

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
“IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA  
FACULTATEA DE FARMACIE**

**CERCETĂRI  
FARMACOGNOSTICE ASUPRA  
SPECIEI *SCILLA BIFOLIA* L. ( *Liliaceae* )**

**REZUMATUL  
TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător științific:**

**Prof. Dr. Honorius POPESCU**

**Doctorand:**

**farm. Maria-Luiza BĂLĂȘOIU**

**2011**

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b> .....	7
<b>MOTIVAREA TEMEI</b> .....	10
<b>PARTEA ÎNTÂI-STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b> .....	12
<b>1. DATE BOTANICE DESPRE <i>Scilla bifolia</i> L.</b> .....	13
1.1. Descriere botanică a genului <i>Scilla</i> .....	13
1.2. Descriere botanică a speciei <i>Scilla bifolia</i> .....	13
1.3. Răspândirea .....	14
1.4. Încadrarea sistematică .....	15
<b>2. DATE FITOCHIMICE PRIVIND SPECIILE DE <i>SCILLA</i></b> .....	16
2.1. Specia <i>Scilla maritima</i> : Descriere, structură, stabilitate .....	16
2.2. Alte componente chimice ale plantei .....	20
<b>3. DATE FARMACOLOGICE DESPRE <i>SCILLA</i> Sp.</b> .....	21
3.1. Acțiunea cardiotonică .....	21
3.2. Acțiunea diuretică .....	21
3.3. Alte acțiuni .....	22
3.4. Acțiuni la doze toxice .....	23
<b>4. DATE TOXICOLOGICE PRIVIND SPECIILE DE <i>SCILLA</i></b> .....	24
4.1. Intoxicația acută .....	24
4.2. Intoxicația cronică .....	25
4.3. Evoluție, diagnosticare, cauză-deces .....	25
4.4. Descrierea analitică a semnelor clinice .....	25
4.5. Tratament .....	27
4.6. Ilustrare prin cazuri clinice .....	27
4.7. Măsuri preventive specifice .....	28
<b>PARTEA A DOUA – CONTRIBUȚII PERSONALE</b> .....	30
<b>5. CERCETĂRI HISTO-ANATOMICE ASUPRA SPECIEI <i>SCILLA BIFOLIA</i> L</b> .....	31
5.1. Material și metodă.....	32
5.2. Rezultate și discuții .....	32
5.2.1. Structura tulpinii .....	32
5.2.2. Structura frunzei .....	35
5.2.3. Structura foliolei bulbului .....	37
5.3. Concluzii parțiale .....	39
<b>6. CERCETAREA COMPOZIȚIEI CHIMICE</b> .....	40
6.1. Identificarea compușilor activi posibili .....	42
6.1.1. Material și metodă .....	42
6.1.2. Screening inițial de compuși activi posibili .....	43
6.1.3. Rezultate obținute .....	44
6.1.4. Concluzii parțiale .....	44
6.2. Determinarea polifenolilor prin CSS .....	45
6.2.1. Material și metodă .....	45
6.2.2. Rezultate obținute .....	46
6.2.3. Concluzii parțiale .....	50
6.3. Dozarea flavonoidelor prin metodă spectrofotometrică.....	51
6.3.1. Material și metodă .....	51
6.3.2. Rezultate obținute .....	52
6.3.3. Concluzii parțiale .....	54
6.4. Dozarea polifenolilor totali prin metodă spectrofotometrică .....	54
6.4.1. Material și metodă .....	54
6.4.2. Rezultate obținute .....	55
6.4.3. Concluzii parțiale .....	57

6.5.	Cercetarea polifenolilor și flavonoidelor prin HPLC și HPLC – MS .....	57
6.5.1.	Analiza HPLC .....	58
6.5.1.1.	Condiții cromatografice .....	58
6.5.1.2.	Rezultate obținute .....	58
6.5.1.3.	Concluzii parțiale .....	71
6.5.2.	Analiza HPLC – MS .....	71
6.5.2.1.	Material și metodă .....	71
6.5.2.2.	Analiza prin detecție UV .....	74
6.5.2.3.	Analiza prin detecție MS .....	76
6.5.2.4.	Rezultate obținute .....	87
6.5.3.	Acidul cafeic și acidul clorogenic .....	94
6.5.3.1.	Material și metodă .....	94
6.5.3.2.	Rezultate și discuții .....	95
6.5.4.	Analiza luteolin-7-glucozidei .....	103
6.5.4.1.	Material și metodă .....	103
6.5.4.2.	Rezultate și discuții .....	108
6.5.5.	Concluzii HPLC – MS .....	108
<b>7.</b>	<b>CERCETAREA GLICOZIDELOR CARDIOTONICE</b> .....	<b>109</b>
7.1.	Determinarea prin CSS .....	110
7.1.1.	Material și metodă .....	110
7.1.2.	Rezultate obținute .....	111
7.1.3.	Concluzii parțiale .....	115
7.2.	Cercetarea prin HPLC – MS .....	116
7.2.1.	Material și metodă .....	116
7.2.2.	Rezultate obținute .....	116
7.2.3.	Concluzii parțiale .....	120
<b>8.</b>	<b>CERCETAREA STEROLILOR</b> .....	<b>121</b>
8.1.	Material și metodă .....	121
8.2.	Rezultate și discuții .....	121
8.3.	Concluzii parțiale .....	136
<b>9.</b>	<b>CERCETAREA COMPUȘILOR MINERALI</b> .....	<b>137</b>
9.1.	Material și metodă .....	137
9.2.	Rezultate obținute .....	138
9.3.	Concluzii parțiale .....	139
<b>10.</b>	<b>CERCETĂRI FARMACODINAMICE PRELIMINARE ASUPRA PRODUSULUI</b> <b>SCILAE BIFOLIAE HERBA</b> .....	<b>140</b>
10.1.	Material și metodă .....	141
10.2.	Rezultate obținute .....	141
10.3.	Discuții rezultate .....	147
10.4.	Concluzii parțiale .....	148
<b>11.</b>	<b>CERCETAREA ACȚIUNII ANTIMICROBIENE A EXTRACTULUI DE SCILLA</b> <b>BIFOLIA</b> .....	<b>149</b>
11.1.	Material și metodă .....	149
11.2.	Rezultate și discuții .....	150
11.3.	Concluzii parțiale .....	150
<b>12.</b>	<b>DETERMINAREA POTENȚIALULUI ANTIOXIDANT</b> .....	<b>151</b>
12.1.	Material și metodă .....	152
12.2.	Datele folosite și rezultatele obținute .....	153
12.3.	Concluzii parțiale .....	162
	<b>CONCLUZII FINALE</b> .....	<b>163</b>
	<b>BIBLIOGRAFIE</b> .....	<b>165</b>
	<b>ANEXE</b> .....	<b>174</b>

**Cuvinte cheie:** *Scilla bifolia* L., *Scilla maritima* ( *Urginea maritima* ) L., cercetări anatomice, histochimie, glicozide cardiotonice, Proscilaridina A, saponine, flavonoide, polifenoli, apigenină, luteolină, acid cafeic, CSS, fitosteroli, HPLC/MS, spectrofotometrie, , imunitate, antioxidant.

### Abrevieri:

CSS Cromatografie în strat subțire  
HPLC/MS Cromatografie de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă  
BHT Butil-hidroxi-toluen

## INTRODUCERE

*Scilla bifolia* L. ( *Liliaceae* ), vioreaua, este cunoscută ca plantă spontană sau cultivată în România. Se mai numește și ceapa ciorii, crăcărele, cucuruzei, furculiță, găurele, gheocei albaștri, merișor, mioriță, viorică, zambilă de câmp.

Dintre speciile de *Scilla*, cea mai cunoscută și mai utilizată este *Scilla maritima* L. Baker, conținând numeroase principii active: glicozide cardiotonice, polifenoli, steroli, saponozide, mucilagii, etc.

