

TEZĂ DE ABILITARE

STUDII FARMACOGNOSTICE DE INVESTIGARE A UNOR EXTRACTE NATURALE CU POTENȚIAL ANTITUMORAL, ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAN ȘI HEPATOPROTECTOR

Conf. dr. DANIELA HANGANU

REZUMAT

Activitatea mea științifică, profesională și academică, desfășurată ulterior conferirii titlului de doctor (1997) până în prezent, s-a derulat în domeniul științelor farmaceutice respectiv în domeniul farmacognoziei generale și speciale. Prezenta teză include cele mai importante realizări științifice, profesionale și academice. În această perioadă au fost continuate studiile farmaceutice anterioare care au avut ca obiectiv cunoașterea și utilizarea medicinală a resurselor vegetale, în special a celor indigene. Teza cuprinde două părți, care prezintă realizări științifice și academice, precum și noi direcții de dezvoltare.

Materiile prime vegetale reprezintă o importantă și modernă categorie de resurse exploatare tot mai frecvent în domeniul farmaceutic. Exploatarea lor terapeutică la un nivel superior presupune acumularea de informații în baza unor studii farmacognostice aprofundate, pentru fundamentarea științifică a utilizării lor terapeutice, a demonstrării corelației dintre compușii bioactivi identificați și cuantificați cu posibilele efecte biologice, extinderea domeniului terapeutic, evidențierea posibilelor efecte secundare, contraindicații. Calitatea materiei prime vegetale se reflectă în calitatea produsului finit, a preparatului fitoterapic, motiv pentru care evaluarea calității acestuia devine un important aspect al cercetării farmacognostice. În acest context, cea mai mare parte a cercetărilor efectuate s-a axat pe analiza fitochimică a unor surse vegetale provenite din flora spontană sau din culturi, premiză importantă în derularea cercetărilor biologice, farmacologice și clinice.

În prezenta teză de abilitare sunt prezentate o parte din cercetările farmacognostice realizate pe extracte bogate în principii active înzestrate cu activități biologice importante și anume acțiunea antitumorală, antioxidantă, antimicrobiană și hepatoprotectoare.

Testarea potențialului antitumoral al unor extracte caracterizate chimic de *Viscum album*, *Euonymus europaeus*, *Sambucus nigra* s-a realizat *in vitro*, pe linii celulare de melanom uman respectiv *in vivo*, în modelul de carcinom ascitic Ehrlich la șoarece. Aceste extracte s-au dovedit a fi eficiente remedii în terapia antitumorală. Extractul de *Viscum album* administrat concomitent cu doxorubicina a eficientizat acest medicament și i-a redus efectele adverse. Extractul de *Euonymus europaeus* standardizat în evodiamină, un component chimic cu proprietăți antitumorale evidențiate relativ recent, are o activitate antitumorală semnificativă și selectivă pe culturi de fibroblaste dermice umane și de melanom uman. Activitatea antiproliferativă a fost evaluată și *in vivo*, pe șoareci cu

carcinom ascitic Ehrlich. Studiile fitochimice preliminare realizate pe specii de *Sambucus* au creat premise pentru obținerea unei fracțiuni de antociani cu importante efecte antiproliferative pe linii celulare de melanom uman.

