



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
“IULIU HAȚIEGANU”  
FACULTATEA DE FARMACIE**

**CERCETĂRI FARMACOBOTANICE ASUPRA SPECIEI *RUSCUS  
ACULEATUS* L. (*LILIACEAE*) ȘI A BIOMASEI PROVENITĂ DIN  
CULTURA DE ȚESUTURI IN VITRO**

**REZUMAT**

**Conducător științific  
Prof. Dr. Mircea Tămaș**

**Doctorand  
Georgeta Balica**

**2009**

## CUPRINS

	Pag
<b>I. INTRODUCERE</b> .....	1
<b>II. STADIUL CUNOAȘTERII</b> .....	6
<i>II.1. DATE BOTANICE</i> .....	6
<i>II.2. DATE FITOCHIMICE</i> .....	20
<i>II.3. STUDII DE BIOTEHNOLOGIE VEGETALĂ APLICATE LA SPECIA RUSCUS ACULEATUS L.</i> .....	33
<i>II.4. DATE FARMACOLOGICE</i> .....	34
<i>II.5. PRODUSUL VEGETAL MEDICINAL ȘI FORME FARMACEUTICE CU RUSCUS ACULEATUS L.</i> .....	40
<b>III. CONTIBUȚII PROPRII</b> .....	48
<i>III.1. CARACTERIZAREA ECOLOGICĂ ȘI CENOLOGICĂ A SPECIEI RUSCUS ACULEATUS L. ÎN DEALURILE LIPOVEI</i> .....	48
<i>III.2. INTRODUCEREA ÎN CULTURA IN VITRO A SPECIEI RUSCUS ACULEATUS L.</i> .....	54
<i>III.3. CERCETĂRI BOTANICE</i> .....	88
<i>III.3.1. Caracterizarea morfologică a speciei <i>Ruscus aculeatus</i> L.</i> .....	92
<i>III.3.2. Caracterizarea histo-anatomică a speciei <i>Ruscus aculeatus</i> L.</i> .....	97
<i>III.4. CERCETĂRI FITOCHIMICE</i> .....	108
<i>III.4.1. Caracterizarea produsului vegetal medicinal, <i>Rusci aculeati rhizoma</i></i> .....	108
<i>III.4.2. Studiul saponinelor steroidice</i> .....	114
<i>III.4.3. Analiza compușilor polifenolici</i> .....	166
<i>III.4.4. Determinarea cantitativă a antocianilor și proantocianilor</i> .....	200
<i>III.4.5. Izolarea și determinarea cantitativă a mucilagiiilor brute</i> .....	203
<i>III.4.6. Analiza compușilor sterolici</i> .....	206
<i>III.5. CERCETĂRI FARMACOLOGICE</i> .....	223
<i>III.5.1. Determinarea acțiunii antiinflamatoare a speciei <i>Ruscus aculeatus</i> L.</i> .....	223
<i>III.5.2. Acțiunea diuretică, saluretică și uricozurică a extractului și saponinei izolate din <i>Ruscus aculeatus</i> L.</i> .....	246
<i>III.5.3. Acțiunea antifungică a speciei <i>Ruscus aculeatus</i> L.</i> .....	253
<i>III.6. REALIZAREA UNOR FORME FARMACEUTICE CU EXTRACT DE RUSCUS ACULEATUS L. DESTINATE TESTĂRIILOR CLINICE</i> .....	260
<b>IV. CONCLUZII FINALE</b> .....	269
<b>V. BIBLIOGRAFIE</b> .....	274

**Cuvinte cheie:** *Ruscus aculeatus* L., in vitro, saponine steroidice, ruscogenina, neoruscogenina, CSS, HPLC-MS/MS, antiinflamator, diuretic, antifungic

## I. INTRODUCERE

*Ruscus aculeatus* L. (ghimpe), familia *Liliaceae*, a fost folosit în etnofarmacie ca diuretic, diaforetic, laxativ și expectorant. În Europa, utilizarea speciei *Ruscus aculeatus* L., are o tradiție lungă și de succes în tratamentul bolilor sistemului circulator. Date despre folosirea plantei ca agent fleboterapeutic datează de acum 2000 de ani.

În ultimul timp, *R. aculeatus* L. a constituit subiectul multor investigații științifice, cercetările fiind orientate asupra proprietăților venotonice, antiedematoase și antiinflamatoare, fiind eficient în terapia hemoroizilor și a bolilor venoase.

La noi în țară specia *Ruscus aculeatus* L. este inclusă pe lista roșie a plantelor vasculare periclitate, aflate în pericol de extincție și, ca urmare, nu poate fi exploatată din flora spontană. Tulpinile aeriene cu filocladii sempervirescente se folosesc pentru decorarea buchetelor și coroanelor ornamentale, exemplarele femeiești fiind exploatate mai mult datorită fructelor sale, bace roșii, care le măresc efectul decorativ. Dacă la acestea se adaugă și recoltarea rizomilor în scopuri diuretice sau pentru combaterea reumatismului se poate spune că perenitatea speciei este pusă în pericol.

O alternativă la exploatarea speciei din flora spontană o reprezintă introducerea în cultura *in vitro*. Biomasa obținută poate reprezenta materia primă în industria medicamentului datorită conținutului în principii active.

Obiectivele studiului au fost următoarele:

- Cunoașterea macroscopică și microscopică a plantei *Ruscus aculeatus* L. și a produsului vegetal medicinal *Rusci aculeati rhizoma*.
- Obținerea de biomasă prin culturi de țesuturi *in vitro* (calus, lăstari și rădăcini) ca o alternativă la exploatarea speciei *R. aculeatus* L. din flora spontană.
- Analiza calitativă și cantitativă a principiilor active conținute în plantă și un studiu comparativ al acestora cu cele din biomasa obținută *in vitro*.
- Izolarea saponinelor steroidice din rizomii cu rădăcini și analiza calitativă a acestora.
- Identificarea principalilor agliconi steroidici rezultați în urma hidrolizei și evaluarea lor calitativă și cantitativă prin tehnica CSS și HPLC-MS.
- Analiza compușilor polifenolici, a sterolilor și mucilagiilor din produsul vegetal medicinal.
- Obținerea și caracterizarea unor extracte hidroalcoolice.
- Testarea acțiunii antiinflamatoare, diuretice, saluretice și uricozurice a extractului și a saponinei brute precum și a efectului antifungic.
- Obținerea și caracterizarea unor forme farmaceutice cu extracte de *R. aculeatus* L. în vederea testărilor clinice.

## II. STADIUL CUNOAȘTERII

Această parte bibliografică reprezintă o sinteză a datelor referitoare la specia *Ruscus aculeatus* L. existente până în prezent în literatura de specialitate.

### II.1. Date botanice

În acest capitol am prezentat poziția speciei *Ruscus aculeatus* L. în sistemele de clasificare sistematică, caracterele generale ale familiei *Liliaceae*, ale genului *Ruscus* și descrierea plantei *Ruscus aculeatus* L. Pe lângă acestea ne-am referit la ecologia speciei *Ruscus aculeatus* L., la răspândirea acesteia pe glob și în țara noastră.

### II.2. Date fitochimice

Cele mai multe studii s-au concentrat asupra produsului vegetal medicinal, *Rusci aculeati rhizoma*, datorită conținutului în saponine steroidice (6%) care au ca agliconi ruscogenina și

neoruscogenina, substanțe responsabile de acțiunea antiinflamatoare, venotonică și antihemoroidală. Pe lângă acești constituenți principali au fost identificați și izolați în partea subterană a plantei acizi grași, derivați de benzofuran, triterpene și steroli, în partea aeriană flavonoide și ulei volatil în cantități reduse iar în fructe antociani. Mai sunt citate și alte principii active cum ar fi cumarinele, sparteina, tiramina și acidul glicolic.