*Scilla bifolia* L., foarte des întâlnită la noi în țară, este o specie care nu a fost studiată până în prezent și, cu excepția medicinei tradiționale, nu se cunosc date de compoziție chimică și utilizări, dar pe baza principiilor chemotaxonomiei și a înrudirii sale cu celelalte specii de *Scilla*, ne oferă în cercetare perspectiva descoperirii unor principii active cu acțiuni similare, cardiotonice și diuretice.

Având la bază principii active numite glicozide sau heterozide cardiotonice, plantele din această grupă ce cresc la noi, conțin substanțe puternic active care trebuie folosite numai cu aviz medical, sub formă de produse farmaceutice precis dozate. Astfel, în insuficiența cardiacă se utilizează: Degețelul roșu și Degețelul lînos, Lăcrămioara, Rușcuța de primăvară și Spînzul.

În tulburările ritmului cardiac, din flora țării noastre se utilizează Drobul, care conține alcaloizi cu nucleu chinolizidinic între care sparteina. Acest alcaloid este util în special în tahicardia de origine basedoviană, afecțiune în care preparatele digitalice au efecte slabe.

Unul din obiectivele acestei cercetări a fost stabilirea compoziției chimice, iar celălalt a fost de a stabili valoarea farmacologică a plantei, după conținutul în Proscilaridina A și polifenoli ( acid cafeic ), respectiv dacă *Scilla bifolia* L. reprezintă o alternativă românească la specia *Scilla maritima* L.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Genul cuprinde circa 125 de specii ( **1.1** ) răspândite în zona temperată din Eurasia și Africa de Nord. ( 1 )

*Scilla bifolia* L. ( *Liliaceae* ), este o plantă erbacee, care crește în 85 de specii răspândită în Europa, nordul Africii și Asia Mică ( **1.2** ). Relativ frecventă în flora spontană a României, vioreaua se întâlnește preponderent în pădurile de foioase de la noi, sau crește prin poienile și tufărișurile zonelor de șes și de deal. Se mai numește și ceapa ciorii, crăcărele, cucuruzei, furculiță, găurele, gheocei albaștri, merișor, mioriță, viorică, zambilă de câmp. ( 2, 4 )

În unele țări, vioreaua se cultivă în scopul furnizării de materie primă pentru industria farmaceutică. Planta are proprietăți melifere, iar în parcuri și grădini se cultivă ca plantă decorativă. ( 1 )

Florile proaspete, fără codită, se utilizează pentru vopsirea în albastru a fibrelor naturale. În tradiția populară ceaiul din rădăcini se administrează contra tusei, iar ca pectoral se recomandă și

ceaiul din flori. Rădăcina se administrează copiilor s-o roadă pentru a le crește dinții. Frunzele, ca și cele ale altor specii înrudite, se foloseau pentru răni și bube ( 1.3 ).

Dintre speciile genului ( 1.4 ) *Scilla*, cea mai cunoscută și mai utilizată este *Scilla maritima* L. Baker, originară din sudul Spaniei, Insulele Canare și Africa de Sud, și cultivată în bazinul mediteranean ( 2.1 ). Partea utilizată din plantă este bulbul, care conține numeroase principii active: glicozide cardiotonice ( 0,15 – 2,4 % bufadienolide), flavonoide, stigmasterol, antocianozide și mucilagii ( 2.2 ).

*Scillae bulbosae* acționează asupra miocardului; acțiunea sa este intermediară între cele ale digitalinei și ouabainei. Preparatele din *Scilla maritima* sunt indicate în formele ușoare de insuficiență musculară cardiacă, mai ales la bătrâni, dar și în cazul unor insuficiențe ce se manifestă după o boală infecțioasă acută, gripă sau pneumonie. În afara acțiunii cardiotonice, *Scilla maritima* mai prezintă și un efect cardiosedativ. Este sinergică cu digitala și se poate administra în pauzele interdigitalice ( 3.1 ).

Ceapa de mare este diuretică prin acțiune cardio-vasculară, ca și digitalicele, dar și prin acțiune renală diuretică; ea crește debitul sangvin la nivelul rinichiului ( 3.2 ).

Alte acțiuni : asupra fibrelor netede, bronhiilor, acțiune vomitivă, insulin-like, iritantă la nivelul pielii ( 3.3 ). La doze toxice acțiunea iritantă asupra pielii s-ar datora cristalelor de oxalat de calciu ce duc la eroziuni ( 3.4 ).

La *Scilla maritima*, doza toxică nu este cunoscută cu exactitate, totuși 3-5 g de pulbere de *Scilla maritima bulbosae* poate fi mortal; în ceea ce privește scillarena, doza toxică este mult mai mică și de ordinul celei digitalice (50-100 mg) ( 4.1 ). Intoxicarea cronică, teoretic este rară datorită unei semi-vieți scurte, a hidrolizei rapide și a slabei fixări miocardice ( 4.2 ). Diagnosticarea intoxicației acute poate fi apreciată în orele următoare admisieii datorită mai multor factori: sex, vârstă, doză absorbită, existența unui BAV, hipo- sau hiper-kaliemie, antecedente cardiace. Cel mai adesea moartea survine prin fibrilație ventriculară sau prin asistolie prelungită sau prin insuficiență circulatorie cardiogenică ( 22-23 ) ( 4.3 ). Tulburările conducerii și ale excitabilității miocardice care conferă întreaga gravitate a intoxicației sunt:

- tulburări de excitabilitate: periculoase când se situează la etajul ventricular; se remarcă extrasistole ventriculare pereche, polimorfe sau bidirecționale și uneori aritmii ventriculare.

- tulburări de conducție: bloc de ramură, bloc auriculo-ventricular ( 22-23 ) ( 4.4 ).

Tratamentul este complex în funcție de gravitatea intoxicației ( 4.5 ) și pentru înțelegerea acestora s-au făcut câteva ilustrări prin cazuri clinice ( 4.6 ). În regiunile unde planta crește în stare endemică se informează populația despre pericolul folosirii și manipulării sale ( 4.7 ).

*Scilla bifolia* L. este o specie care nu a fost studiată până în prezent și, cu excepția medicinei tradiționale, nu se cunosc date de compoziție chimică și utilizări, dar pe baza principiilor chemotaxonomiei și a înrudirii sale cu celelalte specii de *Scilla*, ne oferă în cercetare perspectiva descoperirii unor principii active cu acțiuni similare, cardiotonice și diuretice.

## CONTRIBUȚII PERSONALE

Partea principală a lucrării prezintă contribuțiile proprii la studiul farmaco-botanic al speciei *Scilla bifolia* L.

În capitolul 5. se prezintă studiul anatomic al speciei, punând în evidență, pentru prima dată, următoarele aspecte: tulpina prezintă structură primară și contur circular-costat, limbul foliar este de tip amfistomatic, prezentând structură omogenă, iar foliola bulbului prezintă structură primară.

Capitolul 6. cuprinde cercetarea compoziției chimice a organelor vegetale de la *Scilla bifolia* L. Prin screening inițial de compuși activi, reacțiile au evidențiat posibila prezență în herba și bulbi, a polifenolilor, saponinelor sau glicozidelor cardiotonice, flavonoidelor și posibile cantități mici de aminoacizi liberi.

Determinarea polifenolilor prin CSS în subcapitolul **6.1** a pus în evidență, pe baza valorilor  $R_f$  și a aspectului benzilor în UV 254 nm și fluorescență a etaloanelor și compușilor separați din extractele studiate, prezența în bulbi de *acid clorogenic* și în urme *acidul cafeic*, iar în herba prezența *luteolin-7-glucozidei* și în urme, mai mult în extractele etanolice, *luteolina*. Din cromatograme se observă, pe baza numărului și a intensității benzilor, prezența în cantitate mai mare a polifenolilor în herba față de bulbi.

