



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„IULIU HAȚIEGANU”, CLUJ-NAPOCA**

**CERCETĂRI FARMACOGNOSTICE ASUPRA
SPECIEI *RUBUS CAESIUS* L.
(*ROSACEAE*)**

**REZUMATUL
TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător științific
Prof. univ. dr. Honorius Popescu**

**Doctorand
Ruxandra Mihaela Ionciță**

CLUJ-NAPOCA

2011

Cuprins

1. Introducere	7
1. 1. Motivarea temei	7
1. 2. Contribuții personale	8
STADIUL CUNOAȘTERII	
2. Date botanice asupra speciei <i>Rubus caesius</i>	11
2. 1. Denumiri. Scurt istoric	11
2. 2. Încadrare sistematică	12
2. 3. Caracterele morfologice ale familiei <i>Rosaceae</i>	13
2. 4. Caracterele morfologice ale genului <i>Rubus</i>	13
2. 5. Caracterele morfologice ale speciei <i>R. caesius</i>	14
2. 6. Date geobotanice, ecologice și de răspândire	16
2. 7. Concluzii	16
3. Date fitochimice asupra unor specii de <i>Rubus</i>	17
3. 1. Tanin galic	17
3. 2. Flavonoide	17
3. 3. Alte componente	18
3. 4. Concluzii	19
4. Acțiune farmacologică și utilizări. Produse medicinale	20
4. 1. Acțiune farmacologică și utilizări	20
4. 2. Produse medicinale	21
4. 2. 1. <i>Rubi caesii folium, Rubi caesii fructus</i>	21
4. 2. 2. <i>Rubi fruticosi folium, Rubi fruticosi fructus</i>	22
4. 2. 3. <i>Rubi idaei folium, Rubi idaei fructus</i>	25
4. 3. Concluzii	26
CONTRIBUȚII PERSONALE	
5. Cercetări microscopice asupra speciei <i>Rubus caesius</i>	30
5. 1. Structura histo-anatomică a organelor vegetative	30
5. 1. 1. Material și metodă	30
5. 1. 2. Rezultate și discuții	31
5. 2. Cercetări histologice asupra pulberii din <i>Rubi caesii folium</i>	36
5. 2. 1. Material și metodă	36
5. 2. 2. Rezultate și discuții	36
5. 3. Cercetări de microscopie cantitativă: indicele stomatic și numărul insuliței vasculare	38
5. 3. 1. Material și metodă	38
5. 3. 2. Rezultate și discuții	39
5. 4. Concluzii	42
6. <i>Rubi caesii folium</i> – analiza fitochimică preliminară	44
6. 1. Material și metodă	44
6. 1. 1. Analiza extractului eteric	44
6. 1. 2. Analiza extractului metanolic	47
6. 1. 3. Analiza extractului apos	50
6. 2. Rezultate și discuții	52
6. 3. Concluzii	53
7. Cercetarea cationilor metalici din frunzele și tulpinile de <i>R. caesius</i>	55
7. 1. Material și metodă	55
7. 1. 1. Probele vegetale	55
7. 1. 2. Pregătirea probelor pentru analiză	56
7. 1. 3. Determinarea gravimetrică a cenușii	56

7. 1. 4. Oxidarea la temperatură înaltă. Analiza cationilor metalici	57
7. 2. Rezultate și discuții	59
7. 3. Concluzii	62
8. Analiza polifenolilor din <i>Rubi caesii folium</i> prin HPLC/MS	64
8. 1. Material și metodă	64
8. 1. 1. Proba de analizat	64
8. 1. 2. Obținerea extractelor pentru analiză	64
8. 1. 3. Metoda de analiză a compușilor polifenolici	64
8. 1. 4. Metoda de analiză cantitativă a acidului cafeic în extractele de <i>Rubi caesii folium</i>	68
8. 1. 5. Metoda de analiză cantitativă a acidului clorogenic în extractele de <i>Rubi caesii folium</i>	72
8. 2. Rezultate și discuții	76
8. 2. 1. Analiza compușilor polifenolici în probele de <i>Rubi caesii folium</i>	76
8. 2. 2. Analiza acidului cafeic în probele de <i>Rubi caesii folium</i>	78
8. 2. 3. Analiza acidului clorogenic în probele de <i>Rubi caesii folium</i>	79
8. 3. Concluzii	80
9. Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a unor tincturi din produse vegetale provenite de la specia <i>R. caesius</i>	82
9. 1. Prepararea tincturilor prin metoda percolării simple	82
9. 2. Caracterizarea organoleptică	83
9. 3. Determinarea densității relative	83
9. 4. Determinarea indicelui de refracție	83
9. 5. Condiții de calitate	84
9. 5. 1. Fer	84
9. 5. 2. Metale grele	84
9. 5. 3. Alcool	84
9. 5. 4. Reziduu prin evaporare	84
9. 6. Identificarea prin CSS a flavonozidelor	85
9. 6. 1. Material și metodă	85
9. 6. 2. Rezultate și discuții	86
9. 7. Determinarea cantitativă a flavonozidelor din tincturile de <i>Rubi caesii folium</i> și <i>Rubi caesii cauli</i>	87
9. 8. Analiza GC/MS a carbohidraților din <i>Tinctura Rubi caesii folium</i>	90
9. 8. 1. Material și metodă	91
9. 8. 2. Rezultate și discuții	92
9. 9. Concluzii	99
10. Testarea acțiunii fitobiologice a unor extracte din <i>R. caesius</i>	101
10. 1. Material și metodă	101
10. 2. Rezultate și discuții	102
10. 3. Concluzii	106
11. Testarea microbiologică a tincturilor din <i>R. caesius</i>	108
11. 1. Material și metodă	108
11. 2. Rezultate și discuții	111
11. 3. Concluzii	113
12. Concluzii finale	114
13. Bibliografie	118