Activitatea antioxidantă a fost testată pe o serie de extracte bogate în polifenoli. Polifenolii sunt compuși ai metabolismului secundar vegetal reprezentați de flavonoide (flavonoli, flavone, izoflavone, flavanone, antociani), derivați ai acizilor polifenolcarboxilici, taninuri, lignani etc. implicați în toate activitățile biologice abordate în această teză. Astfel, s-a testat activitatea antioxidantă *in vitro*, prin diferite metode spectrofotometrice pe extracte obținute din material vegetal recoltat de la specii din familia *Fabaceae* cum ar fi *Genistella sagittalis* (L.) Gams., *Genista tinctoria* L., *Cytisus albus* Link, *Cytisus nigricans* L., *Trifolium pratense* L., *Trifolium repens* L., *Medicago sativa* L. și *Melilotus officinalis* L. Acizii fenolici, acidul ferulic și acidul *p*-cumaric, au fost prezenți în concentrații mai mari în extractele de *Trifolium pratense* L., *Medicago sativa* L., *Genista tinctoria* L. respectiv *Genistella sagittalis* (L.) Gam. Aceste extracte au prezentat și componente flavonoidice importante cum ar fi hiperozida, izocvercitrina, apigenina. Rutozida, cvercitrina și luteolina au fost preponderente în extractele de *Cytisus nigricans* L. și *C. albus* L. Potențialul antioxidant al acestor extracte a fost în concordanță cu conținutul polifenolic. Extractele cu cea mai bună activitate antioxidantă au fost cele de *Trifolium sp.* și *Cytisus nigricans* L.

Extractele obținute din material vegetal recoltat de la specii din familia *Lamiaceae* s-au dovedit a fi importante surse de polifenoli, în special de acid rozmarinic, un component polifenolic specific acestei familii. Materialul vegetal a fost recoltat de la 7 specii și subspecii de *Mentha*: *M. viridis* L. var. *crispa* (Schard.) Briq., *M. longifolia* (L.) Huds., *Mentha x rotundifolia* (L.) Huds., *Mentha x piperita* L. var. *officinalis* Sole f. *rubescens* Camus, *Mentha x piperita* L. var. *officinalis* Sole f. *pallescens* Camus), *Mentha spicata* L. subsp. *crispata*, *Mentha suaveolens* Ehrh. var. *variegata*, precum și de la *Hyssopus officinalis* L., *Melissa officinalis* L., *Ocimum basilicum* L., *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L., *Teucrium chamaedris* L. Extractul de *Origanum vulgare* L. s-a dovedit a avea conținutul de acid rozmarinic și potențialul antioxidant cel mai ridicat.

Extractele obținute din cele două chemovarietați ale speciei *Chrysanthemum balsamita* (L.) Baillon, *C. balsamita* var. *balsamita* și *C. balsamita* var. *tanacetoides*, s-au remarcat, de asemenea, a fi importante surse de polifenoli între care predomină acidul *p*-cumaric, rutozida, cvercitrina, cvercitolul și kempferolul, cele de *Lysimachia nummularia* L. și *L. vulgaris* L. au prezentat concentrații ridicate de acid *p*-cumaric, izocvercitrină, rutozidă, cvercitrină, cvercitol și luteolină, iar cele de *Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. et A. Gray au prezentat concentrații ridicate de acid *p*-cumaric, izocvercitrină, rutozidă, cvercitrină și kempferol.

Cercetările realizate asupra unor extractele obținute de la două specii ale genului *Achillea*: *A. millefolium*, *A. schurri* precum și două subspecii de *A. distans*: *subsp. distans* și

subps. alpine au evidențiat conținutul ridicat de compuși polifenolici cu potențial antioxidant remarcabil.

Analiza compușilor polifenolici a fost extinsă și asupra unor extracte obținute de la unele specii de *Amaryllidaceae*, cum ar fi *Galanthus nivalis* L., *Narcissus pseudonarcissus* L., *N. poeticus* L. și *Leucojum vernum* L. Evaluarea potențialului antioxidant a evidențiat superioritatea extractului de *G. nivalis* L., urmat de cel de *N. poeticus* L., *L. vernum* L. și *N. pseudonarcissus* L.

Au fost preparate extracte bogate în izoflavone din material vegetal obținut de la specii de *Fabaceae* care au prezentat un ridicat potențial antioxidant datorat acestor componente implicate și în terapia cancerelor hormonodependente. Extractele de *Genista tinctoria* L., *Genistella sagittalis* (L.) Gam precum și cele obținute din speciile de trifoi s-au dovedit a fi bogate în izoflavone heterozidice cum ar fi daidzina, genistina sau ononina, dar și în agliconi ca daidzeina, genisteina, gliciteina și formononetina. Testările *in vivo* realizate pe extractul de *Trifolium pratense* au dovedit efectul protector al acestuia în stresul oxidativ indus cu bisfenol A, un contaminant alimentar cedat de ambalajele din plastic, cu proprietăți xenoestrogene care induce stres oxidativ.

