
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Studiul fitochimic comparativ
al unor specii de *Mentha*
din familia Lamiaceae,
cu uleiuri volatile

Doctorand **Radu Ioan Moldovan**

Conducător de doctorat Prof. Dr. **Radu Oprean**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	17
1. Date botanice privind speciile de Mentha	19
1.1. Încadrare sistematică și denumiri populare	19
1.2. Răspândire	19
1.3. Caractere generale ale familiei Lamiaceae.....	21
1.4. Descrierea botanică a genului Mentha	22
1.5. Specii de Mentha analizate	23
1.5.1. Mentha piperita L.(var. palescens și var. rubescens)	23
1.5.2. Mentha spicata L. subsp. crispata	26
1.5.3. Mentha suaveolens Ehrh	27
1.5.4. Mentha rotundifolia (L.) Huds	28
2. Compoziția chimică a speciilor de Mentha.....	29
3 Acțiunea farmacologică și indicațiile terapeutice	31
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	33
1. Ipoteza de lucru/obiective	35
2. Studiul 1 – Obținerea produsului vegetal	35
2.1. Introducere	35
2.2. Ipoteza de lucru/obiective.....	36
2.3. Material și metodă	36
2.4. Rezultate	37
2.5. Discuții	42
3. Studiul 2 – Analiza conținutului de compuși polifenolici, polifenoli totali, flavonoide, compuși fenilpropanici, taninuri și ulei volatil	43
3.1. Introducere.....	43
3.2. Ipoteza de lucru/obiective.....	43
3.3. Analiza calitativă și cantitativă a compușilor polifenolici	44
3.3.1. Material și metodă.....	44
3.3.2. Rezultate	45
3.3.3. Discuții	48
3.4. Determinarea conținutului de polifenoli totali	49
3.4.1. Material și metodă.....	49
3.4.2. Rezultate	50
3.4.3. Discuții	50
3.5. Determinarea conținutului de flavonoide	51
3.5.1. Material și metodă.....	51
3.5.2. Rezultate	52
3.5.3. Discuții	53
3.6. Determinarea conținutului de compuși fenilpropanici	53
3.6.1. Material și metodă.....	53
3.6.2. Rezultate	54
3.6.3. Discuții	55
3.7. Determinarea conținutului de taninuri.....	56

3.7.1. Material și metodă.....	56
3.7.2. Rezultate	57
3.7.3. Discuții.....	57
3.8. Determinarea conținutului de ulei volatil	57
3.8.1. Material și metodă.....	57
3.8.2. Rezultate	59
3.8.3. Discuții.....	60
4. Studiul 3 – Analiza compoziției chimice a uleiurilor volatile prin gaz-cromatografie	61
4.1. Introducere	61
4.2. Ipoteza de lucru/obiective.....	61
4.3. Material și metodă	61
4.4. Rezultate	62
4.5. Discuții	112
5. Studiul 4 – Determinarea activității antioxidante, antimicrobiene, antiinflamatoare și analgezice	115
5.1. Determinarea activității antioxidante	115
5.1.1. Introducere	115
5.1.2. Ipoteza de lucru / obiective	116
5.1.3. Material și metodă.....	116
5.1.4. Rezultate	120
5.1.5. Discuții	120
5.2. Determinarea activității antimicrobiene	121
5.2.1. Introducere	121
5.2.2. Ipoteza de lucru / obiective	122
5.2.3. Material și metodă.....	122
5.2.4. Rezultate	122
5.2.5. Discuții	123
5.3. Determinarea activității antiinflamatoare	124
5.3.1. Introducere	124
5.3.2. Ipoteza de lucru / obiective	124
5.3.3. Material și metodă.....	124
5.3.4. Rezultate	126
5.3.5. Discuții	127
5.4. Determinarea activității analgezice	129
5.4.1. Introducere	129
5.4.2. Ipoteza de lucru / obiective	130
5.4.3. Material și metodă.....	130
5.4.4. Rezultate	131
5.4.5. Discuții	132
6. Concluzii generale (sinteză)	133
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	139
REFERINȚE	141
ANEXE	151

Cuvinte cheie: *Mentha piperita* var. *pallescens*, *Mentha piperita* var. *rubescens*, *Mentha spicata* L. subsp. *crispata*, *Mentha suaveolens*, *Mentha rotundifolia*, ulei volatil, compuși polifenolici, polifenoli totali, flavonoide, compuși fenilpropanici, taninuri, acțiune antioxidantă, acțiune antimicrobiană, acțiune antiinflamatoare, acțiune analgezică.

Introducere

În lume, cea mai studiată specie de mentă este *Mentha Piperita* L. În România, cercetări amănunțite asupra acestei specii de mentă au mai fost efectuate în trecut, însă s-au axat mai mult pe studiul compozițional, botanic și morfologic urmărindu-se comportamentul speciei în cultură.

La noi în țară s-au cultivat cu preponderență speciile *Mentha piperita* și *arvensis*. Alte specii de *Mentha* (*spicata*, *suaveolens*, *rotundifolia*) nu au fost introduse în culturi. Prin lucrarea de față se dorește realizarea unor culturi experimentale la Orăștie, folosind mai multe specii de mentă, urmărind stabilirea momentului optim de recoltare astfel încât să obținem un ulei volatil cât mai bogat din punct de vedere compozițional. Se urmărește o analiză gaz-cromatografică comparativă a uleiurilor volatile, precum și analiza altor grupe de principii active (polifenoli, flavonoide, taninuri) care se pot extrage din speciile de *Mentha*.

Odată cu avansarea în cercetarea preclinică și clinică, cresc pretențiile față de informațiile cu privire la compoziția și proprietățile produselor vegetale. Studiul de față își propune determinarea unor acțiuni farmacologice pentru identificarea unor specii de mentă cu valoare fitoterapeutică și introducerea lor în cultură, cu scopul obținerii de noi medicamente și suplimente alimentare.

Contribuția personală

Studiul 1 – Obținerea produsului vegetal

În prima etapă, se urmărește cultivarea unor specii de mentă, în vederea valorificării lor în preparate fitoterapeutice: *Mentha piperita* var. *pallescens*, *Mentha piperita* var. *rubescens*, *Mentha spicata* L. subsp. *crispata*, *Mentha suaveolens* și *Mentha rotundifolia*. În a doua etapă se urmărește recoltarea produsului vegetal în stadii diferite de dezvoltare, pentru a observa influența perioadei de recoltare asupra compoziției uleiului volatil. După recoltare, produsul vegetal va fi supus uscării.

Cele 5 specii de mentă au fost cultivate în culturi experimentale, în localitatea Orăștie, jud. Hunedoara, în cadrul firmei SC Laboratoarele Fares Bio Vital SRL, firmă de la care a fost preluat și materialul săditor pentru realizarea culturilor experimentale. Fiecare soi de mentă a fost experimentat pe 20 m² de cultură. Recoltarea speciilor de mentă s-a realizat manual, dimineața, între orele 10:00 și 12:00.