Cuvinte cheie: *Rubus caesius*, cercetări histo-anatomice, cationi metalici, HPLC/MS, polifenoli, acid cafeic, acid *p*-cumaric, acid ferulic, cvercitol, camferol, hiperozidă, izocvercetrozidă, rutozidă, cvercetrozidă, tincturi, CSS, flavonozide, GC/MS, carbohidrați, acțiune fitobiologică, testare microbiologică.

Abrevieri: CSS – Cromatografie în strat subțire; GC/MS – gaz-cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă; HPLC/MS – cromatografie de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă.

Introducere

Rubus caesius L., mur de miriște (*Rosaceae*) este o specie comună în flora României, în zonele de stepă până în etajul fagului, pe răzoare, pe lângă garduri, prin arături, livezi, tufărișuri, margini de pădure, zăvoaie, marginea apelor, în special la câmpie, mai rar la munte. Înfloreste în perioada mai–iunie, uneori până în septembrie, și cuprinde numeroase varietăți. În lucrările de specialitate există foarte puține date cu privire la compoziția chimică și acțiunea farmacologică a speciei *R. caesius*. Pornind de la principiul de bază al chemotaxonomiei, și anume dacă o specie conține anumite principii active, ne putem aștepta ca speciile înrudite filogenetic cu ea, mai ales dacă provin de la același gen, să prezinte o compoziție chimică similară din punct de vedere calitativ.

Stadiul actual al cunoașterii

Din punct de vedere fitochimic, frunzele provenite de la specii de *Rubus* (*Rubi caesii folium*, *Rubi idaei folium*, *Rubi fruticosi folium*) conțin o diversitate de componente, cum ar fi: tanin galic, flavonozide (heterozide cu agliconi cvercitolul și camferol), antocianozide (heterozide ale cianidolului), triterpenoide pentaciclice, pectine, acizi organici (acid malic, acid citric, acid izocitric, acid succinic, acid oxalic), oze, lipide, vitamine, săruri minerale.

Speciile de *Rubus* prezintă acțiune astringentă, antidiareică, laxativă ușoară, depurativă, antiseptică, hipoglicemiantă, nutritivă, tonică, hemostatică, diuretică, vulnerară, antiinflamatoare. Produsele medicinale recoltate de la speciile de *Rubus* se utilizează în diaree, meno-metroragii, afecțiuni pulmonare, angină pectorală, inflamații laringo-faringiene, hemoroizi, fisuri anale, leucoree. În scop medicinal, de la speciile de *Rubus* se utilizează, cel mai adesea, infuziile și decocturile din frunze, dar și siropurile obținute prin presarea fructelor. Drupele recoltate de la speciile de *Rubus* se folosesc în alimentație, pentru dulceață, marmeladă, sirop.

Contribuții personale

Secțiunile transversale prin tulpina, rahisul foliar și frunza speciei *R. caesius* var. *mitissimus* au fost cercetate și interpretate în scopul expertizei farmacognostice, pentru precizarea caracterelor anatomice referitoare la produsul de interes medicinal *Rubi caesii folium*.

Tulpina prezintă structură secundară incipientă la nivelul cilindrului central. Scoarța este diferențiată într-o zonă externă de colenchim tangențial și o zonă internă de parenchim, unele celule fiind cristalifere, prezentând druze de oxalat de calciu. Toate fasciculele prezintă la periferia liberului câte un cordon gros de fibre sclerenchimatice, cu pereții puternic îngroșați și lignificați.