*Flavonoidele* sunt prezente doar în *herba*, în extractele din bulbi nu apar separate benzi portocalii specifice flavonoidelor.

Se mai observă și o concentrație sensibil mai mare de polifenoli în planta recoltată în 2009 față de cea recoltată în 2008, ceea ce ne demonstrează că în *produsul vegetal uscat se pot petrece procese de degradare a polifenolilor*.

Se observă că etanolul 70 % vol. extrage mai bine polifenolii decât metanolul.

În urma determinării spectrofotometrice a flavonoidelor totale în subcapitolul **6.3.**, rezultatele arată o *concentrație semnificativă de flavonoide totale exprimate în rutozidă în herba plantei studiate* ( 2008 - 6,45 % ; 2009 - 7,97 % ), în bulbi concentrația fiind de cca 8 ori mai mică. Se observă și o sensibilă diferență de concentrație între plantele recoltate în 2008 care conțin o concentrație mai mică față de cele din 2009. Acest fapt susține și rezultatele de la analiza cromatografică pe strat subțire. De asemenea, etanolul extrage o cantitate mai mare de flavonoide.

Subcapitolul **6.4.** este dedicat dozării polifenolilor totali prin metodă spectrofotometrică, aceștia formând, în prezență de acid fosfowolframic, un complex de culoare albastră. Rezultatele arată o concentrație semnificativă de polifenoli totali exprimați în *acid cafeic* atât în herba cât și în bulbii plantei studiate, în bulbi concentrația fiind mai mică. Pentru a identifica *polifenolii individuali* și a-i *doza individual* cu precizie, în subcapitolul **6.5.** s-au realizat analize HPLC care, în primă fază, au folosit un sistem având doar detector UV-Vis cu arie de diode ( **6.5.1.** ), trecând apoi pe cuplajul HPLC-MS (spectrometrie de masă) ( **6.5.2.** ), prin care se pot obține mult mai multe informații referitoare la compușii separați (identificare pe baza spectrelor MS) ( 38, 41, 48-50 ). Analizele HPLC-MS s-au realizat pe extractele etanolice la care am obținut concentrații de *flavonoide și polifenoli* mai mari. Aceste analize s-au realizat atât pe extractele ca atare cât și pe extractele hidrolizate cu acid clorhidric la cald., deoarece, în general, unii agliconi flavonici sau unii acizi polifenol-carboxilici nu se află în stare liberă, ci legată (*glicozide, esteri, etc.*). Au fost utilizate 18 standarde de compuși polifenolici. Acestea au fost: *acid caftaric, acid gentisic, acid cafeic, acid clorogenic, acid paracumaric, acid ferulic, acid sinapic, hiperozida, isoquercitrina, rutozidă, miricetol, fisetină, quercitrină, quercetol, patuletină, luteolină, kaempferol și apigenină*. Pentru determinare cantitativă, a fost realizată curba de calibrare pentru fiecare compus în intervalul de concentrații 0.5-5  $\mu\text{g/ml}$ . Deoarece în condițiile cromatografice utilizate există două perechi de substanțe incomplet separate (acid caftaric – acid gentisic, respectiv acid cafeic – acid clorogenic), pentru acești compuși s-a realizat doar determinare calitativă bazată pe informațiile MS ( 38, 41, 48-50 ).

Dozarea acidului clorogenic și acidului cafeic ( **6.5.3.** ) s-a făcut prin metodă modificată, prin cuplajul HPLC-MS. Pentru creșterea selectivității metodei de analiză LC/MS, s-a realizat fragmentarea ionului caracteristic acidului cafeic ( $m/z$  179) și s-a înregistrat spectrul MS, fragmentarea ionului caracteristic acidului clorogenic ( $m/z$  353) și înregistrarea spectrului MS și, de asemenea, fragmentarea ionului caracteristic luteolin-7-glucozidei ( $m/z$  447) și înregistrarea spectrului MS ( **6.5.4.** ). Concluziile parțiale HPLC-MS ( **6.5.5.** ) au evidențiat în *Scilla bifolia* o serie de *polifenoli* – acizi: cafeic, clorogenic, p-cumaric, ferulic în herba, după hidroliză putând să apară și acidul sinapic. Concentrațiile acestora sunt de obicei sub 1  $\mu\text{g/ml}$ . În *herba* mai apare *hiperozida, cvercitrina, luteolina, kampferolul și apigenina* precum și *luteolin-7-glucozida*, după hidroliză observându-se creșterea concentrației de luteolină și apigenină precum și apariția *cvercetolului* datorită hidrolizei flavonozidelor și evidențierea agliconilor acestora. Concentrație

mare de ordinul zecilor de micrograme per mililitru prezintă *luteolina* și *apigenina*. În bulbi s-au evidențiat mai ales *acizii cafeic, p-cumaric și ferulic* precum și cantități mici de *luteolină și apigenină*.

Determinarea scillarozidelor, posibile glicozide cardiotonice, s-a realizat prin CSS și HPLC-MS și este prezentată în capitolul 7. al tezei. Determinarea prin CSS ( 7.1. ) a folosit ca etalon Proscilaridina A, iar rezultatele arată că nu se pot pune în evidență, cu siguranță, *scillarozidele*, deși, în urme, poate exista mai mult în herba decât în bulbi. Pentru un rezultat mai concludent s-a realizat analiza HPLC-MS ( 7.2. ). *Nu s-a evidențiat prezența proscilaridinei A în nicio probă analizată, nici înainte, nici după hidroliză, rezultatul nu exclude însă eventuala prezență a altor cardiotonice.*

Tot prin analiză HPLC-MS au fost cercetați și sterolii prezenți în extractele vegetale de *Scilla bifolia* ( 8. ), pentru determinarea cantitativă fiind utilizate patru standarde: *beta-sitosterol, stigmasterol, campesterol și ergosterol*. S-a observat prezența celor patru steroli atât în herba, cât și în bulbi, în concentrație mai mare fiind stigmasterolul.

În capitolul 9. se prezintă cercetarea compușilor minerali în extractele de *Scilla bifolia* și se observă concentrații semnificative de zinc, respectiv fier în herba și mai scăzute în bulbi. Concentrațiile de cupru sunt foarte mici, dar acesta este și un element semitoxic.

Capitolul 10. prezintă, în premieră, un studiu farmacodinamic preliminar asupra produsului *Scillae bifoliae herba*, folosind un lot de șobolani masculi din rasa Wistar. Înregistrările ECG și modificările parametrilor electrocardiografici demonstrează că materialul vegetal utilizat determină în general bradicardie (efect cronotrop negativ), mărirea intervalelor PQ, QT și TP (efect dromotrop negativ). *Prezența tulburărilor de ritm de tip extrasistole ventriculare demonstrează un efect cardiotoxic prin creșterea excitabilității miocardului în focare ectopice (efect batmotrop pozitiv).* Aceste date preliminare demonstrează un *efect similar acțiunii digitalicelor* asupra activității cardiace.

Cercetarea acțiunii antimicrobiene, în capitolul 11., a produsului *Scilla bifolia – herba și bulbus*, a evidențiat că *nu prezintă acțiune antibacteriană* asupra formelor vegetative de: *Staphylococcus aureus, E.coli, Pseudomonas aeruginosa* și nici acțiune antilevuriformă asupra *Candidei albicans*.

S-a determinat, în capitolul 12., potențialul antioxidant al extractelor metanolice și etanolice de *Scillae bifoliae herba* și *bulbus*, recoltate în 2008 și 2009, determinându-se procentul de inhibiție a radicalilor liberi, **I** %. Din rezultate SE observă o *activitate antioxidantă semnificativă în extractele etanolice*, care au o concentrație mai mare de *polifenoli* conform datelor din analizele spectrale și cromatografice prezentate anterior. *Scillae bifoliae herba* are o activitate antioxidantă aproximativ egală cu a bulbilor, neexistând diferențe semnificative. Față de etalonul BHT activitatea antioxidantă este de cca 1000 de ori mai slabă, fiind diferența de ordin de mărime de la microgram la miligram în ceea ce privește extractele.

