studies, this being the most extensive description.

Following the chromatographic analysis of *Anethum graveolens* oil, the main identified compounds were: D-limonene, as the main compound (46.3%), followed by D-carvone (40.84%), Dihydrocarvone (4.35%), Benzyl

Benzoate (2.67%) and Limonene Oxide (1.69%). The other seven compounds, except Caran,4,5-epoxy-,trans (1.05%), were present in very small amounts, below 1.00%.

The results obtained by us have been confirmed by other researchers who claim that both the amount and the chemical composition of dill essential oil (European or Indian) vary according to the parts of the plant and its stage of development at the time of harvest. The chemical composition of the essential oil of the two chemotypes, European dill (*A. graveolens*) and Indian dill (*A. sowa*), are differentiated, especially for the monoterpene contained. Thus, *Anethum sowa* contains large amounts of apiol, while *Anethum graveolens* is rich in carvone. Regarding the concentration of apiol, contained in the essential oils of *Anethum sowa*, it varies from one essential oil to another, which emphasizes that the geographical area and climate can significantly influence the chemical composition.

Analyzing the results regarding the chemical composition of *Foeniculum vulgare* essential oil, we find that of the six chemical constituents, the main compounds identified were: anethole (52.74%), followed by alpha-pinene (18.34%) and D-limonene (12.76%), the other three compounds, identified in a smaller percentage, below 10%, being fenchone, isoanethone and anisaldehyde. Compared to the results of other researchers, the chemical composition obtained by us is different, an aspect that can be explained by the climatic differences, different from one country to another and even from one area to another, the harvest season, including the part of the harvested plant.

In the essential oil of *Pimpinella anisum* the main compounds identified were, in order of concentration: propenylanisole, identified in a very high concentration (72.49%), followed by limonene (10.01%), anisal (5.00%), alpha-pinene (3.26%), betaterpinene (2.51%), linalool (1.96%), alpha-phellandrene (1.82%) and 3-Carene (1.32%). The other five compounds, namely 1-Pentanone, 1-(4-methylphenyl)-, anisaldehyde, p-(Pentyloxy) acetophenone, Thymol and 1-(3-Methyl-2-butenoxy)-4-(1-propenyl) benzene were identified in a much smaller percentage, below 1.00%.

Among the constituents identified in the composition of *Cuminum cyminum* oil, we mention, mainly, ocimene (24.48%), which together with beta-pinene (24.09%), constitute the main constituents. Along with them, gamma-terpinene (20.50%) and cumin-aldehyde (21.24%) were also detected, with fairly close values, followed by 2-Carene-10-al (3.44%), alpha -Pinene (2.69%), D-Limonene (1.29%) and beta.-Myrcene (1.12%). The last two constituents recorded values below 1.00%. Among the identified constituents, we mention the presence of D-limonene and alpha-pinene present in relatively low concentrations, but sufficient to support the antimicrobial activity.

The antioxidant activity of the five essential oils was different from one oil to another, being also influenced by the concentration studied. Thus, for the antioxidant activity of *Anethum sowa* essential oil, the percentage of free radical scavenging activity varied between 15.3286%, a value recorded at the oil concentration of 12.50 µl/ml, and 28.6043%, at the maximum concentration of oil, respectively 200.00 µl/ml.

Regarding the antioxidant activity of *Anethum graveolens* oil, compared to *Anethum sowa* oil, the antioxidant activity is much more intense, the percentage of antioxidant activity has a positive value even from the concentration of 12.5 µl/ml, respectively 24.1365 %, with the mention that at the maximum concentration (20 µl/ml), the value of the antioxidant activity almost reaches a double value, of 45.8580%. In contrast, *Foeniculum vulgare* essential oil has a much lower antioxidant activity, with values between 0.5665% and 19.5025%. The last two oils tested, *Pimpinella anisum* oil and *Cuminum cyminum* oil, recorded negative values for the percentage of free radical scavenging activity.

In conclusion, comparing the antioxidant activity of the five essential oils, it is observed that the highest antioxidant activity is found in the essential oils belonging to the species *Anethum sowa* and *Anethum graveolens*.

## **Chapter 6. Research on the antimicrobial activity of the essential oils studied**

### ***The objective of the study***

The fundamental objective of the research, within this chapter, was to determine the antimicrobial activity of the five essential oils, obtained from plants belonging to the *Apiaceae* family.

