

Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Școala Doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT
SEPARAREA ȘI CARACTERIZAREA UNOR COMPUȘI
ORGANICI DIN SOIURI ROMÂNEȘTI DE PLANTE
AROMATICE
(Rezumatul tezei de doctorat)

Doctorand,
Fănică Bălănescu

Președinte	Acad. prof. dr. ing. Eugen Victor Cristian Rusu Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Conducător științific	Prof. univ. dr. chim. habil. Rodica Mihaela Dinică Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Referenți științifici	Prof. univ. dr. chim. habil. Petre Ioniță Universitatea din București CS. grad I dr. chim. habil. Luminița Marin Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași Prof. univ. dr. chim. habil. Geta Cârâc Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați

Seria C: Chimie Nr. 6

Galați, 2023

Seriile tezelor de doctorat susținute public în UDJG începând cu 1 octombrie 2013 sunt:

Domeniul fundamental ȘTIINȚE INGINEREȘTI

- Seria I 1: **Biotehnologii**
- Seria I 2: **Calculatoare și tehnologia informației**
- Seria I 3: **Inginerie electrică**
- Seria I 4: **Inginerie industrială**
- Seria I 5: **Ingineria materialelor**
- Seria I 6: **Inginerie mecanică**
- Seria I 7: **Ingineria produselor alimentare**
- Seria I 8: **Ingineria sistemelor**
- Seria I 9: **Inginerie și management în agricultură și dezvoltare rurală**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE ECONOMICE

- Seria E 1: **Economie**
- Seria E 2: **Management**
- Seria SSEF: **Știința sportului și educației fizice**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE UMANISTE

- Seria U 1: **Filologie - Engleză**
- Seria U 2: **Filologie - Română**
- Seria U 3: **Istorie**
- Seria U 4: **Filologie - Franceză**

Domeniul fundamental MATEMATICĂ ȘI ȘTIINȚE ALE NATURII

- Seria C: **Chimie**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE BIOLOGICE ȘI BIOMEDICALE

- Seria M: **Medicină**

CUPRINS

INTRODUCERE	13
PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRII	27
Capitolul 1. Caracterizarea speciilor de plante aromatice studiate – Analiza datelor din literatura de specialitate	29
1.1. Caracterizarea morfologică a speciilor studiate	29
1.2. Compoziția chimică și potențialul terapeutic al plantelor aromatice studiate	39
1.2.1. Clase importante de compuși chimici prezenți în plantele studiate	40
1.2.2. Importanța terapeutică a speciilor studiate	50
1.2.3. Concluzii parțiale	52
Partea a II-a CONTRIBUȚII PERSONALE	53
Capitolul 2. Pregătirea materialului vegetal și separarea compușilor biologic activi	55
2.1. Introducere	55
2.2. Obiective principale	55
2.3. Prelevarea și caracterizarea materialului vegetal	55
2.4. Extracția și separarea compușilor biologic activi din speciile studiate	57
2.5. Rezultate și discuții	60
2.6. Concluzii parțiale	63
Capitolul 3. Analiza cromatografică și spectrală a compușilor organici naturali separați din plantele aromatice studiate	65
3.1. Introducere	65
3.2. Analiza compușilor organici naturali prin tehnica cromatografică HPTLC	66
3.2.1. Obiective principale	66
3.2.2. Materiale și metode	66
3.2.3. Rezultate și discuții	67
3.2.4. Concluzii parțiale	70
3.3. Analiza compușilor organici naturali prin tehnica GS-MS	70
3.3.1. Obiective principale	70
3.3.2. Materiale și metode	71
3.3.3. Rezultate și discuții	71
3.3.4. Concluzii parțiale	90

3.4. Analiza compușilor organici naturali prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC-DAD)	91
3.4.1. Obiective principale	91
3.4.2. Materiale și metode	91
3.4.3. Rezultate și discuții	91
3.4.4. Concluzii parțiale	97
3.5. Analiza compușilor organici naturali prin cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă	98
3.5.1. Obiective principale	98
3.5.2. Materiale și metode	98
3.5.3. Rezultate și discuții	99
3.5.4. Concluzii parțiale	102
3.6. Analiza compușilor organici naturali prin spectrometrie ^1H – RMN	102
3.6.1. Obiective principale	102
3.6.2. Materiale și metode	102
3.6.3. Rezultate și discuții	103
3.6.4. Concluzii parțiale	108
Capitolul 4. Analiza electrochimică a compușilor cu activitate antioxidantă prezenți în plantele studiate	111
4.1. Introducere	111
4.2. Obiective principale	111
4.3. Materiale și metode	112
4.3.1. Considerații privind metodele electrochimice - metode voltametrice	113
4.4. Rezultate și discuții	117
4.4.1. Evaluarea electrochimică a activității antioxidante a compușilor chimici prezenți în probele de ulei esențial obținut din speciile de <i>Ocimum basilicum</i>	117
4.4.2. Evaluarea electrochimică a activității antioxidante a compușilor chimici prezenți în probele de ulei esențial din <i>Agastache foeniculum</i> (AdB)	137
4.4.3. Evaluarea electrochimică a activității antioxidante a extractelor alcoolice obținute din specii hibride de <i>O. basilicum</i>	139
4.5. Concluzii parțiale	142
Capitolul 5. Cuantificarea unor clase de compuși organici prezenți în speciile studiate și evaluarea unor proprietăți biologice active	145
5.1. Introducere	145

5.2. Obiective principale	147
5.3. Materiale și metode	147
5.3.1. Determinarea cantitativă a polifenolilor totali	147
5.3.2. Determinarea cantitativă a flavonoidelor	148
5.3.3. Evaluarea potențialului antioxidant	149
5.3.3.1. Evaluarea activității antioxidante utilizând metoda de inhibare a radicalului liber DPPH	151
5.3.3.2. Evaluarea activității antioxidante utilizând metoda ABTS	152
5.3.3.3. Evaluarea activității antioxidante utilizând metoda FRAP	153
5.3.4. Evaluarea potențialului citotoxic al unor compuși biologic activi din speciile analizate	153
5.3.5. Evaluarea potențialului inhibitor al unor compuși din speciile analizate asupra xantin oxidazei (XO)	154
5.3.6. Analize statistice	154
5.4. Rezultate și discuții	155
5.4.1. Conținutul total de polifenoli	155
5.4.2. Conținutul total de flavonoide	155
5.4.3. Potențialul antioxidant	156
5.4.3.1. Evaluarea activității antioxidante prin inhibarea radicalului liber DPPH	156
5.4.3.2. Activitatea antioxidantă utilizând metoda ABTS	163
5.4.3.3. Activitatea antioxidantă utilizând metoda FRAP	166
5.4.4. Potențialul citotoxic asupra celulelor tumorale	166
5.4.5. Inhibarea xantin oxidazei de către unii compuși din speciile analizate	173
5.5. Concluzii parțiale	174
Capitolul 6. Analiza unor izoflavonoide separate din speciile analizate prin studii in silico (modelare moleculară)	175
6.1. Introducere	175
6.2. Obiective principale	176
6.3. Materiale și metode	176
6.3.1. Descrierea metodelor de analiză aplicate	176
6.3.2. Etapele procedurii computaționale	177
6.4. Rezultate și discuții	182
6.4.1. Structurile moleculare optimizate ale compușilor studiați	182

6.4.2. Compararea structurii de raze X cu structura moleculară optimizată pentru genisteină	183
6.4.3. Evaluarea parametrilor electronici ai compușilor studiați	186
6.4.4. Evaluarea unor parametri privind biodisponibilitatea compușilor studiați	189
6.4.5. Rezultatele andocării moleculare	190
6.5. Concluzii parțiale	197
Capitolul 7. Concluzii generale și originalitatea contribuțiilor	199
7.1. Concluzii generale	199
7.2. Perspective de continuare a cercetărilor	202
Capitolul 8. Diseminarea rezultatelor	203
8.1. Lista publicațiilor originale	203
8.2. Participarea la conferințe internaționale și naționale	203
ANEXE	205
Referințe bibliografice	211

INTRODUCERE

Plantele au reprezentat surse de hrană dar și de medicamente încă din cele mai vechi timpuri [1]. În medicina tradițională se folosesc plantele atât pentru proprietățile lor curative, cât și pentru prevenirea unor boli [2,3]. Atunci când sunt utilizate în scopuri preventive, adică pentru menținerea sănătății generale, unele plante medicinale pot fi clasificate și ca alimente funcționale și/sau nutraceutice. Un bun exemplu îl constituie condimentele care, pe lângă utilizarea lor ca sursă de compuși de aromă pentru diverse produse alimentare, au și rolul de a ajuta la prevenirea diferitelor afecțiuni precum cele metabolice, respiratorii sau mentale [4,5].

De-a lungul secolelor, cunoștințele empirice despre beneficiile plantelor medicinale în medicina alternativă au fost transmise din generație în generație, iar cercetătorii din întreaga lume au arătat un interes tot mai mare pentru studierea compoziției chimice a plantelor și a efectelor lor terapeutice, cu scopul de a argumenta științific aceste proprietăți [6,7]. Plantele sintetizează o gamă largă de compuși organici care sunt clasificați ca metaboliți primari și secundari [8]. Metaboliții primari sunt compuși care au roluri esențiale asociate cu diferite procese fiziologice precum fotosinteza, respirația, creșterea și dezvoltarea. Dintre aceștia, pot fi amintiți carbohidrații, lipidele sau aminoacizii [9].

Sub denumirea de metaboliți secundari sunt cunoscuți compușii fitochimici care se acumulează în concentrații variate în unele specii de plante și care nu sunt imperios necesari pentru dezvoltarea și reproducerea celulară, dar joacă în schimb un rol important în mecanismele de apărare a plantelor [10–13]. Mulți compuși naturali care fac parte din categoria metaboliților secundari sunt în prezent compuși de interes în diverse domenii. În acest context, s-au separat și caracterizat numeroși compuși pentru aplicațiile acestora în diverse ramuri ale industriei, precum domeniile farmaceutic, cosmetic sau alimentar (medicamente, antiseptice, dezinfectante, insecticide, erbicide, coloranți, agenți de aromatizare sau parfumuri) [14,15].

În ultimii ani, rolul protector al unor metaboliți secundari din alimentele pe bază de plante a fost foarte studiat devenind un domeniu de cercetare din ce în ce mai important pentru nutriția umană [16]. Studiile arată că acești metaboliți nu sunt esențiali pentru bunăstarea pe termen scurt, dar sunt dovezi bine argumentate care arată că aporturile mici pe termen lung pot avea un impact favorabil asupra incidenței bolilor incurabile, cronice, inclusiv cele cardiovasculare și diabetul de tip II, care apar în populațiile occidentale cu o frecvență tot mai mare [4]. În concluzie, compușii chimici biosintetizați de plante au fost și continuă să fie analizați pentru proprietățile lor biologic-active și apoi separați, izolați, purificați sau sintetizați pentru a fi utilizați în scop terapeutic [17,18].

Teza de doctorat intitulată: „*Separarea și caracterizarea unor compuși organici din soiuri românești de plante aromatice*” cuprinde șase capitole. În primul capitol este prezentat stadiul actual al cercetării și cuprinde analiza datelor din literatura de specialitate despre caracterizarea speciilor de plante aromatice studiate. În următoarele cinci capitole este prezentată, contribuția personală originală referitoare la compoziția chimică și unele proprietăți biologice ale speciilor de plante aromatice studiate, respectiv *Ocimum basilicum*, *Ocimum citriodorum*, *Agastache foeniculum*, *Pimpinella anisum*, *Carum carvi* și *Illicium verum*.

Obiectivul general al tezei de doctorat „*Separarea și caracterizarea unor compuși organici din soiuri românești de plante aromatice*” a fost caracterizarea compoziției chimice din șase specii de plante aromatice, soiuri cultivate în România, trei specii aparținând familiei *Lamiaceae*: *Ocimum basilicum*, *Ocimum citriodorum* și *Agastache foeniculum*, două specii de plante aparținând familiei *Apiaceae*: *Pimpinella anisum* și *Carum carvi*, și o specie aparținând familiei *Schisandraceae*: *Illicium verum*. În cadrul tezei de doctorat au fost caracterizate șase soiuri de plante aromatice prin aplicarea de diverse metode de analiză în funcție de natura probelor obținute, în acord cu direcțiile actuale de cercetare din domeniul chimiei compușilor naturali din plante. Astfel, într-o primă etapă s-au identificat, separat și caracterizat unii compuși

fitochimici din speciile analizate, utilizând metode diverse și moderne de analiză precum metodele spectrofotometrice, cromatografice HPTLC, HPLC, GC și spectrale precum MS, IR și RMN.

Un alt obiectiv al acestei teze a constat în găsirea unor noi utilizări practice pentru compușii organici identificați în aceste specii de plante prin studii preliminare *in vitro* și *in silico* și prin studii ale activității biologice ale unora dintre acești compuși.

În cadrul celor șase capitole ale tezei sunt prezentate rezultatele originale obținute în cadrul experimentelor realizate, în strânsă dependență cu datele din literatura de specialitate.

Obiectivele specifice propuse ale tezei de doctorat au fost următoarele:

- Prelevarea materialului vegetal de la Stațiunea de Cercetare - Dezvoltare pentru Legumicultură Buzău, România, și pregătirea probelor pentru analize;
- Caracterizarea materialului vegetal, plantele aromatice *Ocimum basilicum*, *Ocimum citriodorum*, *Agastache foeniculum*, *Pimpinella anisum*, *Carum carvi* și *Illicium verum*, soiuri cultivate în România, cu ajutorul microscopiei de scanare laser confocală;
- Extracția cu solvenți, prin metode aparținând chimiei verzi a compușilor organici naturali din speciile de plante aromatice *Ocimum basilicum*, *Ocimum citriodorum*, *Agastache foeniculum*, *Pimpinella anisum*, *Carum carvi* și *Illicium verum*;
- Extracția uleiurilor volatile din speciile de plante aromatice *Ocimum basilicum*, *Ocimum citriodorum*, *Agastache foeniculum*, *Pimpinella anisum*, *Carum carvi* și *Illicium verum*;
- Analiza calitativă și cantitativă a compușilor organici naturali extrași cu solvenți organici utilizând cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă (HPLC-DAD și UHPLC-MS);
- Caracterizarea prin spectrometrie RMN a uleiurilor esențiale obținute din speciile de plante aromatice studiate, *Ocimum basilicum*, *Ocimum citriodorum*, *Agastache foeniculum*, *Pimpinella anisum*, *Carum carvi* și *Illicium verum*;
- Identificarea și cuantificarea unor clase de compuși organici, polifenoli și flavonoide, din speciile de plante studiate;
- Evaluarea potențialului antioxidant al compușilor biologic activi din speciile de plante aromatice studiate, prin metode microspectrofotometrice de inhibare a radicalilor liberi, precum DPPH, FRAP și ABTS ;
- Evaluarea potențialului antioxidant al compușilor biologic activi din speciile de plante aromatice studiate prin metode electrochimice – voltametria ciclică;
- Interacția unor izoflavonoide identificate în speciile de plante aromatice studiate cu fosfatidilinozitol 3-kinaza alfa și xantinoxidaza prin studii *in silico*.

Cuvinte cheie: compuși fitochimici, plante aromatice, extracte din plante, uleiuri esențiale, compuși bioactivi, analize structurale, cromatografie, studii *in silico*.

PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRII

Capitolul 1. Caracterizarea speciilor de plante aromatice studiate – Analiza datelor din literatura de specialitate

1.1. Caracterizarea morfologică a speciilor studiate

Familia *Lamiaceae*

Descrierea speciilor *Ocimum*

a. *Ocimum basilicum* L. este o specie autohtonă asiatică din familia *Lamiaceae*. Planta poate ajunge până la 65 cm înălțime, având frunzele de culoare verde deschis, mătăsoase, cu lungimi cuprinse între 1,5–5 cm și late de circa 1–3 cm [64]. Clasificarea taxonomică a speciei *Ocimum basilicum* include regnul *Plantae*, diviziunea *Magnoliophyta*, din clasa *Magnoliopsida*, ordinul *Lamiales* [65].

Datorită compușilor săi fenolici și aromatici, busuiocul a demonstrat activități antioxidante, demonstrate prin capacitatea de inactivare a radicalilor liberi [76,77] și antimicrobiene [78–81]. Principalele componente fenolice prezente în busuioc sunt acizii fenolici și flavonol-glicozidele [80,82–86]. Prezența derivaților acidului cafeic au fost raportați la busuioc [82,83,85–87], dar nu au fost raportate profiluri fenolice complete ale busuiocului. Dintre derivații de acid cafeic din busuioc, acizii cicoric și caftaric sunt acizii fenolici majoritari [88] care prezintă activități antioxidante [89].

b. Specia *Ocimum citriodorum* sau busuioc lămâios, este a doua specie de busuioc analizată în acest studiu și este cunoscută a fi un soi obținut prin polenizare încrucișată din două chemotipuri de busuioc dulce: *Ocimum basilicum* și *Ocimum americanum* [64,91,92] (Figura 1.3).

Busuiocul lămâios este o plantă anuală puternic aromată și cu un parfum de lămâie datorat prezenței citralului sub forma izomerilor săi geometrici, neral și geranial [93]. Datorită parfumului și aromei sale de lămâie se poate folosi ca sursă de aromă de citrice și ca alternativă la lămâie și alte plante botanice cu parfum de lămâie.

Descrierea speciei *Agastache foeniculum* (*Lophantus anisatus*)

Genul *Agastache* face parte din familia *Lamiaceae* și include 22 de specii de plante ornamentale și medicinale perene [107].

Agastache foeniculum are frunze parfumate și flori de culoare violet, fiind utilizat pe scară largă în scop ornamental datorită aspectului și aromelor plăcute asemănătoare anasonului, dar și pentru aromatizarea dulciurilor și a altor alimente [108]. Această plantă este folosită sub formă de ceaiuri care sunt preferate în special de nativii americani în scopuri terapeutice, cum ar fi ameliorarea diferitelor simptome de răceală, febră, tuse, boli de inimă, inflamații și dureri [109].

Plantă perenă erbacee și aromatică, este originară din America de Nord și a fost menționată în alte studii sub numele de isop de anason, *Lophantus anisatus*, isop uriaș albastru, isop uriaș flagrant sau isop uriaș de lavandă [110–113].

Clasificarea taxonomică a speciei *Agastache foeniculum* include regnul *Plantae* diviziunea *Magnoliophyta*, clasa *Magnoliopsida* și ordinul *Lamiales* [112].

Profilul fitochimic al acestor plante include metaboliți nevolații aparținând mai multor clase precum flavonele și flavonele glicozilate (o malonilflavonă dimerică rară - agastachină, agastachozidă, acacetină, apigenină, tilianină, miricetină, luteolină) [108,122], compuși fenolici (acid rosmarinic, acid cafeic) [123], lignani (agastenol, agastinol) [124], terpenoide inclusiv triterpenoide (betulina, acid betulinic, acid maslinic, acid oleanolic, β -amirina, acid ursolic, acid

corosolic, α -amirina), diterpene (agastachinonă, agastol) și steroli [108,111,125]. Metaboliți volatili au fost raportați în compoziția sa chimică, cum ar fi estragol, pulegona, eugenol, metileugenol, mentonă, izomentonă, spathulenol [111–113,126,127]. Conform datelor din literatură, randamentul de ulei esențial obținut din *Agastache foeniculum* (planta uscată) variază de la 0,02 până la 3% (mL/g) [94,113,117,118,128–130].

Familia *Apiaceae* (*Umbelifere*)

Speciile *Pimpinella anisum* și *Carum carvi* fac parte din această familie a *Apiaceelor* și ale căror compoziții chimice, compușii naturali din aceste specii precum și unele dintre proprietățile lor biologice au fost studiate în această teză.

a. Descrierea speciei *Pimpinella anisum* (sau anason)

Pimpinella anisum, este o plantă anuală cunoscută sub denumirea populară de anason, are o înălțime de aproximativ 30-60 cm, cu mici inflorescențe de culoare albă, și semințe mici, ovale, caracterizate de miros și aromă dulce aromat (Figura 1.6) [134].

Clasificarea taxonomică a speciei *Pimpinella anisum*: regnul: *Plantae*; subregnul: *Tracheobionta*; superdiviziunea: *Spermatophyta*; diviziunea: *Magnoliophyta*; clasa: *Magnoliopsida*; subclasa: *Rosidae*; ordinul: *Apiales*; familia: *Apiaceae*; genul: *Pimpinella*; specia: *Anisum*; denumirea științifică: *Pimpinella anisum* [135].

Specia *Pimpinella anisum* L este cunoscută din cele mai vechi timpuri în medicina tradițională asiatică pentru proprietățile sale dezinfectante, antifungice, antimicrobiene, antivirale, antioxidante, anticoagulante și antiinflamatoare [136–140].

b. Descrierea speciei *Carum carvi* (sau chimen)

Chimenul (*Carum carvi*) este o plantă bienală, iar în formele cultivate este, de asemenea, o plantă anuală, originară din Europa și vestul Asiei (Figura 1.8).

Clasificarea taxonomică a speciei *Carum carvi*: domeniul: *Eukaryotae*; regnul: *Plantae*; subregnul: *Tracheobionta*; supradiviziunea: *Spermatophyta*; diviziunea: *Magnoliophyta*; clasa: *Magnoliopsida*; subclasa: *Rosidae*; ordinul: *Apiales*; familia: *Apiaceae*; genul: *Carum*; specia: *Carvi* L. [145].