Pentru a urmări calitatea uleiului volatil în funcție de an și de perioada de recoltare, fiecare din cele 5 specii de mentă au fost recoltate în anii 2009, 2010 și 2011 în perioade diferite de recoltare, la începutul perioadei de înflorire, în timpul înfloririi și la sfârșitul perioadei de înflorire. După recoltare, produsul vegetal a fost uscat natural, timp de 5-6 zile, până la maxim 13% umiditate.

Verificarea identității produsului vegetal s-a realizat cu ajutorul microscopului Motic modelul K-500L. În urma analizei microscopice, *Mentha piperita* var. *pallescens* prezintă pe partea inferioară nervațiuni penate, deschise la culoare, cele secundare fiind paralele între ele, cel puțin în zona mediană a limbului foliar. Între ele apar numeroși peri glandulari, cu contur circular, de culoare brună, pe fondul verde al țesutului asimilator. Partea superioară nu prezintă nervațiuni evidente și are foarte puțini peri glandulari pe fondul verde al limbului foliar.

Mentha piperita var. *rubescens* prezintă pe partea inferioară un fond roșu datorat antocianilor conținuți în frunzele acestei specii. Perii glandulari prezintă o densitate foarte mare. Și partea superioară a limbului foliar păstrează o colorație roșie mai ales spre marginea limbului, fiind de asemenea vizibile profilele nervurilor, tot roșcate, dar pe această parte lipsesc perii glandulari.

Mentha spicata subs. *crispata* prezintă pe partea inferioară nervațiuni deschise la culoare și un număr mare de peri glandulari de culoare brună. Pe partea superioară apar numai nervațiunile, țesutul asimilator, verde, dar lipsesc țesuturile secretoare.

Mentha suaveolens prezintă peri tectori, foarte denși, aceștia constituind o adevărată pâslă, mai densă pe epiderma superioară, care nu are țesuturi secretoare. Pe fața inferioară se pot observa nervațiunile, perii tectori și un număr redus de peri glandulari, care apar sub forma unor zone circulare rotunde de culoare brun-roșcată.

Mentha rotundifolia prezintă pe partea inferioară nervațiuni de diferite dimensiuni, peri tectori deschiși la culoare și peri glandulari brun-roșcați. Pe partea superioară pot fi observate nervațiunile, perii tectori, dar lipsesc perii glandulari.

Studiul 2 – Analiza conținutului de compuși polifenolici, polifenoli totali, flavonoide, compuși fenilpropanici, taninuri și ulei volatil

Interesul pentru disponibilitatea compușilor polifenolici și a uleiurilor volatile este în creștere, datorită efectelor terapeutice demonstrate în urma studiilor de specialitate. Ne-am propus determinarea compușilor polifenolici, polifenolilor totali, a flavonoidelor, a compușilor fenilpropanici și a taninurilor pentru corelarea acestora cu efectul antioxidant și antimicrobian. De asemenea, ne propunem obținerea și determinarea cantitativă a uleiului volatil din speciile de mentă, prin metoda oficială.

Analiza calitativă și cantitativă a compușilor polifenolici

Determinarea cantitativă: pentru dozarea polifenolilor s-a folosit cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC), metoda standardului extern, detecție în ultraviolet.

În extractul etanolic de *M. rotundifolia* s-au identificat trei derivați de acid cinamic și anume acizii caftaric, cafeic și clorogenic, și un derivat de acid benzoic, acidul gentisic, dar în cantități prea mici pentru a putea fi cuantificați. Acidul p-cumaric s-a determinat în concentrație de 3,691 mg/100 g produs vegetal. Ca flavonozide, au fost identificate rutozida și izoquercitrina, dar fără a putea fi cuantificate. Quercitrina a fost găsită în concentrații de 4,665 mg/100 g produs vegetal. Agliconii flavonoidici prezenți și cuantificați au fost luteolina (3,371 mg/100 g produs vegetal) și apigenina (4,990 mg/100 g produs vegetal).

În extractele etanolice de *M. spicata* și *M. suaveolens* s-au identificat acizii caftaric, cafeic și clorogenic, gentisic, fiind prezenți în urme. Acidul p-cumaric s-a determinat în cantitate de 5 ori mai mare în *M. suaveolens* (2,126 mg/100 g produs vegetal) decât în *M. spicata* (0,441 mg/100 g produs vegetal). Din clasa flavonozidelor, a fost identificată rutozida; izoquercitrina s-a găsit în cantitate aproape dublă în *M. suaveolens* (31,634) față de *M. spicata* (16,069). Concentrații mai mari de quercitrină, luteolină și apigenină au fost determinate în *M. suaveolens*.

Profilul cromatografic pentru extractul etanolic de *M. piperita* var. *rubescens* este asemănător cu cel determinat pentru *M. piperita* var. *pallescens*, diferențele fiind de ordin cantitativ, forma *pallescens* având o compoziție mai bogată în aceste principii active. S-au identificat compușii fenilpropanici de tipul acizilor cafeic, gentisic, caftaric, clorogenic, p-cumaric, iar acidul ferulic a fost identificat și cuantificat numai în aceste două specii. S-au mai determinat flavonoidele, cum ar fi cele derivate de quercetol: rutozida și izoquercitrina, iar ca agliconi flavonoidici, apigenina și luteolina. Se remarcă cantități importante de izoquercitrină

(9,443-15,607 mg/100 g produs vegetal) și rutozidă (12,436-14,663 mg/100 g produs vegetal), pentru ambele specii de mentă vegetal).

Determinarea conținutului de polifenoli totali

Determinarea cantitativă a polifenolilor totali este o metodă spectrofotometrică, reactivul de culoare fiind Folin-Ciocalteu.

Cantitățile obținute de compuși polifenolici totali sunt cuprinse între 5,14 și 9,78%, exprimarea făcându-se în echivalenți de acid galic. Cele mai bune rezultate s-au obținut pentru speciile *M. rotundifolia* și *M. piperita var. pallescens* (9,78%), fiind urmate de *M. spicata* (8,62%) și *M. suaveolens* (7,6%). Un conținut mai redus în polifenoli totali s-a înregistrat pentru *M. piperita var. rubrescens* (5,14%).

Determinarea conținutului de flavonoide

Determinarea cantitativă a flavonoidelor din produsele vegetale studiate este o metodă spectrofotometrică, absorbanta soluției determinându-se la 430 nm.

Conținutul în flavonoide în *Mentha spp.* (g rutozidă /100g produs vegetal uscat) este cuprins între 0,1-0,5%, exprimarea făcându-se în echivalenți de rutozidă. Cele mai bune rezultate s-au obținut pentru speciile *M. rotundifolia* și *M. suaveolens* (~0,4%), fiind urmate de varietatea *M. piperita var. pallescens* (0,31%). Concentrații mici, în jur de 0,1% s-au determinat pentru speciile *M. piperita var. rubrescens* și *M. spicata*.

Determinarea conținutului de compuși fenilpropanici

Determinarea cantitativă a compușilor fenilpropanici din produsele vegetale studiate este o metodă spectrofotometrică bazată pe reacția de culoare cu reactivul Arnou.