Produsele apicole sunt surse bogate de polifenoli. În extractele de propolis, provenite din diferite zone ale României, s-au evidențiat componente de tipul acizilor fenolici: acid cafeic, acid ferulic și acid galic și componente flavonoidice, crizină și kempferol.

O altă direcție de cercetare importantă a fost reprezentată de testarea activității antimicrobiene a extractelor caracterizate chimic, calitativ și cantitativ. Utilizând metoda difuzimetrică, cu determinarea diametrelor zonelor de inhibiție și în unele cazuri cu determinarea concentrației minime inhibitorii, s-a testat activitatea extractelor de *Trifolium pratense*, *T. repens*, *Mentha* sp., *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Teucrium chamaedrys*, *Achillea* sp., a extractelor de *Amaryllidaceae* precum și a unor extracte bogate în acid rozmarinic. Testările s-au realizat pe 4 tulpini bacteriene și 2 tulpini de fungi. Bacteriile testate au fost *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* și *Salmonella typhimurium*, iar fungii au fost reprezentați de *Candida albicans* și *Aspergillus niger*. Rezultatele testărilor au evidențiat o activitate superioară a extractelor de *Trifolium pratense*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*, *Teucrium chamaedrys*, pe *Staphylococcus aureus* și *Salmonella typhimurium*. Extractele de *Narcissus pseudonarcissus*, *N. poeticus*, *Galanthus nivalis* și *Leucojum vernum* au prezentat o activitate comparabilă cu cea a gentamicinei pe *Staphylococcus aureus*. Extractele de *N. poeticus*, *Rosmarinus officinalis*, *Mentha x rotundifolia*, *Teucrium chamaedrys* au prezentat o activitate antifungică comparabilă cu fluconazolul.

Evaluarea *in vivo* a efectului hepatoprotector în modelul de hepatotoxicitate indusă cu tetraclorură de carbon la șoarece s-a realizat pe două extracte, extractul de *O. vulgare* ssp. *vulgare* și *Rosmarinus officinalis*. Rezultatele au evidențiat eficiența acestor extracte în special a celui de *O. vulgare* ssp. *vulgare*.

Rezultate cercetărilor farmacognostice realizate contribuie la completarea datelor științifice legate de speciile medicinale abordate, putând fi valorificate pentru o mai bună exploatare terapeutică a acestora, cu obținerea de produse standardizate și un nivel adecvat al calității. Rezultatele cercetărilor obținute după acordarea titlului de doctor au fost publicate în 112 articole științifice, din care 52 articole în reviste ISI.

Activitatea didactică a fost desfășurată la disciplina de Farmacognozie a Facultății de Farmacie și a constat în pregătirea și predarea cursurilor și a lucrărilor practice de Farmacognozie pentru studenții de la Facultatea de Farmacie (în limbile română și franceză), predarea cursului opțional de Plante toxice, precum și a unor cursuri postuniversitare. Pentru desfășurarea activității didactice am contribuit la publicarea unor materiale didactice, am publicat 1 carte de curs de Farmacognozie, 4 cărți de lucrări practice, o carte de Plante toxice și am participat la redactarea altor 8 capitole în cărți de specialitate, în calitate de coautor.