### ***Materials and methods***

Microbial reference strains (ATCC) came from the bacterial culture collection of the Microbiology Laboratory of the Interdisciplinary Research Platform within the USVT. The following species were studied: *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Haemophilus influenzae* tip B (ATCC 10211), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19114), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Candida parapsilopsis* (ATCC 22019) and *Candida albicans* (ATCC 10231).



Five essential oils were tested, obtained from: *Anethum graveolens*, *Anethum sowa*, *Foeniculum vulgare*, *Pimpinella anisum* and *Cuminum cyminum*, all belonging to the *Apiaceae* family and obtained from Oleya (Cream Apothecary, Romania).

Antimicrobial susceptibility testing of bacterial and fungal strains was performed by the microdilution method, the CLSI-standardized method for testing bacteria that grow under aerobic conditions, including yeasts and filamentous fungi.

#### **Obtained results**

Analyzing the antimicrobial activity of *Anethum sowa* oil, against G+ strains, we can state that the most significant increase was found in the case of *C. perfringens* and *B. cereus* species, whose growth coefficients varied between 97.42% and 67, 65% Compared to these, the lowest growth was obtained in the case of the *S. aureus* species, with growth rate values of 68.01% in the case of the first concentration and 46.31% in the case of the concentration of 20 µl/ml.

Regarding the growth coefficient, in the case of G- strains, it can be found that the use of *Anethum sowa* oil determined an evolution with a downward trend, with a more pronounced increase in the case of *P. aeruginosa* strains (114.57%) and *E. coli* (106.00%), obtained at the lowest concentrations, while for *H. influenzae* and *S. flexneri* the increase was 82.67% and 86.98%, respectively, at the same concentration, while at 20 µl/ml, the growth rate varied between 84.99% in *E. coli* and 62.97% in *H. influenzae*.

The growth rate of *Candida* strains also showed a positive evolutionary picture, with the decrease in growth rate compared to the increase in the tested concentration. In the case of the *C. parapsilopsis* species, the growth rate values varied between 98.19% and 76.20%, and in the case of the *C. albicans* species, the growth was more intense, with values between 114.61% and 86.85%.

Regarding the ability to inhibit bacterial growth, of *Anethum sowa* oil, there are differences, sometimes significant, from one sample to another, depending on both the bacterial species and the concentration of the tested oil. Thus, in the case of G+ strains, the effectiveness of the oil on *S. aureus* and *L. monocytogenes* species is evident. From the analysis of the results, it is found that the highest growth inhibition rate is found at the concentration of 20 µl/ml, the maximum value (53.69%), being found in *S. aureus*, and the minimum value (23.17%), to *S. pyogenes*. In the case of G- species, *H. influenzae* was the most sensitive, with values between 17.33% at 1.25 µl/ml and 37.03% at 20 µl/ml. Among the two *Candida* species, *Anethum sowa* oil significantly affected the *C. parapsilopsis* strain, with a maximum inhibition value of 23%.

In the case of *Foeniculum vulgare* oil, the highest growth rate was found in *C. perfringens* and *B. cereus* strains, where growth coefficients varied between 99.63% and 74.75%, respectively 97.66% and 78 .07%, with the mention that *S. aureus* had the lowest increase, respectively 60.22% at 1.25 µl and 41.26% at 20 µl/ml. In the G- species, a decreasing trend was also recorded, with a more pronounced increase in the case of *P. aeruginosa* strains (91.25 – 125.53%), *E. coli* (81.05 – 109.14%) and *S. typhimurium* (76.05 – 104.11%). Among *Candida* species, for *C. parapsilopsis* the growth rate values varied between 98.14% to 77.21%, and for *C. albicans* between 99.89% and 76.69%.

Regarding the inhibition rate of fennel oil, it is found that the highest growth inhibition rate is recorded at the concentration of 20 µl/ml, regardless of the nature of the tested microbial species.

The experiments performed demonstrated that *Foeniculum vulgare* essential oil had antimicrobial activity starting from the concentration of 1.25 µl/ml, and against *S. aureus* species, *Foeniculum vulgare* essential oil had excellent antimicrobial activity.

Analyzing the antimicrobial activity of *Anethum graveolens* oil, compared to the two oils above, we can say that it does not influence, except to a small extent, bacterial and fungal growth, even at the dilution of 20.00 µl/ml. We can mention, among the species more sensitive to its action, *S. aureus*, among G+, *E. coli*, among G- and *Candida albicans*, among fungi. Moreover, it was proven that in the case of this oil, the amount tested was insufficient to stop the strain from developing, even proving a "strain-boosting" effect.