Rahisul foliar prezintă în parenchimul fundamental trei fascicule libero-lemnoase de tip colateral-deschis, cel median–abaxial fiind mult mai mare, toate având structura celor din tulpină; în plus, unele celule din parenchimul liberian sunt cristalifere.

Frunza are structură bifacială-dorsiventrală, cu limb hipostomatic, peri tectori lungi, uniceulari și cristale sau druze de oxalat de calciu.

La analiza microscopică a pulberii din frunza speciei *R. caesius* var. *mitissimus* s-au evidențiat drept elemente caracteristice perii tectori.

În cadrul cercetărilor de microscopie cantitativă asupra frunzelor de *R. caesius* var. *mitissimus*, alături de numărul insuliței vasculare, forma și dimensiunile stomatelor anomocitice, precum și aspectul celulelor epidermei inferioare constituie alte criterii de diferențiere față de celelalte specii, stabilite odată cu determinarea indicelui stomatic.

Pentru analiza fitochimică preliminară a produsului *Rubi caesii folium* s-au obținut trei extracte: eteric, metanolic și apos.

Analiza preliminară a extractului eteric a pus în evidență prezența acizilor grași, a agliconilor flavonici, a cumarinelor, celelalte șase reacții dând rezultate negative.

Analiza preliminară a extractului metanolic a pus în evidență prezența taninului galic, compușilor reducători, cumarinelor, a flavonozidelor, celelalte opt grupe de compuși cercetate dând rezultate negative.

Analiza preliminară a extractului apos a dat rezultate pozitive pentru poliuronide, compuși reducători, oze simple, tanin galic, reacțiile pentru saponozide, acizi triterpenici și alcaloizi săruri fiind negative.

În frunzele și tulpinile de *R. caesius*, prin spectrometrie de absorbție atomică, procedeul cu flacăra, au fost identificați și s-a stabilit conținutul în unii cationi metalici.

În cazul speciei *R. caesius*, în scop medicinal sunt utilizate doar frunzele și fructele, produse în care nu se acumulează concentrații ridicate de Pb^{2+} .

Mn^{2+} , Ni^{2+} și Pb^{2+} au prezentat concentrații mai ridicate în tulpini, comparativ cu frunzele, pe când Ca^{2+} , Zn^{2+} , $Fe^{2+/3+}$ și Cr^{3+} au atins concentrații mai ridicate în frunze, având rol, probabil, în procesul de înflorire.

Analiza prin spectrometrie de absorbție atomică a confirmat prezența cationilor metalici divalenți sau trivalenți, specifici produselor vegetale recoltate de la exemplare de *R. caesius* aflate la maturitate (înflorire).

În toate probele analizate au fost determinați cationii Pb^{2+} și Cr^{3+} , indicatori ai poluării solului și aerului din zonele de recoltare. Prezența Pb^{2+} , mai ales în tulpini, fără însă ca valorile determinate să se apropie de limita maximă admisă, se datorează faptului că zonele de unde au fost recoltate probele de *R. caesius* sunt supuse poluării prin relativa apropiere de circulația automobilelor.

Pentru analiza HPLC a polifenolilor din *Rubi caesii folium* au fost utilizate 18 standarde de compuși polifenolici: acid caftaric, acid gentizic, acid cafeic, acid clorogenic, acid *p*-cumaric, acid ferulic, acid sinapic, hiperozidă, izocvercetrozidă, rutozidă, miricetol, fisetină, cvercetrozidă, cvercitol, patuletină, luteol, camferol și apigenol.

Analiza HPLC a confirmat prezența, în frunza speciei *Rubus caesius* a următoarelor componente: trei acizi polifenolcarboxilici (acid cafeic, acid *p*-cumaric, acid ferulic), doi flavonoli (cvercitol, camferol) și patru heterozide flavonolice (hiperozidă, izocvercetrozidă, rutozidă, cvercetrozidă).

Dintre componentele sus-menționate, doar acidul *p*-cumaric, cvercitolul, camferolul și cvercetrozida au putut fi determinate cantitativ, celelalte substanțe fiind în concentrații foarte mici.

Concentrația de camferol din probele analizate este de cca. 4 ori mai mare decât cea de cvercitol. În proba hidrolizată, concentrația de acid cafeic este de cca. 9 ori mai mare decât în proba nehidrolizată ceea ce denotă prezența esterilor acestui acid în produsul vegetal medicinal. Raportată la produsul vegetal, concentrația totală de acid cafeic este de 30 de ori mai mare decât concentrația de acid clorogenic.

Din analiza rezultatelor acestor determinări se poate concluziona că derivații polifenolici se găsesc într-o cantitate mică în *Rubi caesii folium*.