Ultima parte a lucrării se referă la direcțiile viitoare de dezvoltare personală științifică, profesională și academică. În acest sens actualizarea continuă a cursurilor și materialelor didactice în conformitate cu standardele europene actuale și de menținere a nivelului educațional de excelență a fost o preocupare permanentă. Activitatea științifică ulterioară se va dezvolta în direcția aprofundării analizei farmacognostice a materiilor prime vegetale, obținerea de preparate fitoterapeutice conforme standardelor internaționale de calitate, îmbogățite și standardizate în principii active. Astfel, se vor continua studiile asupra unor specii medicinale indigene sau din alte zone europene (*Thymus* sp., *Hypericum* sp., *Salvia* sp., *Teucrium* sp., *Arthemisia* sp., *Origanum* sp., *Achillea* sp., *Stachys* sp., *Stellaria* sp., *Lamium* sp. etc.), pentru a completa datele din literatura de specialitate cu noi date științifice aplicabile în practica terapeutică și care ar putea duce la extinderea potențialului terapeutic al acestor specii. Lipsa de informații legate de prezența compușilor bioactivi din țesuturile meristemice ale plantelor, materii prime pentru obținerea extractelor gemoterapice precum și lipsa de monografii pentru controlul calității acestor produse vegetale deschid perspective de cercetare în acest domeniu al gemoterapiei.

Rezultatele obținute vor fi prezentate la întâlniri științifice și vor fi publicate în reviste. Toate aceste perspective vor fi realizabile prin continuarea unei colaborări eficiente cu colegii din disciplină, din facultate, universitate și alte instituții de profil din țară și străinătate.

ABSTRACT

The scientific, professional and academic activity of the author, that was conducted after receiving the PhD degree (1997) until present, was performed in the field of pharmaceutical sciences, more specifically in the general and special pharmacognosy field. The present thesis includes the most important scientific, professional and academic achievements. During this period, the previous pharmaceutical studies were continued, having as an objective the study of the medicinal use of vegetal resources, specifically of the indigenous ones. The thesis contains two parts, which present the academic and scientific achievements, together with new perspectives of personal development.

The vegetal raw products represent an important and modern category of resources that are exploited more and more frequently in the pharmaceutical field. Their therapeutical exploitation at a superior level consists in the accumulation of informations on basis of elaborate pharmacognostical studies, for the scientific substantiation of their therapeutical use, for proving the correlations between the identified and quantified bioactive compounds with their possible biological effects, for the extension of the therapeutical domain, highlighting the side effects and contraindications. The quality of the vegetal raw material reflects in the quality of the final product and of the phytotherapeutic preparation and this is the main reason for which the evaluation of its quality becomes an important aspect of the pharmacognostical research. In this context, the majority of the performed researches were focused on the phytochemical analysis of some vegetal sources originated from the spontaneous flora or from cultures, which represented an important premise in the development of the biological, pharmacological and clinical researches.

The present habilitation thesis presents a part of the pharmacognostic researches performed on extracts that are rich in active compounds and that present important biological activities as the antitumoral, the antioxidant, the antimicrobial and the hepatoprotective ones.

Testing the antitumoral potential of some phytochemically characterised extracts of *Viscum album*, *Euonymus europaeus* and *Sambucus nigra* was performed on human melanoma cell lines and on the biological model of Ehrlich ascitic carcinoma in mice. These extracts were proved to be effective remedies in the antitumoral therapy. The *Viscum album* extract which was administered simultaneously with doxorubicine has made this drug more effective and has reduced its adverse effects. The *Euonimus europaeus* extract

standardized in evodiamine, a chemical compound with antitumoral properties that are recently highlighted has a significant antitumoral activity, which was proven to be selective on human fibroblastic dermic cell cultures and on human melanoma cells. The antiproliferative activity was observed also *in vivo*, on mice with Erlich ascitic carcinoma. Preliminary phytochemical studies on *Sambucus* species created premises for obtaining fractions that are rich in anthocyanins, with important antiproliferative effect on human melanoma.