### **II.3. Studii de biotehnologie vegetală aplicate la specia *Ruscus aculeatus* L.**

Interesul privind introducerea speciei *Ruscus aculeatus* L. în cultura de celule și țesuturi in vitro este relativ recent, puține fiind studiile care dezvoltă aplicarea biotehnologiilor vegetale la această specie. Culturile in vitro de *Ruscus aculeatus* L. constituie o alternativă pentru producerea de saponine steroidice și pot furniza informații privind biosinteza acestora, căile enzimatică și biochimice nefiind însă pe deplin caracterizate.

### **II.4. Date farmacologice**

Produsul vegetal medicinal, *Rusci aculeati rhizoma* are proprietăți venotonice, vasoprotectoare, la care se adaugă și acțiunea antiinflamatoare, antiexudativă, diuretică asemănătoare cu cea a corticoizilor.

Datorită proprietăților farmacologice antiinflamatorii și venotonice, extractele de *Ruscus aculeatus* L. sunt utilizate în tratamentul varicelor, insuficienței venoase, edemelor limfatice, hemoroizilor și chiar împotriva celulitei.

Deși manifestă activitate citotoxică și antitumorală, ghimpele nu a fost privit în general ca un agent antitumoral. Studiile realizate până în prezent au arătat că potențialul acțiunii antitumorale pentru *R. aculeatus* L. este același ca și la castan: împiedică creșterea activității vasculare și inhibă hialuronidaza,  $\beta$ -glucuronidaza sau elastaza.

### **II.5. Produsul vegetal medicinal și forme farmaceutice cu *Ruscus aculeatus* L.**

În terapie, se utilizează extractele vegetale standardizate în ruscogenine dar și principiile active (ruscogenina și neoruscogenina) izolate în stare pură, singure sau asociate cu alte substanțe sau extracte cu proprietăți similare.

Preparatele farmaceutice obținute din *Rusci aculeati rhizoma* sunt condiționate diferit sub formă de extracte, capsule, tablete, unguente, supozitoare și sunt comercializate sub mai multe denumiri (*Venelbin* – producător Biocur, *Ruscoven* – prod. Aboca, *Varixinal* – prod. Walmark ș.a.).

## **III. CONTRIBUȚII PROPRII**

### **III.1. Caracterizarea ecologică și cenologică a speciei *Ruscus aculeatus* L. în Dealurile Lipovei**

Cercetările efectuate de noi în arboretele de pe Dealul Măgura (zona Dealurilor Lipovei, jud. Arad) au pus în evidență prezența unor fitocenoză forestiere bine structurate floristic și cenotic, care aparțin asociației *Tilia platyphyllo-Carpinetum*. Specia *Ruscus aculeatus* L. realizează o acoperire medie de 40% în fitocenozele de tei și carpen situate în partea superioară a versanților.

### **III.2. Introducerea în cultura in vitro a speciei *Ruscus aculeatus* L.**

În vederea introducerii speciei *Ruscus aculeatus* L. în cultura in vitro, ne-am propus obținerea, prin germinarea aseptică a semințelor, de plantule care pot constitui sursă de explante. Este cunoscut faptul că semințele speciei *R. aculeatus* L. manifestă dormanță îndelungată, însă nu se cunosc metode într-adevăr eficiente pentru stimularea rapidă a germinației, studiile fiind în desfășurare. Dintre factorii de germinare testați, scarificarea mecanică s-a dovedit a fi eficientă, 90% din semințe germinând și dezvoltând ulterior plantule.

Țesuturile calusale primare au fost obținute pornind de la explante provenite din rădăcina plantulelor, cel mai eficient fiind mediul MS suplimentat cu glutamină 0,04% și cazeină hidrolizată 0,04% și cu fitohormonii 2,4-D (2 mg/l) și BA (0,3 mg/l).

Pornind de la calusul primar, pe medii de înrădăcinare s-a obținut calus rizogen, cel mai eficient fiind mediul MS suplimentat cu glutamină 0,04% și cazeină hidrolizată 0,04% și cu fitohormonii 2,4-D (0,5 mg/l) și ANA (1,5 mg/l), o dezvoltare mai bună având loc în condiții de întuneric, la temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

În vederea obținerii de lăstari s-a pornit de la explante nodale și internodii excizate din plantulele obținute prin germinarea aseptică in vitro a semințelor. Din explantele nodale s-a obținut cultura de lăstari în mediul lichid, iar din internodii calus regenerativ pe care s-au dezvoltat lăstari aerieni. Dintre mediile de multiplicare testate (cu adaos de auxine-citochinine în raport de 1:5) cel mai eficient a fost mediul MS suplimentat cu glutamină 0,04% și cazeină hidrolizată 0,04% și cu fitohormonii AIB (0,3 mg/l) și BA (1,5 mg/l).

Cultura de calus a fost obținută pe mediul MS suplimentat cu glutamină 0,04% și cazeină hidrolizată 0,04% și cu fitohormonii: 2,4-D (1 mg/l), AIB (0,5 mg/l), ANA (0,5 mg/l) și BA (0,3 mg/l).

Abrevieri: MS: Murashige Skoog; 2,4-D: acid 2,4-diclorofenoxiacetic; BA: benziladenina; ANA: acid  $\alpha$ -naftilacetic; AIB: acid  $\beta$ -indolilbutiric.

### **III.3. Cercetări botanice**

Deși *Ruscus aculeatus* L. este cunoscută ca plantă medicinală din antichitate, aceasta nu a mai fost până acum studiată din punct de vedere botanic.

#### **III.3.1. Caracterizarea morfologică a speciei *Ruscus aculeatus* L.**

*Ruscus aculeatus* L. este un arbust sempervirescent, cu rizom orizontal pe care se găsesc tulpini metamorfozate cu rol asimilator, numite filocladii. Frunzele sunt reduse la niște bractee membranoase. Florile alb-verzui sunt solitare și se inseră pe partea inferioară a filocladiilor. Fructele sunt bace roșii cu 1-2 semințe sferice.

#### **III.3.2. Caracterizarea histo-anatomică a speciei *Ruscus aculeatus* L.**

Studiile histo-anatomice comparative realizate asupra plantei mature de *R. aculeatus* L. și plantulei obținută în urma germinării aseptice a semințelor in vitro au noutate pe plan național și internațional, în atlasele de plante medicinale dar și în lucrările de farmacognozie din țară și străinătate nefiind prezentate date de microscopie privind caracteristicile anatomice ale acestei specii.

Organele vegetative (rădăcină, tulpină și filocladii) ale plantulelor obținute in vitro cuprind aceleași elemente histologice ca și organele vegetative din planta matură, în cazul plantulelor dimensiunea acestora este mai redusă.

### **III.4. Cercetări fitochimice**

#### **III.4.1. Caracterizarea produsului vegetal medicinal *Rusci aculeati rhizoma***

Prin examinarea la microscopul optic a pulberii de rizomi cu rădăcini, *Rusci aculeati rhizoma*, a fost pusă în evidență prezența vaselor lemnoase cu pereți cu îngroșări scalariforme și punctuațiuni. De asemenea au fost evidențiate grupuri de sclereide și numeroase granule de amidon grupate în sub formă de tetradă, precum și numeroase cristale de oxalat de K sub formă de rafide, acestea din urmă fiind elemente comune la multe specii de monocotiledonate.

Reacția pozitivă cu soluția de albastru de toluidină 2% a indicat prezența mucilagiilor în produsul vegetal medicinal.

#### **III.4.2. Studiul saponinelor steroidice**

Extracția și izolarea saponinelor steroidice din *Ruscus aculeatus* L. s-a realizat printr-o metodă originală bazată pe tehnica de extracție a saponinelor triterpenice elaborată de Cucu și Grecu. Conținutul în saponine steroidice pentru *Ruscus aculeatus* L. recoltat din Dealurile

Lipovei este mult mai mare decât cel citat în literatură, fiind cuprins între 15,5-20,3% în produsul vegetal medicinal și de 8,5% în filocladii.