## CONCLUZII FINALE

*Scilla bifolia* L. este o specie care nu a fost studiată farmacognostic până în prezent și nu se cunosc date de compoziție chimică și utilizări, dar pe baza principiilor chemotaxonomiei și a înrudirii sale cu celelalte specii de *Scilla*, oferă în cercetare perspectiva descoperirii unor principii active cu acțiuni similare cardiotonice și diuretice. Cea mai studiată dintre specii este *Scilla maritima*( *Urginea maritima* ) L. Baker, fam. Liliaceae, denumită popular ceapă de mare. Principalele acțiuni la *Scilla maritima* L. Baker sunt cea cardi tonică și cea diuretică. Nu se cunosc date certe despre efectele cardiace ale pulberii de *Scillae bifoliae herba*. Datele preliminare în experiment preclinic demonstrează un efect similar acțiunii digitalicelor asupra activității cardiace.

Cercetările efectuate arată că *Scilla bifolia* este bogată în *polifenoli* și, ca urmare, atât herba cât și bulbus prezintă o *activitate antioxidantă semnificativă*.

Nu s-au putut evidenția cantități cuantificabile de *glicozide cardiotonice*, în special *scillarozide*, nici în *Scillae bifoliae* herba și nici în bulbus, rezultatul *nu exclude* însă eventuala prezență a *altor cardiotonice*.

S-au putut pune în evidență în schimb o serie de *fitosteroli*, dintre care *stigmasterolul* este în cantitate mai mare.

*Scillae bifoliae* herba, dar și bulbus, conțin *cantități semnificative de zinc și fier*, minerale cu valoare terapeutică mare.

Determinările au arătat că extractele în etanol 70 % vol. conțin o cantitate mai mare de compuși activi, ca urmare *tinctura* poate fi propusă ca o *posibilă formă farmaceutică* din această plantă.

### Referințe bibliografice reprezentative:

FLORA R.S.R., Vol. XI, Ed. Academiei R.S.R., București, 309-313, 1966.

FLORA EUROPAEA, Vol. 5, Cambridge University Press, by V.H. HEYWOOD, 41- 43, 2010.

R.D. MEIKLE, Lily Year Book 25, 122-130, 1961.

E.V. MORDAK, Bot. Zur. 56, 1444-1456, 1971.

KRENN L., FERTH R., ROBIEN W., KOPP B., Bufadienolide aus *Urginea maritima* sensu strictu, Planta Med. 57, 560-565, 1991.

BOSSI M., BRAMBILLA G., CAVALLI A. ET AL.: Threatening arrhythmia by uncommon Digitalic toxicosis, G Ital Cardiol., 11(12): 2254–2257, 1981.

FODOREA CRISTINA-ȘTEFANIA, L.VLASE, S.E.LEUCUȚA, M.TAMAȘ, Phytochemical Study on Some Polyphenols of *Geranium pyrenaicum*, Chemistry of Natural Compounds, 41(4), 400-403, 2005.

BLUMENTHAL M.: Industry alert: plantain adulterated with digitalis. *HerbalGram.*; 40: 28- 29, 1997.

VLASE L., RADU L., FODOREA C.Ș., LEUCUȚA S.E., GOCAN S., Determination of Phenolic Compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 28(19), 3109-3117, 2005.

TOMA C., RUGINĂ RODICA: Anatomia plantelor medicinale. Atlas, Ed. Academiei R.S.R., București, 1998, 320.

MARIA-LUIZA CORNACIU ( **BĂLĂȘOIU** ), Florica Popescu, Anca Berbecaru-Iovan și H. Popescu: „Cercetarea preclinică a acțiunii cardiotonice a bulbului de *Scilla bifolia* L.”, Craiova Medicală, 2006, Vol.8, nr.1, 229 – 232.

LUIZA **BĂLĂȘOIU**, Cornelia Bejenaru, L.E.Bejenaru, G.D.Mogoșanu, H.Popescu: „ Histo-anatomical data concerning the vegetative organs of *Scilla bifolia* L. (Liliaceae)”, „Curent health sciences journal ”, 2010, Vol.36, nr.2, 98 -100..





## Curriculum vitae Europass

### Informații personale

Nume / Prenume **Balăsoiu Maria-Luiza**  
Adresă(e) Str.Craiovei, Nr.3, Românești, Șimnicu de Sus, Dolj  
Telefon(oane) 0251 463322 Mobil: 0723 357545  
Fax(uri)  
E-mail(uri) marialuiza\_balasoiu@yahoo.com

Naționalitate(-tăți) Română

Data nașterii 24.12.1976

Sex Feminin

### Locul de muncă vizat / Domeniul ocupațional

**Manager în domeniul farmaceutic.**

### Experiența profesională

2009- prezent – farmacist la S.C.VEKALMAR PHARMACIE'S S.R.L.

Perioada Noiembrie 2006 - prezent

Funcția sau postul ocupat Farmacist șef

Activități și responsabilități principale

Organizeaza, conduce și controlează activitatea farmaciei ,conform legislației în vigoare;  
Reprezintă farmacia și asigură relația cu departamentele din sediul central, angajații societății, managerul zonal, dar și cu partenerii externi: colaboratori, furnizori, autoritati,organe de control;

Numele și adresa angajatorului SC Hermes Pharma S.R.L. / S.A.

Tipul activității sau sectorul de activitate Farmacie

Perioada Aprilie 2004 –Noiembrie 2006

Funcția sau postul ocupat Farmacist șef

Activități și responsabilități principale

Numele și adresa angajatorului S.C. Farmexim 2 S.R.L.

### Educație și formare

Perioada Martie 2008

Calificarea / diploma obținută

Diplomă de participare - curs postuniversitar "Farmacoterapia în BRGE și UP" București

Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare

UMF Craiova

Nivelul în clasificarea națională sau internațională	Curs postuniversitar
Perioada	27.10.2007
Calificarea / diploma obținută	Diplomă de participare- Atelierul interactiv –Craiova: "Siguranța cardiovasculară în tratamentul disfuncției erectile"
Perioada	August 2007
Calificarea / diploma obținută	Diplomă de merit, Concurs Top of City România
Perioada	19.05.2007
Calificarea / diploma obținută	Atestat de formare profesională continuă: "Optimizarea activității în farmacii"
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Colegiul Farmaciștilor Dolj
Perioada	03.02.2007, Sinaia
Calificarea / diploma obținută	Diplomă de participare, Management for success (level 1)
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	De Klausen management & sales consulting
Perioada	27.07.2006, Craiova
Calificarea / diploma obținută	Certificat de participare "Perspective și confirmări farmacologice ale beneficiilor terapeutice obținute prin extracte vegetale"
Perioada	06.2005, București
Calificarea / diploma obținută	Atestat de formare profesională continuă: "Actualități în legislația farmaceutică"
Perioada	1997 – 2002
Calificarea / diploma obținută	Licențiat
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Universitatea de Medicină și Farmacie - Facultatea de Farmacie Craiova
Nivelul în clasificarea națională sau internațională	Învățământ universitar
Perioada	4.06.2004 - 5.06.2004, Craiova
Calificarea / diploma obținută	Diplomă de participare - Sesiunea de comunicări științifice a studenților farmaciști.
Perioada	1991-1995
Calificarea / diploma obținută	Diplomă de bacalaureat
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Specializarea biologie-chimie
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Gr.Sc.Sanitar- Lic.Teoretic-Real , Craiova

Nivelul în clasificarea națională sau internațională

Învățământ preuniversitar

**Aptitudini și competențe personale**

Aptitudini de inter-relaționare, bună capacitate de de comunicare verbală și scrisă; Competențe de abordare a pacientului, competențe de organizare a activității.