Tincturile din *Rubi caesii folium* și *Rubi caesii cauli*, obținute prin percolare simplă, după F.R. X, au fost caracterizate fizico-chimic. Flavonozidele au fost analizate calitativ prin CSS, iar cantitativ prin metoda spectrofotometrică, în VIZ.

Prin GC/MS, după derivatizare, au fost analizați carbohidrații (alcooli glucidici, mono- și dizaharide) din tinctura de *Rubi caesii folium*, pe baza modelelor de fragmentare din spectrele de masă standard și pornind de la indicii de retenție Kováts. Având în vedere că extracția ozelor și alcoolilor glucidici din produse naturale prevede utilizarea unui mediu hidroalcoolic, concentrațiile relative mari de fructoză și dulcitol din tinctura de *Rubii caesii folium* ar putea fi corelate cu prezența acestor compuși în concentrații ridicate în produsul vegetal supus extracției.

Pentru trei extracte (eteric, metanolic și apos) din frunzele și tulpinile de *R. caesius* s-a testat acțiunea fitobiologică asupra germinăției și alungirii radiculare medii a cariopselor germinate de grâu. Din analiza datelor experimentale, s-a evidențiat inhibiția alungirii radiculare medii, față de

martor, pentru toate extractele supuse testărilor. Efectul inhibitor cel mai puternic s-a înregistrat în cazul extractului metanolic din tulpini.

Testarea microbiologică a tincturilor din *Rubi caesii folium* și *Rubi caesii cauli* a fost realizată pe tulpini de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*. Rezultatele testărilor microbiologice au evidențiat o acțiune antimicrobiană și antimicotică slabă a celor două tincturi. Totuși, se remarcă efectul bacteriostatic de intensitate medie asupra tulpinilor de *Escherichia coli*.

Concluzii finale

Rubus caesius este o specie comună în flora României, în zonele de stepă până în etajul fagului, pe răzoare, prin arături, livezi, tufărișuri.

În lucrările de specialitate există foarte puține date cu privire la compoziția chimică și acțiunea farmacologică a speciei *R. caesius*.

Pentru prima dată, prin tehnica microfotografică au fost redată secțiunile transversale prin tulpina, rahisul foliar și frunza speciei *R. caesius* var. *mitíssimus*. Tot pentru prima dată s-au efectuat și cercetările de microscopie cantitativă asupra frunzelor provenite de la specia *R. caesius* var. *mitíssimus*, cu privire la determinarea indicelui stomatic și a numărului insuliței vasculare.

În scopul identificării grupelor de principii active, s-a realizat analiza fitochimică preliminară a produsului *Rubi caesii folium*, recoltat de la specia *R. caesius* var. *mitíssimus*, din flora României, zona Olteniei.

Prin spectrometrie de absorbție atomică, procedeul cu flacăra, au fost identificați și s-a stabilit conținutul în unii cationi metalici (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$, Ni^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+}) al frunzelor și tulpinilor recoltate de la specia *R. caesius*.

Polifenolii din *Rubi caesii folium* au fost analizați prin cromatografie de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă (HPLC/MS). Au fost analizate, în paralel, două probe din fiecare extract vegetal, una ca atare și cealaltă hidrolizată.

Tincturile din *Rubi caesii folium* și *Rubi caesii cauli* au fost obținute prin percolare simplă, conform F.R. X, și apoi caracterizate fizico-chimic. Din punct de vedere calitativ, flavonozidele au fost analizate prin cromatografie pe strat subțire, iar cantitativ, prin metoda spectrofotometrică, în VIZ. Carbohidrații din compoziția tincturii de *Rubi caesii folium* au fost analizați prin GC-MS, după derivatizare, pe baza modelelor de fragmentare din spectrele de masă standard și pornind de la indicii de retenție Kováts.

S-a testat acțiunea fitobiologică asupra germinăției și alungirii radiculare medii a cariopselor germinate de grâu, pentru trei extracte (eteric, metanolic și apos), obținute din frunzele și tulpinile de *R. caesius*.

Tincturile din *Rubi caesii folium* și *Rubi caesii cauli* au fost testate din punctul de vedere al acțiunii antimicrobiene, pe tulpini de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* și *Pseudomonas aeruginosa*, dar și al acțiunii antifungice, pe tulpini de *Candida albicans*.

În condițiile în care nu s-au realizat cercetări ample asupra speciei *R. caesius*, rezultatele obținute în cadrul tezei de doctorat au în vedere caracterizarea farmacognostică și standardizarea produsului vegetal medicinal *Rubi caesii folium*.