Planta aparține familiei *Apiaceae* și provine din zonele temperate din Asia de Vest și este în prezent cultivată în principal în Polonia, Ungaria și Maroc fiind planta medicinală și condimentară cunoscută din cele mai vechi timpuri [148].

Familia *Schisandraceae* (*Illiciaceae*)

Descrierea speciei *Illicium verum* (anason stelat)

Illicium verum este cunoscut și ca anason stelat sau anason stelat chinezesc și este membru al familiei *Schisandraceae*. Clasificarea taxonomică a speciei *Illicium verum* este: regnul: *Plantae*; diviziune: *Magnoliophyta*; clasă: *Magnoliopsida*; ordin: *Austrobaileyales*; familie: *Schisandraceae* (*Illiciaceae*); gen: *Illicium*; specie: *Verum* [135].

Illicium verum este un copac sau un arbust veșnic verde, bine ramificat, care măsoară în jur de 8–15 m înălțime [180]. A fost inclus în familia *Illiciaceae* (*Badianaceae*) în clasificarea sistematică mai veche. În sistemul APG IV (2016), *Illicium verum* este clasificat în genul *Illicium* aparținând familiei *Schisandraceae* [181,182]. Scoarța plantelor *I. verum* este de culoare albă până la gri deschis. Frunzele sunt de culoare verde deschis, lanceolate și alterne, măsoară 6 până la 12 cm lungime și sunt situate la capetele ramurilor [135,183,184]. Florile sunt solitare,

bisexuale, de culoare alb-gălbuie sau verzuie și au un diametru de 1–7 cm. Ele cresc fie singure, fie aranjate în ciorchini [183]. Fructul are formă de stea și are 6-10 foliculi asemănători capsulei cu câte o sămânță maro mică în interiorul fiecăruia. Semințele sunt ovoide cu o suprafață lucioasă și netedă. Fiecare parte a fructului poartă un miros aromat [183,184].

1.2.2. Importanța terapeutică a speciilor studiate

Proprietăți farmacologice

Familia *Lamiaceae* cuprinde specii importante, conținând constituenți fitochimici activi și care prezintă o gamă largă de activități farmacologice și biologice. Plantele din această familie luate în studiu reprezintă surse bogate de compuși cu proprietăți antioxidante, recunoscute și pentru proprietățile lor antibacteriene, antitumorale, antihelmintice, hipolipemiente, antihepatotoxice și antidiabetice [70,254,255].

Proprietățile farmacologice ale speciilor studiate se datorează unor compuși chimici care produc o acțiune fiziologică importantă asupra corpului uman. Cercetările *in vivo* pe aceste specii studiate au demonstrat numeroase proprietăți biologice, cum ar fi cardioprotectoare, hepatoprotectoare, antidiabetice, de reducere a efectelor stresului oxidativ, a inflamației și a proliferării celulelor canceroase [255].

Flavonoidele prezente în busuioc au atras interesul datorită activităților antiinflamatorii, analgezice, antitumorale, antimicrobiene, antioxidante și imunostimulante a extractelor din această plantă [23].

Partea a II-a CONTRIBUȚII PERSONALE

Capitolul 2. Pregătirea materialului vegetal și separarea compușilor biologic activi

2.3. Prelevarea și caracterizarea materialului vegetal

Soiurile analizate de busuioc au fost cultivate și recoltate la Stațiunea de Cercetare - Dezvoltare pentru Legumicultură (SCDL) Buzău, România. Cele două soiuri noi de busuioc studiate în această teză au fost înregistrate ca soiuri românești de SCDL Buzău și denumite „Aromat de Buzău” (*Ocimum basilicum*) și „Macedon” (*Ocimum citriodorum*). Pentru analiza materialului vegetal, plantele au fost cultivate prin semănare în martie 2019, răsădite în câmp deschis în aprilie 2019 și recoltate la maturitate plantele cu inflorescență, la începutul lunii august 2019 (Figura 2.1).



Figura 2.1. Culturile de *O. basilicum* „Aromat de Buzău” (a) și *O. citriodorum* „Macedon” (b)

O specie nouă de *Lophanthus*, *Agastache foeniculum* soiul „Aromat de Buzău”, a fost adaptată la condițiile climatice din România și cultivată de asemenea la SCDL Buzău. Pentru analiza materialului vegetal, plantele au fost cultivate prin semănare în martie 2020 și recoltate la maturitate plantele cu inflorescență, la începutul lunii august 2020 (Figura 2.2).



Figura 2.2. Culturi de *Lophanthus* (*Agastache foeniculum* soiul „Aromat de Buzău”)

Părțile aeriene întregi ale plantelor din familia *Lamiaceae* (tulpini, frunze, flori, semințe) au fost uscate la temperatura camerei, mărunțite cu ajutorul unei râșnițe electrice (râșnița Heinner, Grinder Optim150, 150W, 50/60 Hz, China) și supuse extracțiilor asistate de ultrasunete și prin hidrodistilare.

Două specii de plante din familia *Apiaceae*: anason boabe (*Pimpinella anisum*) și chimen (*Carum Carvi*) au fost analizate pentru a determina dacă potențiază efectul biologic activ al noilor soiuri de plante din familia *Lamiaceae*. Semințele au fost obținute în august 2019 de la SCDL Buzău (Figura 2.3).

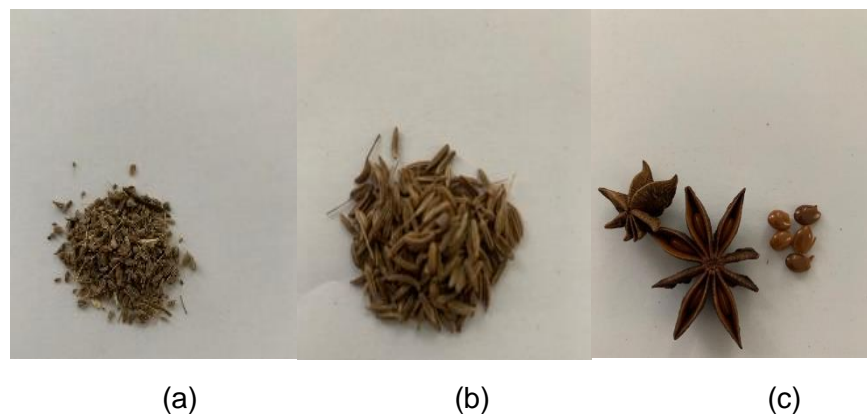


Figura 2.3. Semințe de (a) anason boabe (*Pimpinella anisum*), (b) chimen (*Carum Carvi*), și (c) anason stelat (*Illicium verum*)

2.4. Extracția și separarea compușilor biologic activi din speciile studiate

Extracția din materialele vegetale din acest studiu a compușilor biologic activi s-a realizat prin următoarele metode de extracție:

- a) *extracția simplă cu solvenți asistată de ultrasunete*
- b) *extracția secvențială cu solvenți asistată de ultrasunete (ESUS)*
- c) *extracția prin hidrodistilare (HD)*

2.5. Rezultate și discuții

Cele două soiuri de busuioc selectate pentru acest studiu, *Ocimum basilicum* L. „Aromat de Buzău” și *Ocimum citriodorum* „Macedon”, se remarcă prin aromele specifice ale tuturilor organelor plantelor, mentolată pentru primul soi și respectiv de lămâie pentru cel de-al doilea.

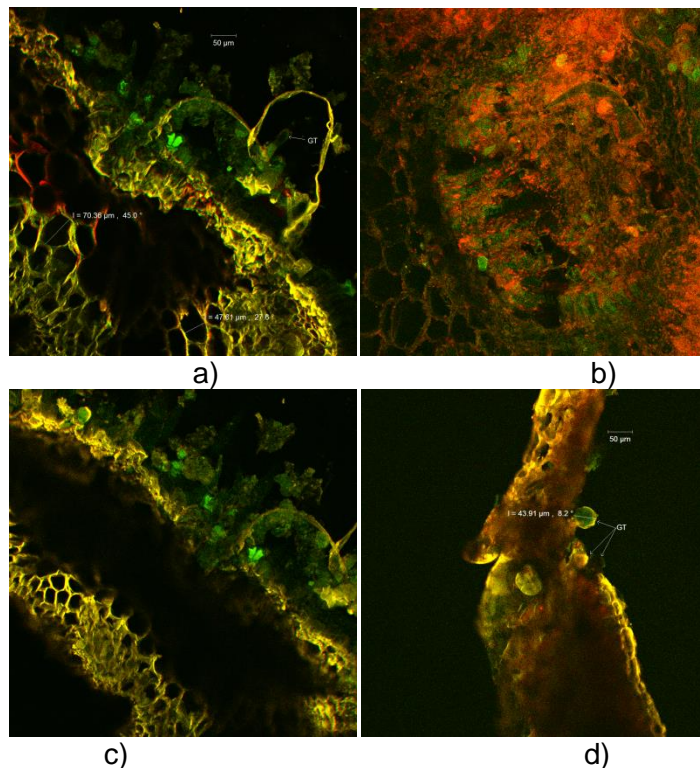


Figura 2.7. Imaginea secțiunii transversale prin (a) tulpină de *O. Basilicum* și (b) *O. Citriodorum*, respectiv prin frunze (c) de *O. Basilicum* și (d) *O. Citriodorum* observate folosind CLSM

Secțiunile prin tulpini și frunze ale plantei mature ale noii varietăți de *A. foeniculum* AdB au indicat celule vegetale cu morfologie și structuri normale, sănătoase, așa cum s-a observat prin microscopia confocală cu scanare laser (Figura 2.8).

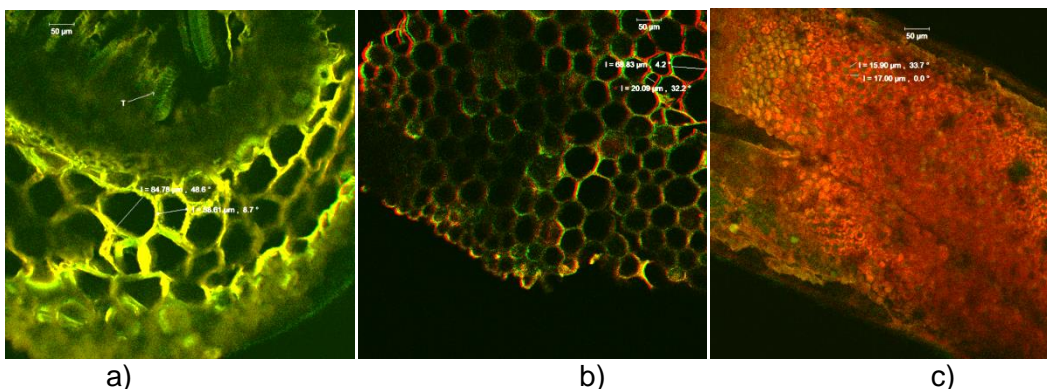


Figura 2.8. Imagini ale secțiunilor transversale prin (a, b) tulpină și (c) prin frunză a speciei *A. foeniculum* observate folosind CLSM

2.6. Concluzii parțiale

- Probele analizate din plantele aromatice *Ocimum basilicum*, *Ocimum citriodorum* și *Agastache foeniculum*, familia *Lamiaceae* au fost cultivate și recoltate la Stațiunea de Cercetare - Dezvoltare pentru Legumicultură (SCDL) Buzău, România.
- Probele analizate din fructele de *Pimpinella anisum* și *Carum carvi*, familia *Apiaceae* au fost achiziționate tot de la Stațiunea de Cercetare - Dezvoltare pentru Legumicultură (SCDL) Buzău, România.
- Pentru extracția cu solvenții organici metanol și etanol a compușilor organici naturali biologic activi din plantele aromatice studiate, precum *Ocimum basilicum*, *Ocimum citriodorum* și *Agastache foeniculum* s-au utilizat metoda de extracție cu ultrasunete.
- Pentru obținerea uleiurilor esențiale din toate cele șase specii de plante aromatice s-a folosit ca, metodă de extracție hidrodistilarea cu un aparat de tip Clevenger.
- S-au obținut randamente de $1,04 \pm 0,76$ % de uleiuri volatile obținute prin hidrodistilare, din soiul *O. Basilicum* „Aromat de Buzău” și $0,92 \pm 0,48$ % ulei volatil din soiul *O. citriodorum* „Macedon”.
- Prin extracție simplă cu solvenți asistată de ultrasunete (EUS) din *Ocimum basilicum* cu metanol s-au obținut $3,49 \pm 0,64$ %, respectiv $4,95 \pm 0,47$ % din *Ocimum citriodorum*, componente totale extractibile iar cu etanol $4,08 \pm 0,82$ % din *Ocimum citriodorum*, respectiv $3,11 \pm 0,51$ % din *Ocimum basilicum*.
- Prin extracție simplă cu solvenți asistată de ultrasunete cu metanol s-a obținut $11,06 \pm 0,95$ % componente totale extractibile din *A. foeniculum* respectiv $7,21 \pm 0,69$ % cu etanol. Prin hidrodistilare s-a obținut un randament de $1,86 \pm 0,64$ % ulei volatil de *A. foeniculum*.
- Prin hidrodistilare s-au obținut un randament de $1,85 \pm 0,73$ % ulei volatil pentru *Pimpinella anisum*, $3,04 \pm 0,86$ % pentru *Illicium verum* și de $2,6 \pm 0,68$ % pentru *Carum carvi* L.

Capitolul 3. Analiza cromatografică și spectrală a compușilor organici naturali separați din plantele aromatice studiate

3.2. Analiza compușilor organici naturali prin tehnica cromatografică HPTLC

3.2.3. Rezultate și discuții

În acest studiu, CSS a fost utilizată ca metodă de separare și identificare pentru diverși compuși în extractele alcoolice și uleiurile volatile. Fazele mobile au fost selectate după multiple încercări de optimizare pentru o migrare bună, clară și identificare ușoară a compușilor organici. Pe baza valorilor factorilor de retenție (R_f) a compușilor standard puri, obținute în aceleași condiții cu valorile R_f pentru probele analizate, s-a identificat rutina ($R_f=0,15$) în extractele metanolice din ambele specii de busuioc analizate dar și în extractul etanolic de *O. citriodorum* (Figura 3.1). Rutina face parte din clasa flavonoidelor, o clasă de molecule importantă datorită proprietăților terapeutice diverse. Rutina, cunoscută și ca vitamina P sau rutozidă, din punct de vedere chimic este o glicozidă care conține agliconul flavonolic quercetină împreună cu dizaharidul rutinoză. În numeroase studii rutina a demonstrat o serie de activități farmacologice precum activități antioxidante, cardioprotectoare, citoprotectoare, vasoprotectoare, neuroprotectoare și anticancerigene [341]. Prin urmare, este un component important din punct de vedere terapeutic identificat în extractele alcoolice analizate de busuioc.

Quercetina ($R_f=0,82$) nu a putut fi identificată în extractele alcoolice de busuioc prin CSS, dar daidzeina a fost identificată în cele patru extracte analizate, metanolice și etanolice de *O. basilicum* și *O. citriodorum*.

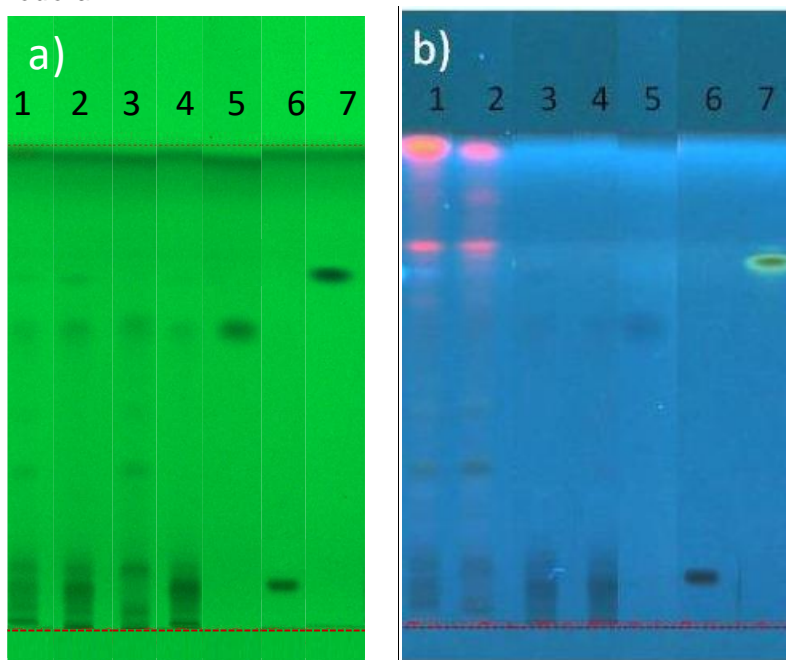


Figura 3.1. Cromatograma HPTLC a: extractelor (1) metanolic și (2) etanolic de *O. basilicum*, extractelor (3) metanolic și (4) etanolic de *O. citriodorum*, (5) daidzeinei, (6) rutinei, și (7) quercetinei, la (a) 254 nm și (b) 366nm

În analiza extractelor alcoolice de *A. foeniculum* au putut fi identificați acidul cafeic ($R_f=0,80$), rutina ($R_f=0,15$) și quercetina ($R_f=0,82$) (Figura 3.2).

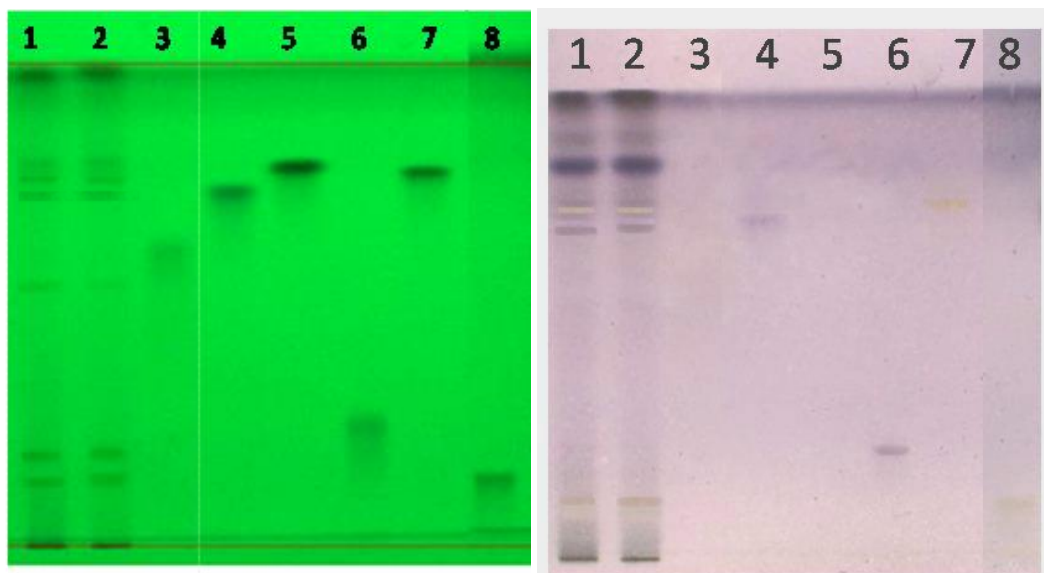


Figura 3.2. Cromatograma HPTLC a: extractelor (1) metanolic și (2) etanolic de *A. foeniculum*, și standardelor (3) acid galic, (4) acid cafeic, (5) acid vanilic, (6) acid clorogenic, (7) quercetină, (8) rutină, înainte de revelare la $\lambda=254$ nm și după revelare chimică cu anisaldehydă-acid sulfuric sub lumină albă

Prin analiza CSS a uleiurilor volatile, s-au identificat anetolul în uleiurile de *I. verum* și *P. anisum*, estragolul în uleiurile de *A. foeniculum* și de *O. basilicum*, linalolul în uleiurile de busuioc *O. basilicum* și *O. citriodorum*, eugenolul în uleiul de *O. basilicum* și carvona în uleiul de *C. carvi* (Figura 3.3).