Din *Rusci aculeati rhizoma* a fost obținut un extract fluid 1:1 prin tehnica repercolării a lui Squibb și o tinctură 1:5 prin macerare conform FR X în vederea caracterizării fitochimice și testării farmacologice.

Analiza prin cromatografie pe strat subțire (CSS) a arătat că atât în extractele de *R. aculeatus* L. cât și în saponina izolată sunt prezente aceleași fracțiuni saponozidice, identice pentru probele din partea subterană și aeriană a plantei.

În *Rusci aculeati rhizoma* au fost evidențiate patru fracțiuni saponozidice majore, trei furostanice (Rf: 0,22 ; 0,29 ; 0,38) și una spirostanică (Rf: 0,16), două din cele furostanice fiind prezente și în filocladii (Rf: 0,22 ; 0,29).

Analiza preliminară calitativă prin CSS a probelor provenite din cultura de țesuturi in vitro a evidențiat existența saponinelor steroidice în cultura de calus, calus cu rădăcini și lăstari aerieni de *R. aculeatus* L. Fracțiunile saponozidice din culturile obținute in vitro sunt identice cu cele ale produsului vegetal medicinal, *Rusci aculeati rhizoma*.

Analiza prin CSS a produsului de hidroliză acidă pentru extractul fluid (1:1) și saponina izolată din *Rusci aculeati rhizoma* a evidențiat prezența celor doi agliconi steroidici, ruscogenina și neoruscogenina, la aceeași valoare Rf = 0,15.

Pentru determinarea și cuantificarea ruscogeninei și neoruscogeninei a fost elaborată o metodă de analiză prin cromatografie de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă (HPLC/MS/MS). Analiza probelor provenite din planta matură de *Ruscus aculeatus* L. (rizomi, rădăcini și rizomi cu rădăcini) a evidențiat cea mai mare cantitate de agliconi steroidici în rizomi (0,2846% - 0,347 g% total sapogenine). În produsul vegetal medicinal *Rusci aculeati rhizoma* a fost determinat un conținut de 0,0448% - 0,0526% ruscogenină și de 0,0891% - 0,0923% neoruscogenină. În extractele vegetale analizate a fost determinat un conținut de sapogenine ușor mai ridicat comparativ cu pulberea de *Rusci aculeati rhizoma*.

Țesuturile și organele de *R. aculeatus* L. sintetizează saponine steroidice și în condiții de cultivare in vitro. În urma hidrolizei acide, în probele provenite din cultura in vitro fost determinat un conținut mai scăzut de sapogenine comparativ cu cel din *Rusci aculeati rhizoma*. Țesuturile nediferențiate au o capacitate mai redusă de a sintetiza saponine steroidice, în organogenează aceasta crescând semnificativ. Astfel, lăstarii de *R. aculeatus* L. au cea mai mare capacitate de a biosintetiza și acumula saponine steroidice comparativ cu calusul rizogen și țesuturile calusale, conținutul total de sapogenine fiind de 0,0931%, de până la două ori mai mare decât în calusul rizogen (0,0232% - 0,0401%) și de patru ori mai mare comparativ cu calusul (0,0236%). A fost realizat și un experiment prin care s-a urmărit acțiunea precursorilor (diosgenină și colesterol) asupra sintezei saponinelor steroidice.

#### III.4.3. Analiza compușilor polifenolici

Profilul compușilor polifenolici din probele provenite din partea subterană respectiv aeriană speciei *R. aculeatus* L. este diferit. Se înregistrează de asemenea diferențe și în ceea ce privește compușii existenți în probele provenite din planta matură și lăstarii proveniți din cultura de țesuturi in vitro. În pulberea de *Rusci aculeati rhizoma* au fost identificate hiperozida, izoquercitrina, quercitrina și rutozida. În filocladiile plantei, rutozida constituie compusul majoritar fiind în cantitate de 91,56 mg%. În lăstarii proveniți din cultura in vitro, conținutul de rutozidă este foarte scăzut, de numai 1,600 mg%.

Prin spectrofotometrie UV-VIS, în filocladiile plantei a fost determinat un conținut de flavonoide totale exprimat în rutozidă de 1,244%. În lăstarii proveniți din cultura in vitro a fost determinat un conținut foarte scăzut de flavonoide totale, de numai 0,014%, sinteza acestor compuși fiind influențată de lipsa radiațiilor UV-B.

#### III.4.4. Determinarea cantitativă a antocianilor și proantocianilor

Plecând de la faptul că antocianii sunt responsabili de colorația roșie a bachelor de *R. aculeatus* L. am analizat prin metoda spectrofotometrică și această clasă de compuși. Prin urmare, în fructele de *R. aculeatus* L. a fost determinat un conținut de 11,4 mg% antociani și respectiv de 364 mg% proantociani.

#### III.4.5. Izolarea și determinarea cantitativă a mucilagiilor brute

Prezența mucilagiilor în rizomul plantei a fost evidențiată atât în secțiune cât și în pulbere prin reacția cu albastru de toluidină.

Prin tehnica gravimetrică, în *Rusci aculeati rhizoma* a fost determinat un conținut în mucilagii de 4,07%.

#### III.4.6. Analiza compușilor sterolici

Prin analiza HPLC-MS a unor extracte din *Rusci aculeati rhizoma* au fost identificați și cuantificați următorii compuși sterolici:  $\beta$ -sitosterolul, stigmasterolul și colesterolul. În urma extracției produsului vegetal medicinal cu alcool etilic 70°, au fost identificați și cuantificați  $\beta$ -sitosterolul (7,41 mg%), stigmasterolul (1,351 mg%) și colesterolul (0,524 mg%). Prin extracția cu hexan a fost determinat un conținut în colesterol de 206,9 mg% și  $\beta$ -sitosterol de 17,1 mg%, stigmasterolul fiind absent.

### III.5. Cercetări farmacologice

#### III.5.1. Determinarea acțiunii antiinflamatoare a speciei *Ruscus aculeatus* L.

Extractul fluid 1:1 și saponina izolată din *Ruscus aculeatus* L. au prezentat efecte antiinflamatoare semnificative statistic în testul edemului labei de șobolan indus cu caolin 10%. Saponina izolată a produs un efect antiinflamator superior prednisonului la 2h și 24h de la producerea inflamației în timp ce extractul fluid a produs efecte antiinflamatoare superioare prednisonului la 2h și 4h de la producerea inflamației.

Saponina izolată din *Ruscus aculeatus* L. are efect antiinflamator pentru că scade numărul de leucocite prin scăderea fagocitelor neutrofile și monocitelor și are efect antioxidant pentru că determină creșterea capacității oxidative și scade speciile active ale oxigenului prin scăderea sintezei de NO.

#### III.5.2. Acțiunea diuretică, saluretică și uricozurică a extractului și saponinei izolate din *Ruscus aculeatus* L.

Prin studiul întreprins am demonstrat și confirmat acțiunea diuretică, saluretică și uricozurică a speciei *Ruscus aculeatus* L. explicând astfel utilizarea plantei ca diuretic în medicina tradițională.

Extractul fluid 1:1 și saponina brută au produs o diureză superioară lotului martor dar inferioară furosemidului; efectul maxim apare la lotul tratat cu extractul de *Ruscus aculeatus* L. (I.D.=1,541). Sub aspectul acțiunii saluretice, atât extractul cât și saponina izolată prezintă o excreție urinară crescută pentru  $\text{Na}^+$  prezentând indici saluretici cuprinși între 1,390-1,468, precum și o eliminare crescută a  $\text{K}^+$ , indicii saluretici ai acestuia fiind cuprinși între 1,928-2,448. De asemenea loturile de animale tratate cu extract și saponină de *Ruscus aculeatus* L. au prezentat efecte uricozurice semnificative statistic.

#### III.5.3. Acțiunea antifungică a speciei *Ruscus aculeatus* L.

Tinctura de *Ruscus aculeatus* L. manifestă activitate antifungică asupra speciilor *Aspergillus niger*, *Botrytis cynerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, *Penicillium expansum* și *Sclerotia sclerotiorum* mult superioară Fluconazolului, concentrația minimă inhibitorie fiind cuprinsă între 60  $\mu\text{l/ml}$  și 100  $\mu\text{l/ml}$ .