Limba(i) maternă(e)

Română

Limba(i) străină(e) cunoscută(e)

Autoevaluare

Nivel european (\*)

**Limba engleză**

**Limba franceză**

Înțelegere				Vorbire				Scriere	
Ascultare		Citire		Participare la conversație		Discurs oral		Exprimare scrisă	
B2	Utilizator independent	B2	Utilizator independent	B1	Utilizator independent	B1	Utilizator independent	B1	Utilizator independent
A1	Utilizator elementar	A1	Utilizator elementar	A1	Utilizator elementar	A1	Utilizator elementar	A1	Utilizator elementar

(\*) Nivelul Cadrelui European Comun de Referință Pentru Limbi Străine

Competențe și abilități sociale

Abilități de comunicare interpersonală; Empatie și spirit de echipă; Decizii prompte  
Loialitate; Perseverență

Competențe și aptitudini organizatorice

Abilități și cunoștințe de management al proiectelor, dobândite în urma implicării mele ca voluntar în diverse proiecte naționale de tineret, organizate prin AIE Quiz ([www.aie-quiz.ro](http://www.aie-quiz.ro)).

Competențe și aptitudini de utilizare a calculatorului

Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint, Internet Explorer.

Permis(e) de conducere

Cat.B, 10.2002.

**Informații suplimentare**

**Activitatea științifică:** Lucrări publicate *in extenso* :

Maria-Luiza Comaciu ( Bălășoiu ), Florica Popescu, Anca Berbecaru-Iovan și H. Popescu: „Cercetarea preclinică a acțiunii cardiotonice a bulbului de *Scilla bifolia* L.”, Craiova Medicală, 2006, Vol.8, nr.1, 229 – 232.

Luiza Bălășoiu, Cornelia Bejenaru, L.E.Bejenaru, G.D.Mogoșanu, H.Popescu: „Histo-anatomical data concerning the vegetative organs of *Scilla bifolia* L. (Liliaceae)”, „Curent health sciences journal”, 2010, Vol.36, nr.2, 98 -100..

**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY  
“IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA  
FACULTY OF PHARMACY**

**PHARMACOGNOSTIC RESEARCHES  
CONCERNING THE SPECIES  
*SCILLA BIFOLIA* L. (Liliaceae)**

**ABSTRACT of the DOCTORAL THESIS**

**Scientific supervisor:**

**Prof. Dr. Honorius POPESCU**

**PhD student:**

**Pharm. Maria-Luiza BĂLĂȘOIU**

**2011**

# CONTENT

<b>INTRODUCTION</b> .....	7
<b>ARGUMENT</b> .....	10
<b>FIRST PART-CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE</b> .....	12
<b>1. BOTANICAL DATA ABOUT <i>Scilla bifolia</i> L.</b> .....	13
1.1 Botanical description of <i>Scilla</i> genus.....	13
1.2 Botanical description of species <i>Scilla bifolia</i> .....	13
1.3 Proliferation .....	14
1.4 Systematical framing .....	15
<b>2. PHYTOCHEMICAL DATA CONCERNING THE <i>SCILLA</i> SPECIES</b> .....	16
2.1 Maritime species of <i>Scilla</i> : Description, structure, stability.....	16
2.2 Other chemical components of the plant .....	20
<b>3. PHARMACOLOGICAL DATA CONCERNING THE <i>SCILLA</i> SPECIES.</b> .....	21
3.1 Cordial action.....	21
3.2 Diuretic action.....	21
3.3 Other actions .....	22
3.4 Actions at toxic doses .....	23
<b>4. TOXICOLOGIC DATA CONCERNING THE <i>SCILLA</i> SPECIES</b> .....	24
4.1 Acute intoxication.....	24
4.2 Chronic intoxication.....	25
4.3 Evolution, diagnose, cause-death.....	25
4.4 Analytical description of clinical signs.....	25
4.5 Treatment .....	27
4.6 Illustration by means of clinical cases .....	27
4.7 Precautionary specific measures .....	28
<b>SECOND PART-PERSONAL RESEARCHES</b> .....	30
<b>5. HISTO-ANATOMICAL RESEARCHES CONCERNING THE SPECIES <i>SCILLA BIFOLIA</i> L.</b> .....	31
5.1 Material and method .....	32
5.2 Results and discussions.....	32
5.2.1 Strain's structure .....	32
5.2.2 Leaf's structure .....	35
5.2.3 The bulb's folium structure.....	37
5.3 Partial conclusions .....	39
<b>6. RESEARCH ON THE CHEMICAL COMPOSTION</b> .....	40
6.1 Identification of the possible active compounds.....	42
6.1.1 Material and method .....	42
6.1.2 Initial screening of the possible active compounds .....	43
6.1.3 Results.....	44
6.1.4 Partial conclusions .....	44
6.2 Polyphenols' determination through TLC .....	45
6.2.1 Material and method .....	45
6.2.2 Results.....	46
6.2.3 Partial conclusions .....	50
6.3 Flavonoids' dosage by means of spectrophotometric method.....	51
6.3.1 Material and method .....	51
6.3.2 Results.....	52
6.3.3 Partial conclusions .....	54

6.4 Total polyphenols' dosage by means of spectrophotometric method.....	54
6.4.1 Material and method .....	54
6.4.2 Results.....	55
6.4.3 Partial conclusions .....	57
6.5 Research on polyphenols and flavonoids by means of HPTLC and HPTLC-MS.....	57
6.5.1 HPTLC analysis .....	58
6.5.1.1 Chromatographic conditions.....	58
6.5.1.2 Results.....	58
6.5.1.3 Partial conclusions .....	71
6.5.2 HPTLC-MS analysis.....	71
6.5.2.1 Material and method .....	71
6.5.2.2 Analysis by UV detection .....	74
6.5.2.3 Analysis by MS detection .....	76
6.5.2.4 Results.....	87
6.5.3 Caffeic and chlorogenic acid .....	94
6.5.3.1 Material and method .....	94
6.5.3.2 Results and discussions.....	95
6.5.4 Analysis of luteolin-7-glucoside.....	103
6.5.4.1 Material and method .....	103
6.5.4.2 Results and methods .....	108
6.5.5 HPLC-MS conclusions .....	108
<b>7. RESEARCH ON CARDIAC GLYCOSIDES .....</b>	<b>109</b>
7.1 TLC determination.....	110
7.1.1 Material and method .....	110
7.1.2 Results.....	111
7.1.3 Partial conclusions .....	115
7.2 HPTLC-MS research .....	116
7.2.1 Material and method .....	116
7.2.2 Results.....	116
7.2.3 Partial conclusions .....	120
<b>8. STEROLS' RESEARCH.....</b>	<b>121</b>
8.1 Material and method .....	121
8.2 Results and discussions.....	121
8.3 Partial conclusions .....	136
<b>9. RESEARCH ON MINERAL COMPUNDS.....</b>	<b>137</b>
9.1 Material and method .....	137
9.2 Results.....	138
9.3 Partial conclusions .....	139
<b>10. PRELIMINARY PHARMACODYNAMIC RESEARCHES CONCERNING THE PRODUCT <i>SCILLA BIFOLIAE HERBA</i> .....</b>	<b>140</b>
10.1 Material and method .....	141
10.2 Results.....	141
10.3 Discussions .....	147
10.4 Partial conclusion.....	148
<b>11. RESEARCH ON THE ANTIMICROBICAL ACTION OF THE EXTRACT OF <i>SCILLA BIFOLIA</i>.....</b>	<b>149</b>
11.1 Material and method .....	149
11.2 Results and discussions.....	150
11.3 Partial conclusions .....	150
<b>12. DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANT POTENTIAL.....</b>	<b>151</b>
12.1 Material and method .....	152

12.2 Used data and results .....	153
12.3 Partial conclusions .....	162
<b>FINAL CONCLUSIONS</b> .....	163
<b>BIBLIOGRAPHY</b> .....	165
<b>ANNEXES</b> .....	174

**Key words:** *Scilla bifolia* L., *Scilla maritima* (*Urginea maritima*) L., anatomical researches, histochemistry, cardiac glycosides, proscillaridin A, saponins, flavonoids, polyphenols, apigenin, luteolin, caffeic acid, TLC, phytosterols, HPTLC/MS, spectrophotometry, immunity, antioxidant.