Conținutul în compuși fenilpropanici la *Mentha spp.* variază între 0,73-2,09, exprimarea făcându-se în echivalenți de acid cafeic. Cele mai bune rezultate s-au obținut pentru speciile *M. rotundifolia* (2,09%), *M. spicata* (1,976%) și *M. suaveolens* (1,886%), comparabile cu concentrația de derivați de acid cafeic din produsul vegetal *Cynarae folium* (~2%). *M. piperita var. pallescens* conține 1,106% compuși fenilpropanici. Concentrații mai mici, în jur de 0,7%, s-au determinat pentru specia *M. piperita var. rubrescens*.

Determinarea conținutului de taninuri

Este o metodă spectrofotometrică, a cărei principiu se bazează pe proprietățile reducătoare ale taninurilor și altor polifenoli asupra acidului fosfowolframic, în mediu alcalin și măsurarea intensității colorației albastre a amestecului de oxizi de wolfram rezultat, la lungimea de undă de 715 nm.

Conținutul în taninuri la *Mentha spp.* variază între 3,1-6,96%. Cele mai bune rezultate s-au obținut pentru speciile *M. rotundifolia* și *M. piperita var. pallescens*, fiind urmate de *M. suaveolens* și *M. Spicata*. Un conținut mai redus în taninuri s-a înregistrat pentru *M. piperita var. rubrescens*.

Determinarea conținutului de ulei volatil

Uleiul volatil se obține cu ajutorul unui aparat de distilare (conform Ph Eur ediția a 7-a, metoda 2.8.12), echivalent instalației Clevenger

Cantitățile de ulei volatil determinate pentru produsele vegetale analizate sunt cuprinse între 0,55-2,02%. Valorile determinate experimental ne arată că procentul cel mai ridicat de ulei volatil se găsește la specia *Mentha spicata subsp. crispata*, urmată de *Mentha piperita var. pallescens* și *Mentha piperita var. rubrescens*. Procentul cel mai scăzut de ulei volatil se găsește în specia *Mentha suaveolens* și *Mentha rotundifolia*.

De asemenea, se observă că la toate speciile de mentă analizate, cantitatea cea mai ridicată de ulei volatil s-a obținut în cazul produselor vegetale recoltate în perioada de înflorire (când circa 50-60% din flori sunt deschise), iar cantitatea cea mai scăzută de ulei volatil s-a obținut în cazul produselor vegetale recoltate la începutul perioadei de înflorire (când circa 90% din flori se află în faza de muguri flori).

Comparând produsele vegetale recoltate în ani diferiți, observăm că procentul cel mai ridicat de ulei volatil pentru speciile de mentă s-a obținut în anul 2011, cantitatea de ulei volatil fiind influențată și de factorii pedo-climatici.

Studiul 3 – Analiza compoziției chimice a uleiurilor volatile prin gaz-cromatografie

Ne-am propus analiza uleiurilor volatile izolate din speciile de *Mentha* utilizând un gazcromatograf cuplat cu spectrometru de masă de tip Agilent Technologies GC 7890A cuplat cu un spectrometru de masă Agilent Technologies 5975C.

Analiza gazcromatografică ne arată că, compușii de bază din uleiul volatil de *Mentha piperita* var. *palleescens* și *Mentha piperita* var. *rubescens* sunt mentolul, mentona și izomentona, compușii de bază din uleiul volatil de *Mentha spicata* subsp. *crispata* sunt carvona și mentolul, compusul de bază din uleiul volatil de *Mentha suaveolens* este oxidul de piperitonă, iar compușii de bază din uleiul volatil de *Mentha rotundifolia* sunt carvona și limonenul.

În anul 2010 *Mentha piperita* var. *palleescens* și *Mentha piperita* var. *rubescens* recoltate la sfârșitul înfloririi, au un procent mai mare de mentol față de menta recoltată în timpul și la începutul înfloririi. De asemenea, menta recoltată la începutul înfloririi conține un procent mai mare de mentonă. Conținutul de mentol a crescut odată cu maturizarea plantei, iar conținutul de mentonă a scăzut odată cu maturizarea plantei. În anul 2011, menta recoltată la începutul înfloririi conține un procent mai mare de mentol față de menta recoltată în timpul înfloririi și la sfârșitul înfloririi. *Mentha piperita* var. *rubescens* a conținut cel mai mult mentol în anul 2009 iar *Mentha piperita* var. *palleescens* a conținut cel mai mult mentol în anul 2011.

Mentha spicata subsp. *crispata* recoltată în anul 2010 în timpul înfloririi conține un procent mai mare de carvonă față de menta recoltată la începutul și sfârșitul înfloririi. În anul 2011, nu au fost diferențe mari privind conținutul de carvonă, în cele 3 perioade de recoltare. Analizând conținutul de carvonă la probele recoltate la începutul înfloririi din cei trei ani de recoltare, observăm că nivelul cel mai ridicat de carvonă a fost în anul 2009.

La *Mentha suaveolens* recoltată atât în 2010 cât și în 2011, observăm că la sfârșitul înfloririi conține un procent mai mare de oxid de piperitonă, comparativ cu menta recoltată la începutul și în timpul înfloririi. Menta recoltată în anul 2009 la începutul înfloririi conține mai mult oxid de piperitonă față de menta recoltată în anii 2010-2011.

La *Mentha rotundifolia* recoltată atât în 2010 cât și în 2011, observăm că în timpul înfloririi conține un procent mai mare de carvonă comparativ cu menta recoltată la începutul și sfârșitul înfloririi. Menta recoltată în anul 2009 la începutul înfloririi conține mai multă carvonă față de mentă recoltată în anii 2010-2011.

Studiul 4 – Determinarea activității antioxidante, antimicrobiene, antiinflamatoare și analgezice

Determinarea activității antioxidante

În cadrul acestui studiu ne-am propus evaluarea activității antioxidante (AAO) prin metoda DPPH, utilizând extracte etanolice de mentă.

În urma determinării acțiunii antioxidante prin metoda DPPH, se constată că extractul etanolic de *M. rotundifolia* și *M. piperita pallescens* prezintă activitatea antioxidantă cea mai puternică (104,74 μg/ml respectiv 109,8 μg/ml), fiind urmate de probele de *M. spicata* (151,05 μg/ml) și *M. suaveolens* (169,86 μg/ml).

Cea mai scăzută acțiune antioxidantă a prezentat-o extractul de *M. piperita rubescens* (284,61 μg/ml). Toate valorile obținute sunt inferioare standardelor alese, care sunt substanțe chimice antioxidante. Rezultatele obținute pentru activitatea antioxidantă sunt în corelație directă cu cantitatea de polifenoli totali din probele studiate. *M. rotundifolia* conține cantitatea cea mai mare de polifenoli totali și a prezentat acțiunea antioxidantă cea mai mare. *M. rubescens* cu numai 5,145% polifenoli a manifestat cea mai scăzută activitate antioxidantă.