### **III.6. Realizarea unor forme farmaceutice cu extract de *Ruscus aculeatus* L. destinate testărilor clinice**

În colaborare cu Catedra de Tehnologie farmaceutică au fost realizate și caracterizate trei forme farmaceutice (gel, cremă și supozitoare) cu extract fluid 1:1 de *Ruscus aculeatus* L. în vederea testării clinice.

## **IV. CONCLUZII FINALE**

Această teză de doctorat reprezintă prima abordare științifică realizată la noi în țară asupra speciei *Ruscus aculeatus* L. Caracterizarea histo-anatomică a organelor vegetative ale plantei, precum și studiile privind acțiunea diuretică, saluretică și uricozurică au caracter de noutate pe plan național și internațional, iar studiile de fitochimie aduc un aport deosebit la datele deja existente în literatura de specialitate. Urmare a studiilor de biotehnologie vegetală efectuate, putem afirma că există posibilitatea introducerii în cultura in vitro a speciei *R. aculeatus* L. în vederea obținerii culturilor de rădăcini și lăstari cu principii active (în principal saponine steroidice) ca alternativă la exploatarea din flora spontană.

## **V. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ**

1. Boșcaiu N., Coldea G., Horeanu C. Lista roșie a plantelor vasculare dispărute, periclitare, vulnerabile și rare din flora României. *Ocrot Med Inconj.* 1994;t 38(1):45-6.
2. Bruneton J. *Pharmacognosie Phytochemistry Plantes Medicinales.* 2-nd ed. Paris: Ed. Tec&Doc 1993:556-8.
3. El Sohly M., Knapp J. E., Slatkin K. F., Schiff P. L., Doorenboos N. J., Quimby M. W. Constituents of *Ruscus aculeatus*. *Lloydia.* 1974;32(2):106-8.
4. Hostettman K., Marston A. *Saponins.* Cambridge: Cambridge University Press 1995:1-306.
5. Istudor V. *Farmacognozie, Fitochimie, Fitoterapie.* Vol. I. București: Ed. Medicală 1998:280-6.
6. Nemcova S., Gloviczki P., Rud K. S., Miller V. M. Cyclic nucleotides and production of prostanoids in human varicose veins. *Journal of Vascular Surgery.* 1999;30(5): 876-84.
7. Oniga I. *Farmacognozie, Compuși terpenici naturali.* Cluj-Napoca: Ed. Med. Univ "Iuliu Hațieagă" 2007:95-6.
8. *Ruscus aculeatus* (butcher's broom). *Altern Med Rev* 2001;6:608-12.
9. Stănescu U., Hăncianu M., Miron A., Aprotosoia C. *Plante medicinale de la A la Z, Monografii ale produselor de interes terapeutic.* Vol. II. Iasi: Ed. Gr. T. Popa 2004:494-6.
10. Tămaș M. *Botanică farmaceutică, Sistematică-Cormobionta.* Vol. III. Cluj-Napoca: UMF "Iuliu Hațieagă" 1999:252.
11. Weiss R. F., Fintelmann V. *Herbal medicine.* Second ed. Stuttgart New York: Thieme 2000:100-3.



## CURRICULUM VITAE

### Date biografice

**Nume:** BALICA

**Prenume:** GEORGETA

**Data și locul nașterii:** 16.01.1971, Buzău

**Cetățenie:** română

**Starea civilă:** căsătorită

**Contact:** [bgeorgeta@umfcluj.ro](mailto:bgeorgeta@umfcluj.ro)

### Studii :

- 2003 Masterat în Biologie, specializarea Biotransformări celulare, Facultatea de Biologie și Geologie, Universitatea “Babeș-Bolyai” Cluj-Napoca – *Diplomă de Master*
- 2002 Facultatea de Biologie și Geologie, Universitatea “Babeș-Bolyai” Cluj-Napoca, specializarea Biologie-Chimie – *Diplomă de licență*
- 1994 Școala postliceală sanitară, Buzău – *Diplomă de absolvire*
- 1989 Liceul Mihai Eminescu, Buzău – *Diplomă de Bacalaureat*

### Specializări și cursuri de perfecționare postuniversitară

#### *Cursuri postuniversitare:*

- 2006 Compuși naturali cu acțiune imunostimulentă, UMF Cluj-Napoca
- 2005 Metodologia cercetării științifice, UMF Cluj-Napoca
- 2005 Citostatice naturale, UMF Cluj-Napoca
- 2005 Tehnici și metode cromatografice și spectrale, UMF Cluj-Napoca
- 2005 Plante medicinale – curs introductiv, UMF Cluj-Napoca

### Activitate profesională

- 2008 - 2009 Asistent universitar la Catedra de Botanică farmaceutică, Facultatea de Farmacie, UMF “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca
- 2004 – 2008 Doctorand cu frecvență la Facultatea de Farmacie, UMF “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca

### Limbi străine cunoscute:

Engleză

Franceză

### Memoriu de activitate științifică

#### Lucrări științifice publicate in extenso:

1. Balica G., Deliu C., Tămaș M., Biotehnologii aplicate la specia *Ruscus aculeatus* L. (Liliaceae), *Hameiul și Plantele Medicinale*, Cluj-Napoca, Ed. Academic Press, 2005, Nr. 1-2 (25-26): 185-188.
2. Balica G., Tămaș M., Deliu C. Contributions to the anatomy of *Ruscus aculeatus* L. (Liliaceae), *Contribuții Botanice*, 2005, XL: 221-225.

3. Balica G., Tămaș M., Deliu C., Crișan G., Biotechnological and phytochemical research on *Ruscus aculeatus* L., Proceedings of the 4<sup>th</sup> Conference on Medicinal and Aromatic Plants of South-East European Countries, Iași – Romania, 28<sup>th</sup> -31<sup>st</sup> Mai 2006, p: 347-353.
4. Tămaș M., Balica G., Crișan G., Ștefănescu C., Coldea Gh., Deliu C., The analysis of flavonoids and furanocoumarins of *Peucedanum* species from Transylvania, *Romanian Biological Sciences*, 2007, Vol. V., nr. 1-2, p.: 130-132.
5. Balica G., Crișan G., Deliu C., Vlase L., Tămaș M., Study on polyphenols from phylloclades, young shoots, and in vitro shoots cultures of *Ruscus aculeatus* L., *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat.*, 2008, Vol. 112. Nr. 2, Suppl. 1, p: 34-37.
6. Crișan G., Vlase L., Balica G., Crișan O., Analiza HPLC a polifenolilor pentru unele specii ale genului *Veronica* L., *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat.*, 2009, Vol. 113. Nr. 2, Suppl. 4, p: 81-85.
7. Vlase L., Kiss B., Balica G., Crisan G., Tamas M., Leucuta S. "High Throughput LC/MS/MS Analysis of Ruscogenin and Neoruscogenin in *Ruscus aculeatus*", *Journal of AOAC International*, 2009, 92 (4): 1055-1059.
8. Crișan G., Vlase L., Tămaș M., Kiss B., Balica G., HPLC determination of some phenolic compounds of *Scrophularia nodosa* and *Scrophularia scopolii*, *Chemistry of Natural Compound* (acceptat pentru publicare)

#### Lucrări științifice publicate în rezumat:

1. Balica G., Vlase L., Deliu C., Tămaș M., Crișan G. Comparative phytochemical study on rhizome and tissue culture of *Ruscus aculeatus* L., *Planta Medica*, 2007, 73:894.
2. Vlase L., Balica G., Crișan G., Tămaș M., Leucuța SE., Sensitive and selective quantification of ruscogenin and neoruscogenin by liquid chromatography with mass spectrometry detection, *Planta Medica*, 2007, 73:929.