*Pimpinella anisum* oil had a very good inhibitory activity, in the case of G+ strains, with values, in the case of the *S. aureus* strain, starting from 28.38% and reaching up to 46.15%, inhibition percentage, in the case of the maximum tested concentration of 20 µl/ml. We find a medium activity, following the use of anise oil, also against the strains of

*S. pyogenes* and *L. monocytogenes*, while the strain of *C. perfringens* demonstrates a special resistance. *Pimpinella anisum* also had strong activity against G-bacteria, the most obvious being the inhibition of the *S. typhimurium* strain, followed by *H. influenzae*, *S. flexneri* and *P. aeruginosa*, with the mention that *E. coli* was the most resistant strain .

The inhibitory activity of *Cuminum cyminum* essential oil, on G- bacterial strains, is weak to average, with values starting from 1.53% and reaching 13.45%, in the case of the *S. aureus* strain, at a concentration of 20 µl/ml.

#### **Chapter 7. Research on the anti-inflammatory effect of some plants from the *Apiaceae* family**

##### ***The objective of the study***

The main objective was to highlight the anti-inflammatory capacity of the five oils by two methods: inhibition of heat-induced hemolysis and inhibition of protein denaturation.

##### ***Materials and methods***

To obtain the erythrocyte suspension, the method described by Okoli et al. (2007), with minor modifications. Thus, to induce heat hemolysis, a mixture of 5 ml of PBS (10 mM) at a pH of 7.4 was made, containing the tested concentrations of essential oil and 100 µl of erythrocyte suspension. The absorbance of the obtained supernatant was measured using the Specord UV-VIS spectrophotometer at a wavelength of 540 nm. All samples were performed in triplicate.

For inhibition of protein denaturation, the working method was as described by Dharmadeva et al. (2018), with minor modifications. Absorbance was also measured using Specord 205 UV-VIS spectrophotometer at a wavelength of 660 nm.

##### ***Obtained results***

The anti-inflammatory activity of the tested oils was confirmed by positive values of the percentage of erythrocyte lysis inhibition, different values depending on the concentration used.

For *Anethum sowa*, the percentage of inhibition was between 4.933% and 37.551%, the anti-inflammatory activity being demonstrated already from the concentration of 12.5 µl/ml. Similarly, the activity of *Anethum graveolens* oil was also found from the first concentration tested, namely 12.5 µl/ml. In the case of this species, the percentage of hemolysis inhibition was 3.975%, at the minimum concentration, after which a constant increase followed at the following concentrations, respectively 6.460% at 25 µl/ml, 10.772% at 50 µl, 22.538% at 100 µl, so that, at 200 µl/ml, the inhibition percentage is approximately ten times higher, compared to the first dilution, reaching 40.142%.

Compared to the two oils above, in the case of *Foeniculum vulgare* essential oil, the results are more varied, the inhibition percentage having a negative value, at the first two concentrations, -11.535 and -0.852%, and the positive results were between 6.655 % and 34.463%

Regarding the anti-inflammatory capacity of *Pimpinella anisum* oil, it is observed that the percentage of inhibition has a negative value, only at the first concentration (12.5 µl/ml), respectively -12.050%, then, starting with the concentration of 25 µl/ml, the inhibition reaction becomes positive, with values between 0.248% and 26.744%.

In conclusion, we can mention that the results regarding the anti-inflammatory capacity of the five tested oils is demonstrated and confirmed for *Anethum sowa* and *Anethum graveolens*, starting from the lowest concentrations, for *Pimpinella anisum* from 25 µl/ml, and for *Foeniculum vulgare* and *Cuminum cyminum* from 50 µl/ml.

The anti-inflammatory activity of *Anethum sowa* oil, determined by the protein denaturation inhibition method, was 100% influenced by the oil concentration. Thus, the inhibition percentages varied between 6.262% and 57.381%, with the mention that between the minimum concentration (12.5 µl/ml) and the maximum concentration (200 µl/ml), there was a difference of 51.12%.

Similar results were also found in the case of *Anethum graveolens* oil, where the inhibition percentage was between 17.495% and 42.277%, which allows us to state that the two *Anethum* spp. oils demonstrated their anti-inflammatory effect, both by the hemolysis inhibition reaction, as well as by the protein denaturation inhibition reaction.