Determinarea activității antimicrobiene

Extractele etanolice de *Mentha spp.* au fost testate pentru activitatea antimicrobiană pe două tulpini de bacterii gram-pozitive: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, pe două tulpini de bacterii gram-negative: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* și o tulpină fungică: *Candida albicans*, folosind tehnica de difuziune în agar a godeurilor în care s-a depus substanța activă antimicrobiană.

Toate cele cinci extracte de *Mentha spp.* au arătat o activitate antibacteriană ridicată față de *L. monocytogenes* (diametru inhibiție ≥ 20 mm), mai puternică în comparație cu gentamicina, antibiotic standard de referință. Diametrele respective de inhibiție au fost de 24 mm, 26 mm și 28 mm.

Extractele de *M. spicata*, *M. rotundifolia* și *M. piperita pallescens* au arătat o activitate antibacteriană comparabilă cu cea a gentamicinei față de *S. aureus* (diametrele de inhibiție au fost 18 mm) și efect antibacterian scăzut față de *S. typhimurium* și *E. coli* (diametru de inhibiție între 10 și 15 mm).

Dintre cele cinci specii de mentă testate, extractele etanolice de *M. piperita rubescens* au avut diametrele de inhibiție mai mici față de *S. aureus* (10 mm), *E. coli* (8 mm) și *S. typhimurium* (12 mm). *M. suaveolens* a demonstrat o activitate moderată față de *S. typhimurium* (diametru de inhibiție între 15 și 20 mm). Valorile obținute pentru diametrele zonelor de inhibiție față de *S. aureus* și *E. coli* au fost reduse (10 mm și respectiv 8 mm) și au demonstrat că extractul de *M. suaveolens* a fost inactiv.

Datele de screening antifungice relevă faptul că doar două extracte au prezentat activitate inhibitorie slabă față de *C. Albicans*. Extractele de *M. spicata* și *M. rotundifolia* au demonstrat o activitate antifungică proeminentă față de *Candida albicans* comparativ cu cea a Fluconazolului, utilizat ca medicament standard. Celelalte trei extracte de mentă (*M. suaveolens*, *M. piperita pallescens* și *rubescens*) au fost inactice față de tulpina fungică. Diametrele de inhibiție respective au fost de 8 mm.

Rezultatele prezentei investigații sugerează că cele mai multe dintre plantele studiate pot reprezenta o bună sursă de agenți antibacterieni, în special față de tulpini bacteriene gram-pozitive, putând constitui alternative ale antibioticelor, în tratamentul infecțiilor cu aceste tulpini.

Determinarea activității antiinflamatoare

Pentru a determina efectul antiinflamator al uleiurilor volatile din specii de *Mentha*, s-a utilizat metoda edemului labei de șobolan indus cu carrageenină.

În acest model experimental uleiurile volatile din 5 specii de *Mentha* (*M. piperita pallescens*, *M. piperita rubescens*, *M. spicata*, *M. suaveolens*, *M. rotundifolia*) au fost administrate oral prin gavaj șobolanilor, în doze crescătoare de 125 mg/kgc, 250 mg/kgc, respectiv 500 mg/kgc, cu o oră înainte de inducerea inflamației. Membrul posterior al șobolanilor a devenit edematos după administrarea intraplantară a carrageeninei, inflamația

atingând valorile maxime după 4 ore. Administrarea antiinflamatorului de referință, diclofenacul 20 mg/kg, a inhibat semnificativ formarea edemului la animalele tratate, efectul manifestându-se încă din prima oră și atingând nivelul maxim la 3 ore de la administrare (66.00% inhibiție a edemului inflamator).

Administrarea uleiurilor volatile din *M. piperita* var. *pallescens*, *M. spicata*, *M. suaveolens* și *M. rotundifolia*, a redus inflamația în special la doza de 500 mg/kg, producând efecte comparabile cu cele ale substanței de referință, diclofenacul sau chiar ușor superioare acestuia la 2h și 4h de la producerea inflamației, în cazul uleiului volatil din *M. spicata*. Pentru cele 4 specii menționate rezultatele au fost semnificative statistic la doza de 500 mg/kg și parțial semnificative la dozele inferioare de 250 mg/kg și 125 mg/kg.

Uleiul volatil din specia *M. piperita* var. *rubescens* nu a produs efecte antiinflamatoare semnificative statistic.

Determinarea activității analgezice

Pentru a determina efectul analgezic al uleiurilor volatile din speciile de *Mentha*, s-a utilizat testul contorsiunilor induse de acidul acetic la șoarece. Uleiurile volatile din 5 specii de *Mentha* recolta 2, 2010 (*M. piperita pallescens*, *M. piperita rubescens*, *M. spicata*, *M. suaveolens*, *M. rotundifolia*) au fost administrate oral prin gavaj șoarecilor, în doze crescătoare de 125 mg/kgc, 250 mg/kgc, respectiv 500 mg/kgc, cu o oră înainte de administrarea acidului acetic.

Administrarea analgezicului de referință, ketorolacul în doză de 10 mg/kg, a redus semnificativ numărul contorsiunilor induse de acidul acetic la șoarece, procentul de inhibiție fiind de 60.49%. Administrarea uleiurilor volatile din *M. spicata*, *M. rotundifolia*, *M. piperita pallescens*, *M. suaveolens* a redus de asemenea numărul contorsiunilor, procentele de inhibiție situate între 25.30% și 47.53% fiind însă inferioare ketorolacului. Rezultatele au fost semnificative statistic în cazul uleiurilor volatile din *M. spicata*, *M. rotundifolia* și *M. piperita pallescens*, efectul analgezic fiind doză-dependent. Uleiul volatil din specia *M. piperita rubescens* nu a produs efecte analgezice semnificative statistic.

De asemenea rezultatele se corelează cu conținutul de limonen (la *M. spicata*, *M. rotundifolia*, *M. piperita pallescens* și *M. suaveolens*) sau carvonă (la *M. spicata* și *M. rotundifolia*) evidențiate prin analize gaz-cromatografice. Astfel, se confirmă unele date din literatura de specialitate care semnalau efectul analgezic al acestor substanțe.

Concluzii generale

S-au identificat și dozat principalii constituenți din speciile de mentă: ulei volatil, compuși polifenolici, polifenoli totali, flavonoide, compuși fenilpropanici, taninuri.

Deși are un conținut mai scăzut de ulei volatil, la *Mentha rotundifolia* s-au obținut cele mai bune rezultate la dozarea polifenolilor totali, flavonoidelor, compușilor fenilpropanici și a taninurilor, aceste rezultate fiind în corelație directă cu analizele farmacologice realizate la această specie de mentă.

Un conținut mai redus în polifenoli totali, flavonoide, compuși fenilpropanici și taninuri, s-a înregistrat pentru *M. piperita* var. *rubescens*, aspect evidențiat și la analizele farmacologice realizate pentru această specie de mentă.