Bibliografie selectivă

***: Flora României, Ed. Academiei Române, vol. IV, București, 1956, 161, 276, 277, 532–539.

GUDEJ J., TOMCZYK M.: Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus* L. species, Archives of Pharmacal Research, 2004, 27(11):1114–1119.

IONCICĂ RUXANDRA, BUBULICĂ MARIA-VIORICA, CHRIGIU L., MOGOȘANU G. D., POPESCU R., POPESCU H.: Researches upon the heavy metals content of *Rubus caesius* L. (*Rosaceae*), Current Health Sciences Journal, January–March, 2010, 36(1):51–54.

IONCICĂ RUXANDRA, MOGOȘANU G. D., POPESCU H.: Cercetări microscopice asupra speciei *Rubus caesius* L. (*Rosaceae*), Craiova Medicală, 2006, 8(Supl 1):250–253.

- LEUCUTA S., VLASE L., GOCAN S., RADU L., FODOREA C.: Determination of phenolic compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2005, 28(19):3109–3117.
- LIMBAN CARMEN, DINU MIHAELA, MISSIR AL., MIHĂILĂ CLAUDIA: Testarea acțiunii unor noi compuși, O-acil-oximino-dibenz-[b,e]-oxepine, pe celula vegetală, *Farmacia*, 1998, 46(5):3–15.
- MEDEIROS P. M., SIMONEIT B. R. T.: Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2007, 1141(2):271–278.
- NIKITINA V. S., KUZ'MINA L. IU., MELENT'EV A. I., SHENDEL' G. V.: Antibacterial activity of polyphenolic compounds isolated from plants of *Geraniaceae* and *Rosaceae* families, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2007, 43(6):629–634.
- TUTIN T. G., HEYWOOD V. H., BURGESS N. A. *et al.*: *Flora Europaea*. Volume 2: *Rosaceae* to *Umbelliferae*, Cambridge University Press, 2001, 7, 25.
- WAGNER H., BLADT SABINE: *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd edition, Springer Verlag, Berlin–Heidelberg, 1996, 210, 211.

CURRICULUM VITAE

I. DATE BIOGRAFICE

- Numele și prenumele: IONCICĂ MIHAELA RUXANDRA (căsătorită BISCHIN)
- Data nașterii: 26 iulie 1979
- Locul nașterii: Craiova, județul Dolj
- Domiciliul: Craiova, Str. Păltiniș, Bl. K20, Ap. 7
- Naționalitatea: română
- Cetățenia: română
- Starea civilă: căsătorită

II. STUDII GIMNAZIALE ȘI LICEALE

- 1986–1990: Liceul Teoretic „Nicolae Bălcescu”, Craiova (cls. I–IV).
- 1990–1994: Liceul Teoretic „Nicolae Bălcescu”, Craiova (cls. V–VIII).
- 1994–1998: Liceul Teoretic „Nicolae Bălcescu”, Craiova, profil uman, limbi străine; diplomă de bacalaureat – iunie 1998.

III. STUDII UNIVERSITARE

- 1998–2003: Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova; diplomă de licență – septembrie 2003.

IV. SPECIALIZAREA PRINCIPALĂ

- Farmacie, cu durata studiilor de 5 ani.

VI. FUNCȚII ÎNDEPLINITE

- 2003–2004: farmacist stagiar la Spitalul de Neurologie (Spitalul nr. 4) din Craiova.
- 2004–2008: farmacist *part-time* la Farmacia „Lilifarm”, Craiova.
- 2004–2011: farmacist șef la Farmacia Serviciului de Ambulanță Dolj, Craiova.

VII. ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ ȘI PROFESIONALĂ

VII. 1. Doctorat

La 1 noiembrie 2003 am fost admisă la doctorat, în cadrul Universității de Medicină și Farmacie din Craiova, sub conducerea științifică a Dlui prof. univ. dr. Honorius Popescu.

În perioada 2003–2010, am susținut toate examenele și referatele prevăzute în planul individual al activității de pregătire doctorală.

Din anul 2008, am continuat activitatea de cercetare pentru definitivarea tezei de doctorat intitulată „Cercetări farmacognostice asupra speciei *Rubus caesius* L. (*Rosaceae*)”, la Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, sub conducerea științifică a Dlui prof. univ. dr. Honorius Popescu.

VII. 2. Simpozioane și cursuri de formare profesională

1. Cursul pentru „Pregătirea personalului didactic”, Departamentul pentru Pregătirea Personalului Didactic, U.M.F. Craiova – 28 iunie 2003.
2. Cursul postuniversitar „Metode analitice în controlul medicamentului”, U.M.F. Craiova, 10–20 noiembrie 2003.
3. Cursul postuniversitar „Limba franceză pentru farmaciști”, U.M.F. Craiova, 18.I.–18.II.2005.
4. Cursul postuniversitar „Actualități în legislația farmaceutică”, Facultatea de Farmacie București, martie 2005.
5. Simpozionul „Perspective și confirmări farmacologice ale beneficiilor obținute din extracte vegetale”, iulie 2006.