#### **Chapter 8. Research on the immunomodulatory effect of an extract of *Foeniculum vulgare***

##### ***The objective of the study***

The objective of the study was to evaluate the immunomodulatory effect of an aqueous extract of *Foeniculum vulgare*, on the humoral and cellular immune response in pigs, following immunization with an immunogen against contagious agalaxia of sheep and goats.

##### ***Materials and methods***

The research was carried out between July and November 2021, on 30 piglets, aged 40 days, from the Landrace breed, grouped into three experimental groups. The immunogen was represented by an animal vaccine, namely Agalaxin Forte, a vaccine used for active immunization against contagious ovine and caprine agalaxia, and the immunomodulatory preparation was constituted by an aqueous extract of *Foeniculum vulgare*.

The antibody titer was determined using the immunoenzymatic test (ELISA), the indirect variant. Serum lysozyme concentration was determined by the diffusimetric method, taken from S.N. Institut Pasteur S.A., and the serum properdin concentration was established using the colorimetric method. Total leukocytes were determined directly in the hemocytometer, and the leukocyte formula on stained smears by the May - Grünwald - Giemsa method.

#### **Obtained results**

The concentration of properdin registered fairly close values, in the two experimental groups, where the vaccine was administered in association with *Foeniculum vulgare* extract, the highest values being found 21 days after the first vaccination (29.20 mg/100 ml serum) in experimental group 1, in which the immunomodulatory preparation was administered only at the first vaccination. The concentration in properdin, in the group to which the immunogen was administered simultaneously with the extract of *Foeniculum vulgare*, in both vaccinations, was significantly higher than the values recorded in the animals in the control group, but close to those recorded in the experimental group 1.

The evolution of lysozyme was similar to that observed for properdin, with the mention that the average values were significantly lower, compared to those of properdin, in all three lots studied. The phagocytic index showed a dynamic similar to that of lysozyme, the highest values being recorded in animals from group E2, in which the fennel extract was inoculated in two rounds.

The concentration of antibodies increased in all three batches taken into the study, between the initial moment and the second and third collection, there were large differences that varied from one batch to another. These results allow us to state that the aqueous extract of *Foeniculum vulgare* stimulates more intensively the specific defense factors and to a lesser extent the non-specific factors.

The last part of the thesis, includes in chapter 9, "**General conclusions**", the practical aspects that can be deduced from the research carried out, the recommendations for practitioners and the revelation of new aspects, among which we mention:

- ✚ Limonene has important antibacterial activity and can be used in food preservation due to its broad-spectrum bactericidal activity, safety and low toxicity.
- ✚ D-limonene can significantly inhibit gram-negative and gram-positive bacteria as well as fungal activity.
- ✚ Apiol and D-carvone, identified in a significant concentration in *Anethum sowa* and *Anethum graveolens* oils, have antimicrobial, but also antioxidant, antifungal, anticarcinogenic and antiproliferative action.
- ✚ The antioxidant activity of *Anethum sowa* oil recorded positive values, even from the lowest concentration tested (12.5 µl/ml), which allows us to state that the antioxidant activity is in close correlation with the concentration of the tested oil.
- ✚ Compared to *Anethum sowa* oil, the antioxidant activity of *Anethum graveolens* oil is much more intense, the percentage of antioxidant activity having an almost double value, namely 45.86%, value recorded at the concentration of 20 µl/ml.
- ✚ *Foeniculum vulgare* essential oil has a much lower antioxidant activity compared to the two *Anethum* oils, with values between 0.57% and 19.50%.
- ✚ Comparing the antioxidant activity of the five tested oils, we can state that the highest antioxidant activity is present in the oils belonging to the species *Anethum sowa* and *Anethum graveolens*, followed by *Foeniculum vulgare*, *Cuminum cyminum* and *Pimpinella anisum*.
- ✚ Based on these results, we recommend the use of these spices in the preparation and composition of food products, both for their taste qualities and their antioxidant capacity.
- ✚ The antimicrobial activity of the five oils studied showed significant differences, depending on both the concentration of the oil and the microbial species tested.
- ✚ *Anethum sowa* essential oil demonstrated significant antimicrobial activity against G+ bacterial species, particularly *S. aureus* and *L. monocytogenes* strains.

✚ The efficiency of *Anethum sowa* oil was lower in the case of *C. perfringens* and *B. cereus* species, with growth coefficients ranging between 67.65% and 97.42.

✚ Among G- species, *Anethum sowa* oil affected, to a greater extent, the growth of *H. influenzae* and *S. flexneri*, less affected being *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. typhimurium*.