Am pus în evidență faptul că nivelul de ulei volatil precum și compoziția chimică determinată gascromatografic, diferă în funcție de anul recoltării și în funcție de perioada de recoltare (probele recoltate în timpul și la sfârșitul înfloririi sunt mai bogate compozițional).

Cele două varietăți de *Mentha: pallescens* și *rubescens* au o compoziție chimică asemănătoare, *Mentha piperita* var. *rubescens* având un procent mai mare de mentol.

S-a determinat faptul că *Mentha suaveolens* și *Mentha rotundifolia* au o compoziție chimică diferită fapt susținut și de analiza microscopică realizată. *Mentha suaveolens* are ca și

component de bază oxidul de piperitonă, în timp de *Mentha rotundifolia* are ca și component de bază carvona. Deși unii autori le-au considerat sinonime, din analiza uleiului volatil realizată în lucrarea de față, cele 2 specii de mentă se pot diferenția.

În urma determinării acțiunii antioxidante, s-a constatat că extractele etanolice de *M. rotundifolia* și *M. piperita pallescens* au prezentat o puternică activitate antioxidantă, fiind urmate de probele de *M. spicata* și *M. suaveolens*, rezultatele fiind în corelație directă cu cantitatea de polifenoli totali din probele studiate.

S-a evidențiat faptul că toate cele cinci extracte de *Mentha* au arătat o activitate antibacteriană ridicată față de *Listeria monocytogenes*, mai puternică în comparație cu gentamicina, antibiotic standard de referință. Extractele de *M. spicata*, *M. rotundifolia* și *M. piperita pallescens* au arătat o activitate antibacteriană comparabilă cu cea a gentamicinei față de *Staphylococcus aureus*. Extractele de *M. spicata* și *M. rotundifolia* au demonstrat o activitate antifungică proeminentă față de *Candida albicans* comparativ cu cea a Fluconazolului, utilizat ca medicament standard.

S-a obținut un efect antiinflamator semnificativ statistic în special la doza de 500 mg/kg pentru uleiurile volatile din *M. piperita pallescens*, *M. spicata*, *M. suaveolens* și *M. rotundifolia*. Uleiul volatil din *M. spicata* a redus inflamația încă din prima oră, similar diclofenacului, fiind superior acestuia la 2h și 4h de la provocarea inflamației.

S-a determinat efectul analgezic al uleiurilor volatile din cele 5 specii de *Mentha* obținându-se un efect analgezic semnificativ statistic la doza de 500 mg/kg pentru uleiurile volatile din *M. spicata*, *M. rotundifolia* și *M. piperita pallescens*. Uleiul volatil din *M. spicata* a produs cel mai ridicat procent de inhibiție a contorsiunilor induse de acidul acetic la șoarece.

Pentru prima dată în literatură s-a evidențiat acțiunea antiinflamatoare și analgezică pentru *Mentha rotundifolia*.

Rezultatele prezentei cercetări conturează perspective de utilizare a acestor specii de *Mentha* în noi preparate fitoterapeutice.

PhD THESIS ABSTRACT

Comparative phytochemical study
of some *Mentha* species
from the Lamiaceae family,
with volatile oils

PhD Student: **Radu Ioan Moldovan**

PhD Scientific Coordinator: Prod. Dr. **Radu Oprean**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

Introduction	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	17
1. Botanical data regarding <i>Mentha</i> species.....	19
1.1. Systematic classification and popular names	19
1.2. Spread	19
1.3. General characteristics of Lamiaceae Family.....	21
1.4. Botanical description of the genus <i>Mentha</i>	22
1.5. <i>Mentha</i> species analyzed	23
1.5.1. <i>Mentha piperita</i> L.(var. <i>palescens</i> and var. <i>rubescens</i>)	23
1.5.2. <i>Mentha spicata</i> L. subsp. <i>crispata</i>	26
1.5.3. <i>Mentha suaveolens</i> Ehrh	27
1.5.4. <i>Mentha rotundifolia</i> (L.) Huds	28
2. The chemical composition of <i>Mentha</i> species.....	29
3 Pharmacological action and therapeutic indications.....	31
PERSONAL CONTRIBUTION.....	33
1. Working hypothesis / objectives	35
2. 1st Study – Obtaining the vegetal product	35
2.1. Introduction	35
2.2. Working hypothesis / objectives	36
2.3. Material and method.....	36
2.4. Results	37
2.5. Discussions	42
3. 2nd Analysis of the chemical composition of volatile oils by gas-chromatography	43
3.1. Introduction	43
3.2. Working hypothesis / objectives	43
3.3. Qualitative and quantitative analysis of polyphenolic compounds.....	44
3.3.1. Material and method	44
3.3.2. Results.....	45
3.3.3. Discussions	48
3.4. Determination the content of total polyphenols	49
3.4.1. Material and method	49
3.4.2. Results.....	50
3.4.3. Discussions	50
3.5. Determination the content of flavonoids	51
3.5.1. Material and method	51
3.5.2. Results.....	52
3.5.3. Discussions	53
3.6. Determination the content of phenylpropanoid compounds.....	53
3.6.1. Material and method	53
3.6.2. Results.....	54
3.6.3. Discussions	55

3.7. Determination the content of tannins	56
3.7.1. Material and method	56
3.7.2. Results.....	57
3.7.3. Discussion	57
3.8. Determination the content of volatile oil	57
3.8.1. Material and method	57
3.8.2. Results.....	59
3.8.3. Discussions	60
4. 3rd Study – Analysis of the chemical composition of volatile oils by gas-chromatography	61
4.1. Introduction	61
4.2. Working hypothesis / objectives	61
4.3. Material and method.....	61
4.4. Results	62
4.5. Discussions	112
5. 4th Study – Determination of antioxidant activity, antimicrobial, anti-inflammatory and analgesic.....	115
5.1. Determination of antioxidant activity.....	115
5.1.1. Introduction.....	115
5.1.2. Working hypothesis / objectives	116
5.1.3. Material and method	116
5.1.4. Results.....	120
5.1.5. Discussions	120
5.2. Determination of antimicrobial activity	121
5.2.1. Introduction.....	121
5.2.2. Working hypothesis / objectives	122
5.2.3. Material and method	122
5.2.4. Results.....	122
5.2.5. Discussions	123
5.3. Determination of anti-inflammatory activity.....	124
5.3.1. Introduction.....	124
5.3.2. Working hypothesis / objectives	124
5.3.3. Material and method	124
5.3.4. Results.....	126
5.3.5. Discussions	127
5.4. Determination of analgesic activity.....	129
5.4.1. Introduction.....	129
5.4.2. Working hypothesis / objectives	130
5.4.3. Material and method	130
5.4.4. Results.....	131
5.4.5. Discussions	132
6. General conclusions (synthesis)	133
7. Originality and innovative contributions of the thesis	139
References	141
Annexes	151

Keywords: *Mentha piperita* var. *pallescens*, *Mentha piperita* var. *rubescens*, *Mentha spicata* L. subsp. *crispata*, *Mentha suaveolens*, *Mentha rotundifolia*, volatile oil, polyphenolics compounds, total polyphenols, flavonoids, phenylpropanoids compounds, tannins, antioxidant action, antimicrobial action, anti-inflammatory action, analgesic action.