#### Cărți :

1. M. Tămaș, Gianina Crișan, Cristina Ștefănescu, Georgeta Balica, *Botanique Pharmaceutique, La Systematique*, Ed. Univeritară „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, 2005.

#### Granturi și proiecte de cercetare:

1. Membru în Proiectul de Cercetare de Excelență pentru tineret ET nr. 3263/19.10.2005 intitulat „*Ruscus aculeatus* între protecție și utilizare medicinală. Aplicarea biotehnologiilor în vederea obținerii de biomasă cu principii active”, 2006-2007
2. Membru în Proiectul de Cercetare de Excelență (CEEX) nr. 8/2005 intitulat “Biodiversitatea genofondului natural la genul *Peucedanum* din Transilvania pentru evaluarea potențialului biosintetic sșutilizabil în fitoterapie”, 2006-2008.
3. Membru în Proiectul de Cercetare de Excelență (CEEX) nr. 98/2006 intitulat „Studiul biologic, biochimic, corologic și bioproductiv al unor specii spontane din genul *Epilobium* (fam. Onagraceae) din Transilvania, în scopul obținerii unor extracte farmaceutice utilizabile în tratarea adenomului de prostată”, 2006-2008.
4. Membru în Proiectul de Cercetare de Excelență (CEEX) nr. 104/2006 intitulat Cercetări privind valorificarea durabilă a plantelor medicinale (*Echinacea purpurea* (L.) Moench, *Calendula officinalis* L., *Melissa officinalis* L., *Tagetes patula* L.) și hameiului, 2006-2008.

5. Membru în Grantul nr. 32151/2008 “Genul *Veronica* - identificarea interrelațiilor între diversitatea biologică și cea ecologică a speciilor identificate în arii protejate și la nivel national, în scopul caracterizării, conservării și gestionării durabile a resurselor genetice”

#### **Participare la conferințe, congrese**

##### ***În țară:***

Participare la al XIII-lea Congres Național de Farmacie, Cluj-Napoca, România, 28-30 septembrie 2006

Participare la a IV-a Conferință a Asociației pentru Plante Medicinale și Aromatice din Sud-Estul Europei (AMAPSEEC), Iași, România, 28-31 mai 2006

Participare la Simpozionul Național “Medicamentul – de la concepere până la utilizare”, Iași, România, 30 mai – 1 iunie 2007

Participare la lucrările celei de a X-a ediții a simpozionului “Plante medicinale – prezent și perspective”, cu participare internațională, Piatra-Neamț, România, 6-8 iunie 2007

##### ***În străinătate:***

Participare la 55<sup>th</sup> International Congress & Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Graz, Austria, 2-6 septembrie 2007.

#### **Apartenență la asociații profesionale:**

Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA) - membru din anul 2007



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY  
“IULIU HAȚIEGANU”  
FACULTY OF PHARMACY**

**PHARMACOBOTANICAL STUDIES ON *RUSCUS ACULEATUS* L.  
(*LILIACEAE*) AND BIOMASS OBTAINED BY *IN VITRO* TISSUE  
CULTURE**

**PhD THESIS ABSTRACT**

**Scientific advisor  
Prof. Dr. Mircea Tămaș**

**PhD student  
GEORGETA BALICA**

**2009**

## TABLE OF CONTENT

	Pag
<b>I. INTRODUCTION</b> .....	1
<b>II. PRESENT STAGE OF KNOWLEDGE</b> .....	6
<i>II.1. BOTANICAL DATA</i> .....	6
<i>II.2. PHYTOCHEMICALS DATA</i> .....	20
<i>II.3. PLANT BIOTECHNOLOGY APPLIED ON THE RUSCUS ACULEATUS L.</i>	33
<i>II.4. PHARMACOLOGICAL DATA</i> .....	34
<i>II.5. MEDICINAL DRUGS AND PHARMACEUTICAL FORMS WITH RUSCUS ACULEATUS L.</i> .....	40
<b>III. PERSONAL CONTRIBUTIONS</b> .....	48
<i>III.1. ECOLOGICAL AND CENOLOGICAL CHARACTERIZATION OF RUSCUS ACULEATUS L. SPECIES FROM LIPOVEI HILLS</i>	48
<i>III.2. INTRODUCING THE IN VITRO CULTURE OF SPECIES RUSCUS ACULEATUS L.</i>	54
<i>III.3. BOTANICAL STUDIES</i> .....	88
III.3.1. Morphological characterisation of <i>Ruscus aculeatus</i> L.....	92
III.3.2. Histochemical characterisation of <i>Ruscus aculeatus</i> L.....	97
<i>III.4. PHYTOCHEMICAL STUDIES</i> .....	108
III.4.1. Characterization of <i>Rusci aculeati rhizoma</i> medicinal plant drug.....	108
III.4.2. Steroidic saponins study.....	114
III.4.3. Polyphenolic compounds analysis.....	166
III.4.4. Anthocyanins and proanthocyanins quantitative determination.....	200
III.4.5. Isolation and quantitative determination of raw mucilages.....	203
III.4.6. Analysis of sterol compounds.....	206
<i>III.5. PHARMACOLOGICAL STUDIES</i> .....	223
III.5.1. Determination of anti-inflammatory action of <i>Ruscus aculeatus</i> L. species.....	223
III.5.2. Diuretic, saluretic and uricosuric action of the extract and saponin isolated from <i>Ruscus aculeatus</i> L.	246
III.5.3. Fungicidal activity of <i>Ruscus aculeatus</i> L. species.....	253
<i>III.6. IMPLEMENTATION OF PHARMACEUTICAL FORMS OF RUSCUS ACULEATUS L. FOR CLINICAL TRIALS</i> .....	260
<b>IV. CONCLUSIONS</b> .....	269
<b>V. SELECTED REFERENCES</b> .....	274

**Keywords:** *Ruscus aculeatus* L., in vitro, steroidal saponins, ruscogenin, neoruscogenin, CSS, HPLC-MS/MS, anti-inflammatory, diuretic, antifungal

## I. INTRODUCTION

*Ruscus aculeatus* L. (Butcher's broom), *Liliaceae* family, has extensively been used in ethno-pharmacy as diuretic, diaphoretic, laxative and expectorant. A long and successful tradition is documented in Europe, where the *Ruscus aculeatus* L. species has been used for the treatment of circulatory system diseases. Information about the use of this plant as phlebotherapeutic agent is documented as 2000 years old.

*R. aculeatus* L. is the subject of an increasing number of scientific investigations during the past years, the studies being mainly focused over the venotonic, anti-edema and anti-inflammatory proprieties, with high efficiency in the hemorrhoids and venom diseases therapy.

In Romania, *R. aculeatus* L. is included on the red list of vascular endangered plants, and therefore it cannot be harvested from the wild flora. The aerial stems with evergreen phylloclade are used bouquet and ornamental coronas decoration. The female samples appear to be more extensively harvested due to their fruits, red berries, which enhance the decorative effect. If rhizomes harvesting for traditional medicine (i.e. diuretics or anti-rheumatic therapy) is added to all of these, the perenity of the species is seriously put in danger.

An alternative to the wild harvesting is given by the introduction of the *in vitro* culture. The resulted biomass could represent the raw material for the pharmaceutical industry due to its content of active principles.

The objectives of the present study are:

- Macroscopic and microscopic knowledge of *Ruscus aculeatus* L. plant and its medicinal vegetal product *Rusci aculeati rhizoma*.
- Biomass acquirement by *in vitro* tissue cultures (callus, shoots and roots) as an alternative to wild harvesting *R. aculeatus* L. species.
- Quantitative and qualitative analysis of the plant active principles, and a comparative study of these principles and those contained by *in vitro* biomass.
- Steroidal saponins isolation from roots rhizomes and qualitative analysis.
- Identification of the main steroidal aglicons resulted by hydrolyze and their CSS and HPLC-MS quantitative and qualitative assessment.
- Poliphenolic compounds, sterols and mucilage from the medicinal vegetal product analysis.
- Acquirement and characterization of hydro alcoholic extracts.
- Testing of the anti-inflammatory, diuretic, saluretic, uricosuric and anti-fungal effect the extract and saponin.
- Acquirement and characterization of some pharmaceutical forms with *R. aculeatus* extracts for clinical trials.