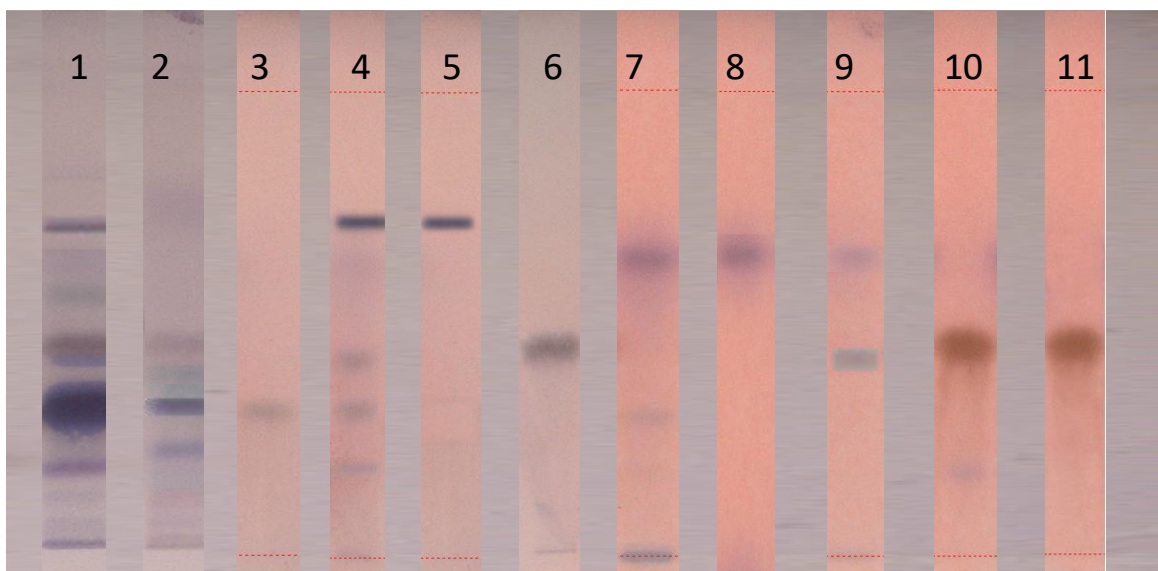


Figura 3.3. Cromatograma HPTLC a uleiurilor analizate și compușilor standard: (1) ulei esențial de *O. basilicum*, (2) ulei esențial de *O. citriodorum*, (3) linalol, (4) ulei esențial de *A. foeniculum*, (5) estragol, (6) eugenol, (7) ulei esențial de *I. verum*, (8) trans-anetol, (9) ulei esențial de *P. anisum*, (10) ulei esențial de *C. carvi* și (11) carvonă, după revelare chimică cu anisaldehydă-acid sulfuric sub lumină albă

3.2.4. Concluzii parțiale

- Profilul CSS al extractelor și uleiurilor volatile a arătat că acestea sunt amestecuri de compuși cu valori Rf diferite. În plantele aromatice studiate, compușii identificați au fost variați și secretați în concentrații diferite în funcție de specie, părțile plantelor folosite pentru extracții și metodele de extracție.
- Prin analiza extractelor alcoolice de *A. foeniculum* sau identificat polifenolii acidul cafeic, rutina și quercetina.
- Prin analiza CSS a uleiurilor volatile, s-au identificat anetolul în uleiurile de *I. verum* și *P. anisum*, estragolul în uleiurile de *A. foeniculum* și de *O. basilicum*, linalolul în uleiurile de busuioc *O. basilicum* și *O. citriodorum*, eugenolul în uleiul de *O. basilicum* și carvona în uleiul de *C. Carvi*.
- Prin urmare, prezența unor compuși importanți cu proprietăți benefice pentru sănătatea umană a fost confirmată în probele analizate. Unii compuși au fost identificați și cuantificați mai departe prin cromatografie de lichide înaltă performanță și gaz cromatografie.

3.3. Analiza compușilor organici naturali prin tehnica GS-MS

3.3.3. Rezultate și discuții

Uleiurile esențiale analizate au fost amestecuri complexe de compuși organici naturali, compuse predominant din hidrocarburi terpenice (limonen, pinen, mircen, p-cimen, α -felandren) și terpenoide precum alcoolii monoterpenici (borneol), cetone monociclice (carvonă) și fenolii aromatici (carvacrol, timol, eugenol). Natura diversă a acestor compuși, cuplată cu variația interspecie și intraspecie, are ca rezultat un domeniu larg de posibile aplicații ale compușilor extrași din plantele aromatice.

Uleiurile esențiale din acest studiu au fost extrase prin hidrodistilare iar separarea și identificarea compușilor organici s-au realizat cu ajutorul unui cromatograf de gaze cuplat cu un spectrometru de masă. Cromatogramele înregistrate prin GC-MS pentru uleiul esențial de *Ocimum basilicum* „Aromat de Buzău” au prezentat 16 compuși a căror structură a fost identificată (Figura 3.18). Uleiul esențial de *Ocimum citriodorum* „Macedon lămâios” a prezentat 15 compuși a căror structură a fost identificată (Figura 3.19). Uleiul esențial de *A. Foeniculum* „Aromat de Buzău” a prezentat 7 compuși a căror structură a fost identificată deasemenea (Figura 3.20). În uleiul esențial de chimen (*Carum carvi*) s-au identificat 2 compuși (Figura 3.21), în uleiul esențial de anason stelat (*Illicium verum*) s-au pus în evidență 16 compuși (Figura 3.22), iar în uleiul esențial de *Pimpinella anisum* s-au identificat 5 compuși (Figura 3.23).

Estragolul (metil-chavicol/p-alilanol), compus utilizat foarte mult în industria parfumurilor, este compusul majoritar prezent în uleiul esențial de *Agastache foeniculum* (94,89%±1,02%), identificat și în uleiurile esențiale de *O. basilicum* (12,81%±0,44%), *O. citriodorum* (7,14%±0,08%), *Illicium verum* (0,69%±0,04%) și *P.anisum* (0,33%±0,02%). Estragolul are formula moleculară C₁₀H₁₂O, având picul de bază cu masa m/z=148. Spectrul de masă al estragolului (Figura 3.6) arată o abundență ridicată a picului ionului molecular, ceea ce ar putea fi explicat prin stabilitatea chimică a acestui compus. Fragmentarea ionului molecular al estragolului poate urma trei căi de fragmentare propuse pe baza fragmentelor rezultate din spectrul de masă și a regulilor de fragmentare din literatura de specialitate [358,362]: a) formarea fragmentelor ionice cu masa m/z=133 care se datorează formării ionului [M-CH₃]⁺ prin pierderea radicalului metil din ionul molecular, b) formarea fragmentelor ionice cu masa m/z=121, [M-C₂H₄]⁺, datorită pierderii radicalului C₂H₄ din ionul molecular și c) formarea fragmentelor ionice cu masa m/z=117, [M-OCH₃]⁺, care se datorează pierderii grupării metoxi din ionul molecular (Figura 3.7). În continuare, fragmentul cu masa m/z=117 poate pierde radicalul C₂H₄• cu formarea fragmentului cu masa m/z=105, [M-OCH₃-C₂H₄]⁺, care poate fi obținut și din fragmentul ionic [M-C₂H₄]⁺ prin pierderea unui radical metil. Fragmentul cu masa m/z=117 poate să piardă radicalul

$\text{CH}_2=\text{CH}^+$ pentru a forma ionul tropiliu cu masa $m/z=91$ $[\text{M}-\text{OCH}_3-\text{CH}_2=\text{CH}]^+$ care prin fragmentare tropilică și pierderea CH_2^+ conduce la ionul cu masa $m/z=77$.

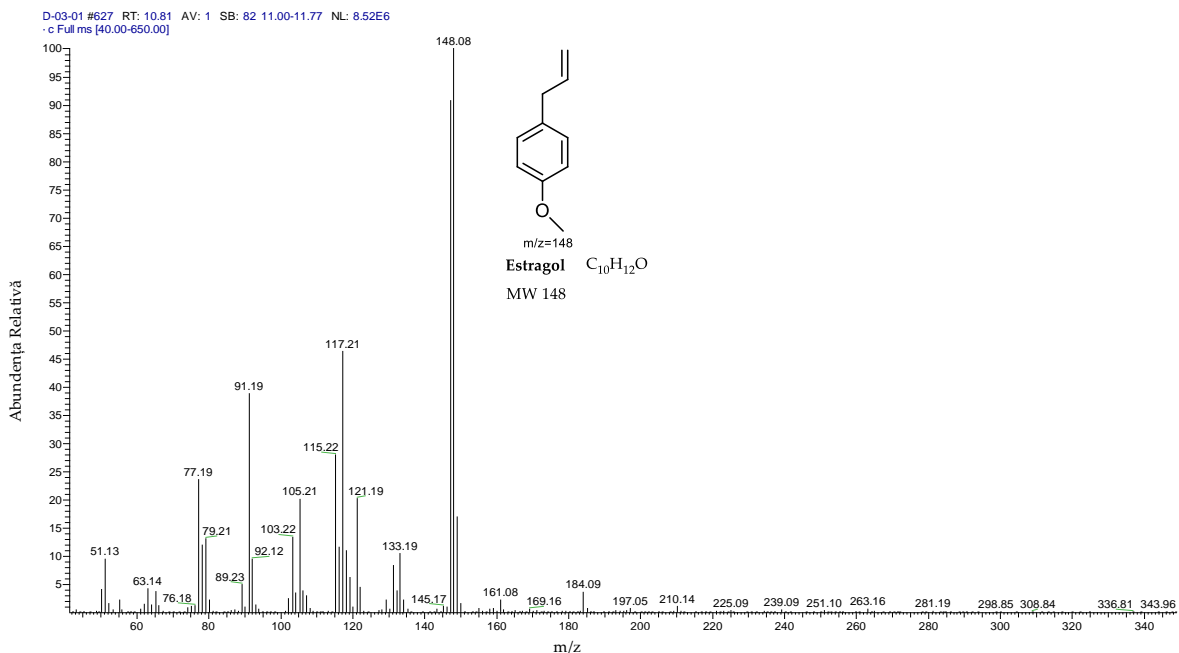


Figura 3.6. Spectrul MS și fragmentarea metil-chavicolului (estragol)

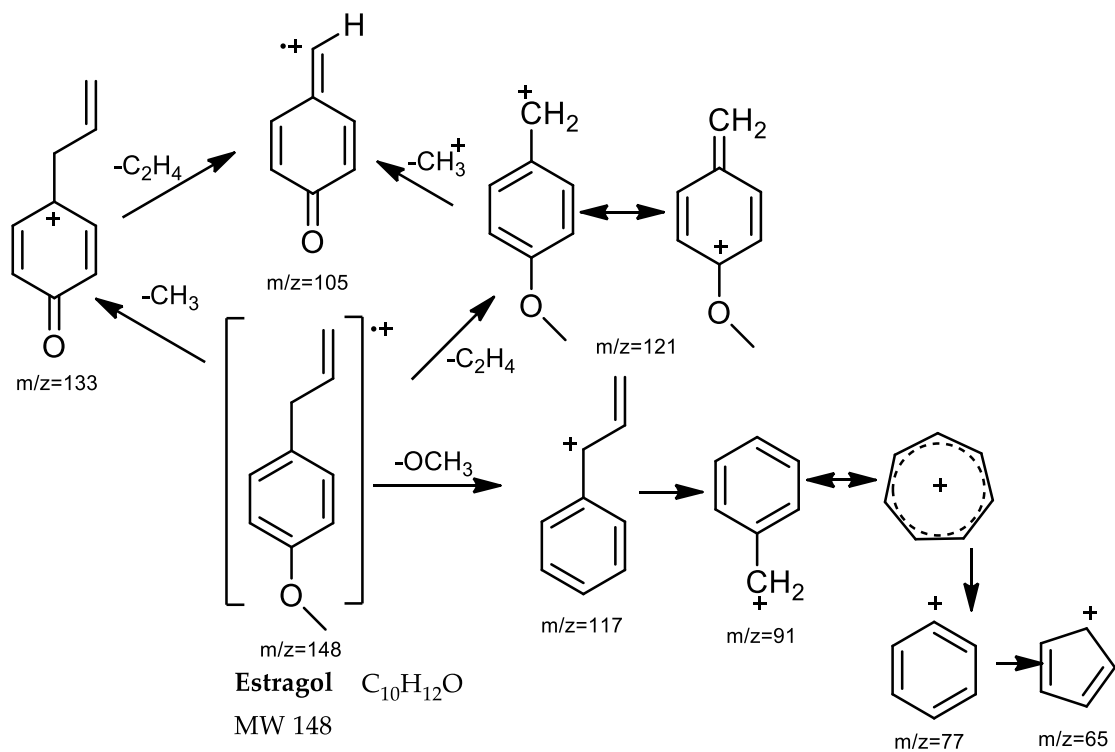


Figura 3.7. Mecanismul de fragmentare propus pentru metil-chavicol (estragol)

Componenta principală detectată prin analiza GC-MS în uleiul esențial de *Agastache Foeniculum* denumit și „Aromat de Buzău” a fost estragolul (1-alil-4-metoxibenzen), un analog alilbenzenic, lichid incolor, cu miros aromat de anason și gust dulce.

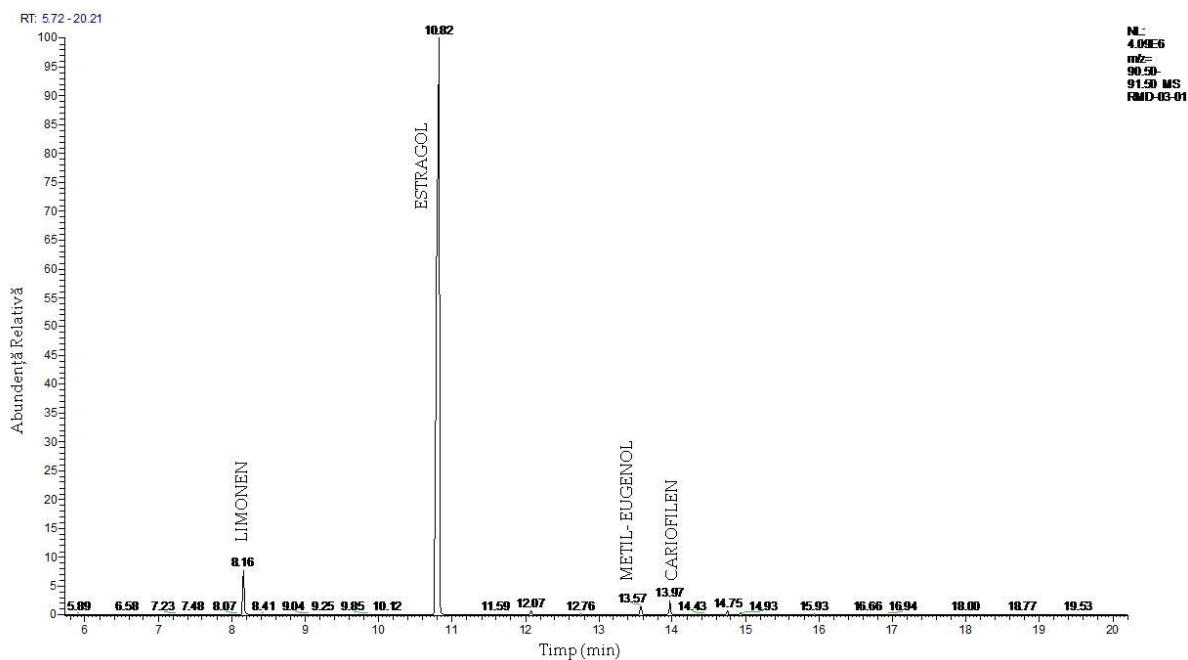


Figura 3.20. Cromatograma GC–MS a uleiului esențial de *A. foeniculum* „Aromat de Buzău”

3.3.4. Concluzii parțiale

- S-a analizat pentru prima dată comparativ compoziția chimică a extractelor obținute prin hidrodistilare din specii de plante aromatice din familia *Lamiaceae*: *Ocimum basilicum*, *Ocimum citriodorum* și *Agastache foeniculum*, cultivate în România.
- Acest studiu experimental confirmă prezența compușilor majoritari linalol, metil chavicol (estragol), eugenol, metil-eugenol, d-germacrena, 1,8-cineol, β-cariofilen în concordanță cu datele din literatura de specialitate, în această etapă a cercetării analizându-se totodată compoziția chimică a două specii de plante din familia *Apiaceae*, *Pimpinella anisum* și *Carum carvi* dar și a unei specii din familia *Schisandraceae* și anume *Illicium verum* în care se confirmă prezența compușilor majoritari trans-anetol, γ-himacalen, carvona, limonen și estragol.
- Componenta principală detectată prin analiza GC-MS în uleiul esențial de *Ocimum basilicum* „Aromat de Buzău” ($34,87 \pm 1,05\%$) a fost terpenoidul aciclic linalol (3,7-dimetilocta-1,6-dien-3-ol).
- Componenta principală detectată prin analiza GC-MS în uleiul esențial de *Agastache Foeniculum* denumit și „Aromat de Buzău” a fost estragolul (1-alil-4-metoxibenzen), un analog alilbenzenic, lichid incolor, cu miros aromat de anason și gust dulce.
- Uleiul esențial de chimen (*Carum carvi*) analizat a fost bogat în carvonă ($68,49 \pm 1,41\%$), o cetonă monociclică responsabilă pentru aroma chimenului, și limonen ($29,01 \pm 1,61\%$), un monoterpen ciclic.
- Componenta principală identificată în uleiurile esențiale analizate de anason stelat (*Illicium verum*) și de anason boabe (*Pimpinella anisum*) prin analiza GC-MS a fost trans-anetolul.

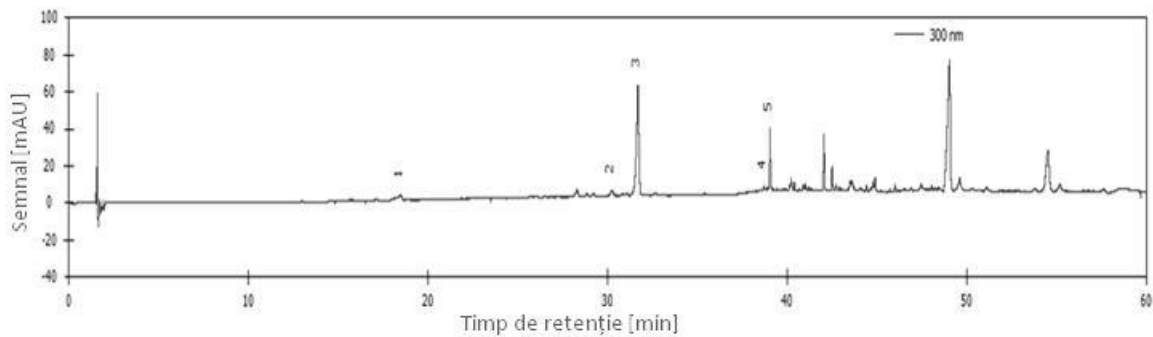
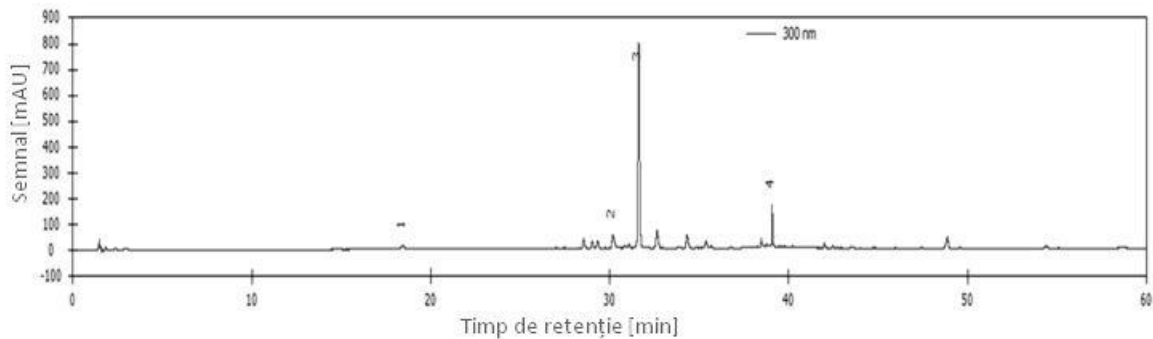
3.4. Analiza compușilor organici naturali prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC-DAD)

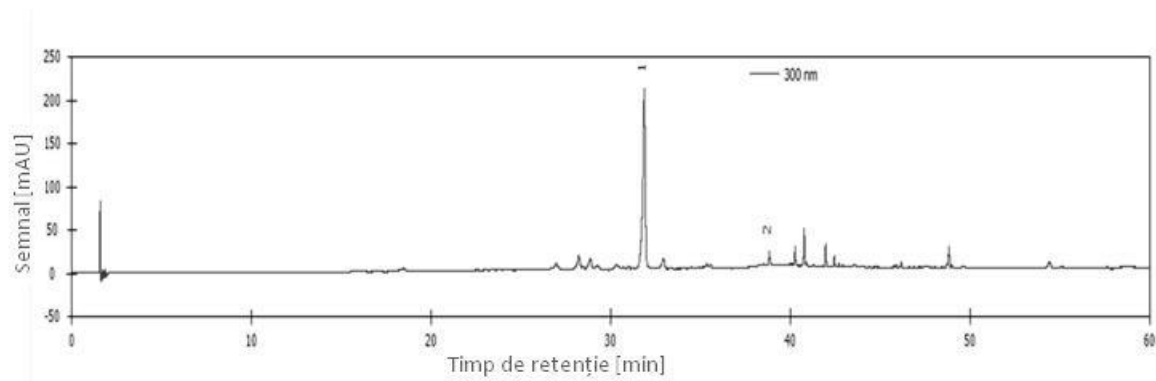
3.4.1. Obiective principale

Unul dintre obiectivele principale ale tezei a constat în utilizarea cromatografiei de lichide de înaltă performanță (HPLC), folosind tehnica HPLC-DAD, în identificarea, separarea și cuantificarea unor compuși din clasa polifenolilor prezenți în extractele alcoolice obținute din speciile de *Ocimum basilicum*, *Ocimum citriodorum* și *Agastache foeniculum*. Extractele supuse separării, identificării și cuantificării compușilor biologic activi s-au obținut utilizând diverși solvenți și diferite metode de extracție.