**Abbreviations:**

CSS	TLC (thin layer chromatography)
HPLC/MS	HPTLC/MS (high performance thin layer chromatography)
BHT	BHT (butylhydroxytoluene)

## INTRODUCTION

*Scilla bifolia* L. (*Liliaceae*), viola, is known as a spontaneous or cultivated plant in Romania. It is also known as chives, two-leaf-squill, alpine squill, rosea, *Cheirantus cheiri*.

Among the *Scilla* species, the most known and used is *Scilla maritima* L. Baker, with numerous active principles: cardiac glycosides, polyphenols, sterols, saponosides, mucilages etc.

*Scilla bifolia* L., widely known in our country, is a species which has not been studied until now and, with the exception of traditional medicine, there are no data about its chemical composition and usage; however, based on chemotaxonomy's principles and its affinity with some other species of *Scilla*, it offers us by means of research the perspective of discovering some active principles with similar cardiac and diuretic actions.

Based on active principles called glycosides or cardiac heterosides, the plants that belong to this group and are growing in our country contain strong active substances which have to be used only with doctor's approval, under the form of pharmaceutical products strictly dosed. The refore, it is recommended to take in case of a heart block: Common Foxglove (*Digitalis purpurea*) or *Digitalis lanata*, lily-of-the-valley (*Convallaria majalis*), *Adonis vernalis* and *Heleborus species*.

In heart rhythm disorders, among our country's flora, it is used *Sarothamus scoparius* which contains alkaloids with quinolizidine nucleus such as sparteine. This kind of alkaloid is especially useful for the tachycardia originating from the Basedowian syndrome, disease for which the digitalis preparations have weak effects.

One of this research's objectives was the establishment of the chemical composition, and the other one was to determine the plant's pharmacological value, based on its content of proscillaridin A and polyphenols (caffeic acid), respectively whether *Scilla bifolia* L. represents a Romanian alternative to the species of *Scilla maritima* L.

## THE CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE

The genus comprises approximately 125 species (1.1) dispersed within the temperate area of Eurasia and Northern Africa. (1)

*Scilla bifolia* L. (*Liliaceae*) is an herbaceous plant which grows in 85 species dispersed in Europe, North Africa and Asia Minor (1.2). Relatively frequent in Romania's spontaneous flora, the violet is mostly found in our deciduous forests or grows on the glades and shrubs of our lowland and hill areas. It is also known as chives, two-leaf-squill, alpine squill, rosea, *Cheirantus cheiri*. (2,4)

In some countries, viola is cultivated as provider of raw materials for the pharmaceutical industry. The plant has melliferous properties and is cultivated in parks and gardens as decorative plant. (1)

Fresh flowers, without shanks, are used for blue painting of natural fibers. In folk traditions, the tea made out of roots was administered against cough, and the tea made out of flowers is also recommended as expectorant. The root was given to the children to have it chewed for their teeth to grow. Its leaves, like the ones of other cognate species, were used for wounds and blains (1.3).

Among the species of *Scilla* genus (1.4), the most known and used one is *Scilla maritima* L. Baker, native of South Spain, Canary Islands and South Africa, and cultivated in the Mediterranean basin (2.1). The part of the plant which is normally used is its bulb, which contains numerous active principles: cardiac glycosides (0,15-2,4% bufadienolides), flavonoids, stigmasterol, anticyanosides and mucilages (2.2).

*Scilla bifolia* reacts upon the myocardium; its action works as an intermediate between the digitalin and ouabain. The preparates made out of *Scilla maritima* L. are indicated for the slight symptoms of heart blocking, especially to old people, but also for some cases of failure which appear after an infectious acute disease, flu or pneumonia. Besides its cardiac action, *Scilla maritima* also presents a cardiosedative effect. It is synergic with the digital one and can be administered during the *Digitalis* sp. (3.1).

Chives are diuretic through their cardiovascular action, like the *Digitalis*, but also through their renal diuretic action; they increase the kidney's blood flow (3.2).

Other actions: upon the smooth fibers, bronchia, vomitive action, insulin-like, irritant to the skin (3.3). At toxic doses the irritant action could be the result of erosions caused by calcium oxalate crystals (3.4).

Regarding the species *Scilla maritima*, the toxic dose is not entirely known; however, 3-5 g of *Scilla maritima bulbosus* powder can be lethal; regarding scillaren, its toxic dose is much smaller (50-100 mg) (4.1). Chronic intoxication is theoretically speaking quite rare due to a short semi-life, rapid hydrolysis and weak myocardial fixation (4.2). The actual diagnose of acute intoxication can be appreciated in the hours following admission due to many factors: gender, age, absorbed dose, AV block, hypo- or hyperkalaemia, cardiac antecedents. The most common death happens through ventricular fibrillation, prolonged asystoly or cardiogenic circulatory failure (22-23) (4.3). Conduction disorders and myocardial excitability, which represent the entire severity of intoxication, are:

- excitability disorders: dangerous when being situated at the ventricular level; are noticed paired, polymorphic or bidirectional ventricular extrasystoles or even ventricular irregularities.
- conduction disorders: bundle branch block, auriculoventricular block (22-23) (4.4).

The treatment is complex according to the intoxication's severity (4.5) and there have been illustrated some clinical cases for its better understanding (4.6). In those areas where the plant grows in endemic condition, the population is still being informed about its usage and handling (4.7).

*Scilla bifolia* L. is a species which has not been studied until now and, with the exception of traditional medicine, there are no data about its chemical composition and usage; however, based on chemotaxonomy's principles and its affinity with some other species of *Scilla*, it offers us by means of research the perspective of discovering some active principles with similar cardiac and diuretic actions.

## PERSONAL CONTRIBUTIONS

The main part of the paper presents the species' *Scilla bifolia* L. own contributions to its pharmacobotanical study.



Chapter 5 presents the anatomical study of the species highlighting, for the first time, the following aspects: the stem has primary structure and circular-ribbed contour, the leaf's limb is amphistomatic, having an equifacial structure, and the bulb's foliole has primary structure.

Chapter 6 comprises the research of chemical composition of the vegetal organs of *Scilla bifolia* L. By means of initial screening of active compounds (6.1), the reactions have emphasized the possible presence in the actual herba and bulbs of polyphenols, saponins or cardiac glycosides, flavonoids and possible small quantities of free amino acids.

Polyphenols' determination by means of TLC in subchapter 6.2 has emphasized, based on the R<sub>f</sub> values and the aspect of the strips under UV 254 nm and fluorescence of etalons and separate compounds within the studied extracts, the presence in bulbs of *chlorogenic acid* and traces of *caffeic acid*, and the presence in the actual herba of luteolin-7-glucoside and traces of luteolin, more in the ethanolic extracts. From chromatograms we observe, based on the number and strips' intensity, the presence in higher quantity of polyphenols in the actual herba than in bulbs.

*Flavonoids* are presented only in the *herba*, in the bulb extracts there are no separate orange strips flavonoids-specific.

It is also observed that there is a visible higher concentration of polyphenols in the plant harvested in 2009 than in the plant harvested in 2008, fact which demonstrates that *within the withered vegetal products there can take place processes of degradation of polyphenols*.