## II. PRESENT STAGE OF KNOWLEDGE

### **II.1. Botanical data**

The chapter presents the position of *Ruscus aculeatus* L. species in different systematic classification schemes, general characteristics of *Liliaceae* family and *Ruscus* genus and a detailed description of *Ruscus aculeatus* L. species. In addition to that, a biogeographic distribution of the plant is also presented.

### **II.2. Phytochemicals data**

Most of the studies realized up to now are focused over the medicinal vegetal product, *Rusci aculeati rhizoma*, due to its content of steroidal saponins (6%) whose aglicons ruscogenin and neoruscogenin as substances responsible for the anti-inflammatory, venotonic and anti-

hemorrhoid effects. Among these main compounds, fat acids, benzofuran derivatives, triterpenes and sterols had been identified and isolated in the subterranean parts of the plant, flavonoids and small quantities of volatile oils in the aerial parts, and antocianins in the fruits. Some other active principles, such as coumarins, sparteine, tiramine and glycolic acid are also reported.

### **II.3. Plant biotechnology applied on the *Ruscus aculeatus* L.**

The interest concerning the introduction of *in vitro* cells and tissues cultures of the *Ruscus aculeatus* L. species came only recently, studies on the vegetal biotechnologies applications development being very scarce. *In vitro* cultures of *R. aculeatus* L. species represent an alternative to steroidal saponins production, and at the same time can give information concerning their biosynthesis, yet the enzymatic and biochemical paths being insufficiently constrained.

### **II.4. Pharmacological data**

The medicinal vegetal product, *Rusci aculeati rhizoma* has both venotonic, vessel protective properties and anti-inflammatory, anti-exudative and diuretic effects, similar to the corticoids action.

Due to its anti-inflammatory and venotonic properties, the *R. aculeatus* extracts are used in the venous insufficiency, lymphatic edema, hemorrhoids and even anti-cellulitic prophylaxis and care.

Although it manifests cytotoxic and antitumour activity, *R. aculeatus* L. was not widely regarded as an antitumour agent. Studies to date have shown that the potential antitumour for *R. aculeatus* L. is the same as the chestnut: prevent increased vascular activity and inhibits hyaluronidase,  $\beta$ -glucuronidase or elastase.

### **II.5. Medicinal drugs and pharmaceutical forms with *Ruscus aculeatus* L.**

Standardized herbal extracts and active principles (ruscogenin and neoruscogenin) isolated or associated with other substances that have similar properties are used in therapy.

Pharmaceutical preparations obtained from *Rusci aculeati rhizoma* are found in different forms such as capsules, tablets, unguents, suppositories and are marketed under several names: (*Venelbin* – manufacturing company Biocur, *Ruscoven* – manufacturing company Aboca, *Varixinal* – manufacturing company Walmark etc.).

## **III. PERSONAL CONTRIBUTIONS**

### **III.1. Ecological and cenological characterization of *Ruscus aculeatus* L. species from Lipovei Hills**

Our research on the new forest stands on the Măgura Hill (Lipovei Hills area, Arad County) highlighted the presence of some well structured floral and cenotic forest phytocenosis, belonging to *Tilia platyphyllo-Carpinetum* association. *Ruscus aculeatus* L. species made an average coverage of 40% within the lime and hornbeam phytocenosis in the top of the slope.

### **III.2. Introducing the *in vitro* culture of species *Ruscus aculeatus* L.**

In order to introduce species *Ruscus aculeatus* L. to *in vitro* culture, we intend to obtain, plantlets by aseptic seed germination, which can be a source of explants. It is known that seeds of *R. aculeatus* L. manifest long dormant, but there is no really effective ways to stimulate rapid germination, although studies are in progress. Among the germination test factors, mechanical scarification proved to be effective, 90% of the seeds subsequently germinating and developing plantlets.

The primary callus tissues were obtained excised from explants from plantlet roots, the most effective culture medium being the MS supplemented with 0.04% glutamine and 0.04% hydrolyzed casein and with growth regulators 2,4-D (2 mg/l) and BA (0.3 mg/l).

Starting from the primary callus on rooting medium, callus with roots were obtained, the most effective medium being the MS supplemented with 0.04% glutamine and 0.04% hydrolyzed casein and 2,4-D (0.5 mg/l) and ANA (1.5 mg /l). In the dark at a temperature of  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  a better development takes place.

In order to obtain shoots we started from nodal explants and internodes excised from plantlets obtained by aseptic *in vitro* germination of seeds. Shoot cultures were obtained from the nodal explants in liquid medium and regenerative callus that developed aerial shoots from the internodes on media with agar. From the tested multiplication media (with added auxines-cytokinin in 1:5 ratio) the most effective was the MS medium supplemented with 0.04% glutamine and 0.04% hydrolyzed casein and AIB (0.3 mg/l) and BA (1.5 mg/l).

Callus culture was obtained on MS medium supplemented with glutamine 0.04% and 0.04% hydrolyzed casein and growth regulators: 2,4-D (1 mg/l), AIB (0.5 mg/l), ANA (0.5 mg/l) and BA (0.3 mg/l)

Abbreviations: MS: Murashige Skoog; 2,4-D: 2,4-dichlorofenoxyacetic acid; BA: benziladenine; ANA:  $\alpha$ -naftilacetic acid; AIB:  $\beta$ -indolilbutiric acid.

### **III.3. Botanical studies**

Although *Ruscus aculeatus* L. is known as a medicinal plant since ancient times, it was not botanically studied until recently.

#### **III.3.1. Morphological characterization of *Ruscus aculeatus* L.**

*Ruscus aculeatus* L. is a small evergreen shrub, with horizontal rhizomes and though leaf-like branches having assimilative role, know as phylloclade. Leaves are reduced to membranous scales. The white-greenish solitary flowers appear on the lower side of the phylloclade. The fruit is reddish berry, each with 1-2 spherical seeds.

#### **III.3.2. Histochemical characterization of *Ruscus aculeatus* L.**

Histo-anatomical comparative studies performed on mature plant of *R. aculeatus* L. and the plantlet obtained from aseptic *in vitro* seed germination represent a novelty at the national and international scale, the atlas of medicinal plants and also the Pharmacognosy works in the country and abroad presenting no microscopy data on the anatomical characteristics of this species

The vegetative organs (root, stem and phylloclade) of the plantlets obtained by *in vitro* technique include the same histological elements as the vegetative organs of the mature plant, although the size of histological elements for plantlets is smaller.

### **III.4. Phytochemical studies**

#### **III.4.1. Characterization of *Rusci aculeati rhizoma* medicinal plant drug**

By optical microscope examination of the *Rusci aculeati rhizome* powder the presence of wood-walled vessels with scalariform and punctuation thickening was highlighted. There have also been highlighted sclereides groups and numerous starch granules grouped in the form of tetrad, as well as numerous bundles of K oxalate crystals, the latter being common elements in many monocotyledonous species.

The positive reaction with 2% toluidine blue reagent indicated the presence of mucilage in the medicinal plant product.

#### **III.4.2. Steroid saponins study**

Extraction and isolation of steroidal saponins from *Ruscus aculeatus* L. was performed by an original method based on triterpenic saponins extraction technique developed by Cucu and Grecu. Steroidal saponins content of *Ruscus aculeatus* L. harvested from Lipovei Hills is much higher than that mentioned in literature, ranging from 15.5-20.3% in medicinal plant product and 8.5% in phylloclade.



Out of *Rusci aculeati rhizoma* a 1:1 fluid extract was obtained by Squibb's repercolation technique and a 1:5 tincture by maceration, according to FR X, for phytochemicals characterization and pharmacological testing.

Analysis by thin layer chromatography (CSS) showed that both in the extracts of *R. aculeatus* L. and in the isolated saponin, the same saponozidic fractions are present, identical for the samples from the underground and aerial plant part.