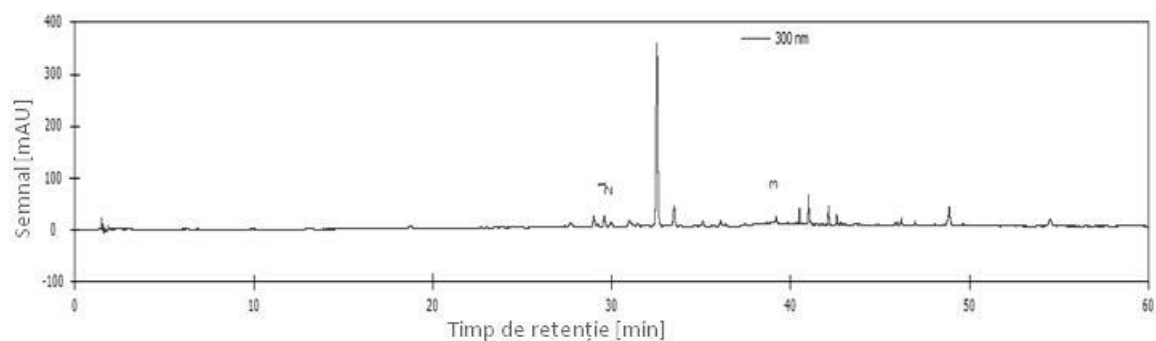
3.4.3. Rezultate și discuții

Separarea cromatografică, a evidențiat prezența în extractele din soiurile de busuioc românești analizate a șase constituenți principali, folosind compușii standard de referință pentru identificarea și cuantificarea acestora, și anume catechina, rutina, hiperozida, naringina, naringenina și genisteina (Figura 3.24).





(c)



(d)

Figura 3.24. Cromatogramele HPLC - DAD ale probelor analizate: (a) extract metanolic „Aromat de Buzău” (1 – catechină, 2 – rutina, 3 – naringină, 4 – genisteina), (b) extract etanolic „Aromat de Buzău” (1 – catechină, 2 – rutina, 3 – naringina, 4 – naringenina, 5 – genisteina), (c) extract metanolic „Macedon” (1 – naringina, 2 – naringenina) și (d) extract etanolic „Macedon” (1 – rutina, 2 – hiperozidă, 3 – genisteina) cu detecție la $\lambda = 300$ nm.

Cuantificarea compușilor chimici identificați din cele patru extracte metanolice și etanolice de busuioc ale celor două soiuri românești de *Ocimum* sunt rezumate în Tabelul 3.2. Rezultatele au arătat că naringina este compusul principal al extractelor de busuioc, concentrația acestuia variind între $930,10 \pm 0,15$ $\mu\text{g/g}$ și $2618,11 \pm 0,23$ $\mu\text{g/g}$. Cele mai mari concentrații de naringină s-au înregistrat pentru extractele metanolice pentru ambele soiuri de busuioc, concentrația fiind de trei ori mai mare la soiul *O. basilicum* „Aromat de Buzău”.

Genisteina și quercetina au fost găsite în concentrații mari în ambele extracte alcoolice asistate de ultrasunete de *A. foeniculum*, în timp ce acidul tanic a fost cuantificabil doar în extractul metanolic (Tabelul 3.3 și Figura 3.25).

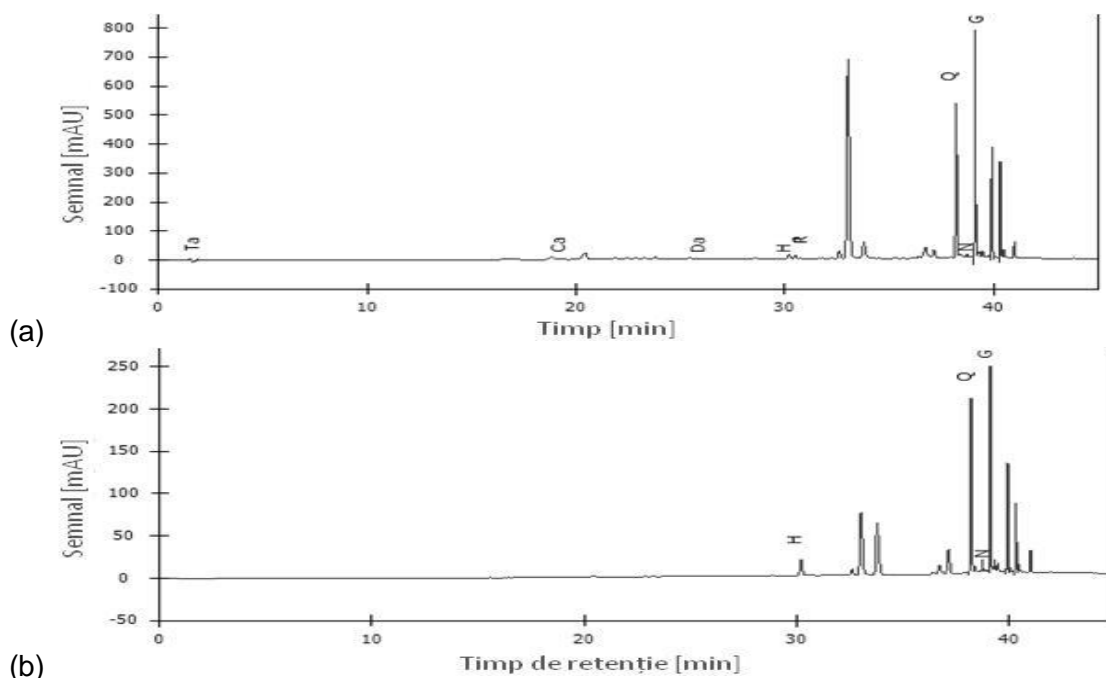


Figura 3.25. Separarea cromatografică HPLC-DAD a compușilor din: (a) *A. foeniculum*-extract metanolic (Ta-acid tanic, Ca-acid cafeic, Da-daidzeină, H-hiperozidă, R-rutină, Q-quercetină, N-naringenină, G- genisteina); (b) *A. foeniculum*-extract etanolic (Ta-acid tanic, H-hiperozidă, Q-quercetină, N-naringenină, G-genisteină).

3.4.4. Concluzii parțiale

- În acest studiu s-au analizat extracte alcoolice, etanolice și metanolice de *Ocimum basilicum*, *Ocimum citriodorum* și *Agastache foeniculum*.
- Principalii compuși cu proprietăți biologice active identificați în cele două soiuri românești de *Ocimum* au fost diferite în funcție de specie de modul de extracție și solventul utilizat.
- În extractele alcoolice din soiurile de busuioc românești analizate s-au evidențiat șase constituenți principali și anume catechina, rutina, hiperozida, naringina, naringenina și genisteina.
- În extractele metanolice din specia *Ocimum basilicum* (AB) s-au evidențiat compuși precum catechina, rutina, naringina și genisteina iar în extractele etanolice ale aceleiași specii s-au identificat compușii catechina, rutina, naringina, naringenina și genisteina.
- În extractele metanolice obținute din specia *Ocimum citriodorum* (MB) s-au identificat compușii naringina și naringenina iar în cele etanolice rutina, hiperozida și genisteina.
- În specia *Agastache foeniculum* au fost identificați atât în extractele metanolice cât și în cele etanolice acizii fenolici p-cumaric și cafeic, flavonolii rutina, quercetină și hiperozida, flavanona naringenina și izoflavona genisteina. Acidul tanic a fost identificat doar în extractele metanolice de *Agastache foeniculum*.
- Genisteina și quercetina au fost găsite în concentrații mari în ambele extracte alcoolice de *A. foeniculum*, conținutul de quercetină variind între 704,148 - 1073,637 $\mu\text{g/g}$ s.u. și cel de genisteină între 2229,999 - 3171,823 $\mu\text{g/g}$ s.u. Acidul tanic a fost cuantificabil doar în extractul metanolic. Acidul cafeic, acidul p-cumaric, quercetina, rutina și hiperozida au fost identificate în ambele extracte de *A. foeniculum*.

Capitolul 4. Analiza electrochimică a compușilor cu activitate antioxidantă prezenți în plantele studiate

4.2. Obiective principale

Cercetările raportate anterior în literatura de specialitate dar și studiile efectuate în perioada doctoratului, au indicat prezența unor compuși polifenolici în plantele aromatice studiate.

➤ Principalul obiectiv al prezentului studiu experimental a fost acela de a evalua prin analize *in vitro*, potențialul antioxidant al extractelor alcoolice și al uleiurilor esențiale, obținute din soiuri noi de busuioc, *Ocimum basilicum*, *Ocimum citriodorum*, *Agastache foeniculum* dar și al uleiului comercial de busuioc, prin metode electrochimice (voltametrie ciclică). Clase diferite de compuși prezente în probele studiate indică potențiale proprietăți antioxidante, care induc diferite mecanisme de acțiune.

➤ Evaluarea electrochimică a compușilor prezenți în speciile analizate precum eugenol, estragol și linalol.

➤ Studiarea posibilităților interacțiuni sinergice între compușii antioxidanți din materialul vegetal, având în vedere compoziția complexă a plantelor medicinale.

➤ Caracterizarea capacității antioxidante (ox/red) generală a extractelor alcoolice sau a uleiurilor esențiale obținute din acestea prin utilizarea de metode electrochimice.

4.4. Rezultate și discuții

4.4.2. Evaluarea electrochimică a activității antioxidante a compușilor chimici prezenți în probele de ulei esențial din *Agastache foeniculum* (AdB)

Probe de 5 μL de ulei esențial din *Agastache foeniculum* solubilizate în 20 mL metanol au fost analizate prin OCP (potențial în circuit deschis), pentru soluții proaspăt preparate, soluții analizate după 24 de ore și după 5 zile, fiind păstrate la frigider la 4°C. Condițiile de experimentare sunt similare cu cele utilizate la analiza uleiului de busuioc AB (4.4.1).

Din Figura 4.29 (a) se poate observa evoluția potențialului (E) al probelor analizate până la 10 min. Pentru proba analizată după 24 de ore există o diferență de aproximativ +30 mV în zona pozitivă față de proba proaspătă, o disociere și aranjare structurală între compușii biologic activi din probă.

În următoarele 30 de minute nu se mai observă diferențe vizibile între probele analizate, la intervale de timp diferite de momentul preparării, dar se înregistrează o deplasare spre valori pozitive a potențialului. Rezultatele indică disponibilitatea schimburilor electronice între componentele chimice din proba cu ulei esențial de *Agastache foeniculum*, fiind sisteme cu evoluție dinamică care înregistrează o creștere a valorilor de potențial de până la 100 mV, și stabilitate ulterioară.

Voltamograme ciclice înregistrate la aplicarea unui potențial de $E = \pm 2 \text{ V/Ag/AgCl}_{\text{sat}}$, la viteza de scanare de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, pentru probele de ulei esențial de *Agastache foeniculum*, evaluate la intervale diferite de timp sunt redate în Figura 4.30 (b). Așa cum se prezintă voltamogramele, poate fi observat evident picul anodic semnificativ cu intensitate mare la potențial mai mare de 1,3 V, care are valoare ușor crescută la probe, în timp.

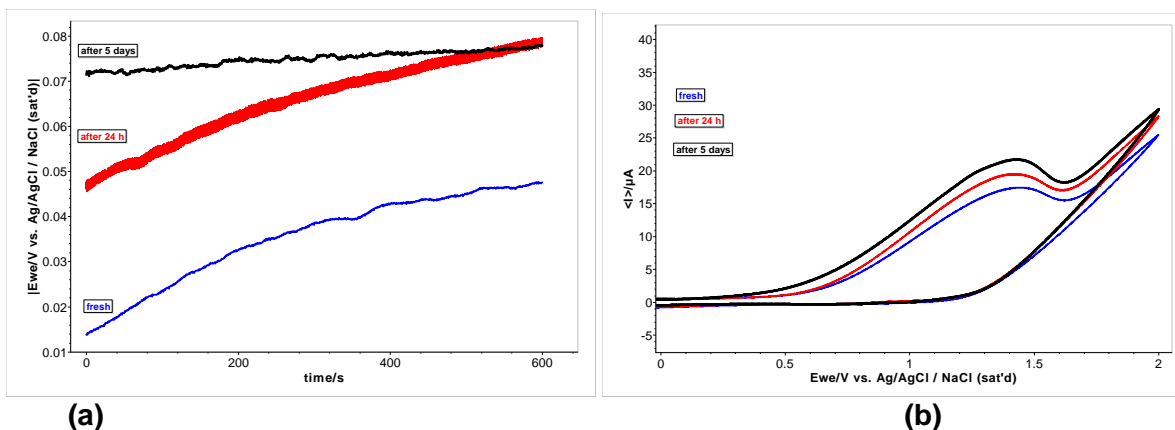


Figura 4.29. Probe de ulei esențial de *Agastache foeniculum* (soiul „Aromat de Buzău”): (a) valori OCP înregistrate (b) voltamograme ciclice înregistrate, $E = \pm 2 \text{ V}_{/Ag/Ag \text{ Clsat}}$, la viteza de scanare de $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

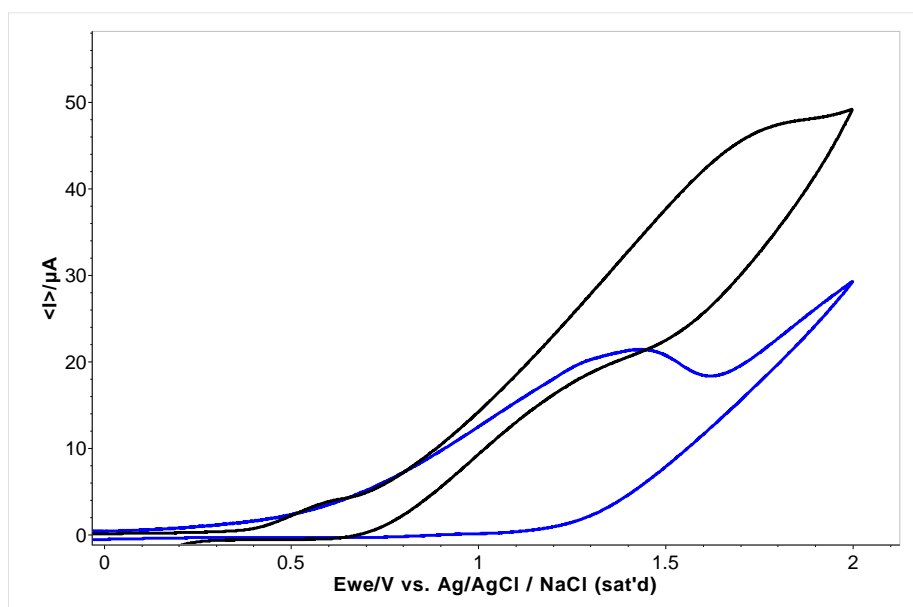


Figura 4.30. Voltamogramele ciclice înregistrate pentru probele de ulei esențial de *Agastache foeniculum* (soiul „Aromat de Buzău”) (albastru) și compusul standard pur eugenol (negru), $E = \pm 2 \text{ V}_{/Ag/Ag \text{ Clsat}}$, la viteza de scanare de $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

În Figura 4.31 sunt reprezentate voltamogramele ciclice ale probelor de ulei *Agastache foeniculum* comparativ cu compusul pur, eugenol, și se remarcă că profilul voltamogramelor sunt similare. Eugenolul a fost confirmat prin metode cromatografice ca fiind un fitoconstituent al uleiului esențial de *Agastache foeniculum* (capitol 3). În ambele probe analizate, de la 0,5 V, unii compuși biologic activi au început să prezinte o intensitate de potențial antioxidant activ. La proba analizată de ulei esențial de *Agastache foeniculum* s-a înregistrat un maxim al curentului anodic de 20 – 22 μA la potențialul cuprins între 1,32 și 1,42 V, valoare comparabilă cu potențialul de semiundă ($E_{1/2}$) al eugenolului înregistrat la circa 1,35 $\text{V}_{/Ag/Ag \text{ Clsat}}$.

4.4.3. Evaluarea electrochimică a activității antioxidante a extractelor alcoolice obținute din specii hibride de *O. basilicum*

S-a realizat un studiu electrochimic pentru extractele metanolice și etanolice ale celor două specii hibride de busuioc, AB („Aromat de Buzău”) și MB („Macedon lămâios”) [440].

Evaluarea electrochimică a inclus metoda OCP și CV, prepararea probelor, iar condițiile de experimentare sunt similare cu cele prezentate pentru probele din uleiul de busuioc AB (4.4).

Rezultatele obținute pentru OCP (potențial în circuit deschis) pentru speciile hibride de busuioc, extracte metanolice și etanolice sunt redată în Figura 4.32.

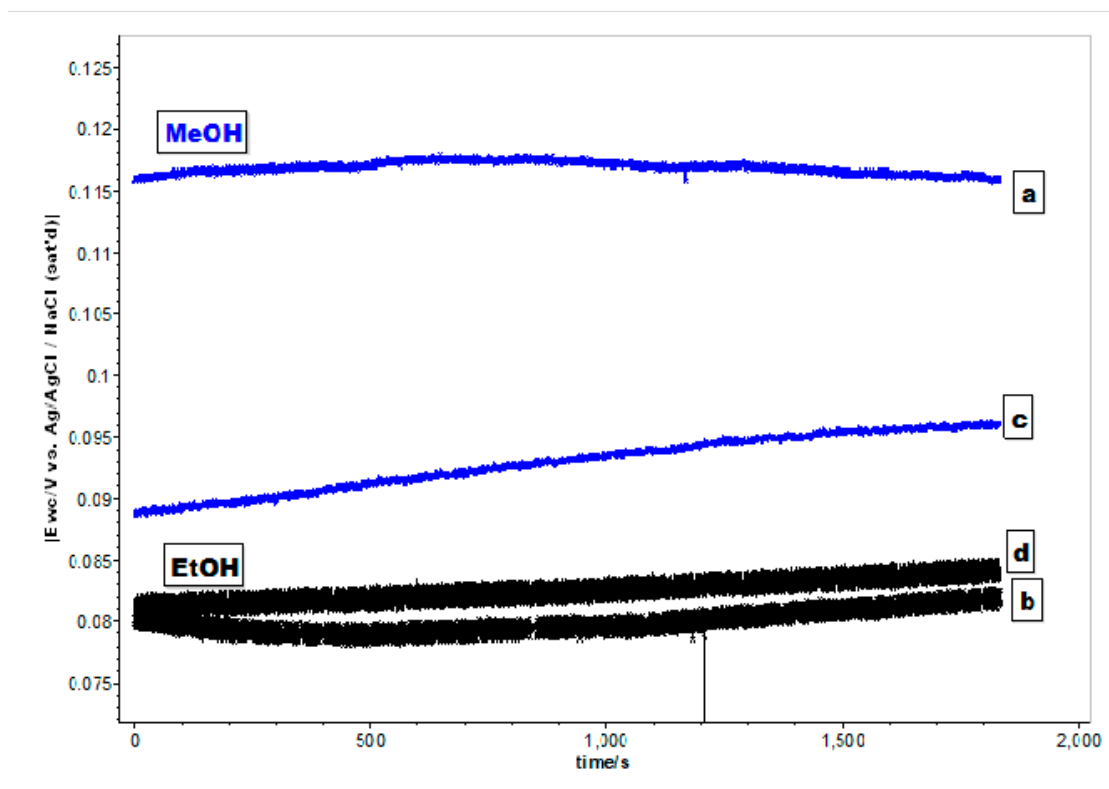


Figura 4.31. Valori OCP înregistrate pentru extractele metanolice de busuioc din AB (a) și MB (c) și, respectiv, pentru extracte etanolice din AB (b) și MB (d)

Valorile de OCP înregistrate la ambele probe, specii hibride de busuioc, indică un potențial stabil după 30 minute cu o diferență mică a valorilor potențialului în funcție de solvenții utilizați. Pentru extractul metanolic AB („Aromat de Buzău”), este observat un potențial cu valori mai pozitive, ($E = 0,115 \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}}$) comparativ cu extractul metanolic MB („Macedon”), un potențial ($E = 0,095 \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}}$). La extractele etanolice nu sunt diferențe semnificative între cele două specii hibride de busuioc, înregistrându-se un potențial de $0,080 \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}}$.

Figura 4.32. și Figura 4.33. prezintă voltamogramele ciclice înregistrate la probele hibride de busuioc, extracte alcoolice, și se observă un profil diferit al voltamogramelor.

În proba de *O. basilicum* AB („Aromat de Buzău”) extractul metanolic, la potențial de $0,5 \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}}$ sunt biocompuși cu activitate potențial intensă, înregistrându-se un curent anodic $I_a = 12 \mu\text{A}$, cu circa 50% mai activ decât în extractul metanolic de *O. citriodorum* MB („Macedon”) (Figura 4.33).

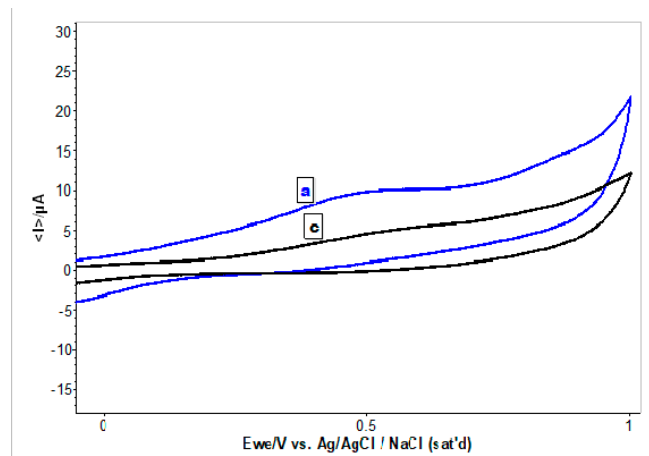


Figura 4.32. Voltamograme ciclice înregistrate pentru extractele metanolice de busuioc AB (a- albastru) și MB (c-negru), $E = \pm 1 V_{/Ag/AgCl_{sat}}$, la $100 mV \cdot s^{-1}$.