It was also noticed that ethanol 70% vol. does a better job in extracting polyphenols than methanol.

After the spectrophotometric determination of total flavonoids in subchapter 6.3, the results show a significant concentration of total flavonoids rendered in rutin in the studied plant's *herba* (2008-6,45%; 2009-7,97%), while the concentration in bulbs is 8 times smaller. It was also noticed a visible difference of concentration between the plants harvested in 2008, which contain a smaller concentration than those of 2009. This fact also supports the results of the TLC analysis. Likewise, ethanol does a better job when extracting flavonoids.

Subchapter 6.4 is dedicated to the dosage of total polyphenols by means of spectrophotometric method; in the presence of phosphowolframic acid they form a blue-colored complex. The results show a significant concentration of total polyphenols rendered in caffeic acid both in the herba and bulbs of the studied plant (the bulb's concentration is smaller). In order to identify individual polyphenols and dose them individually with precision, subchapter 6.5 presents the HPTLC analyses which, in the first phase, have used a system with a UV-Vis detector with diode area only (6.5.1); they eventually went to the HPTLC-MS coupling (6.5.2), which can give a lot more information about the separate compounds (identification based on MS spectra) (38, 41, 48-50). HPTLC-MS analyses have been made on ethanolic extracts where we obtained higher concentrations of flavonoids and polyphenols. These analyses have been made both on actual extracts, as well as on hydrolyzed extracts with chlorhidric acid, because, in general, some flavonoids aglicons or some polyphenolic carboxylic acids are not found in free condition, but bound (glycosides, esters etc.). There have been used 18 standards of polyphenolic compounds, such as: *caftaric acid*, *gentisic acid*, *caffeic acid*, *chlorogenic acid*, *paracumaric acid*, *ferulic acid*, *sinapic acid*, *hyperozide*, *isoquercitrin*, *rutin*, *miricetol*, *fisetin*, *quercitrin*, *quercetol*, *patuletin*, *luteolin*, *kaempferol* and *apigenin*. For the quantitative determination there has been done the calibration curb for each compound within the concentration interval of 0.5-5 µg/ml. Due to the fact that in the used chromatographic conditions there are two pairs of incompletely separate substances (caftaric acid - gentisic acid, respectively caffeic acid - chlorogenic acid), for these compounds the determination has been done only for the quality, based on MS information (38, 41, 48-50).

The chlorogenic and caffeic acid's dosage (6.5.3) has been made by means of an altered method, through HPTLC-MS coupling. For the selectivity's increase of the method of analysis LC/MS, we have done the fragmentation of the caffeic acid-related ion (m/z 179), registering in

the same time the MS spectrum, the fragmentation of the chlorogenic acid-related ion (m/z 353), along with registration of the MS spectrum and, likewise, the fragmentation of the luteolin-7-glucoside-related ion (m/z 447) and the MS spectrum's registration (6.5.4). The partial conclusions of HPTLC-MS (6.5.5) have emphasized the existence in *Scilla bifolia*'s herba of a series of polyphenols - caffeic, chlorogenic, paracumaric, ferulic acids; after the hydrolysis we also obtained the sinapic acid. Their concentration is usually under 1 µg/ml. In the *herba* we also have hyperozide, quercitrin, luteolin, kaempferol and apigenin, as well as luteolin-7-glucoside. After hydrolysis, the concentration of luteolin and apigenin increases, while the quercetol acid finally appears due to the flavonoids' hydrolysis and their aglicons' emphasis. A high concentration of tens of micrograms/mm is found in luteolin and apigenin. The *bulb* has especially concentrations of *caffeic, paracumaric and ferulic acids*, as well as small quantities of *luteolin and apigenin*.

The scillarosides' determination, possible cardiac glycosides, has been done by means of TLC and HPTLC-MS and is presented in chapter 7 of the thesis. TLC determination (7.1) has used as etalon proscillaridin A, and the results show that they be emphasized, although their trace is more to be found in herba than in bulbs.

For a more concluding result we have used the HPTLC-MS analysis (7.2). None of the analyzed samples have emphasized the presence of proscillaridin A (neither before nor after); however, the results do not exclude the presence of other cardiac substances.

By means of HPTLC analysis have also been researched the sterols existing in vegetal extracts of *Scilla bifolia* (8), four standards being used for the quantitative determination: *β-sitosterol, stigmasterol, campesterol and ergosterol*. The four sterols have been noticed both in herba and the bulbs, stigmasterol having a higher concentration.

Chapter 9 presents the research of mineral compounds within the extracts of *Scilla bifolia*, where we also notice significant concentrations of Zn, respectively Fe in herba and much more reduced in bulbs. Copper concentrations are very small, but this is also a semi-toxic element.

Chapter 10 presents, as a first, a preliminary pharmacodynamic research on the product *Scillae bifoliae herba*, by means of some male rats from Wistar race. ECG registrations and the alterations of its parameters show that the used vegetal material determines in general bradycardia (negative cronotropic effect), the increase of PQ, QT and TP intervals (negative dromotropic effect). *The presence of rhythm disorders type ventricular extrasystoles demonstrates a cardiotoxic effect through the myocardium's excitability in ectopic focuses (positive batmotropic effect)*. These preliminary data demonstrate a similar effect to the *Digitalis*'s action upon the cardiac activity.

The research of the antimicrobial action, in chapter 11, of the product *Scilla bifolia - herba and bulb*, has showed that it does not have an antimicrobial action upon the vegetative forms of: *Staphylococcus aureus, E.coli, Pseudomonas aeruginosa* and no anti-levuriform action upon *Candida albicans*.

Chapter 12 has determined the antioxidant potential of the methanol and ethanol extracts of *Scillae bifoliae herba and bulb*, harvested in 2008 and 2009, the percentage of free radicals' inhibition being determined at I %. These results show a significant antioxidant activity in the ethanol extracts, which have a higher concentration of polyphenols according to the data from the spectral and chromatographic analyses previously presented. *Scillae bifoliae herba* has an antioxidant activity approximately equal to the bulbs', with no significant differences. Up against the BHT etalon, the antioxidant activity is circa 1000 times weaker, with a difference of micrograms and milligrams.

## FINAL CONCLUSIONS

*Scilla bifolia* L. is a species which has not been pharmacognostic studied until now and there are no data about its chemical composition and usage; however, based on chemotaxonomy's

principles and its affinity with some other species of *Scilla*, it offers us by means of research the perspective of discovering some active principles with similar cardiac and diuretic actions. The most studied among the species is *Scilla maritima (Urginea maritima)* L. Baker, Liliaceae, known among people as chives. Its main actions are the cardiac and diuretic ones.

There are no specific data about the cardiac effects of the powder of *Scillae bifoliae herba*.

The preliminary data in preclinical experiment demonstrate a similar effect like the *Digitalis*'s on the cardiac activity.

The undertaken researches show that *Scilla bifolia* is rich in polyphenols and, as a consequence, both the herba and the bulb have a significant antioxidant activity.

Quantifiable quantities of cardiac glycosides, especially scillarosides, were emphasized neither in *Scillae bifoliae herba* nor in the bulbs; however, the presence of other cardiac substances is not excluded.

Instead of that, a series of phytosterols have been eventually emphasized, among which *stigmasterol* in a higher quantity.

*Scillae bifoliae herba and bulb* contain significant quantities of Zn and Fe, minerals with high therapeutic value.

Studies have shown that extracts in ethanol 70 % vol. contain a higher quantity of active compounds, therefore the *tincture* from this plant can be proposed as a possible pharmaceutical form.

#### **Representative bibliographical references:**

FLORA R.S.R., Vol. XI, Ed. Academiei R.S.R., Bucharest, 309-313, 1966.

FLORA EUROPAEA, Vol. 5, Cambridge University Press, by V.H. HEYWOOD, 41- 43, 2010.

R.D. MEIKLE, Lily Year Book 25, 122-130, 1961.