✚ The growth rate of *Candida* species, in the presence of *Anethum sowa* oil, shows a positive evolutionary picture, with the decrease in the growth rate, in correlation with the increase in concentration.

✚ The growth inhibition rate of G+ bacteria, in the presence of *Anethum sowa* oil, at the concentration of 20  $\mu$ l, was 53.69% for *S. aureus* and only 23.17% for *S. pyogenes*.

✚ The inhibition capacity of *Anethum sowa* oil, against G- strains, was insignificant, the most sensitive being *H. influenzae*, with values between 17.33% and 37.03%.

✚ Following the action of *Foeniculum vulgare* oil, on G+ species, the highest growth rate was recorded for *C. perfringens* (99.63%) and *B. cereus* (97.6%), at the dilution of 1.25  $\mu$ l, and the lowest in *S. aureus* (37.19%) at the dilution of 20.0  $\mu$ l.

✚ The growth rate of G- strains was influenced by *Foeniculum vulgare* oil, registering a decreasing trend, from the first to the last dilution, with a more pronounced increase in the case of *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. typhimurium* species.

✚ The ability to inhibit bacterial growth, following the action of *Foeniculum vulgare* oil, in the case of G+ strains, is significant on the *S. aureus* species (39.78% - 62.81%), followed by *S. pyogenes* and *B. cereus*.

✚ Considering the inhibition rate of fennel oil against *S. aureus*, it can be concluded that fennel oil has excellent antimicrobial activity against this species.

✚ The weakest antimicrobial activity, among the five essential oils tested, was found in *A. graveolens* oil, followed by *Pimpinella anisum* and *Cuminum cyminum* oil.

✚ The anti-inflammatory effect of the five oils, evidenced by the heat-induced hemolysis inhibition reaction and inhibition of protein denaturation, was differentially present in all tested oils.

✚ Among the five oils taken in the study, *Anethum sowa* and *Anethum graveolens* oils appear to have the strongest anti-inflammatory effect, manifested even from the lowest concentration tested.

✚ At the maximum concentration tested, respectively 200  $\mu$ l/ml, the two *Anethum sowa* and *Anethum graveolens* oils recorded significant inhibition percentage values, almost half of those obtained by using the positive control (dexamethasone).

✚ *Foeniculum vulgare* extract, used as an immunomodulatory preparation and administered in association with an immunogen, represented by an anti-*Mycoplasma* vaccine, potentiates both the humoral immune response and the cellular immune response.

✚ Based on the data obtained, it is recommended to use the aqueous extract of *Foeniculum vulgare* in stimulating immunological reactivity in animals, in association with an immunogen.

✚ The original elements of the thesis arise from the fact that this is the first larger research on the antibacterial and antifungal activity of some plants, known especially for their spice qualities.

✚ It is the first larger research, carried out in our country, which demonstrates the antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory activity of some plants from the Apiaceae family.

✚ It is the first research carried out in our country that recommends the use of spices as potential candidates in the treatment of diseases with bacterial or fungal etiology.

✚ The demonstration of antimicrobial activity against some strains, known to be of major risk in food safety, underlines the possibility of using these oils as new alternative additives that either extend the shelf life of the products or ensure a reduced degree of contamination in processing time.

✚ It is the first research to present the chemical composition of *Anethum sowa* essential oil and the role of some of the identified chemical compounds.

✚ The methods and coefficients used to evaluate the antimicrobial and anti-inflammatory action are correlated with the current European norms of the methodologies used in a research laboratory, methods that succeed the usual techniques used so far in terms of effectiveness, sensitivity and repeatability.

The original elements of the thesis arise from the fact that this is the first larger research on the antibacterial and antifungal activity of some plants, known especially for their spice qualities.

It is the first larger research, carried out in our country, which demonstrates the antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory activity of some plants from the *Apiaceae* family.

It is the first research carried out in our country that recommends the use of spices as potential candidates in the treatment of diseases with bacterial or fungal etiology.

The demonstration of antimicrobial activity against some strains, known to be of major risk in food safety, underlines the possibility of using these oils as new alternative additives that either extend the shelf life of the products or ensure a reduced degree of contamination in processing time.

It is the first research to present the chemical composition of *Anethum sowa* essential oil and the role of some of the identified chemical compounds.

The methods and coefficients used to evaluate the antimicrobial and anti-inflammatory action are correlated with the current European norms of the methodologies used in a research laboratory, methods that succeed the usual techniques used so far in terms of effectiveness, sensitivity and repeatability.