În extracte etanolice, activitatea de potențial este mai redusă decât în extractul metanolic, la specia hibridă AB („Aromat de Buzău”) în comparație cu extractul din specia hibridă MB („Macedon”), specie care indică o disponibilitate mai largă pentru inițierea de modificări electronice, de la un potențial de $0,25 V_{/Ag/AgCl_{sat}}$ până la $0,80 V_{/Ag/AgCl_{sat}}$ (Figura 4.36).

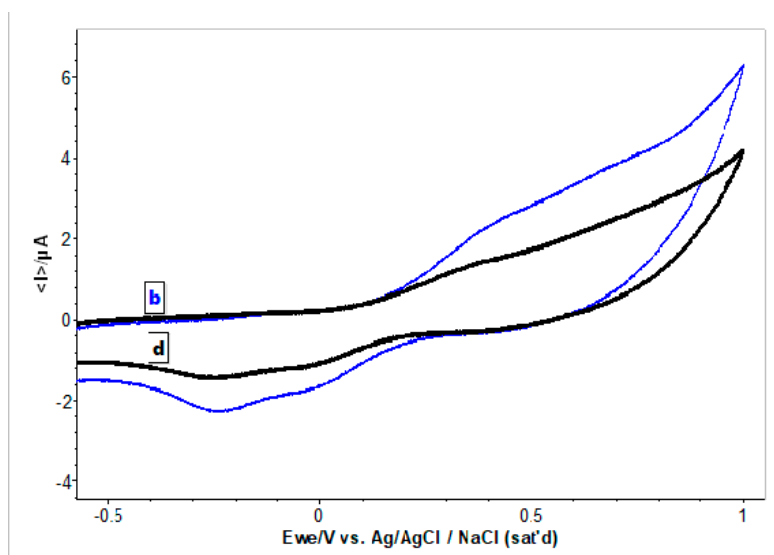


Figura 4.33. Voltamograme ciclice înregistrate pentru extractele etanolice de busuioc AB (b- albastru) și MB (d-negru), $E = \pm 1 V_{/Ag/AgCl_{sat}}$, viteza de scanare de $100 mV \cdot s^{-1}$.

4.5. Concluzii parțiale

➤ Voltametria ciclică (CV) este o tehnică versatilă, intens utilizată pentru caracterizarea electrochimică generală a compușilor naturali, oferind date privind capacitatea lor de oxidare/reducere, în probele analizate, și în solvenți diferiți, referințele din literatura de specialitate confirmând că există o corelație bună între potențialul de oxidare ale diferiților antioxidanți și eficiența lor antioxidantă.

➤ În evaluarea potențialului antioxidant la probe cu ulei de busuioc s-au utilizat două tehnici electrochimice, OCP (potențial la circuit deschis) și CV (voltametria ciclică), și s-au evaluat parametri electrochimici importanți, cum ar fi intensitatea curentului anodic, potențialul de semiundă, coeficientul de difuzie.

➤ Prin evaluarea OCP a probelor cu conținut diferit de ulei de busuioc de proveniență diferită, în solvenții metanol și etanol s-a observat o diversitate în potențialul înregistrat, dar se pot considera ca predominante, valori pozitive de $0,100 \text{ V}_{/Ag/Ag \text{ Clsat}}$, cu bună stabilitate în timp (fiind analizate probele până la 30 minute).

➤ S-au analizat electrochimic compuși chimici puri care se regăsesc în speciile de ulei de plante analizate, confirmate prin alte tehnici instrumentale, cum ar fi eugenolul, estragolul și linalolul, și rezultatele au indicat că se pot diferenția probele, prin curentul anodic înregistrat, dependent de concentrația compusului de interes.

➤ Evaluarea probelor de ulei de busuioc comparativ cu eugenolul și linalolul (substanțe de referință) a indicat, că la potențial de $0,5 \text{ V}_{/Ag/Ag \text{ Clsat}}$ încep schimburi electronice, se înregistrează un curent anodic, ce reflectă potențialul antioxidant, fiind influențat și de specia analizată.

➤ Voltamogramele ciclice (CV) înregistrate la extractul metanolic la probe cu uleiul *O. basilicum* AB („Aromat de Buzău”) au indicat un curent anodic, I_a de valoare maximă de $12 \mu\text{A}$, la potențial de $0,5 \text{ V}_{/Ag/Ag \text{ Clsat}}$.

➤ Voltamogramele ciclice (CV) înregistrate au indicat pentru curentul anodic, I_a , în solvenți diferiți, valori variabile, la probele de ulei de busuioc (AB, MB, CB), specii hibride (AB, MB), ulei de *Agastache foeniculum*, care se modifică cu concentrația de ulei, și depind de potențialul aplicat.

➤ Curentul anodic înregistrat, deci capacitate antioxidantă superioară, se obține la probe cu ulei de busuioc, când potențialul aplicat este mai mare de $1 \text{ V}_{/Ag/Ag \text{ Clsat}}$, ceea ce confirmă activitatea unor compuși chimici, care interacționează eficient în schimburi electronice, cum ar fi grupările hidroxil, din polifenoli, cu aportul de oxigen din probe.

➤ Prin voltamogramele înregistrate, probele cu conținut diferit de ulei, din specii diferite se pot diferenția prin curentul anodic înregistrat, deci prin potențial antioxidant activ pentru speciile chimice prezente.

➤ Studiul parametrilor electrochimici este util pentru caracterizarea generală a potențialului antioxidant al probelor și diferențierea dintre acestea.

➤ Metodele electrochimice pot fi utilizate pe scară largă în evaluarea antioxidanților din probele de ulei din plante, extracte din alte produse din plante și alimente.

Studiul nostru oferă o soluție cuprinzătoare pentru utilizarea voltametriei ciclice, prin parametri electrochimici, în explorarea structurii și comportării uleiului de busuioc, pentru a avansa cercetarea, și de a găsi utilitate adecvată pentru acest produs, cu reale proprietăți antioxidante benefice.

Rezultatele acestor cercetări, obținute în acest capitol, au fost parțial publicate în articole științifice cu impact, ca prim autor: *Molecules*, *Flavonoid profiles of two new approved romanian ocimum hybrids*, 2020; *IJMS*, *Bridging the Chemical Profile and Biological Activities of a New Variety of Agastache foeniculum (Pursh) Kuntze Extracts and Essential Oil*, 2023.

Capitolul 5. Cuantificarea unor clase de compuși organici prezenți în speciile studiate și evaluarea unor proprietăți biologice active

5.2. Obiective principale

Obiectivele principale ale acestui capitol a fost de a identifica și cuantifica diferite clase de compuși din extractele obținute din plantele medicinale selectate, cultivate în România, și de a investiga proprietățile biologice active ale acestora.

5.4. Rezultate și discuții

5.4.1. Conținutul total de polifenoli

Printre cei mai importanți antioxidanți naturali cu activități biologice importante sunt polifenolii, compuși care au atras interesul cercetătorilor pentru prevenirea și tratarea diferitelor afecțiuni [553]. Conținutul total de polifenoli pe baza micrometodei Folin–Ciocalteu a fost determinat pentru extractele etanolic și metanolic de busuioc și lofantus iar rezultatele sunt prezentate în Tabelul 5.3. Extractele analizate au fost preparate prin extracție asistată de ultrasunete cu solvenți, care favorizează ruperea peretelui celular și un randament de extracție îmbunătățit [554].

5.4.2. Conținutul total de flavonoide

Evaluarea eficienței de extracție a flavonoidelor, exprimate ca echivalenți de quercetină (Q), s-a realizat pentru extractele etanolic și metanolic de busuioc și de lofantus. Rezultatele celor patru extracte de busuioc au arătat o cantitate mai mare din conținutul total de flavonoide decât conținutul total de compuși fenolici. Au fost observate unele variații în funcție de specia de plante analizate și de solvenții de extracție utilizați (Tabelul 5.3).

Conținutul total de compuși fenolici și de flavonoide a fost determinat atât pentru extractele metanolic cât și etanolic din tulpina uscată, flori și frunze de *O. basilicum*, *O. citriodorum* și de *A. foeniculum*.

Eficiența extracției compușilor fenolici a fost evaluată pentru doi solvenți diferiți, etanol și metanol, pe baza conținutului total de acizi fenolici exprimat ca echivalenți de acid galic (GA). Rezultatele au arătat că, din cele patru extracte de busuioc, extractul metanolic de „Aromat de Buzău” conține cea mai mare cantitate de compuși fenolici ($936,2 \pm 0,23$ mg EqAG/g), în timp ce extractul etanolic al aceluiași soi conține o concentrație mai mică de compuși fenolici ($114,7 \pm 0,12$ mg EqAG/g). Prin comparație, compușii fenolici prezenți în extractele de busuioc „Macedon” au prezentat un conținut mai mic decât extractul metanolic de *O. basilicum*, dar concentrații mai mari decât extractul etanolic al aceluiași soi. Au fost observate unele variații în funcție de specia de plante și de solvenții de extracție utilizați. Extractul metanolic „Aromat de Buzău” (*O. basilicum*) a prezentat o cantitate de flavonoizi de $619,34 \pm 4,98$ mg EqQ/g, în timp ce extractul etanolic de $598,78 \pm 4,98$ mg EqQ/g. Cantitatea totală de flavonoide din extractul metanolic din soiul „Macedon” (*O. citriodorum*) a fost de $689,05 \pm 5,78$ mg EqQ/g, în timp ce conținutul de flavonoide pentru soiul „Macedon” (*O. citriodorum*) din extractul etanolic a fost de $505,20 \pm 3,34$ mg EqQ/g. Extractul metanolic de *A. foeniculum* a prezentat un conținut total de $485,1 \pm 0,05$ mg EqAG/g mai mare decât cel etanolic de $403,9 \pm 0,06$ mg EqAG/g. De asemenea, conținutul total de flavonoide în extractul metanolic ($367,32 \pm 0,01$ mg EqQ/g) a fost mai mare decât pentru extractul etanolic al aceluiași soi ($355,94 \pm 0,01$ mg EqQ/g).

Extractele metanolic au fost caracterizate prin cel mai mare conținut de compuși fenolici și flavonoide. Prin urmare metanolul este un solvent care duce la o extracție optimizată de

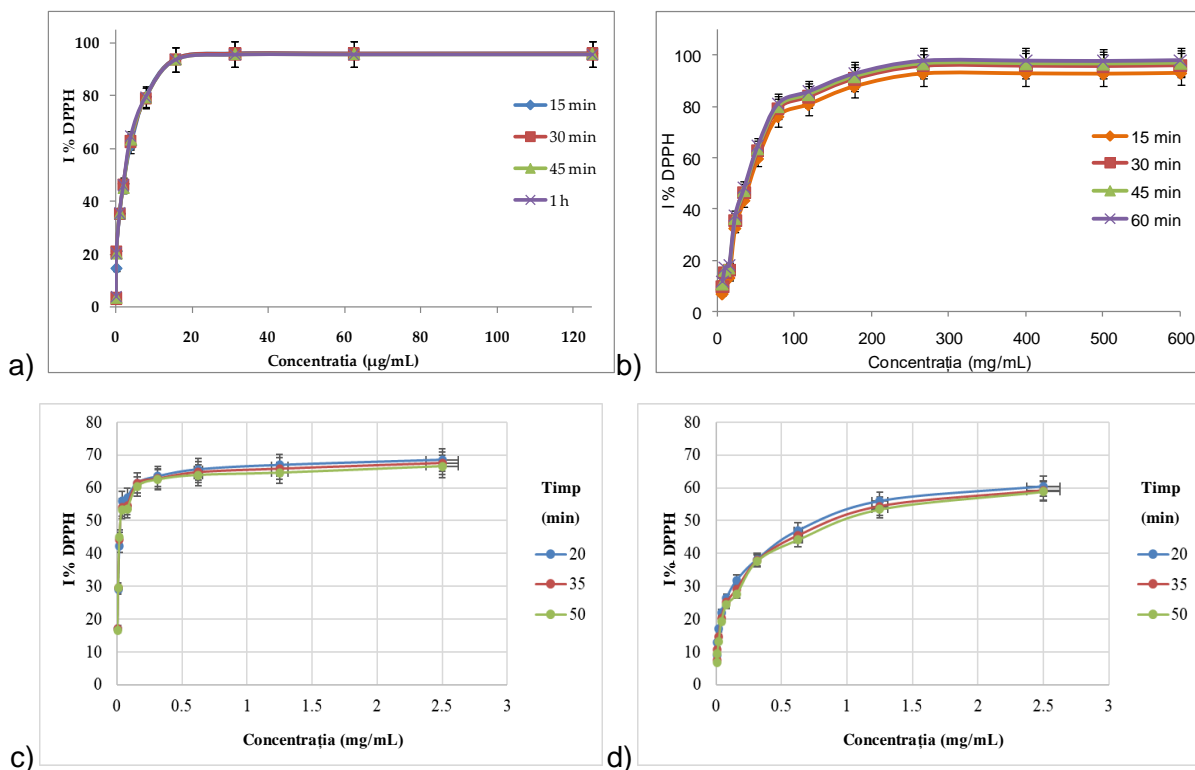
compuși fenolici și flavonoide comparativ cu etanolul, aceste rezultate fiind similare cu alte date din literatură [419].

5.4.3. Potențialul antioxidant

5.4.3.1. Evaluarea activității antioxidante prin inhibarea radicalului liber DPPH

Plantele cu un conținut ridicat de metaboliți secundari pot prezenta activitate antioxidantă datorită proprietăților redox ale acestora [314]. S-a demonstrat în multe studii că compușii polifenolici de origine vegetală exercită efecte antioxidante [555]. Prin creșterea concentrației de compuși fenolici și a gradului de hidroxilare a compușilor fenolici, crește și activitatea lor de captare a radicalilor DPPH și poate fi definită ca activitate antioxidantă [556].

Extractele și uleurile esențiale de *O. basilicum*, *O. citriodorum* și *A. foeniculum* au arătat activitate antioxidantă împotriva radicalilor liberi DPPH[•] (Figurile 5.9 și 5.10). De asemenea uleurile esențiale de *C. carvi*, *I. verum* și *P. anisum* au prezentat o activitate foarte bună de inhibare a radicalilor DPPH, mai ridicată decât celelalte probe analizate din speciile de plante din familia Lamiaceae. Extractele fracționate de *A. foeniculum* au prezentat activități antioxidante variate, datorate compoziției variate de compuși aparținând unor clase diferite .



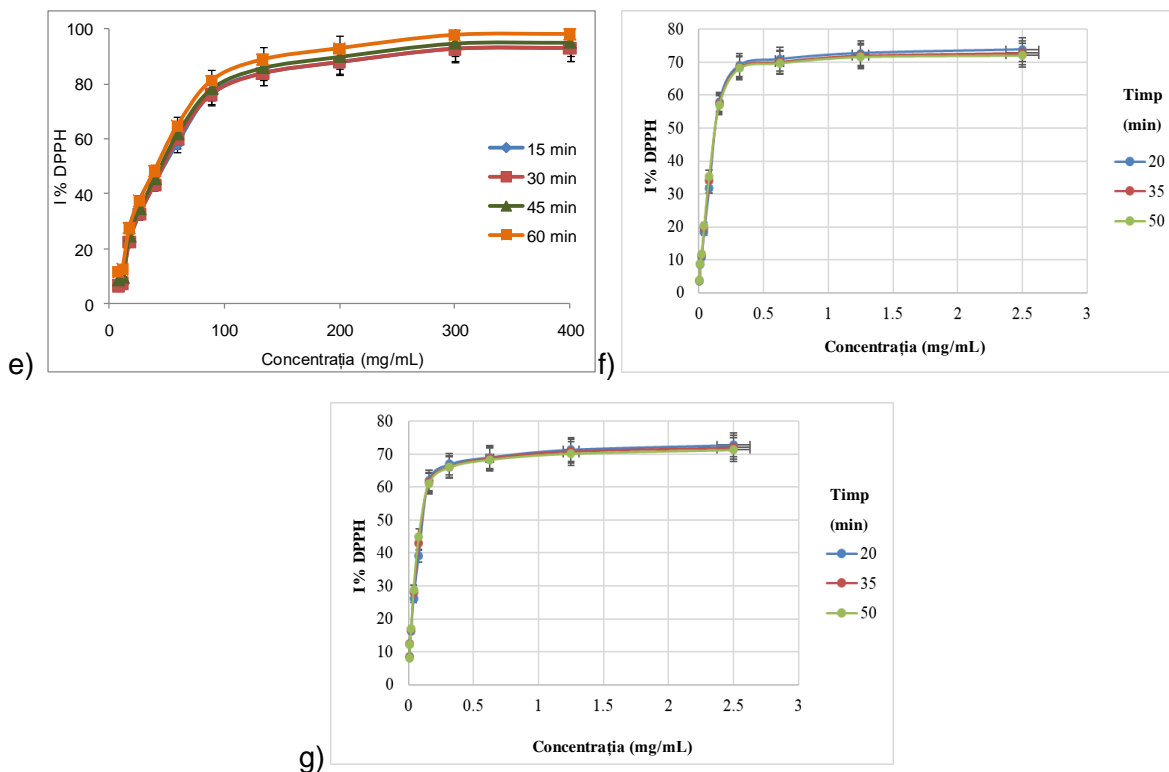
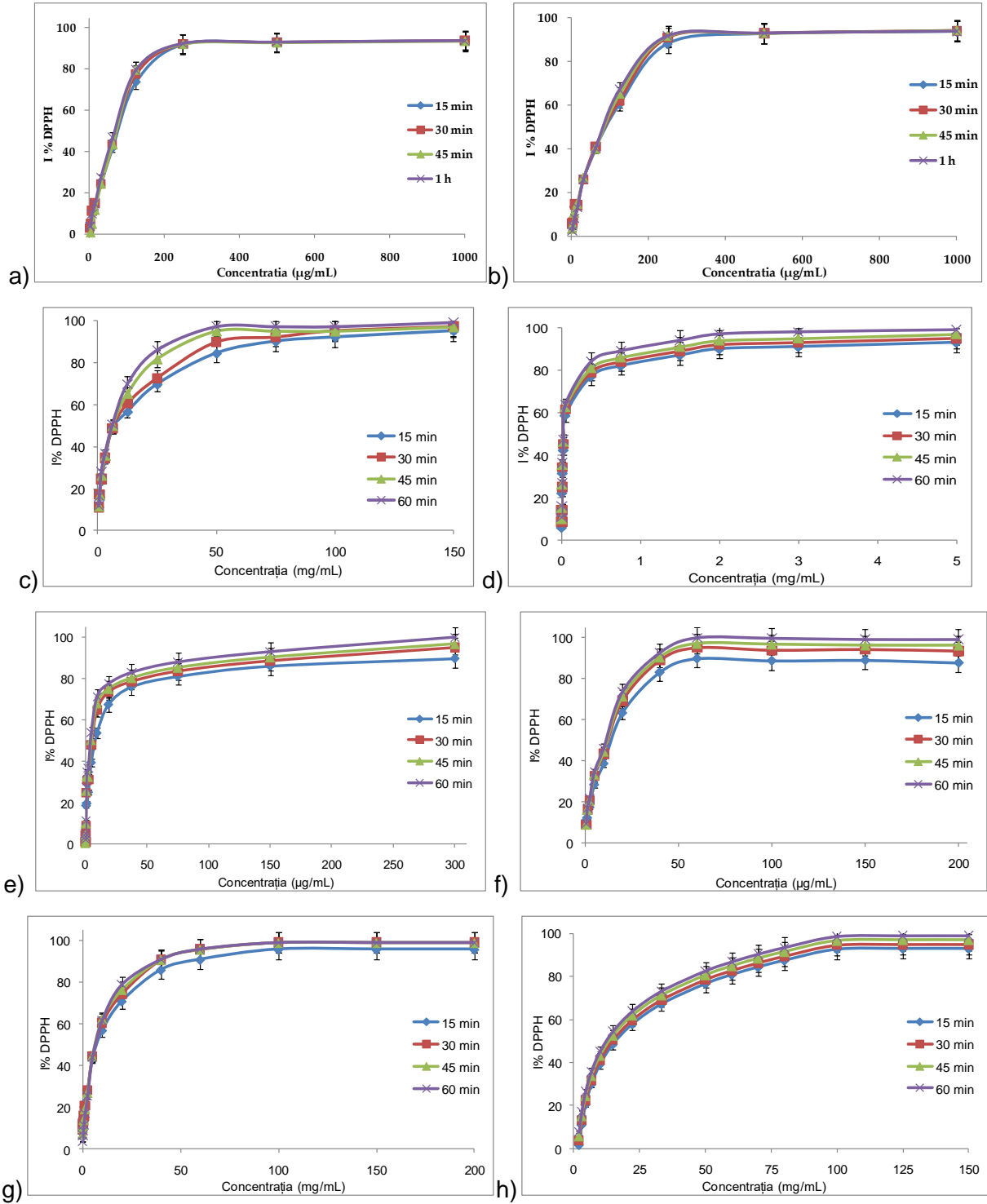


Figura 5.9. Procentul de inhibare a radicalului DPPH pentru (a) acid galic, (b) uleiul esențial de *O. basilicum*, (c) extractul metanolic de *O. basilicum*, (d) extractul etanolic de *O. basilicum*, (e) uleiul esențial de *O. citriodorum*, (f) extractul metanolic *O. citriodorum* și (g) extractul etanolic de *O. citriodorum* după diferite intervale de timp de incubare. Fiecare valoare reprezintă media a trei experimente individuale și barele de eroare cu deviația standard.