E.V. MORDAK, Bot. Zur. 56, 1444-1456, 1971.

KRENN L., FERTH R., ROBIEN W., KOPP B., Bufadienolide aus *Urginea maritima* sensu strictu, Planta Med. 57, 560-565, 1991.

BOSSI M., BRAMBILLA G., CAVALLI A. ET AL.: Threatening arrhythmia by uncommon Digitalic toxicosis, G Ital Cardiol., 11(12): 2254–2257, 1981.

FODOREA CRISTINA-ȘTEFANIA, L.VLASE, S.E.LEUCUȚA, M.TAMAȘ, Phytochemical Study on Some Polyphenols of *Geranium pyrenaicum*, Chemistry of Natural Compounds, 41(4), 400-403, 2005.

BLUMENTHAL M.: Industry alert: plantain adulterated with digitalis. *HerbalGram.*; 40:28- 29, 1997.

VLASE L., RADU L., FODOREA C.Ș., LEUCUȚA S.E., GOCAN S., Determination of Phenolic Compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 28(19), 3109-3117, 2005.

TOMA C., RUGINĂ RODICA: Anatomia plantelor medicinale. Atlas, Ed. Academiei R.S.R., Bucharest, 1998, 320.

MARIA-LUIZA CORNACIU (**BĂLĂȘOIU**), Florica Popescu, Anca Berbecaru-Iovan and H. Popescu: "Preclinical research of the cardiac action of the *Scilla bifolia* L. bulb", Medical Craiova, 2006, vol. 8, no. 1, 229-232.

MARIA-LUIZA **BĂLĂȘOIU**, Cornelia Bejenaru, L.E. Bejenaru, G.D. Mogosanu, H. Popescu: „Histo-anatomical data concerning the vegetative organs of *Scilla bifolia* L. (Liliaceae)”, „Current health sciences journal ”, 2010, Vol.36, nr.2, 98 -100.



## Europass Curriculum Vitae

### Personal information

First name(s) / Surname(s) **Maria-Luiza BĂLĂȘOIU**  
Address Craiovei, no. 3, 207550 Simnicu de Sus (Romania)  
Telephone(s) 0251 463322 Mobile | 0723 357545  
E-mail(s) marialuiza\_balasoiu@yahoo.com  
Nationality Romanian  
Date of birth 24/12/1976  
Gender Female

### Desired employment / Occupational field

**Manager in pharmaceutical field**

### Work experience

Dates 2009 - 2011  
Occupation or position held Pharmacist  
Main activities and responsibilities Communication with the patient, issuance of pharmaceutical products and NHIH prescriptions.  
Name and address of employer SC VEKALMAR PHARMACIE'S SRL  
Caracal, no. 62, Craiova (Romania)

Dates 15/04/2004 - 2011  
Occupation or position held Chief pharmacist  
Main activities and responsibilities Organizes, leads and controls the pharmacy's activity, according to the legislation in force. Represents the pharmacy and ensures the good relationship with the departments within its headquarter, employees, site manager, but also with its external partners: collaborators, suppliers, authorities, control bodies.  
Name and address of employer SC HERMES SRL and SA  
Piata Teatrului, no. 55, Buzau (Romania)  
Type of business or sector Pharmacy

### Education and training

Dates 2010  
Title of qualification awarded Master of Arts  
Principal subjects / occupational skills covered "Managing the Sanitary Units"  
Name and type of organisation providing education and training U.M.F Craiova (Postgraduate studies)

Dates 2008 - 2010  
Title of qualification awarded Master of Arts  
Principal subjects / occupational skills "Human resources management"

	covered
Name and type of organisation providing education and training	University of Craiova
Dates	13/05/2010
Title of qualification awarded	Certificate of Continuing Professional Development
Principal subjects / occupational skills covered	"Therapeutical modern options when approaching AP, AHT and HF"
Name and type of organisation providing education and training	The College of Pharmacists from Romania Craiova
Dates	03/2008
Title of qualification awarded	Participation award certificate
Principal subjects / occupational skills covered	"Pharmacotherapy in BRGE and UP"
Name and type of organisation providing education and training	U.M.F (Postgraduate studies) Craiova
Dates	27/10/2007
Title of qualification awarded	Participation award certificate - interactive workshop
Principal subjects / occupational skills covered	"Cardiovascular safety in the treatment of erectile dysfunction"
Name and type of organisation providing education and training	U.M.F. Craiova
Dates	08/2007
Title of qualification awarded	Degree with Honours
Principal subjects / occupational skills covered	Contest "Top of City Romania"
Name and type of organisation providing education and training	Hermes Pharma Constanta
Dates	19/05/2007
Title of qualification awarded	Certificate of Continuing Professional Development
Principal subjects / occupational skills covered	"Optimizing the activity within the pharmacy"
Name and type of organisation providing education and training	The College of Pharmacists from Romania
Dates	03/02/2007
Title of qualification awarded	Participation Award Certificate
Principal subjects / occupational skills covered	Management for success (level 1)
Name and type of organisation providing education and training	De Klausen Management and Sales Consulting Sinaia
Dates	27/07/2006
Title of qualification awarded	Participation award certificate
Principal subjects / occupational skills covered	"Perspectives and pharmacological acknowledge of the therapeutic benefits obtained through vegetal extracts"
Name and type of organisation	Craiova

providing education and training

Dates 06/2005

Title of qualification awarded Certificate of Continuing Professional Development

Principal subjects / occupational skills covered "Novelties in the pharmaceutical legislation"

Name and type of organisation providing education and training Bucharest

Dates 1997 - 2002

Title of qualification awarded Graduate

Name and type of organisation providing education and training University of Medicine and Pharmacy - Faculty of Pharmacy Craiova (Undergraduate studies)

Dates 04/06/2004 - 05/06/2004

Title of qualification awarded Participation Award Certificate

Principal subjects / occupational skills covered Session of scientific communications of the students from the Faculty of Pharmacy

Name and type of organisation providing education and training Craiova

Dates 1991 - 1995

Title of qualification awarded Baccalaureate diploma

Principal subjects / occupational skills covered Biology-chemistry specialization

Name and type of organisation providing education and training Sanitary School Group - Academical High School (Preuniversity studies) Craiova (Romania)

**Personal skills and competences**

Mother tongue(s) **Romanian**

Other language(s)

Self-assessment  
*European level (\*)*

**English**

**French**

Understanding				Speaking				Writing	
Listening		Reading		Spoken interaction		Spoken production			
B2	Independent user	B2	Independent user	B1	Independent user	B1	Independent user	B1	Independent user
A1	Basic User	A1	Basic User	A1	Basic User	A1	Basic User	A1	Basic User

(\*) [Common European Framework of Reference \(CEF\) level](#)

Social skills and competences Interpersonal communication skills, empathy and team spirit, prompt decisions, loyalty, perseverance.

Organisational skills and competences Skills and knowledge of project management, acquired through my engagement as volunteer in various national youth projects, organized by AIE Quiz ([www.aie-quiz.ro](http://www.aie-quiz.ro))

Computer skills and competences Microsoft Word, Excel, PowerPoint, Internet Explorer

Driving licence(s) B

**Additional information**

Scientific activity: Papers published in extenso:  
Maria-Luiza Cornaciu (Balasoiu), Florica Popescu, Anca Berbecaru-lovan and H. Popescu: "Preclinical

research of the cardiac action of the *Scilla bifolia* L. bulb", Medical Craiova, 2006, vol. 8, no. 1, 229-232.

Luiza Balasoiu, Cornelia Bejenaru, L.E. Bejenaru, G.D. Mogosanu, H. Popescu: „Histo-anatomical data concerning the vegetative organs of *Scilla bifolia* L. (Liliaceae)”, „Current health sciences journal ”, 2010, Vol.36, nr.2, 98 -100.