In the *Rusci aculeati rhizoma* four major saponozidic fractions were highlighted, three of furostanol type (Rf: 0.22, 0.29, 0.38) and one of spirostanol type (Rf: 0.16), two fractions out of the three furostanol fractions being identified in phylloclade (Rf: 0.22, 0.29).

CSS preliminary qualitative analysis of samples from *in vitro* tissue culture revealed the existence of steroidal saponins in sample of callus, callus with roots and aerial shoots of *R. aculeatus* L. Saponozidic fractions from *in vitro* cultures are identical to those of plant medicinal product, *Rusci aculeati rhizoma*.

CSS analysis of acid hydrolysis product of fluid extract (1:1) and isolated saponin from the *Rusci aculeati rhizoma* revealed the presence of the two steroid aglicons, ruscogenin and neoruscogenin, at the same Rf= 0.15 value

In order to determine and quantify the ruscogenin and neoruscogenin, an analysis method of high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC- MS) was developed. An comparative analysis of the samples hydrolyzed from the mature plant *Ruscus aculeatus* L. (rhizomes, roots and rhizomes with roots) showed the largest amount of steroidal aglicons in rhizomes (0.2846% - 0.347 g% total saponogenines). In the medicinal plant product *Rusci aculeati rhizoma* a concentration of 0.0448% - 0.0526% ruscogenin and 0.0891% - 0.0923% neoruscogenin was determined. In extracts a higher content of saponogenins was determinate compared with *Rusci aculeati rhizoma*.

*R. aculeatus* L. tissues and organs synthesize steroidal saponins while *in vitro* cultivation conditions. Following the acid hydrolysis, for the samples resulted from *in vitro* culture, a lower saponin content was determined as compared to that of *Rusci aculeati rhizoma*. The undifferentiated tissues have a lower capacity to synthesize the steroidal saponins, which increases significantly in organogenesis. Thus, the *R. aculeatus* L. shoots have the highest capacity to biosynthesize and accumulate steroidal saponins compared with the callus with roots and tissues, the total saponogenins content being of 0.0931%, approximately 2 times higher than those of the callus with roots (0.0232% - 0.0401%) and 4 times higher compared to those of the callus (0.0236%). An experiment regarding the actions of the precursors (diosgenin and cholesterol) on steroidal saponins synthesis was developed.

#### III.4.3. Polyphenolic compounds analysis

The profile of the polyphenolic compounds of underground and aerial samples of *R. aculeatus* L. species, respectively, differ. It is also recorded differences in terms of the existing compounds of mature plant samples and of shoots derived from *in vitro* tissue culture samples. Within the powder of *Rusci aculeati rhizoma* hyperozide, izoquercitrin, quercitrin and rutoside were identified. In the plant phylloclade, the rutoside constitutes the major compound in the amount of 91.56 mg%. In the shoots derived from *in vitro* culture, the rutoside content is very low, of only 1.600 mg%

By UV-VIS spectrophotometry, a total flavonoid content of 1.244% expressed as rutozide in the plant phylloclade has been determined. In the shoots derived from the *in vitro* culture, a very low content of total flavonoids of only 0.014% was determined; the synthesis of these compounds is influenced by the lack of UV-B.

#### III.4.4. Anthocyanins and proanthocyanins quantitative determination

Starting from the fact that anthocyanins are responsible for the red color of the *R. aculeatus* L. berries, we also analyzed by spectrophotometric method this class of compounds.

Therefore, in the fruit of *R. aculeatus* L., a concentration of 11.4 mg% anthocyanins and 364 mg% proanthocyanins was determined

#### III.4.5. Isolation and quantitative determination of raw mucilages

The presence of the mucilages was highlighted in cross-section of rhizome and medicinal product powder by toluidin blue reaction.

Mucilage content of 4.07% was determined for *Rusci aculeati rhizoma* by gravimetric technique.

#### III.4.6. Analysis of sterol compounds

By HPLC-MS analysis of *Rusci aculeati rhizoma* extracts the following sterol compounds were identified and quantified:  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol and cholesterol. As a result of medicinal plant products extraction with 70° alcohol,  $\beta$ -sitosterol (7.41 mg%), stigmasterol (1.351 mg%) and cholesterol (0.524 mg%) were identified and quantified. By hexane extraction a cholesterol content of 206.9 mg% and  $\beta$ -sitosterol of 17.1 mg% was determined, while the stigmasterol was absent.

### **III.5. Pharmacological studies**

#### III.5.1. Determination of anti-inflammatory action of *Ruscus aculeatus* L. species

The 1:1 fluid extract and the isolated saponin from *Ruscus aculeatus* L. have shown statistically significant anti-inflammatory effects in rat paw edema induced with kaolin 10%. The isolated saponin produced a higher anti-inflammatory effect than that of prednisone at 2h and 24h after the inflammation while the fluid extract produced higher anti-inflammatory effects than those of prednisone at 2h and 4h after the inflammation.

Since it reduce the total leukocytes count by decreasing the number of phagocytes and monocytes, the isolated saponin from *Ruscus aculeatus* L. has anti-inflammatory effect, while the anti-oxidative effect is determined by the increment of the oxidative capacity and lowering the active oxygen species by decreasing NO synthesis.

#### III.5.2. Diuretic, saluretic and uricosuric action of the extract and saponin isolated from *Ruscus aculeatus* L.

The study demonstrated and confirmed the diuretic, saluretic and uricosuric action of the *Ruscus aculeatus* L. species, thereby explaining the use of the plant as a diuretic in the traditional medicine.

The 1:1 fluid extract and the raw saponin caused a greater diuresis of the control group but inferior to furosemide; peak effect occurs in the batch treated with the extract of *Ruscus aculeatus* L. (ID = 1.541). In terms of saluretic action, both the extract and isolated saponin present an increased urinary excretion for Na<sup>+</sup> showing saluretic indices between 1.390-1.468, as well as an increased removal of K<sup>+</sup>, its saluretic indices ranging between 1.928-2.448. Also the animal groups treated with *Ruscus aculeatus* L. saponin extract have shown statistically significant uricosuric effect.

#### III.5.3. Fungicidal activity of *Ruscus aculeatus* L. species

*Ruscus aculeatus* L. tincture has shown antifungal activity on the species *Aspergillus niger*, *Botritis cynerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, *Penicillium expansum* and *Sclerotia sclerotiorum*, higher than fluconazole, at a MIC between 60  $\mu$ l/ml and 100  $\mu$ l/ml.

### **III.6. Implementation of pharmaceutical forms of *Ruscus aculeatus* L. for clinical trials**

In collaboration with the Department of Pharmaceutical Technology three pharmaceutical forms (gels, creams and suppositories) with 1:1 fluid extract of *Ruscus aculeatus* L. were made and characterized in order to the clinical testing.

#### IV. CONCLUSIONS

This doctoral thesis is the first scientific approach to the species *Ruscus aculeatus* L. made in our country. Histo-anatomical characterization of vegetative organs of the plant, and studies on the diuretic, saluretic and uricosuric action represent a major breakthrough at national and international level while the phytochemical studies make a great contribution to the existing data in the literature. As a result of these studies of plant biotechnology, we can say that there is a good potential for introducing the in vitro culture of the *R. aculeatus* L. species to obtain roots and shoots cultures with active principles (mainly steroidal saponins) as an alternative to the harvesting of the wild flora.