6. Simpozionul „Facultatea de Farmacie – 10 ani de învățământ universitar craiovean”, Craiova, mai 2006.
7. Simpozionul „Produsele Gedeon Richter România – tradiție și continuitate”, septembrie 2006.
8. Simpozionul „Rolul farmacistului în recomandarea suplimentelor alimentare și a dermo-cosmeticeleor”, Brașov, mai 2007.
9. Cursul postuniversitar „Noi strategii terapeutice. Forme moderne oftalmologice”, martie 2007.
10. Cursul postuniversitar „Terapia în boala Alzheimer”, 2007.

VII. 3. Publicații

1. **Ionică Ruxandra**, Mogoșanu G. D., Popescu H.: Cercetări microscopice asupra speciei *Rubus caesius* L. (*Rosaceae*), Craiova Medicală, 2006, 8(Supl 1):250–253.
2. **Ionică Ruxandra**, Bubulică Maria-Viorica, Chirigiu L., Mogoșanu G. D., Popescu R., Popescu H.: Researches upon the heavy metals content of *Rubus caesius* L. (*Rosaceae*), Current Health Sciences Journal, January–March, 2010, 36(1):51–54.



**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
„IULIU HAȚIEGANU”, CLUJ-NAPOCA**

**PHARMACOGNOSTIC RESEARCHES OF
RUBUS CAESIUS L.
(*ROSACEAE*) SPECIES**

**ABSTRACT
OF THE DOCTORAL THESIS**

**Scientific advisor
University Professor Honorius Popescu, PhD**

**PhD student
Ruxandra Mihaela Ionciă**

CLUJ-NAPOCA

2011

Contents

1. Introduction	7
1. 1. Theme motivation	7
1. 2. Personal contributions	8
KNOWLEDGE STAGE	
2. Botanical data on <i>Rubus caesius</i> species	11
2. 1. Names. Short history	11
2. 2. Systematic framing	12
2. 3. Morphological features of <i>Rosaceae</i> family	13
2. 4. Morphological features of <i>Rubus</i> genus	13
2. 5. Morphological features of <i>R. caesius</i> species	14
2. 6. Geo-botanical, ecological and spreading data	16
2. 7. Conclusions	16
3. Phytochemical data on some <i>Rubus</i> species	17
3. 1. Gallic tannin	17
3. 2. Flavonoids	17
3. 3. Other components	18
3. 4. Conclusions	19
4. Pharmacological action and uses. Medicinal products	20
4. 1. Pharmacological action and uses	20
4. 2. Medicinal products	21
4. 2. 1. <i>Rubi caesii folium, Rubi caesii fructus</i>	21
4. 2. 2. <i>Rubi fruticosi folium, Rubi fruticosi fructus</i>	22
4. 2. 3. <i>Rubi idaei folium, Rubi idaei fructus</i>	25
4. 3. Conclusions	26
PERSONAL CONTRIBUTIONS	
5. Microscopic researches of <i>Rubus caesius</i> species	30
5. 1. Histochemical structures of vegetative organs	30
5. 1. 1. Material and method	30
5. 1. 2. Results and discussions	31
5. 2. Histological researches on the powder from <i>Rubi caesii folium</i>	36
5. 2. 1. Material and method	36
5. 2. 2. Results and discussions	36
5. 3. Quantitative microscopy researches: stomatic index and vascular island number	38
5. 3. 1. Material and method	38
5. 3. 2. Results and discussions	39
5. 4. Conclusions	42
6. <i>Rubi caesii folium</i> – preliminary phytochemical analysis	44
6. 1. Material and method	44
6. 1. 1. Ethereal extract analysis	44
6. 1. 2. Methanolic extract analysis	47
6. 1. 3. Aqueous extract analysis	50
6. 2. Results and discussions	52
6. 3. Conclusions	53
7. Research of metallic cations from the leaves and stalks of <i>R. caesius</i>	55
7. 1. Material and method	55
7. 1. 1. Vegetal samples	55
7. 1. 2. Preparing the samples for analysis	56
7. 1. 3. Gravimetric measurement of the ash	56
7. 1. 4. High temperature oxidation. Metallic cations analysis	57