The antioxidant activity was tested on some extracts that were proved to be rich in polyphenols. Polyphenols are compounds resulted from the secondary vegetal metabolism and are represented by flavonoids (flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, anthocyanins), polyphenolcarboxylic acids, tanins, lignans etc. that are involved in all the biological activities that are presented in the thesis. Thus, the antioxidant *in vitro* activity was tested by different spectrophotometrical methods on vegetal extracts obtained from vegetal materials harvested from species belonging to *Fabaceae* family, as *Genistella sagittalis* (L.) Gams., *Genista tinctoria* L., *Cytisus albus* Link, *Cytisus nigricans* L., *Trifolium pratense* L., *Trifolium repens* L., *Medicago sativa* L. and *Melilotus officinalis* L. The phenolic acids, as the ferulic and *p*-coumaric acid were found in high amounts in the *Trifolium pratense* L., *Medicago sativa* L., *Genista tinctoria* L. respectively *Genistella sagittalis* (L.) Gam. extracts. These extracts presented flavonoidic compounds as hyperoside, isoquercitrin and apigenin. Rutoside, quercitrin and luteolin were majoritary in the *Cytisus nigricans* L. and *C. albus* L. extracts. The antioxidant potential of these extracts was consistent with the polyphenolic content. Extracts with the best antioxidant activity were the ones belonging to *Trifolium sp.* and *Cytisus nigricans* L.

Extracts obtained from the vegetal material harvested from species belonging to *Lamiaceae* family were proved to be important sources of polyphenols, especially rosmarinic acid, a specific compound for species of this family. The vegetal material was harvested from 7 species and subspecies of the *Mentha* genus (*M. viridis* L. var. *crispa* (Schard.) Briq., *M. longifolia* (L.) Huds, *Mentha x rotundifolia* (L.) Huds., *Mentha x piperita* L. var. *officinalis* Sole f. *rubescens* Camus, *Mentha x piperita* L. var. *officinalis* Sole f. *pallescens* Camus, *Mentha spicata* L. subsp. *crispata*, *Mentha suaveolens* Ehrh. var. *variegata*), but also from species of *Hyssopus officinalis* L., *Melissa officinalis* L., *Ocimum basilicum* L., *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L. and *Teucrium chamaedris* L. The *Origanum vulgare* L. extract proved to be the richest in rosmarinic acid and had the most significant antioxidant potential.

Extracts obtained from two chemovarieties of the species *Chrysanthemum balsamita* (L.) Baillon, *C. balsamita* var. *balsamita* și *C. balsamita* var. *tanacetoides*, were also proved to be important sources of polyphenols among which the majoritary ones were proved to be the *p*-coumaric acid, rutoside, quercitrin, quercetol and kaempferol, extracts of *Lysimachia nummularia* L. and *L. vulgaris* L. presented high concentrations of *p*-coumaric acid, isoquercitrin, quercitrin, rutoside, quercetol and luteolin and extracts of *Echinocystis*

lobata (Michx.) Torr. et A. Gray presented high concentrations of *p*-coumaric acid, isoquercitrin, rutoside, quercitrin and kaempferol.

Researches performed on some extracts obtained from two species of the *Achillea* genus (*A. millefolium*, *A. schurri*) and on two subspecies of *A. distans* (*A. distans* subsp. *distans* and *A. distans* subsp. *alpine*) highlighted large amounts of polyphenolic compounds and their important antioxidant potential.

Analysis of polyphenolic compounds was extended also on some extracts obtained from some species of *Amaryllidaceae*, as *Galanthus nivalis* L., *Narcissus pseudonarcissus* L., *N. poeticus* L. and *Leucojum vernum* L. Evaluation of the antioxidant potential highlighted the increased effectiveness of the *G. nivalis* extract, followed by the extracts of *N. poeticus* L., *L. vernum* L. and *N. pseudonarcissus* L.

Extracts that are rich in isoflavones were prepared from species belonging to *Fabaceae* family which presented important antioxidant potential due to the compounds involved also in the therapy of hormonodependent cancers. Extracts of *Genista tinctoria* L., *Genistella sagittalis* (L.) Gam and extracts of *Trifolium* sp. proved to be rich in heterosidic isoflavones as daizin, genistin or ononin, but also in aglycones as daidzein, genistein, glycitein and formononetin. Tests performed on the extract of *Trifolium pratense* proved the protective effect of this extract in the oxidative stress induced by bisphenol A, a food contaminant that is released by plastic packages, with xenoestrogenic properties that induce oxidative stress.