#### V. SELECTED REFERENCES

1. Boşcaiu N., Coldea G., Horeanu C. Lista roşie a plantelor vasculare dispărute, periclitare, vulnerabile și rare din flora României. *Ocrot Med Inconj.* 1994;t 38(1):45-6.
2. Bruneton J. *Pharmacognosie Phytochemistry Plantes Medicinales.* 2-nd ed. Paris: Ed. Tec&Doc 1993:556-8.
3. El Sohly M., Knapp J. E., Slatkin K. F., Schiff P. L., Doorenboos N. J., Quimby M. W. Constituents of *Ruscus aculeatus*. *Lloydia.* 1974;32(2):106-8.
4. Hostettman K., Marston A. *Saponins.* Cambridge: Cambridge University Press 1995:1-306.
5. Istudor V. *Farmacognozie, Fitochimie, Fitoterapie.* Vol. I. Bucureşti: Ed. Medicală 1998:280-6.
6. Nemcova S., Gloviczki P., Rud K. S., Miller V. M. Cyclic nucleotides and production of prostanoids in human varicose veins. *Journal of Vascular Surgery.* 1999;30(5): 876-84.
7. Oniga I. *Farmacognozie, Compuși terpenici naturali.* Cluj-Napoca: Ed. Med. Univ "Iuliu Hațieagă" 2007:95-6.
8. *Ruscus aculeatus* (butcher's broom). *Altern Med Rev* 2001;6:608-12.
9. Stănescu U., Hăncianu M., Miron A., Aprotosoia C. *Plante medicinale de la A la Z, Monografii ale produselor de interes terapeutic.* Vol. II. Iasi: Ed. Gr. T. Popa 2004:494-6.
10. Tămaș M. *Botanică farmaceutică, Sistematică-Cormobionta.* Vol. III. Cluj-Napoca: UMF "Iuliu Hațieagă" 1999:252.
11. Weiss R. F., Fintelmann V. *Herbal medicine.* Second ed. Stuttgart New York: Thieme 2000:100-3.

## CURRICULUM VITAE

**Surname:** BALICA

**First name:** GEORGETA

**Date and place of birth:** 16.01.1971, Buzău

**Citizenship:** Romanian

**Marital status:** married

**e-mail:** [bgeorgeta@umfcluj.ro](mailto:bgeorgeta@umfcluj.ro)

### **Studies:**

- 2003 *MSc degree* - Biology, Cell biotransformation specialization, Faculty of Biology and Geology, “Babeş-Bolyai” University, Cluj-Napoca
- 2002 *Licence* - Faculty of Biology and Geology, Biology and Chemistry specialization, “Babeş-Bolyai” University, Cluj-Napoca
- 1994 *Further studies* - Post-High School School Health, Buzău
- 1989 *Baccalaureate* - High School „Mihai Eminescu”, Buzău

### **Specialization and postgraduate courses**

#### ***Postgraduate courses:***

- 2006 Natural compounds with immunostimulant activity, UMF Cluj-Napoca
- 2005 The methodology of the scientific research, UMF Cluj-Napoca
- 2005 Cytostatic natural drugs, UMF Cluj-Napoca
- 2005 Chromatographic and spectral techniques and methods, UMF Cluj-Napoca
- 2005 Medicinal herbs – introductory course, UMF Cluj-Napoca

### **Professional activity**

- 2008 - 2009 Assistant professor at Pharmaceutical Botany Department, Faculty of Pharmacy, UMF “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca
- 2004 – 2008 PhD student at Faculty of Pharmacy, UMF “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca

### **Foreign languages:**

English  
French

### **Memoir of scientific activity**

#### **Scientific papers published in extenso:**

1. Balica G., Deliu C., Tămaş M., *Biotehnologii aplicate la specia Ruscus aculeatus L. (Liliaceae), Hameiul și Plantele Medicinale*, Cluj-Napoca, Ed. Academic Press, 2005, Nr. 1-2 (25-26): 185-188.
2. Balica G., Tămaş M., Deliu C., *Contributions to the anatomy of Ruscus aculeatus L. (Liliaceae), Contribuții Botanice*, 2005, XL: 221-225.
3. Balica G., Tămaş M., Deliu C., Crişan G., *Biotechnological and phytochemical research on Ruscus aculeatus L., Proceedings of the 4<sup>th</sup> Conference on Medicinal and Aromatic Plants of South-East European Countries, Iași – Romania, 28<sup>th</sup> -31<sup>st</sup> Mai 2006*, p: 347-353.

4. Tămaș M., Balica G., Crișan G., Ștefănescu C., Coldea Gh., Deliu C., The analysis of flavonoids and furanocoumarins of *Peucedanum* species from Transylvania, *Romanian Biological Sciences*, 2007, Vol. V., nr. 1-2, p.: 130-132.
5. Balica G., Crișan G., Deliu C., Vlase L., Tămaș M., Study on polyphenols from phylloclades, young shoots, and in vitro shoots cultures of *Ruscus aculeatus* L., *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat.*, 2008, Vol. 112. Nr. 2, Suppl. 1, p: 34-37.
6. Crișan G., Vlase L., Balica G., Crișan O., Analiza HPLC a polifenolilor pentru unele specii ale genului *Veronica* L., *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat.*, 2009, Vol. 113. Nr. 2, Suppl. 4, p: 81-85.
7. Vlase L., Kiss B., Balica G., Crisan G., Tamas M., Leucuta S. "High Throughput LC/MS/MS Analysis of Ruscogenin and Neoruscogenin in *Ruscus aculeatus*", *Journal of AOAC International*, 2009, 92 (4): 1055-1059.
8. Crișan G., Vlase L., Tămaș M., Kiss B., Balica G., HPLC determination of some phenolic compounds of *Scrophularia nodosa* and *Scrophularia scopolii*, *Chemistry of Natural Compound* (in press)

#### Abstracts:

3. Balica G., Vlase L., Deliu C., Tămaș M., Crișan G. Comparative phytochemical study on rhizome and tissue culture of *Ruscus aculeatus* L., *Planta Medica*, 2007, 73:894.
4. Vlase L., Balica G., Crișan G., Tămaș M., Leucuța SE., Sensitive and selective quantification of ruscogenin and neoruscogenin by liquid chromatography with mass spectrometry detection, *Planta Medica*, 2007, 73:929.

#### Books:

2. M. Tămaș, Gianina Crișan, Cristina Ștefănescu, Georgeta Balica, *Botanique Pharmaceutique, La Systematique*, Ed. Univeristară „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, 2005.

#### Grants and research projects:

6. Member of the research team of grant ET no. 3263/19.10.2005 named „*Ruscus aculeatus* between protection and medicinal use. Application of the biotechnologies in order to obtain biomass with active principles”, 2005-2007.
7. Member of the research team of grant CEEEX no. 8/2005 named “Natural genofond biodiversity to *Peucedanum* genus from Transylvania for the evaluation of the biosynthetic potential usable in phytotherapy”, 2006-2008.
8. Member of the research team of grant CEEEX no. 98/2006 named „The biologic, biochemical, chorological and bioproductive study for some spontaneous species of the genus *Epilobium* (fam. Onagraceae) from Transylvania, in order to obtain pharmaceutical extracts used in treating prostate adenoma”, 2006-2008.
9. Member of the research team of grant CEEEX no. 104/2006 named “Researches on sustainable exploitation medicinal plants (*Echinacea purpurea* (L.) Moench, *Calendula officinalis* L., *Melissa officinalis* L., *Tagetes patula* L.) and hops, 2006-2008.
10. Member of the research team of grant no.32151/2008 “*Veronica* genus – identify interrelations between biological and ecological diversity of the species found in protected areas and nationwide, purpose of characterization, conservation and sustainable management durable of genetic resource”, 2008-2011.

**Conferences, congresses:**

***National conferences and congresses:***

The XIII<sup>th</sup> National Congress of Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania, 28-30 September 2006.

The IV<sup>th</sup> Conference of Association for Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (AMAPSEEC), Iași, Romania, 28-31 May, 2006.

The National Symposium named “The medicine – from conception to use”, Iași, Romania, 30 May – 1 June, 2007.

The Symposium “Medicinal plants – present and perspective”, X<sup>th</sup> edition, with international participation, Piatra-Neamț, Romania, 6-8 June, 2007

***International conferences and congresses:***

The 55<sup>th</sup> International Congress & Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Graz, Austria, 2-6 September, 2007.

**Membership in professional associations:**

Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA) - member from 2007