Conținutul ridicat de compuși fenolici și flavonoide justifică activitatea antioxidantă a extractelor alcoolice din plantele analizate. Compușii cu proprietăți redox din compoziția uleiurilor esențiale pot fi și ei responsabili de activitatea antioxidantă ridicată a acestora. Procentul de inhibare a radicalilor DPPH de către extracte nu a variat semnificativ în timp (de la 15 min până la 60 min), spre deosebire de uleiurile esențiale unde s-a constatat că aceeași concentrație crește activitatea sa de inhibare a radicalilor DPPH în timp (Figurile 5.9 și 5.10). Rezultatele obținute prin analiza probelor au arătat că activitatea de inhibare a radicalilor DPPH este foarte influențată de solventul cu care s-a realizat extracția și, în consecință, de compoziția fitochimică a extractului (Figura 5.9 și 5.10). Capacitatea antioxidantă a speciilor analizate este un parametru util care se corelează cu determinările fitochimice. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu datele din literatură care au arătat o activitate puternică de captare a radicalului DPPH pentru extractele și uleiurile esențiale din speciile de plante selectate [70,253,265,289,409,527,528].



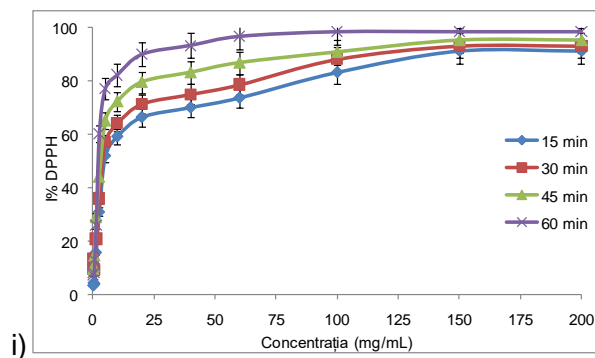


Figura 5.10. Activitatea de inhibare a radicalilor DPPH pentru (a) extractul metanolic din *A. foeniculum*, (b) extractul etanolic din *A. foeniculum*, (c) uleiul esențial de *A. foeniculum*, (d) extractului fracționat în diclorometan de *A. foeniculum*, (e) extractului fracționat în acetat de etil de *A. foeniculum* (f) extractului fracționat în etanol de *A. foeniculum*, (g) uleiul esențial de *C. carvi*, (h) uleiul esențial de *P. anisum*, (i) uleiul esențial de *I. verum* după diferite intervale de timp de incubare. Fiecare valoare reprezintă media a trei experimente individuale și barele de eroare cu deviația standard.

Activitatea crescută de reducere a radicalilor liberi a compușilor naturali justifică și rezultatele acestui studiu în care extractele cu un conținut total ridicat de flavonoide au prezentat activități antioxidante ridicate. Mai multe studii au demonstrat o relație între concentrația mare de flavonoide și modularea proceselor de homeostazie redox celulară, cum ar fi eliminarea ROS [512,557]. Extractele de plante și uleiurile esențiale din acest studiu au demonstrat efecte antioxidante care pot justifica și încuraja unele dintre utilizările lor pentru prevenirea mai multor afecțiuni și studii clinice ulterioare.

Activitățile biologice potențiale ale speciilor analizate diferă între subspecii, deoarece fiecare soi are un profil chimic variat. Variația în compoziția uleiurilor esențiale și a extractelor de plante medicinale se datorează variațiilor genetice ale acestora, etapelor de creștere a plantelor, condițiilor geoclimatice, îngrășămintelor, regimurilor de irigare și stadiului de maturitate în momentul recoltării [360].

Datorită componentelor lor bioactive, soiurile analizate (*Ocimum basilicum* "Aromat de Buzău", *Ocimum citriodorum* "Macedon lămâios", *Agastache foeniculum* "Aromat de Buzău", *Carum carvi*, *Pimpinella anisum* și *Illicium verum*) ar putea fi agenți terapeutici promițători pentru sănătatea umană cu proprietăți antioxidante, antiinflamatorii, analgezice, antimicrobiene, antihipertensive, vasorelaxante, antivirale, nutraceutice, anticancerigene și antidiabetice [108,109,382]. Este necesară o continuare a studiilor de cercetere pentru a explora întregul potențial sinergic/antagonic al numeroaselor combinații posibile care nu au fost determinate în această teză. În acest sens, sunt necesare studii ulterioare de evaluare a mecanismului lor de acțiune și a dozei optime pentru prevenirea și tratarea diverselor afecțiuni generate de stresul oxidativ.

5.4.3.2. Activitatea antioxidantă utilizând metoda ABTS

Antioxidanții puternici împiedică biomoleculele (proteine, zaharuri, acizi nucleici, lipide polinesaturate) să sufere daune oxidative prin reacții mediate de radicalii liberi [564]. Decolorarea soluției de ABTS este determinată de inhibarea cationului radical ABTS^{•+} în funcție de concentrația probei și de timp (Figurile 5.14 și 5.13).

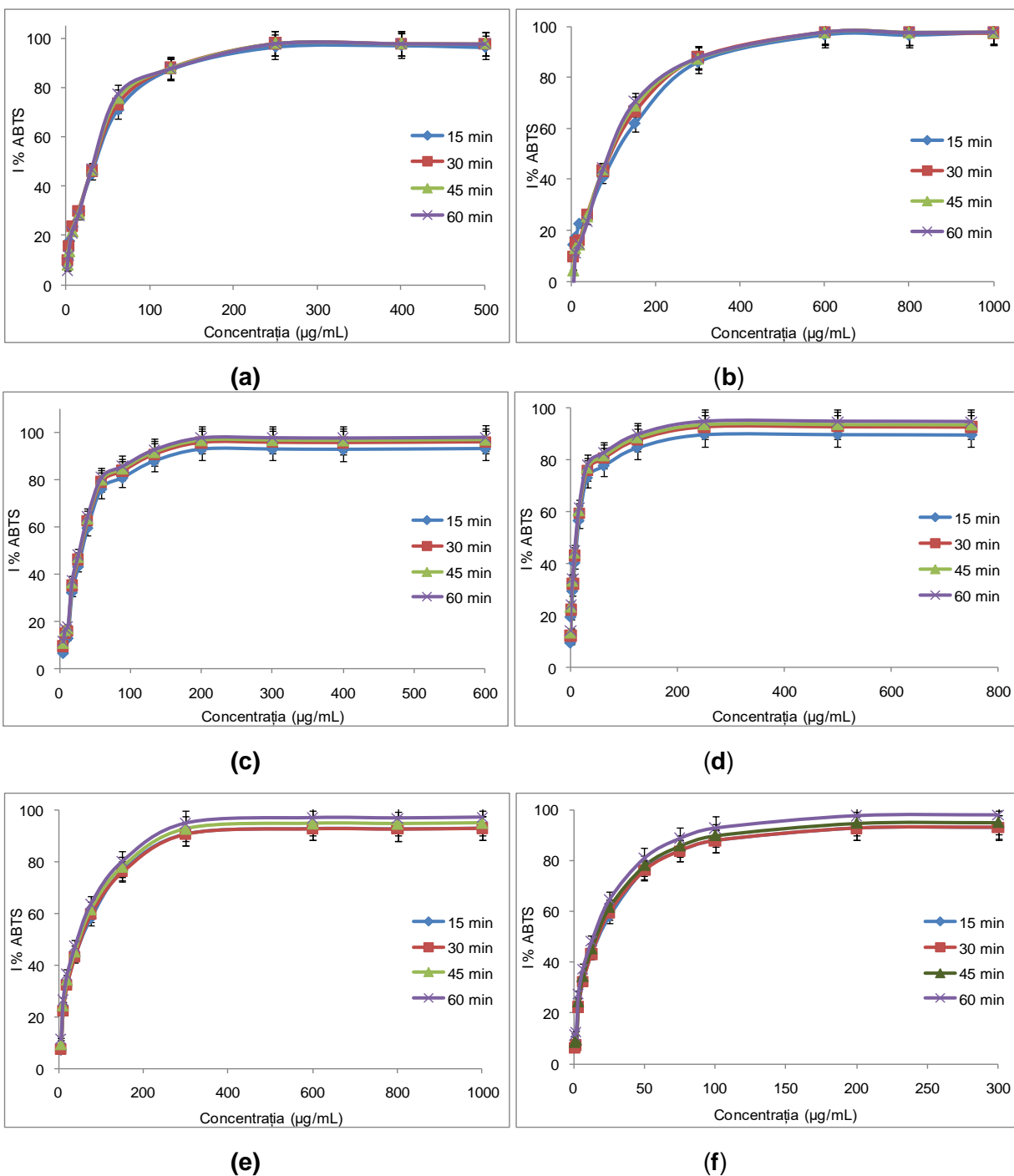
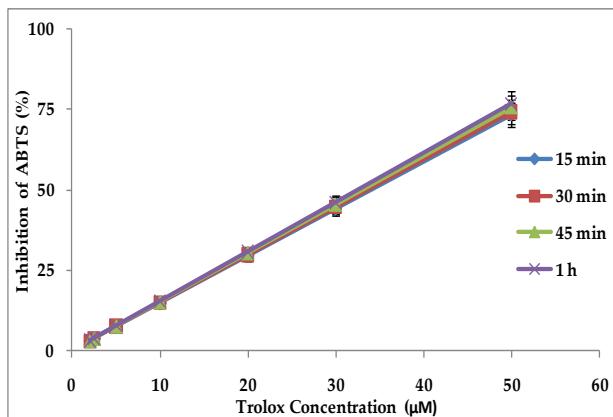


Figura 5.14. Activitatea de inhibare a radicalilor ABTS a (a) extractului metanolic, (b) extractului etanolic, (c) uleiului volatil de *Ocimum basilicum*; (d) extractului metanolic, (e) extractului etanolic, (f) uleiului volatil de *Ocimum citriodorum*. Fiecare valoare reprezintă media a trei experimente și barele de eroare cu deviația standard.

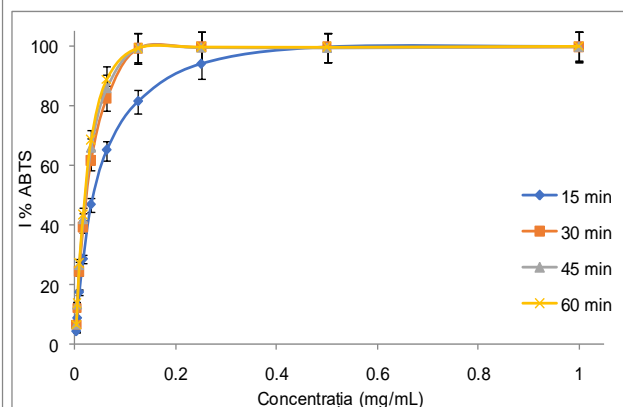
Compușii antioxidanți sunt disponibili din abundență în plante și joacă un rol important în eliminarea radicalilor liberi, oferind astfel organismului uman beneficii importante împotriva daunelor oxidative. Extractele și uleiurile esențiale analizate au demonstrat proprietăți antioxidante datorită prezenței compușilor biologic activi precum anetol, estragol, carvonă, linalol, eugenol, rutină, quercetină, gensteină, daidzeină și hiperozidă. Activitățile antioxidante ale

probelor analizate au prezentat un efect antioxidant corelat cu concentrația probelor dar și cu alte rezultate din literatura de specialitate pentru toate soiurile de plante analizate [107,391,392,409,529,530].

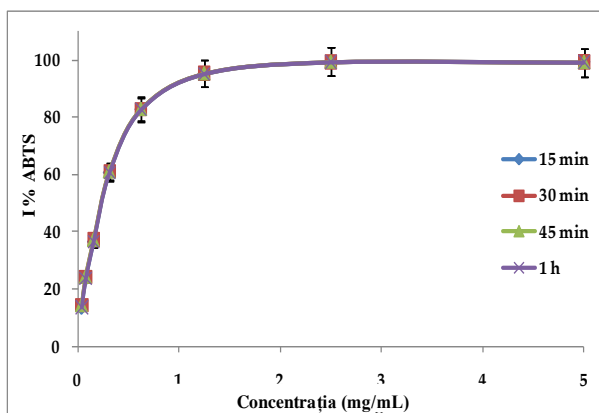
S-au constatat cele mai bune activități antioxidante dintre uleiurile esențiale analizate pentru cel extras din semințe de *C. carvi* iar în cazul extractelor pentru extractul metanolic pentru toate soiurile de plante din familia Lamiaceae (Figurile 5.14 și 5.15).



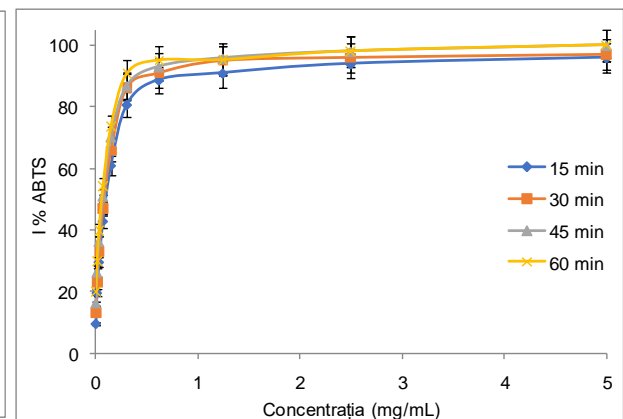
(a)



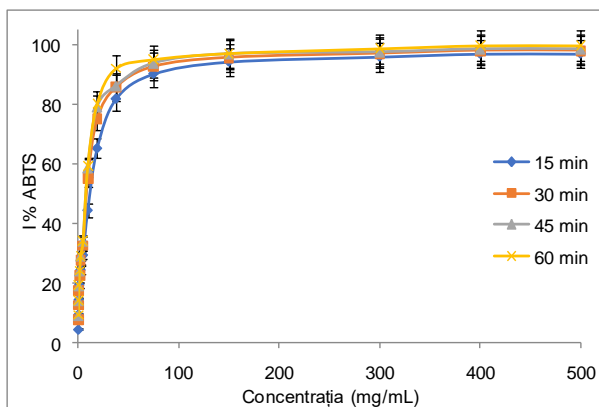
(b)



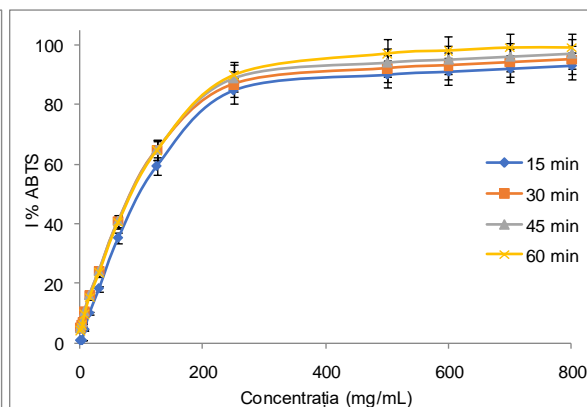
(c)



(d)



(e)



(f)

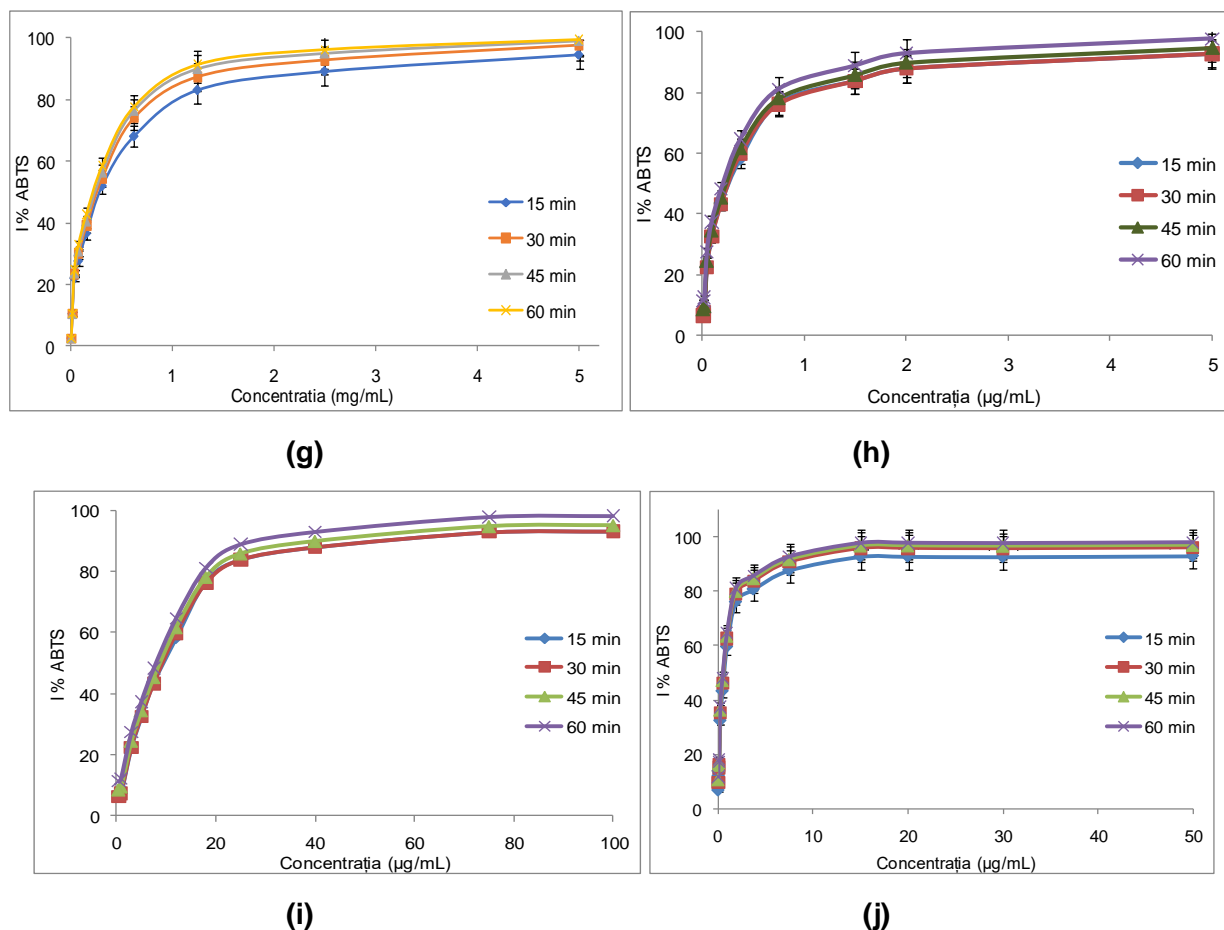


Figura 5.15. Activitatea de inhibare a radicalilor ABTS a (a) unui standard-Troxol, (b) extractului metanolic de *A. foeniculum*, (c) extractului etanolic de *A. foeniculum*, (d) extractului fracționat în diclorometan de *A. foeniculum*, (e) extractului fracționat în acetat de etil de *A. foeniculum*; (f) extractului fracționat în etanol de *A. foeniculum*; (g) uleiului volatil de *A. foeniculum*; (h) ulei esențial de *C. carvi*; (i) ulei esențial de *I. verum*; (j) ulei esențial de *P. anisum*. Fiecare valoare reprezintă media a trei determinări și barele de eroare cu deviația standard.

Toate extractele obținute ca urmare a extracției secvențiale cu solvenți cu polaritate în creștere (diclorometan, acetat de etil și etanol) din pulbere de frunze uscate de *A. foeniculum* au prezentat activitate antioxidantă ridicată prin metoda ABTS. Cea mai bună activitate s-a observat pentru fracția în acetat de etil. În funcție de solventul utilizat la extracția fracționată, compoziția chimică a extractelor este variată și unele clase de compuși se regăsesc doar în anumiți solvenți. Compoziția chimică a extractelor cu diclorometan poate fi constituită din compuși din clasele alcaloizilor și terpenoidelor, cu acetat de etil se pot extrage terpenoide, saponine și alcaloizi iar cu etanol se pot extrage compuși din clasele flavonoide, compuși fenolici, saponine și zaharuri [565]. Prin urmare, acest tip de extracție este util în evaluarea compușilor responsabili de activitatea antioxidantă a extractelor. Studii ulterioare vor fi efectuate și pentru obținerea extractelor fracționate pentru speciile de busuioc.

S-a constatat că extractele și uleiurile esențiale din plantele analizate au efecte antioxidante împotriva cationilor radicali ABTS^{•+} care se datorează compoziției fitochimice unice a fiecărei probe analizate. Aceste rezultate pot justifica și, prin urmare, încuraja utilizarea plantelor din acest studiu ca surse de compuși cu proprietăți antioxidante.