Bee products are rich sources of polyphenols. In propolis extracts which have different Romanian origins, phenolic acids were found, as caffeic acid, ferulic acid and gallic acid, together with flavonoidic compounds as crysin and kaempferol.

Another important research subject was represented by testing the antimicrobial activity of some phytochemically characterised extracts from qualitative and quantitative points of view. Using the difusimetric method, which implies the determination of inhibition zones and in some cases the determination of the minimal inhibitory concentration, the activity of some extracts of *Trifolium pratense*, *T. repens*, *Mentha* sp., *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Teucrium chamaedrys*, *Achillea* sp., of some *Amaryllidaceae* species and of some extracts that are rich in rosmarinic acid was tested. Tests were performed on 4 bacterial strains and 2 fungal strains. Tested bacterial strains were *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* and the tested fungal strains were *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. Results of these tests highlighted a superior activity of the *Trifolium pratense*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*, *Teucrium chamaedrys* extracts on the *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* strains. *Narcissus pseudonarcissus*, *N. poeticus*, *Galanthus nivalis* and *Leucojum vernum* Extracts proved an activity comparable to gentamicin on the *Staphylococcus aureus* strain. *N. poeticus*, *Rosmarinus officinalis*, *Mentha x rotundifolia* and *Teucrium chamaedrys* extracts proved an antifungal activity comparable to fluconazole.

Evaluation of the hepatoprotector effect in the hepatotoxicity model which is induced by carbon tetrachloride in mice was performed on two extracts of *O. vulgare* ssp. *vulgare* and *Rosmarinus officinalis*. Results showed their effectiveness, especially the one of *O. vulgare* ssp. *vulgare*.

Results of the performed pharmacognostic researches can contribute to completing the scientific data on the medicinal species, which can be exploited for a better therapeutical use, by obtaining standardized products and an adequate level of quality. Results of the obtained researches after receiving the PhD degree were published in 112 scientific articles, of which 52 are in ISI journals.

The academic activity was performed at the Pharmacognosy Department and consisted in the preparation and teaching of Pharmacognosy courses and practical works for the students of the Faculty of Pharmacy (both in Romanian and French), teaching the optional course „Toxic Plants”, but also of some post-university courses for specialists. In order to develop the academic activity, collaboration to publishing academic materials was also performed, for one Pharmacognosy course book and 4 books for practical works, one book on Toxic Plants, together with the participation in writing 5 other chapters in speciality books, as coauthor.

The last part of the thesis refers to the future directions of personal development from scientific, professional and academic point of view. In this regard, the continuous update of courses and academic materials in accordance with current European standards and of maintaining the educational excellence level. The future scientific activity will be developed for the detailed pharmacognostic analysis of the raw vegetal materials, obtaining phytotherapeutic preparations according to international quality standards, enriched and standardized in active compounds. Therefore, studies on some medicinal species that are indigenous or belong from other European regions will be performed (*Thymus* sp., *Hypericum* sp., *Salvia* sp., *Teucrium* sp., *Artemisia* sp., *Origanum* sp., *Achillea* sp., *Stachys* sp., *Stellaria* sp., *Lamium* sp. etc.), in order to complete scientific literature with new scientific data that can be applied in the therapeutical practice and that can lead to the extension of the therapeutical potential of these species. The lack of information on the presence of bioactive compounds in meristematic tissues of plants, in raw materials used for obtaining gemotherapeutic extracts and the lack of some monographs for quality control of these vegetal products open new research perspectives in this field of gemotherapy.

Obtained results will be presented at scientific meetings and will be published in scientific journals. All these perspectives will be achieved by continuing an effective collaboration with the colleagues from the Laboratory, from the University, but also from other institutions in the same field, both in Romania and abroad.