Introduction

The world's most studied species of menthe is *Mentha Piperita Peppermint* L. In Romania, extensive research on this species of menthe have been made in the past, but focused more on the study of composition, botanical and morphologic, pursuing the species' behavior in culture.

In our country were mainly cultivated species *Mentha piperita* and *arvensis*. Other species of *Mentha* (*spicata*, *suaveolens*, *rotundifolia*) were not placed in culture. By this paper is desired the achievement of some experimental cultures in Orăștie, using several species of menthe, pursuing optimal harvest timing so as to obtain the best volatile oil from the compositional point of view. It is follows a comparative gas-chromatographic analysis of volatile oils, and also an analysis of other groups of active ingredients (polyphenolics, flavonoids, tannins) which can be extracted from *Mentha* species.

With the advancement in preclinical and clinical research, increase the information demands on the composition and properties of vegetal products. This study aims to determine the pharmacological actions to identify species of menthe with phytotherapeutic value and placing them in culture, in order to obtain new drugs and dietary supplements.

Personal contribution

1st study - Obtaining the vegetal product

The first stage aims to cultivate species of mint, to use them in phytotherapeutic products: *Mentha piperita* var. *pallescens*, *Mentha piperita* var. *rubescens*, *Mentha spicata* L. subsp. *crispata*, *Mentha suaveolens* and *Mentha rotundifolia*. In the second stage is pursuing the harvesting of the vegetal product in different stages of development, to observe the influence of harvesting period on the essential oil composition. After harvesting, the vegetal product is subjected to drying.

The five species of menthe were cultured in experimental cultures in the Orăștie, county Hunedoara, at the Fares Bio Vital Ltd Company laboratories, firm which was taken over also the planting material, to achieve experimental cultures. Each menthe variety was tested on 20 m² of culture. Harvesting was done manually, morning, between 10:00 and 12:00.

To track the quality of volatile oil depending on the year and harvest time, each of the 5 species of menthe were collected in 2009, 2010 and 2011 in different periods of harvest, at the beginning of flowering, during flowering and end of flowering. After harvesting, the vegetal product was natural dried for 5-6 days until a maximum of 13% moisture.

Vegetal product identity verification was performed using the microscope Motic K-500L model. After microscopic analysis, *Mentha piperita* var. *pallescens* presents on inferior side ribs pinnate, light colored, the secondary one being parallel to each other, at least in the middle of the foliages lamina. Among them there are many glandular hairs, with a circular contour, brown, on a green background of the assimilate tissue. On the upper side don't present obvious ribs and has very few glandular hairs on the green background of the foliages lamina.

Mentha piperita var. *rubescens* presents on the lower part a red background due to anthocyanins contained in the leaves of this specie. Glandular hairs have a very high density. Also, the upper of the foliages lamina keep a red color, in particular on the edge of the lamina, being also visible the ribs' profiles, also reddish, but on this side are missing glandular hairs.

Mentha spicata subs. *crispata* present on lower side, ribs light-colored and a large number of glandular hairs brown. On upper side appear only ribs, the assimilation tissue, green, but are missing the secretory tissues.

Mentha suaveolens presents tector hairs very dense; they are a real felt, thicker on the upper epidermis, which don't have secretory tissues. On the underside you can see the ribs, brushes tector and a few glandular hairs, which appear as circular areas round, colored in reddish-brown.

Mentha rotundifolia presents on the lower side various sizes of ribs, light-colored tector hairs and glandular hairs reddish-brown. At the top can be seen the ribs, tector hairs, but are missing glandular hairs.

2nd Study - Analysis of the content of polyphenolics compounds, total polyphenols, flavonoids, phenylpropanoid compounds, tannins and volatile oil

The interest for the availability of the polyphenolic compounds and volatile oils is increasing due to the therapeutic effects demonstrated in the specialized studies.

We aimed to determine polyphenolic compounds, total polyphenols, flavonoids, of the phenylpropanoid compounds and tannins, for their correlation with antioxidant and antimicrobial effect. Also, we intend to obtain the quantitative determination of volatile oil of menthe species, by officinal method.

Qualitative and quantitative analysis of polyphenolic compounds

Quantitative determination: for polyphenolic's dosage was using the high performance liquid chromatography (HPLC), external standard method, ultraviolet detection.

In the ethanol extract of *M. rotundifolia* have been identified three cinnamic acid derivatives i.e. caftaric acid, caffeic acid and chlorogenic acid, and a derivative of benzoic acid, gentisic acid, but the quantities are too small to be quantified. P-Coumaric acid was determined at a concentration of 3.691 mg / 100 g vegetal product. As flavonoids were identified rutoside and isoquercitrin, but without being quantify. Quercitrin was found in concentrations of 4,665 mg / 100 g vegetal product. The flavonoid aglycones, present and quantified, were luteolin (3371 mg / 100 g vegetal) and apigenin (4990 mg / 100 g vegetal).

In the ethanol extracts of *M. spicata* and *M. suaveolens* were identified caftaric, caffeic and chlorogenic acid, gentisic acid being present in traces. P-Coumaric acid was measured at 5-fold higher in *M. suaveolens* (2.126 mg / 100 g vegetable) than *M. spicata* (0.441 mg / 100 g vegetable). From flavonoid class, has been identified rutoside; isoquercitrin was found almost double in *M. suaveolens* (31,634) than in *M. spicata* (16,069). Higher concentrations of quercitrin, luteolin and apigenin were found in *M. suaveolens*.

The chromatographic profile of the ethanol extract of *M. piperita* var. *rubescens* is similar to that determined for *M. piperita* var. *pallescens*, the differences being on a quantitative level, *pallescens* having a richer composition in the active ingredients. Phenylpropanoid

compounds have been identified as the caffeic, gentisic, caftaric, chlorogenic and P-Coumaric acids, and ferulic acid were identified and quantified only in these two species. We have determined flavonoids, such as derivatives of quercetin: rutoside and isoquercitrin and the aglycone flavonoid, luteolin and apigenin. It is noted important amounts of isoquercitrin (9.443 to 15.607 mg / 100 g vegetal product) and rutoside (12.436-14.663 mg / 100 g vegetal product) for both species of menthe.

Determination the content of total polyphenols

Quantitative determination of total polyphenols is a spectrophotometric method, the color reagent being Folin-Ciocalteu.

The obtained quantities of total polyphenol compounds are between 5.14 and 9.78%, the expression being made in equivalents of gallic acid. The best results were obtained for the species *M. rotundifolia* and *M. piperita var. pallescens* (9.78%), being followed by *M. spicata* (8.62%) and *M. suaveolens* (7.6%). A lower content of total polyphenols was recorded for *M. piperita var. rubescens* (5.14%).

Determination the content of flavonoids

Quantitative determination of flavonoids in vegetal products studied is a spectrophotometric method, the absorbance of the solution being determined at 430 nm.