7. 2. Results and discussions	59
7. 3. Conclusions	62
8. Analysis of the polyphenols from <i>Rubi caesii folium</i> using HPLC/MS	64
8. 1. Material and method.....	64
8. 1. 1. Samples to be analyzed	64
8. 1. 2. Obtaining the extracts for analysis.....	64
8. 1. 3. Analysis method of polyphenolic compounds	64
8. 1. 4. Quantitative analysis method of the caffeic acid in the extracts of <i>Rubi caesii folium</i>	68
8. 1. 5. Quantitative analysis method of the chlorogenic acid in the extracts of <i>Rubi caesii folium</i>	72
8. 2. Results and discussions	76
8. 2. 1. Analysis of polyphenolic compounds in the samples of <i>Rubi caesii folium</i>	76
8. 2. 2. Analysis of the caffeic acid in the samples of <i>Rubi caesii folium</i>	78
8. 2. 3. Analysis of the chlorogenic acid in the samples of <i>Rubi caesii folium</i>	79
8. 3. Conclusions	80
9. Achievement and physical and chemical characterization of tinctures resulted from vegetal products from <i>R. caesius</i> species.....	82
9. 1. Preparing tinctures through simple percolation method	82
9. 2. Organoleptic characterization	83
9. 3. Determining relative density	83
9. 4. Determining the refraction index	83
9. 5. Quality conditions	84
9. 5. 1. Ferrum	84
9. 5. 2. Heavy metals	84
9. 5. 3. Alcohol	84
9. 5. 4. Evaporation residual	84
9. 6. Flavonosides identification through CSS	85
9. 6. 1. Material and method	85
9. 6. 2. Results and discussions.....	86
9. 7. Quantitative determination of flavonosides from tinctures of <i>Rubi caesii folium</i> and <i>Rubi caesii cauli</i>	87
9. 8. GC/MS analysis of carbohydrates from <i>Tinctura Rubi caesii folium</i>	90
9. 8. 1. Material and method	91
9. 8. 2. Results and discussions.....	92
9. 9. Conclusions	99
10. Testing of the phytobiological actions of some extracts from <i>R. caesius</i>	101
10. 1. Material and method.....	101
10. 2. Results and discussions	102
10. 3. Conclusions	106
11. Microbiological testing of tinctures from <i>R. caesius</i>	108
11. 1. Material and method.....	108
11. 2. Results and discussions	111
11. 3. Conclusions	113
12. Final conclusions	114
13. References	118

Key words: *Rubus caesius*, histo-anatomic researches, metallic cations, HPLC/MS, polyphenols, caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, quercetol, kampferol, hyperoside, isoquercitroside, rutoside, quercitroside, tinctures, CSS, flavonosides, GC/MS, carbohydrates, phytobiological action acțiune, microbiologic testing.

Abbreviations: CSS – Column switching system; GC/MS – gas chromatography coupled with

mass chromatography; HPLC/MS – high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry.

Introduction

Rubus caesius L., blackberry (*Rosaceae*) is a common species from the Romanian flora, in the steppe areas to the beech level, on balks, near fences, through plough lands, orchards, bush-like trees, forest edges, riverside coppices, water sides, especially in plain areas, rarely in mountainous areas. It blossoms in May-June, sometimes until September and has numerous varieties. Specialized papers include very few data regarding the chemical composition and pharmacological action of *R. Caesius* species. Starting from the main principle of chemo-taxonomy, that is if a species includes some active principles, we can expect that its phylogenetically related species, especially if they come from the same genus, have a similar chemical composition from qualitative point of view.

Current knowledge stage

From phytochemical point of view, the leaves coming from the species of *Rubus* (*Rubi caesii folium*, *Rubi idaei folium*, *Rubi fruticosi folium*) include a variety of components like: Gallic tannin, flavonosides (heterosides with aglycons of quercetol and campherol), antocianosides (cyanidol heterosides), pentacyclic triperpenoids, pectines, organic acids (malic acids, citric acid, isocitric acid, succinic acid, oxalic acid), oze, lipids, vitamins, mineral salts.

Rubus species have astringent, antidiarrheic, easy laxative, depurative, antiseptic, hypoglicemiant, nutritive, tonic, haemostatic, diuretic, vulnerary, anti-inflammation action. Medicinal products taken from *Rubus* species are used in diarrhoeas, menometroragias, pulmonary diseases, angina pectoris, laryngeal-pharyngeal inflammations, haemorrhoids, anal fissures, leukorrhoea. For medicinal purposes *Rubus* species often serve as leaves infusions and decocts, as well as for syrups resulted from fruits pressing. The fruits taken from *Rubus* species are used in feeding, for making jam, marmalade, syrup.