5.4.3.3. Activitatea antioxidantă utilizând metoda FRAP

Testul constă în reducerea ionilor ferici în feroși la pH scăzut, oferind un complex colorat. Tripiridiltriazina ferică (TPTZ 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) are o culoare galben-deschis care, la reducerea la formă feroasă de către antioxidanți, se transformă într-o culoare violet-albastră [232]. Modificarea absorbantei este proporțională cu puterea de reducere totală a antioxidanților din proba analizată.

Tabelul 5.4. Potențialul antioxidant al plantelor analizate prin metoda FRAP

Specia plantei analizate	Probele analizate	FRAP IC ₅₀ (μM Echivalenți Fe(II) / g de extract)
<i>O. basilicum</i>	MeOH	54,178 ± 0,051 ^a
	EtOH	49,685 ± 0,024 ^b
<i>O. citrodorum</i>	MeOH	51,582 ± 0,030 ^b
	EtOH	46,314 ± 0,018 ^c
<i>A. foeniculum</i>	MeOH	45,721 ± 0,014 ^c
	EtOH	39,483 ± 0,017 ^d

Valorile urmate de aceeași literă (a, b, c, d) în aceeași coloană nu prezintă diferențe semnificative statistic ($p < 0,01$). Fiecare valoare reprezintă media a trei experimente individuale ± deviația standard.

Pentru speciile de busuioc, s-a constatat că extractele metanolice au o concentrație IC₅₀ mai mare decât cele etanolice. În cazul speciei *A. foeniculum*, extractul metanolic a demonstrat o putere totală de reducere a complexului feric mai mare (IC₅₀ = 45,721 ± 0,014 μM echivalenți Fe(II)/g extract) în comparație cu extractul etanolic (IC₅₀ = 39,483 ± 0,017 μM echivalenți Fe(II)/g extract), ceea ce indică faptul că extractele metanolice conțin o cantitate mai mare de compuși antioxidanți (Tabelul 5.4). Rezultatele obținute prin evaluarea activității antioxidante prin metoda FRAP sunt similare cu alte rezultate din literatura de specialitate pentru soiurile de plante analizate [265,527,529,531–533].

5.4.4. Potențialul citotoxic asupra celulelor tumorale

Activitatea citotoxică a uleiurilor esențiale a fost evaluată în celulele canceroase mamare MCF-7 și fibroblastele dermice normale, HDF. Uleiurile volatile analizate reprezintă amestecuri complexe de compuși și fiecare compus potențial îmbunătățește sau modifică efectele altor constituenți. În acest studiu s-au utilizat uleiurile volatile cu toți constituenții, amestecuri fitochimice complex, pentru a maximiza potențialul efect anticancerigen și pentru a evalua în mod corespunzător potențialele riscuri pentru celulele și țesuturile sănătoase.

Activitatea citotoxică a uleiului esențial *A. foeniculum* a fost evaluată prin testul MTT. La concentrații mai mici (1 μL/mL) a fost observată o citotoxicitate ridicată împotriva celulelor tumorale mamare MCF-7, dar nu și asupra fibroblastelor dermice umane sănătoase (HDF), care au indicat selectivitatea pentru celulele tumorale și sugerează prezența componentelor biologice active care contribuie la efectul citotoxic ridicat observat. Rezultatele prezentului studiu oferă noi perspective asupra utilizării uleiului esențial *A. foeniculum* ca sursă potențială de compuși bioactivi și un bun candidat pentru produsele farmaceutice pe bază de plante.

Studiul actual al uleiului esențial de *A. foeniculum* din România asupra liniei celulare tumorale MCF-7 a indicat un efect citotoxic mai mare la concentrații mai mici (1 μL/mL), ceea ce a sugerat prezența altor componente active din punct de vedere biologic care au contribuit la efectul citotoxic ridicat. În plus, folosind celulele sănătoase, fibroblastele dermice umane HDF, efectul citotoxic pare să indice o selectivitate îmbunătățită pentru celulele tumorale mamare, la

concentrații mai mari de 0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Figura 5.17). Uleiul esențial *A. foeniculum* prezintă activitate citotoxică semnificativă asupra celulelor tumorale mamare MCF-7, din punct de vedere statistic, la concentrații mai mari de 0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ($p < 0,001$). Valorile IC_{50} obținute la utilizarea programului de statistică GraphPad Prism (vs. 5.0) au fost asupra celulelor tumorale mamare MCF-7 $\text{IC}_{50}=0,24\pm 0,09$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ și asupra celulelor dermice umane sănătoase HDF $\text{IC}_{50}=0,47\pm 0,1$ $\mu\text{L}/\text{mL}$.

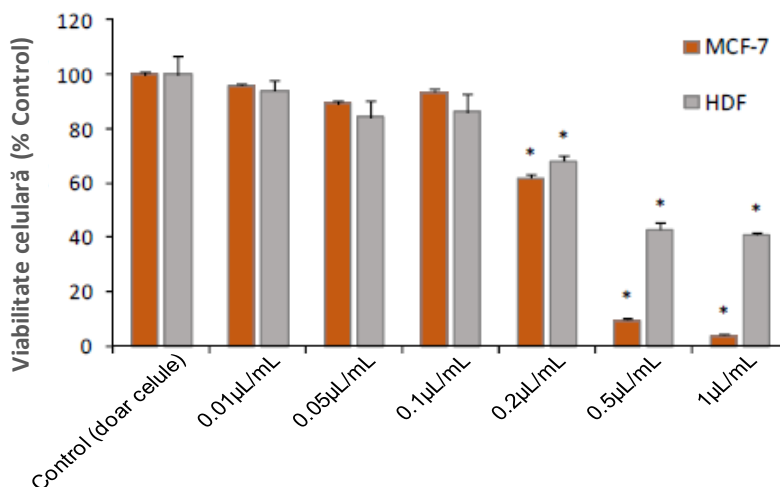


Figura 5.17. Activitatea citotoxică a uleiului esențial *A. foeniculum* împotriva liniilor celulare MCF-7 și HDF. Control = doar celule fără tratament. Datele reprezintă media \pm SD a două experimente independente cu cel puțin patru replici per condiție. *Semnificativ diferite (testul Dunnett) de la condițiile de bază ($p < 0,001$).

Studiile noastre privind evaluarea uleiului volatil de *A. foeniculum* din România pe liniile celulare ale cancerului de sân MCF-7 au indicat un efect citotoxic ridicat la concentrații scăzute ($<0,5$ $\mu\text{L}/\text{mL}$), ceea ce înseamnă că un amestec de compuși biologic activi au contribuit la efectul citotoxic ridicat observat. În cazul celulelor dermice sănătoase HDF numai la concentrații mai mari de 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, s-a observat pierderea viabilității, dar nu la fel de mult ca cea observată pentru celulele canceroase. Alte studii au raportat că agastinol și agastenol, lignani detectați în specii de *Agastache*, au inhibat apoptoza în celulele leucemice U937 [124]. Estragolul, componenta principală a uleiului volatil, a demonstrat proprietăți anticancer dar și alte activități biologice importante precum antimicrobiene, bradicardic, relaxant muscular, anestezic, anticonvulsivant, vasoprotectoare, antiinflamator și antioxidant [108].

Cea mai puternică acțiune de scădere a viabilității celulare tumorale pe celulele MCF-7 s-a obținut pentru uleiul esențial de *Carum carvi*, a cărui constituent majoritar este carvona (Figura 5.18).

5.4.5. Inhibarea xantin oxidazei de către unii compuși din speciile analizate

Xantin oxidaza (XO) este implicată în degradarea purinei la om prin formarea xantinei din hipoxantină și este în cele din urmă transformată în acid uric printr-o reacție enzimatică catalizată de xantinoxidază [575]. Acidul uric este eliminat prin urină, dar formarea excesivă a acidului uric poate duce, în consecință, la hiperuricemie și gută [575,576]. EO de la *A. foeniculum* a demonstrat o inhibare ridicată a activității xantinoxidazei *in vitro* ($84,077 \pm 0,031\%$) la o concentrație de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, care este comparabilă cu cea a alopurinolului 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, un bine-cunoscut inhibitor de XO [576]. EO și extractele alcoolice au demonstrat activități inhibitorii semnificative la concentrații mai mari de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,001$) și, respectiv, mai mari de 0,25 mg/mL ($p < 0,001$), (Figura 5.15).

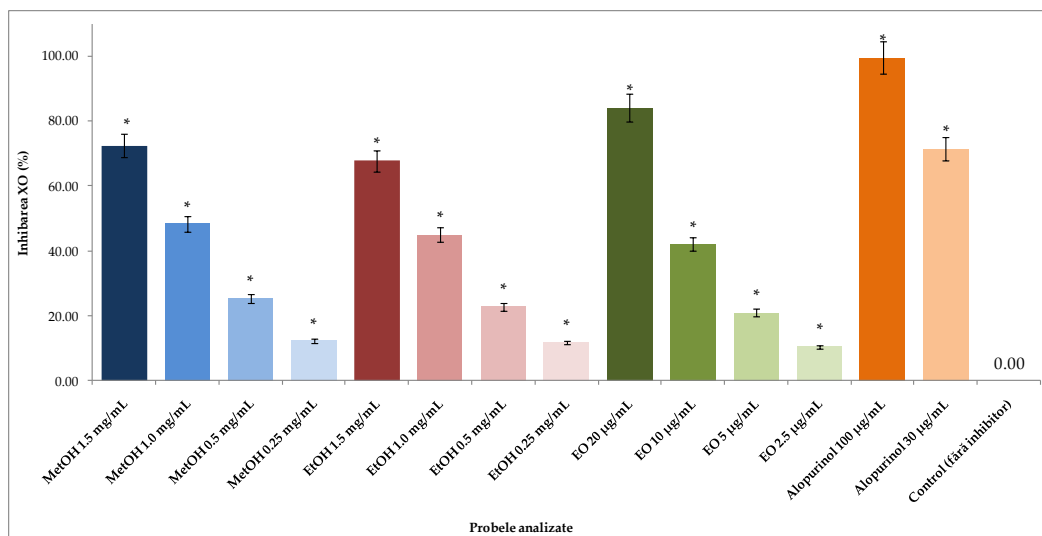


Figura 5.15. Activitatea inhibitoare a xantin oxidazei (XO) de către alopurinol, extracte și ulei volatil (EO) de *A. foeniculum* evaluate la concentrații diferite. Rezultatele prezentate reprezintă mediile a trei experimente individuale și barele de eroare cu deviația standard. *Semnificativ diferit (Dunnett *t*-tests) față de condițiile control (fără inhibitor) ($p < 0,001$).

Aceste rezultate sugerează că extractele de *A. foeniculum* și uleiul esențial pot avea multiple mecanisme de acțiune și activități biologice diverse care contribuie la activitatea lor biologică. Studii ulterioare sunt necesare pentru a evalua potențialul de inhibare a XO pentru extractele alcoolice de busuioc și uleiurile esențiale de busuioc, chimen și anason.

5.5. Concluzii parțiale

- Extractele și uleiurile esențiale de *O. basilicum*, *O. citriodorum* și *A. foeniculum* au arătat activitate antioxidantă împotriva radicalilor liberi DPPH*. De asemenea uleiurile esențiale de *C. carvi*, *I. verum* și *P. anisum* au prezentat o activitate foarte bună de inhibare a radicalilor DPPH, mai ridicată decât celelalte probe analizate din speciile de plante din familia Lamiaceae. Extractele fracționate de *A. foeniculum* au prezentat activități antioxidante variate, datorate compoziției variate de compuși aparținând unor clase diferite.
- Prin metoda FRAP de evaluare a activității antioxidante, pentru speciile de busuioc, s-a constatat că extractele metanolice au o concentrație IC_{50} mai mare decât cele etanolice. În cazul speciei *A. foeniculum*, extractul metanolic a demonstrat o putere totală de reducere a complexului feric mai mare ($IC_{50} = 45,721 \pm 0,014 \mu\text{M}$ echivalenți Fe(II)/g extract) în comparație cu extractul etanolic ($IC_{50} = 39,483 \pm 0,017 \mu\text{M}$ echivalenți Fe(II)/g extract).
- Cea mai puternică acțiune de scădere a viabilității celulare tumorale pe celulele MCF-7 s-a obținut pentru uleiul esențial de *Carum carvi*, a cărui constituent majoritar este carvona.
- Uleiurile esențiale și extractele alcoolice au demonstrat activități inhibitorii semnificative la concentrații mai mari de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$) și, respectiv, mai mari de 0,25 mg/mL ($p < 0,001$).
- Aceste rezultate sugerează că extractele și uleiurile esențiale din *A. foeniculum* pot avea mai multe activități biologice datorită compoziției lor chimice. Acest studiu intenționează să ofere noi contribuții la efectele relevante din punct de vedere farmacologic ale extractelor alcoolice și ale EO din *A. foeniculum*, cum ar fi activitățile antioxidante și inhibitorii ale xantinoxidazei, precum și proprietăți citotoxice ale EO asupra celulelor canceroase, care pot fi considerate drept dovezi de eficacitate a acestei plante medicinale.

Capitolul 6. Analiza unor izoflavonoide separate din speciile analizate prin studii *in silico* (modelare moleculară)

6.2. Obiective principale

În acest studiu obiectivul principal a fost evaluarea rezultatelor obținute la analiza *in silico* a potențialului bioactiv al unor izoflavone (genisteina și daidzeina) identificate în speciile de plante analizate prin studii de modelare moleculară în care au fost utilizate două proteine, PI3K α (fosfatidilinozitol 3-kinaza alfa) și XO (xantinoxidaza), proteine cu rol enzimatic important și care sunt implicate în atenuarea diferitelor maladii inflamatoare.

De asemenea, s-a propus investigarea capacității de inhibare a două enzime, kinaza PI3K α și xantinoxidaza (XO) de către cei doi compuși.

6.4. Rezultate și discuții

Rezultatele obținute prin aplicarea metodei computaționale au fost realizate cu succes. Sunt evidențiate structurile moleculare optimizate ale compușilor genisteină și daidzeină, compararea structurii de raze X cu structura moleculară optimizată pentru genisteină, evaluarea parametrilor electronici, orbitalii moleculari de frontieră, harta potențialului electrostatic molecular, calculul unor parametri moleculari cu programele SwissADME și AdmetSAR, precum și andocarea compușilor studiați pe două enzime, proteinele kinaza PI3K α și xantinoxidaza XO.

Au fost reprezentate hărțile potențialului electrostatic molecular (ESP) pentru fiecare compus investigat în vederea ilustrării polarității relative a moleculei și a identificării situs-urilor active unor atacuri electrophile/nucleofile. Hărțile ESP (Figurile 6.10 și 6.11) indică zonele cu potențial electrostatic negativ în culoare roșie și pozitiv în albastru. Regiunile cu potențial electrostatic negativ sunt localizate în zona grupărilor C = O, OH sau ciclului piranic ce conțin oxigen. Aceste zone sunt situsuri favorabile pentru atacul agenților electrophili, în timp ce zonele cu potențial pozitiv favorizează atacul agenților nucleofili.

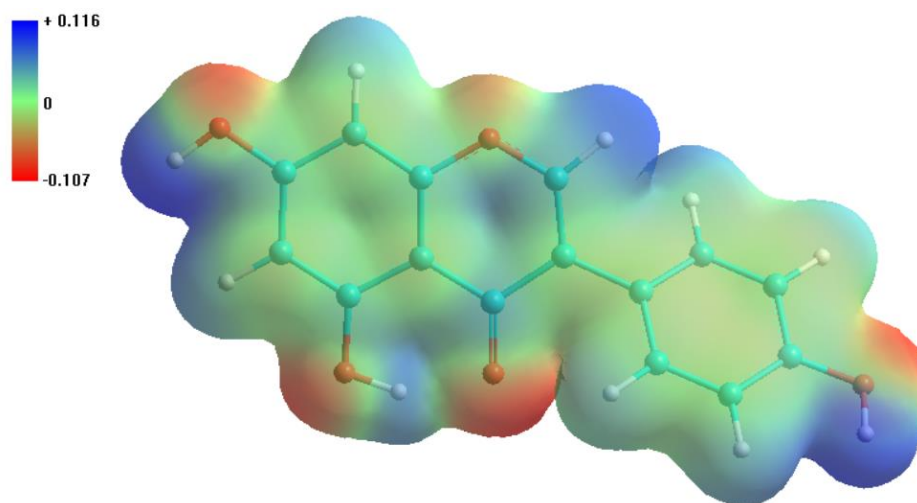


Figura 6.10. ESP pentru compusul 5,7-dihidroxi-3-(4-hidroxifenil)cromen-4-onă (genisteină)

Cu ajutorul hărților ESP s-a identificat faptul că genisteina are cinci situs-uri active pentru atacul electrophil în timp ce daidzeina are patru astfel de situs-uri.

6.4.4. Evaluarea unor parametri privind biodisponibilitatea compușilor studiați

Biodisponibilitatea unui medicament indică eficacitatea acestuia și reprezintă cantitatea de substanță activă eliberată din medicament, absorbită și distribuită în organism pentru a ajunge la locul de acțiune unde se manifestă efectul terapeutic, precum și viteza cu care se derulează acest proces [618].

Tabelul 6.6. Calculul unor parametri privind biodisponibilitatea orală a compușilor investigați cu ajutorul programelor SwissADME și AdmetSAR

Nr. crt	Denumire compus	LogS	LogPapp (cm/s)	BBB	Absorbție Gastrointestinală	Scor BA
1	Genisteină	-3,72	1,0095	Nu	Crescută	0,55
2	Daidzeină	-3,53	1,1564	Da	Crescută	0,55

*BBB-bariera hemato-encefalică

6.4.5. Rezultatele andocării moleculare

Andocarea moleculară a compușilor studiați pe receptorul PI3K α

Structura proteinei PI3K α (PDB ID: 4JPS) a fost descărcată de pe site-ul web al Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>). În analizele de andocare, izoflavonele au fost folosite ca liganzi în timp ce kinaza PI3K α a fost folosită ca receptor. Toate moleculele de apă și alte molecule mici din structura cristalină a proteinei au fost excluse, iar atomii de hidrogen polar și sarcinile Gasteiger au fost adăugate. După setarea parametrilor implicați, studiile de andocare au fost efectuate între PI3K α și izoflavone și ligandul standard. Pentru generarea celor mai concludente rezultate de andocare, s-au realizat multiple analize în vederea căutării situsului celui mai potrivit, prin folosirea mai multor cutii grid (x, y, z).

Comparând rezultatele andocării (Tabel 6.7) pentru genisteină și daidzeină cu cele ale ligandului standard, alpelisib (Figurile 6.12), se constată că izoflavonele investigate formează un complex cu kinaza PI3K α mai puțin stabil decât în cazul standardului alpelisib prin faptul că energia de legătură pentru kinază-standard (-9,1 kcal/mol) este mai mică decât în cazul izoflavonelor (-7,8 kcal/mol pentru genisteină și -8 kcal/mol pentru daidzeină). Prin urmare, activitatea de inhibare a izoflavonelor (constanta de inhibare $K_i = 1.48 \mu\text{M}$ pentru daidzeină, $K_i = 2,09 \mu\text{M}$ pentru genisteină) este mai mică decât a compusului standard ($K_i = 0,21 \mu\text{M}$). Menționăm că din experiment [613] se știe că alpelisib este un medicament cu activitate inhibitorie intensă. În concluzie, compușii investigați pot fi considerați drept potențiali inhibitori de kinază PI3K α cu activitate medie.

6.5. Concluzii parțiale

➤ Au fost analizate din punct de vedere structural și al potențialului chimic, două izoflavone, genisteina și daidzeina, prezente în plantele analizate, prin modelare moleculară. Compușii au fost optimizați obținându-se astfel geometriile de echilibru, OM de frontieră (HOMO, LUMO), harta potențialului electrostatic molecular și o serie de parametri electronici. Validarea metodei de optimizare B3LYP/6-311G(d,p) s-a realizat prin compararea structurii optimizate a genisteinei cu analiza XRD. Concordanța foarte bună a geometriilor moleculei (lungimea legăturilor, unghiul dintre legături) obținute teoretic și experimental a confirmat faptul că metoda de modelare B3LYP/6-311G(d,p) aleasă pentru optimizare este foarte performantă.

➤ Din analiza parametrilor electronici (energia ΔE_{H-L} , rigiditatea chimică, flexibilitatea chimică, indicele de electrofilicitate, etc.), reiese că atât genisteina cât și daidzeina, prezintă potențial chimic mediu. În privința distribuției de sarcină pentru orbitalii de frontieră, s-a remarcat că legătura dublă C2 = C3 permite o delocalizare mai pronunțată a sarcinii electrice la trecerea de la orbitalul HOMO la orbitalul LUMO pentru compușii investigați.

➤ Hărțile potențialului electrostatic molecular au identificat pentru compusul genisteină existența a cinci situsuri active pentru atacul electrofil, spre deosebire de compusul daidzeină unde au fost remarcate doar patru situsuri active la atacul electrofil.

➤ Din analiza parametrilor privind biodisponibilitatea orală s-a constatat că ambii compuși investigați respectă regulile extinse ale lui Lipinski și au un scor de biodisponibilitate de 0,55, demonstrând astfel că prezintă o bună biodisponibilitate orală.

➤ Verificarea potențialului de inhibare a genisteinei și daidzeinei asupra receptorilor, PI3K α și XO, s-a făcut prin andocare moleculară și utilizând liganzi standard cu activitate inhibitorie cunoscută. S-a constatat că liganzii investigați au potențial de inhibare mediu (de ordinul μM) atât asupra kinazei PI3K α cât și asupra xantinoxidazei, fapt confirmat și de datele experimentale. Deci, genisteina și daidzeina pot fi potențiale medicamente (adjuvante) pentru tratarea cancerului și a gutei, investigații suplimentare fiind necesare, pentru conformitate și aplicații viitoare.