The content of flavonoids in *Mentha spp.* (g rutoside/ 100 g dry vegetal product) is in the range of 0.1-0.5%, the expression being made in rutoside equivalents. The best results were obtained for the species *M. rotundifolia*, *M. suaveolens* (~ 0.4 %), followed by the *M. piperita var. pallescens* (0.31%). A low concentration of about 0.1% was determined for the species *M. piperita var. rubescens* and *M. spicata*.

Determination the content of phenylpropanoid compounds

Quantitative determination of phenylpropanoid compounds in vegetal products studied is a spectrophotometric method based on color reaction with Arnou reagent.

Content phenylpropanoid compounds from *Mentha spp.* ranges from 0.73 to 2.09, the expression being in caffeic acid equivalents. The best results were obtained for the species *M. rotundifolia* (2.09%), *M. spicata* (1.976%), and *M. suaveolens* (1.886%), comparable to the concentration of caffeic acid derivatives from the vegetal product *Cynarae folium* (2%). *M. piperita var. pallescens* contains 1,106% phenylpropanoid compounds. Lower concentrations, about 0.7%, were determined for the species *M. piperita var. rubescens*.

Determination the content of tannins

It is a spectrophotometric method, the principle of which is based on reducing properties of tannins and other polyphenolics on phosphotungstic acid in an alkaline medium, and measuring the intensity of the blue coloration of the mixture oxides of resulting tungsten at a wavelength of 715 nm.

Tannin content in *Mentha spp.* ranges from 3.1 to 6.96%. The best results were obtained for the species *M. rotundifolia*, *M. piperita var. pallescens*, being followed by *M. suaveolens* and *M. spicata*. A lower in tannin content was recorded for *M. piperita var. rubescens*.

Determination the content of volatile oil

The volatile oil is obtained by using a distillation apparatus (according to Ph Eur, 7th Edition, Method 8.2.12) equivalent with Clevenger installation.

Amounts of volatile oil derived for vegetal products analyzed are between 0.55 to 2.02%. The experimentally determined values shows that the highest percentage of volatile oil is found at

Mentha spicata subsp. *crispata* followed by *Mentha piperita* var. *pallescens* and *Mentha piperita* var. *rubescens*. The lowest percentage of volatile oil is found in *Mentha suaveolens* and *Mentha rotundifolia*.

It also notes that at all species of menthe analyzed, the highest amount of volatile oil was obtained in vegetable products harvested during the flowering season (when about 50-60% of flowers are open), and the lowest amount of volatile oil was obtained in vegetable products harvested at the beginning of flowering (when 90% of flowers are in bud stage).

Comparing the vegetal products harvested in different years, we see that the highest percentage of volatile oil for menthe species was obtained in 2011, the amount of volatile oil being influenced by pedo-climatic factors.

3rd Study - Analysis of the chemical composition of volatile oils by gas-chromatography

We have proposed the analysis of isolated volatile oils from *Mentha* species using a gas chromatograph coupled with mass spectrometer type 7890 Agilent Technologies GC, coupled with an Agilent Technologies 5975C mass spectrometer.

Gas-chromatographic analysis shows that the basic compounds of volatile oil of *Mentha piperita* var. *pallescens* and *Mentha piperita* var. *rubescens* are menthol, menthone and isomenthone, the basic compounds of *Mentha spicata* subsp. *crispata* volatile oil are carvone and menthol, the basic compound of volatile oil of *Mentha suaveolens* is piperitone oxide, and basic compounds of the volatile oil of *Mentha rotundifolia* are carvone and limonene.

In 2010, *Mentha piperita* var. *pallescens* and *Mentha piperita* var. *rubescens* harvested at the end of flowering had a higher percentage of menthol compared with the mint harvested during the early flowering. Also, the mint harvested in the beginning of flowering contains a higher percentage of menthone. Menthol content increased with plant maturation and menthone content decreased with plant maturity. In 2011, mint harvested in the beginning of flowering contains a higher percentage of menthol compared with mint harvested at the end of flowering or flowering time. *Mentha piperita* var. *rubescens* contained the most menthol in 2009, and *Mentha piperita* var. *pallescens* contained the most menthol in 2011.

Mentha spicata subsp. *crispata* harvested in 2010 during flowering contains a higher percentage of carvone compare with the mint harvested at the beginning and end of flowering. In 2011, there were no significant differences in the content of carvone in the three sampling periods. Analyzing the carvone content at harvested samples at the beginning of flowering of the three years of harvest, we see that the highest level of carvone was in 2009.

At the *Mentha suaveolens* harvested in 2010 and 2011, we can see that the end of flowering contains a higher proportion of piperitone oxide, compared to the mint harvested at the beginning of flowering time. The mint harvested in 2009 at the beginning of flowering contains more piperitone oxide compared to mint harvested in 2010-2011.

At *Mentha rotundifolia* collected both in 2010 and in 2011, we note that during flowering contains a higher percentage of carvone compared to mint harvested at the beginning and end of flowering. The mint harvested in 2009 at the beginning of flowering contains more carvone than the mint harvested in 2010-2011.

4th Study - Determination of antioxidant activity, antimicrobial, anti-inflammatory and analgesic

Determination of antioxidant activity

In this study we have proposed evaluation of antioxidant activity (AAO) by DPPH method using ethanol extracts of mint.

After determining the antioxidant action of DPPH method, it appears that ethanol extract of *M. rotundifolia* and *M. piperita pallescens* presents the strongest antioxidant activity (104.74 µg / ml respectively 109.8 µg / ml), followed by samples of *M. spicata* (151.05 µg / ml) and *M. suaveolens* (169.86 µg / ml).

The lowest antioxidant activity was presented by *M. piperita rubescens* extract (284.61 µg / ml). All values obtained are lower than the chosen standards, which are antioxidant chemicals. The results for antioxidant activity are directly correlated to the amount of total polyphenols from the studied samples. *M. rotundifolia* contains the highest amount of total polyphenols and presented the greater antioxidant action. *M. rubescens*, with only 5.145% polyphenols showed the lowest antioxidant activity.

Determination of antimicrobial activity

Ethanol extracts of *Mentha spp.* were tested for antimicrobial activity on two gram-positive strains of bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, on two strains of Gram-negative bacteria: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and a fungal strain: *Candida albicans*, using diffusion technique in agar wells, in which has been deposited the active antimicrobial substance.

All the five extracts of *Mentha spp.* showed a high antibacterial activity compared to *L. monocytogenes* (diameter inhibition of ≥ 20 mm), stronger compared to gentamicin, antibiotic reference standard. The respective diameters of inhibition were 24 mm, 26 mm and 28 mm.

Extracts of *M. spicata*, *M. rotundifolia*, *M. piperita pallescens* showed antibacterial activity comparable to that of gentamicin, compared with *S. aureus* (inhibition diameters were 18 mm) and a low antibacterial effect against *S. typhimurium* and *E. coli* (diameter inhibition of 10 to 15 mm).