Rezultatele acestor cercetări, obținute în acest capitol, au fost parțial publicate în articole științifice cu impact, ca prim autor: *Separations, "Comparative Study of Natural Antioxidants from Glycine max, Anethum graveolens and Pimpinella anisum Seed and Sprout Extracts Obtained by Ultrasound-Assisted Extraction, 2022" [441].*

Capitolul 7. Concluzii generale și originalitatea contribuțiilor

7.1. Concluzii generale

Cercetările desfășurate pe parcursul acestei teze de doctorat au fost complexe și ramificate, abordând studiul fitochimic al unor plante aromate soiuri noi/cultivate în România, studiile axându-se în principal pe două metode de extracție, cu ajutorul ultrasunetelor și prin hidrodistilare. Identificarea, separarea și cuantificarea compușilor organici naturali s-a realizat din extracte alcoolice, (etanolic și metanolic), obținute prin ultrasonare, și din extracte uleioase, obținute prin hidrodistilare. Contribuțiile științifice originale rezultate în urma studiilor sunt prezentate sintetic mai jos.

- ✿ Speciile de plante aromate, soiuri hibride noi de busuioc „Aromat de Buzău” (*Ocimum basilicum*) și „Macedon” (*Ocimum citriodorum*) dar și *Lophanthus* (*Agastache feniculum* (Pursch) Kuntze „Aromat de Buzău”), precum și plante cultivate în România, anason boabe (*Pimpinella anisum*) și chimen (*Carum Carvi*) și anason stelat (*Illicium verum*), au fost prelevate de la Stațiunea de Cercetare - Dezvoltare pentru Legumicultură Buzău, România
- ✿ Extracția compușilor organici naturali din plantele aromate s-a realizat pentru prima dată, pentru soiurile hibride, prin metode de extracție cu solvenți și asistată de ultrasunete (US), utilizând drept solvenți alcoolul etilic și metanolul. Pentru prima dată s-au obținut extracte din specia *Agastache feniculum* (Pursch) Kuntze „Aromat de Buzău” utilizând extracția cu US, fracționat, utilizând solvenți cu polarități diferite. Prin extracția prin hidrodistilare s-au extras compușii organici volatili din cele șase plante aromatice studiate
- ✿ Separarea, identificarea și cuantificarea compușilor naturali din speciile studiate s-au realizat, pentru prima dată, pentru speciile noi de busuioc „Aromat de Buzău” (*Ocimum basilicum*) și „Macedon” (*Ocimum citriodorum*) și de *Agastache feniculum* (Pursch) Kuntze „Aromat de Buzău”
- ✿ S-a analizat pentru prima dată prin cromatografie GC-MS compoziția chimică a extractelor obținute prin hidrodistilare din specii de plante aromatice cultivate în România din familia *Lamiaceae*: *Ocimum basilicum*, *Ocimum citriodorum*, *Agastache foeniculum*, *Pimpinella anisum*, *Carum carvi* și *Illicium verum* în care s-a confirmat prezența compușilor majoritari linalol, metil chavicol (estragol), eugenol, metil-eugenol, d-germacrena, 1,8-cineol, β -cariofilen, trans-anetol, γ -himacalen, carvona, limonen și estragol.
- ✿ Componenta principală detectată prin analiza GC-MS în uleiul esențial de *Ocimum basilicum* „Aromat de Buzău” ($34,87 \pm 1,05\%$) a fost terpenoidul aciclic linalol (3,7-dimetilocta-1,6-dien-3-ol), în uleiul esențial de *Agastache Foeniculum* denumit și „Aromat de Buzău” a fost estragolul (1-alil-4-metoxibenzen), în uleiul esențial de chimen (*Carum carvi*) analizat a fost bogat în carvonă ($68,49 \pm 1,41\%$), iar omponenta principală identificată în uleiurile esențiale analizate de anason stelat (*Illicium verum*) și de anason boabe (*Pimpinella anisum*) a fost trans-anetolul.
- ✿ S-a utilizat cromatografia de lichide de înaltă performanță pentru identificarea, separarea și cuantificarea unor compuși din clasa polifenolilor, flavonoidelor și lignanilor din extracte alcoolice, etanolic și metanolic, de *Ocimum basilicum*, *Ocimum citriodorum* și *Agastache foeniculum*.
- ✿ Principalii compuși cu proprietăți biologice active identificați au fost diferiți în funcție de specie de modul de extracție și de solventul utilizat. Astfel, în extractele alcoolice din soiurile de busuioc românești analizate s-au evidențiat șase constituenți principali și anume catechina, rutina, hiperozida, naringina, naringenina și genisteina.
- ✿ S-a realizat cuantificarea compușilor chimici identificați în extractele alcoolice și rezultatele

au arătat că naringina este compusul principal al extractelor de busuioc, concentrația acestuia variind între $930,10 \pm 0,15 \mu\text{g/g}$ și $2618,11 \pm 0,23 \mu\text{g/g}$. Cele mai mari concentrații de naringină s-au înregistrat pentru extractele metanolice pentru ambele soiuri de busuioc, concentrația fiind de trei ori mai mare la soiul *O. basilicum* "Aromat de Buzău".

- ✿ În specia *Agastache foeniculum* au fost identificați atât în extractele metanolice cât și în cele etanolice acizii fenolici p-cumaric și cafeic, flavonolii rutina, quercetină și hiperozida, flavanona naringenina și izoflavona genisteina. Acidul tanic a fost identificat doar în extractele metanolice de *Agastache foeniculum*.
- ✿ Genisteina și quercetina au fost găsite în concentrații mari în ambele extracte alcoolice de *A. foeniculum*, conținutul de quercetină variind între $704,148 - 1073,637 \mu\text{g/g}$ s.u. și cel de genisteină între $2229,999 - 3171,823 \mu\text{g/g}$ s.u. Acidul tanic a fost cuantificabil doar în extractul metanolic. Acidul cafeic, acidul p-cumaric, quercetina, rutina și hiperozida au fost identificate în ambele extracte de *A. foeniculum*.
- ✿ S-a confirmat prezența compușilor polifenolici și flavonoidici (acidul cumaric, acidul cafeic, catechina, rutina, hiperozida, quercetina, naringenina, naringina și genisteina) și prin analiza UHPLC/MS, în diferite fracții de *Ocimum basilicum*, *Ocimum citriodorum* și *Agastache foeniculum*.
- ✿ S-au identificat și alți compuși specifici, în fracțiile de *Ocimum* fiind identificați compuși cu structură polifenolică precum acidul malonic-3,4-O-dicafeoilchinic respectiv acidul 1-cafeoil-5-feruloilchinic, sau acidul rozmarinic (care prezintă un spectru similar cu esculetina sau acidul cafeic) dar și a unor flavonoide precum calicosina, o izoflavonă O-metilată, sau miricetina,
- ✿ Analiza UHPLC/MS a fracțiilor de *Agastache foeniculum* au evidențiat prezența compușilor polifenolici și flavonoidici (acid p-cumaric, acid clorogenic, rutina, quercetina, daidzina, genisteina), dar și alți compuși specifici din clasa flavonoidelor (pinocembrina, formonetina, ononina, glicetina, prunetina, pseudobaptigenina, tectorigenina, irisolidona), compuși din clasa triterpenoidelor (acid oleanic, acid betulinic) cumestanilor (glicozidul cumestrolului) alcaloizilor (hordenina, flindersina și salsolinolul) și aminoacizilor (S-Lactoilglutation, acid L-aspartic, citrulina).
- ✿ S-a utilizat pentru prima dată spectrometria RMN în analiza uleiurilor esențiale obținute din specii de plante de la stațiunea de cercetare SCDL Buzău, uleiuri obținute prin metoda hidrodistilării. Astfel, prin analiza ^1H RMN a uleiului esențial de *Agastache foeniculum* soiul „Aromat de Buzău”, s-a putut identifica prezența componentului principal, estragolul. Spectrul RMN protonic al uleiului esențial de *A. foeniculum* în stare proaspătă prezintă și după 1 an aceleași semnale, cu aceeași intensitate, constatându-se că în condițiile de păstrare menționate uleiul esențial nu a suferit modificări ale compoziției chimice. Prezența estragolului în concentrații mari conduce la concluzia că varietatea *A. foeniculum* „Aromat de Buzău” poate fi considerată a fi chemotipul de tip estragol. În uleiul esențial de *Carum carvi* s-a identificat prezența compusului chimic majoritar, carvona iar în uleiul esențial de *P. anisum* și *I. verum*, s-a identificat prezența compusului chimic majoritar, trans-anetolul. S-a demonstrat ca analiza RMN poate ajuta atât la identificarea componentelor uleiurilor esențiale contribuind la identificarea și diferențierea speciilor între ele cât și la respectarea reglementărilor guvernamentale în falsificarea uleiurilor esențiale comerciale.
- ✿ S-au utilizat pentru prima dată două tehnici electrochimice, OCP (potențial la cicuit deschis) și CV (voltametria ciclică), și s-au evaluat parametri electrochimici importanți, cum ar fi intensitatea curentului anodic, potențialul de semiundă, coeficientul de difuzie pentru evaluarea extractelor obținute din plante cultivate în România din familia *Lamiaceae*: *Ocimum basilicum*, *Ocimum citriodorum*, *Agastache foeniculum*, *Pimpinella anisum*, *Carum carvi* și *Illicium verum*.

- ✿ S-au analizat electrochimic compuși chimici puri care se regăsesc în speciile de ulei de plante analizate, confirmate prin alte tehnici instrumentale, cum ar fi eugenolul, estragolul și linalolul, și rezultatele au indicat că se pot diferenția probele, prin curentul anodic înregistrat, dependent de concentrația compusului de interes.
- ✿ Evaluarea probelor de ulei de busuioc comparativ cu eugenolul și linalolul (substanțe de referință) a indicat, că la potențial de 0,5 V_{/Ag/AgCl_{sat}} încep schimburi electronice, se înregistrează un curent anodic, ce reflectă potențialul antioxidant, fiind influențat și de specia analizată.
- ✿ Voltamogramele ciclice (CV) înregistrate la extractul metanolic la probe cu uleiul *O. basilicum* AB („Aromat de Buzău”) au indicat un curent anodic, I_a de valoare maximă de 12 μA, la potențial de 0,5 V_{/Ag/Ag Cl_{sat}}.
- ✿ Voltamogramele ciclice (CV) înregistrate au indicat pentru curentul anodic, I_a , în solvenți diferiți, valori variabile, la probele de ulei de busuioc (AB, MB, CB), specii hibride (AB, MB), ulei de *Agastache foeniculum*, care se modifică cu concentrația de ulei, și depind de potențialul aplicat.
- ✿ Curentul anodic înregistrat, deci capacitate antioxidantă superioară, se obține la probe cu ulei de busuioc, când potențialul aplicat este mai mare de 1 V_{/Ag/Ag Cl_{sat}}, ceea ce confirmă activitatea unor compuși chimici, care interacționează eficient în schimburi electronice, cum ar fi grupările hidroxil, din polifenoli, cu aportul de oxigen din probe.
- ✿ Prin voltamogramele înregistrate, probele cu conținut diferit de ulei, din specii diferite se pot diferenția prin curentul anodic înregistrat, deci prin potențial antioxidant activ pentru speciile chimice prezente, studiul parametrilor electrochimici fiind util pentru caracterizarea generală a potențialului antioxidant al probelor și diferențierea dintre acestea.
- ✿ Extractele și uleurile esențiale de *O. basilicum*, *O. citriodorum* și *A. foeniculum* au arătat activitate antioxidantă împotriva radicalilor liberi DPPH•. De asemenea uleurile esențiale de *C. carvi*, *I. verum* și *P. anisum* au prezentat o activitate foarte bună de inhibare a radicalilor DPPH, mai ridicată decât celelalte probe analizate din speciile de plante din familia Lamiaceae. Extractele fracționate de *A. foeniculum* au prezentat activități antioxidante variate, datorate compoziției variate de compuși aparținând unor clase diferite.
- ✿ Dintre combinațiile de uleiuri volatile analizate prin metoda microspectrofotometrică de inhibare a radicalilor DPPH, amestecurile dintre uleiul esențial de *C. carvi* și *A. foeniculum* s-a dovedit a fi cu potențial sinergic mai ridicat decât în cazul combinațiilor cu uleurile volatile de busuioc, valoarea efectului sinergic fiind cel mai ridicat pentru combinația 25:15 mg/mL de ulei esențial de *C. carvi* și uleiul esențial de *A. foeniculum*, cu o valoare de 1,14 ± 0,04.
- ✿ Prin metoda FRAP de evaluare a activității antioxidante, pentru speciile de busuioc, s-a constatat că extractele metanolice au o concentrație IC₅₀ mai mare decât cele etanolice. În cazul speciei *A. foeniculum*, extractul metanolic a demonstrat o putere totală de reducere a complexului feric mai mare (IC₅₀ = 45,721 ± 0,014 μM echivalenți Fe(II)/g extract) în comparație cu extractul etanolic (IC₅₀ = 39,483 ± 0,017 μM echivalenți Fe(II)/g extract).
- ✿ Cea mai puternică acțiune de scădere a viabilității celulare tumorale pe celulele MCF-7 s-a obținut pentru uleiul esențial de *Carum carvi*, a cărui constituent majoritar este carvona.
- ✿ Uleurile esențiale și extractele alcoolice au demonstrat activități inhibitorii semnificative la concentrații mai mari de 2,5 μg/mL ($p < 0,001$) și, respectiv, mai mari de 0,25 mg/mL ($p < 0,001$).
- ✿ Aceste rezultate sugerează că extractele și uleurile esențiale din *A. foeniculum* pot avea mai multe activități biologice datorită compoziției lor chimice.

- ✿ Au fost analizate din punct de vedere structural și al potențialului chimic două izoflavone, genisteina și daidzeina, prezente în plantele analizate, prin modelare moleculară, la baza acestei modelări aflându-se relația dintre activitatea biologică și parametri fizico-chimici ce definesc structura moleculară a compușilor chimici. Compușii au fost optimizați obținându-se astfel geometriile de echilibru, OM de frontieră, ESP și o serie de parametri electronici.
- ✿ Din analiza parametrilor electronici a rezultat că atât genisteina cât și daidzeina, prezintă potențial chimic mediu.
- ✿ Hărțile potențialului electrostatic molecular au identificat pentru compusul genisteină existența a cinci situsuri active pentru atacul electrofil, spre deosebire de compusul daidzeină unde au fost remarcate doar patru situsuri active la atacul electrofil.
- ✿ Din analiza parametrilor privind biodisponibilitatea orală s-a constatat că ambii compuși investigați respectă regulile extinse ale lui Lipinski și au un scor de biodisponibilitate de 0,55, demonstrând astfel că prezintă o bună biodisponibilitate orală.
- ✿ Verificarea potențialului de inhibare a genisteinei și daidzeinei asupra receptorilor, PI3K α și XO, s-a făcut prin andocare moleculară și utilizând liganzi standard cu activitate inhibitorie cunoscută. S-a constatat că liganzii investigați au potențial de inhibare mediu (de ordinul μ M) atât asupra kinazei PI3K α cât și asupra xantinoxidazei, fapt confirmat și de datele experimentale. Deci, genisteina și daidzeina pot fi potențiale medicamente (adjuvante) pentru tratarea cancerului și a gutei, investigații suplimentare fiind necesare, pentru conformitate și aplicații viitoare.

7.2. Perspective de continuare a cercetărilor

Rezultatele experimentale obținute pe parcursul studiilor doctorale ne determină să ne dorim să aprofundăm cercetările începute, perspectivele de cercetare putându-se axa pe activități precum:

- ✓ Evaluarea activității antimicrobiene și antivirale a uleiurilor esențiale obținute;
- ✓ Evaluarea activității antitumorale pe alte linii celulare și *in vivo* a extractelor și uleiurilor esențiale din plantele studiate,
- ✓ Continuarea cercetărilor asupra acțiunii sinergice a categoriilor de compuși bioactivi prin teste *in vitro* și *in vivo*;
- ✓ Continuarea studiilor *in silico* în vederea confirmării activităților analizate *in vitro* prin cercetarea mecanismelor de acțiune a compușilor majoritari identificați în plantele studiate;
- ✓ Încapsularea uleiurilor esențiale obținute din speciile de plante aromatice studiate pentru obținerea de produse cosmetice, alimentare și farmaceutice;
- ✓ Formularea unor preparate farmaceutice cu extractele și uleiurile obținute din plantele studiate;
- ✓ Continuarea cercetărilor cu abordări interdisciplinare pentru realizarea unor studii clinice, în vederea identificării beneficiilor asupra organismului uman;
- ✓ Alte studii *in silico* ale compușilor identificați în plantele analizate cu biomolecule de interes;
- ✓ Biosinteza nanoparticulelor de Au, Ag, Cu, Pt și Sn și obținerea de filme subțiri cu proprietăți antimicrobiene cu posibile aplicații în diverse domenii precum farmaceutic, medical sau alimentar.

Capitolul 8. Diseminarea rezultatelor

8.1. Lista publicațiilor originale (Factor de impact cumulat=14,479)

1. **Bălănescu, Fănică**, Andreea Veronica Botezatu, Fernanda Marques, Anna Busuioc, Olivian Marincaș, Costel Vînătoru, Geta Cârâc, Bianca Furdui, and Rodica Mihaela Dinica. "Bridging the Chemical Profile and Biological Activities of a New Variety of *Agastache Foeniculum* (Pursh) Kuntze Extracts and Essential Oil", *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 828, doi:10.3390/ijms24010828, **F.I.=6,208**.

2. **Balanescu, Fanica**, Anna Cazanevscaia Busuioc, Andreea Veronica Dediu Botezatu, Steluta Gosav, Sorin Marius Avramescu, Bianca Furdui, and Rodica Mihaela Dinica. "Comparative Study of Natural Antioxidants from Glycine Max, Anethum Graveolens and Pimpinella Anisum Seed and Sprout Extracts Obtained by Ultrasound-Assisted Extraction", *Separations* 2022, 9, 152, doi:10.3390/separations9060152, **F.I.=3,344**.

3. **Balanescu, Fanica**, Maria Daniela Ionica Mihaila, Geta Cârâc, Bianca Furdui, Costel Vînătoru, Sorin Marius Avramescu, Elena Lacramioara Lisa, Mihaela Cudalbeanu, and Rodica Mihaela Dinica. "Flavonoid Profiles of Two New Approved Romanian *Ocimum* Hybrids", *Molecules* 2020, 25, 4573, doi:10.3390/molecules25194573, **F.I.=4,927**.

Lucrări ISI publicate în colaborare în perioada studiilor doctorale (Factor de impact cumulat=8,39)

1. Botezatu (Dediu) Andreea Veronica; Horincar Georgiana; Ghinea Ioana Otilia; Furdui Bianca; Bahrim Gabriela-Elena; Barbu Vasilica; **Balanescu Fanica**; Favier Lidia, Dinica Rodica-Mihaela- *Whole-Cells of Yarrowia lipolytica Applied in "One Pot" Indolizine Biosynthesis*, *Catalysts*, 2020, Volume 10, Issue 6, Article Number 629, DOI 10.3390/catal10060629, WOS:000551908500001, **F.I. 4,501**.

2. Dinica Rodica-Mihaela, Sandu Cristina, Botezatu Dediu Andreea Veronica, Busuioc Anna Cazanevscaia, **Balanescu Fanica**, Ionica Mihaila Maria Daniela, Dumitru Caterina Nela, Furdui Bianca, Iancu Alina Viorica- *Allantoin from Valiable Romanian Animal and Plant Sources with Promising Anti-inflammatory Activity as a Nutricosmetic Ingredient*, *Sustainability*, 2021, Volume 13, Issue 18, Article Number 10170, DOI 10.3390/su131810170, **F.I. 3,889**.

8.2. Participarea la conferințe internaționale și naționale

- 📌 Conferința Internațională de la Constanța –CHIMIA 2018 -"New Trends in Applied Chemistry", 2018;
- 📌 Conferința Științifică a Școlilor Doctorale SCDS-UDJG 2018, Ediția a VI-a 2018, GALAȚI;
- 📌 Conferința IasiCHEM 2018, Zilele Facultății de Chimie "Universitatea Alexandru Ioan Cuza" Iași, 2018;
- 📌 Conferința Științifică a Școlilor Doctorale SCDS-UDJG 2018, Ediția a VII-a 2019, GALAȚI;
- 📌 Congresul Internațional de chimie IUPAC, Paris, 2019;
- 📌 Natural Products in Drug Discovery and Human Health, Lisabona, 2019;
- 📌 Conferința Științifică a Școlilor Doctorale SCDS-UDJG 2018, Ediția a VIII-a 2020, GALAȚI;
- 📌 Conferința Științifică a Școlilor Doctorale SCDS-UDJG 2018, Ediția a IX-a 2021, GALAȚI;
- 📌 Conferința Științifică a Școlilor Doctorale SCDS-UDJG 2018, Ediția a X-a 2022, GALAȚI;
- 📌 Conferința Națională de Chimie ediția a XXXVI-a, Călimănești-Căciulata, 2022.