Of the five mint species tested, ethanolic extracts of *M. piperita rubescens* had smaller inhibition diameter than *S. aureus* (10 mm), *E. coli* (8 mm), and *S. typhimurium* (12 mm). *M. suaveolens* showed a moderate activity against *S. typhimurium* (inhibition diameter of 15 to 20 mm). The obtained values for the diameters of the zones of inhibition against *S. aureus* and *E. coli* were small (10 mm or 8 mm) and showed that *M. suaveolens* extract was inactive.

The antifungal screening data reveals that only the two extracts showed a weak inhibitory activity against *C. albicans*. *M. spicata* and *M. rotundifolia* extracts showed a projecting antifungal activity against *Candida albicans*, in comparison with that of fluconazole used as the standard drug. The other three mint extracts (*M. suaveolens*, *M. piperita pallescens* and *rubescens*) were inactive against fungal strain. The inhibition diameters in question were 8 mm.

The results of this investigation suggests that most of the investigated plants can be a good source of antibacterial agents, particularly against Gram-positive bacterial strains, which may be the alternative of antibiotics to treat infections with these strains.

Determination of anti-inflammatory activity

To determine the anti-inflammatory effect of volatile oils of *Mentha* species, was used the method of the rat paw edema induced by carrageenan.

In this experimental model, 5 volatile oils of *Mentha* species (*M. piperita pallescens*, *M. piperita rubescens*, *M. spicata*, *M. suaveolens*, *M. rotundifolia*) were administered orally by gavage in rats, in increasing doses of 125 mg / kg 250 mg / kg and 500 mg / kg, with one hour before the induction of inflammation. The hind limb of the rats became edematous after intraplantar administration of carrageenan, the inflammation reaching maximum values after 4 hours. The administration of reference anti-inflammatory, diclofenac 20 mg / kg, significantly inhibited the formation of edema at the treated animals, the effect was manifested from the first hour and reaching the maximum level after 3 hours after administration (66.00% inhibition of the inflammatory edema).

Managing volatile oils of *M. piperita var. pallescens*, *M. spicata*, *M. suaveolens* and *M. rotundifolia* reducing the inflammation in particular at a dose of 500 mg/ kg, producing effects comparable to those of the reference substance, diclofenac, or even slightly higher of it, at 2 and 4 hours from the production of inflammation, at the volatile oil from of *M. spicata*. For the other four species mentioned, the results were statistically significant at the dose of 500 mg / kg and partial significant at lower doses of 250 mg / kg and 125 mg / kg.

The volatile oil of the species *M. piperita var. rubescens* didn't produce statistically significant anti-inflammatory effects.

Determination of analgesic activity

To determine the analgesic effect of the volatile oils of *Mentha* species, we used the contortions induced test of acetic acid in mice. Volatile oils of *Mentha* species second harvest in May 2010 (*M. piperita pallescens*, *M. rubescens piperita*, *M. spicata*, *M. suaveolens*, *M. rotundifolia*) were administered orally by gavages to mice, in increasing doses of 125 mg/ kg 250 mg/ kg and 500 mg/ kg, with one hour before the administration of acetic acid.

The administration of reference analgesic, ketorolac at a dose of 10 mg/ kg, significantly reduced the number of contortions induced by acetic acid in mice, the percentage inhibition being 60.49%. Administration of volatile oil of *M. spicata* essential oils, *M. rotundifolia*, *M. piperita pallescens* and *M. suaveolens* also reduced the number of contortions, the percentages of inhibition ranging between 25.30% and 47.53% being however lower to ketorolac. The results were significantly from statistic point of view for volatile oils of *M. spicata*, *M. rotundifolia* and *M. piperita pallescens*, the analgesic effect being dose-dependent. The volatile oil of *M. piperita rubescens* didn't produced statistically significant analgesic effects.

Also, the results match the content of limonene (*M. spicata*, *M. rotundifolia*, *M. piperita pallescens* and *M. suaveolens*) and carvone (*M. spicata* and *M. rotundifolia*) evidenced by gas-chromatographic analysis. This confirms some literature data, which indicate the analgesic effect of these substances.

General conclusions

Was identified and dosed the main constituents of the mint species: volatile oil, polyphenolics compounds, total polyphenols, flavonoids, phenylpropanoid compounds, tannins.

Although it has a lower content of volatile oil, at *Mentha rotundifolia* were obtained the best results in dosage of total polyphenols, flavonoids, phenylpropanoid compounds and tannins,

these results are in direct correlation with the pharmacological analyzes performed in this species of mint.

A lower content of total polyphenols, flavonoids, phenylpropanoid compounds and tannins was recorded for *M. piperita* var. *rubescens*, aspect emphasized at pharmacological analyzes conducted for this species of mint.

I highlighted the fact that the level of volatile oil and chemical composition determined through gas-chromatography, varies by harvest year and depending on the period of harvest (samples taken during and after flowering are compositionally richer).

The two varieties of *Mentha*: *pallescens* and *rubescens* have a similar chemical composition, *Mentha piperita* var. *rubescens* having a higher percentage of menthol.

It was determined that *Mentha rotundifolia* and *Mentha suaveolens* have a different chemical composition, actually supported by microscopic analysis performed. *Mentha suaveolens* has, like a basic component, oxide piperitone, while *Mentha rotundifolia* has like a basic component carvone. Although some authors have considered them synonyms, through the volatile oil analysis performed in this paper, the two mint species can be differentiated.

After determining the antioxidant action, it was found that ethanol extracts of *M. rotundifolia* and *M. piperita pallescens* showed strong antioxidant activity, being followed by *M. spicata* and *M. suaveolens* samples, the results being in direct correlation with the amount of total polyphenols in the samples studied.

It was revealed that all five *Mentha* extracts showed a high antibacterial activity against *Listeria monocytogenes*, stronger compared to gentamicin, the standard reference antibiotic. Extracts of *M. spicata*, *M. rotundifolia*, *M. piperita pallescens* showed an antibacterial activity comparable to that of gentamicin against *Staphylococcus aureus*. *M. spicata* and *M. rotundifolia* extracts showed a projecting antifungal activity against *Candida albicans* in comparison with that of Fluconazole, used as a standard drug.

It was achieved a statistically significant anti-inflammatory effect especially at the dose of 500 mg / kg volatile oils of *M. piperita pallescens*, *M. spicata*, *M. suaveolens* and *M. rotundifolia*. The volatile oil of *M. spicata* reduced inflammation from the first hour, similar to diclofenac, but being higher than it at 2h and 4h after the inflammation moment.

It was determined the analgesic effect of the volatile oils of 5 species of *Mentha*, being obtained an analgesic effect statistically significant at the dose of 500 mg / kg of volatile oils from *M. spicata*, *M. rotundifolia* and *M. piperita pallescens*. The volatile oil of *M. spicata* produced the highest percentage of inhibition of the induced contortions of the acetic acid in mice.

For the first time in literature it was highlighted the inflammatory and analgesic action for *Mentha rotundifolia*.

The results of this study outline the perspectives for using these *Mentha* species in new phytotherapeutic preparations.