Personal contributions

Transversal sections through the stem, foliar rachis and the leaf of *R. caesius* species var. *mitissimus* were researched and interpreted for purposes of pharmacognostic expertise, in order to indicate the anatomic features regarding the medicinal product *Rubi caesii folium*.

The stem has an incipient secondary structure at the level of the central cylinder. The cortex is differentiated in the external area by tangential collenchymas and in the internal area by the parenchyma, some cells being crystal like and have druses of calcium oxalate. All fascicles have a thick string of sclerenchymatic fibres with strongly thickened and lignified walls in the peripheral area of the bast.

The foliar rachis has three collateral-open type bast-ligneous fascicles in the fundamental parenchyma, the middle-abaxial one being bigger, all of them having the same structure like the ones in the stem; moreover, some cells from the Liberian parenchyma are crystal like.

The leaf has a bifacial-dorsiventral structure, with hipostomatic limb, long unicellular rough hair, and calcium oxalate crystals or druses.

The microscopic analysis of the powder from the leaf of *R. caesius* species var. *mitissimus* was performed for the first time, rough hair being the characteristic element.

Within quantitative microscopy researches on the leaves of *R. caesius* var. *mitissimus*, along with the number of vascular island, the form and sizes of anomocytic stomata, as well as the aspect of the lower are other criteria for differentiating them from the other species, established with the determination of the stomatic index.

For the preliminary phytochemical analysis of the product *Rubi caesii folium* three extracts resulted: ethereal, methanolic and aqueous.

The preliminary analysis of the ethereal acid revealed the presence of fat acids, flavonic aglycons, cumarins, the other six reactions giving negative results.

The preliminary analysis of the metanolic extract revealed the presence of the Gallic tannin, reducing compounds, cumarins, flavonosides, the other eight groups of compounds giving negative results.

The preliminary analysis of the aqueous extract gave positive results for poli-uronids, reducing compounds, simple monoglucides, Gallic tannin, the reactions for saponosides, triterpenic acids and alkaloid salts being negative.

In the leaves and stems of *R. caesius*, through atomic absorption spectrometry, the flame procedure, was used to identify and establish the content in some metallic.

In the case of *R. Caesius* species, for medicinal purposes, only leaves and fruits are used, because they are products where high quantities of Pb^{2+} cannot accumulate.

Mn^{2+} , Ni^{2+} and Pb^{2+} had higher concentrations in stems as compared to the leaves, while Ca^{2+} , Zn^{2+} , $Fe^{2+/3+}$ and Cr^{3+} reached higher concentrations in leaves and probably played a role in the blossoming process.

The analysis through atomic absorption spectrometry confirmed the presence of bivalent or trivalent metallic cations, specific to the vegetal products taken from samples of matured (blossomed) *R. caesius*.

In all the analyzed samples Pb^{2+} and Cr^{3+} cations were determined, as indicators of soil and air pollution in gathering areas. The presence of Pb^{2+} , especially in stems, without values getting closer to the maximum allowed limit, is due to the fact that the areas the samples of *R. caesius* were gathered from are facing pollution due to their relative closeness to vehicle traffic.

For the HPLC analysis of the polyphenols of *Rubi caesii folium* 18 standards of polyphenolic compounds were used: caftaric acid, gentisic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, *p*-cumaric acid, ferulic acid, sinapinic acid, hiperoside, isoquercitroside, rutoside, miricetol, fisetine, quercitroside, quercetol, patuletine, luteol, kaempferol and apigenol.

The HPLC analysis confirmed the presence in the leaf of *Rubus caesius* species of the following components: three polyphenol-carboxylic acids (caffeic acid, *p*-cumaric acid, ferulic acid), two flavonols (quercetol, kaempferol) and four flavonolic heterosides (hiperoside, isoquercitroside, rutoside, quercitroside).

Of the above components, only the *p*-cumaric acid, the quercetol, the kaempferol and the quercitroside could be quantitatively determined, the other substances being present only in very low concentrations.

The concentration of kaempferol from the analyzed samples is about 4 times higher than the one of quercetol. In the hydrolyzed sample, the concentration of caffeic acid is about 9 times higher than in the non-hydrolyzed sample which reveals the presence of this acid esters in the medicinal vegetal product. Compared to the vegetal product, the total concentration of caffeic acid is 30 times higher than the concentration of chlorogenic acid.

The analysis of these results leads to the conclusion that polyphenolic derivatives can be found in small amounts in *Rubi caesi folium*.

Tinctures of *Rubi caesii folium* and *Rubi caesii cauli* were achieved through simple percolation, according to F.R. X, and then characterized from physical and chemical point of view. From qualitative point of view, flavonosides were analyzed through thin layer chromatography, and quantitatively through spectrophotometric method, in VIZ.

Through GC/MS, after deritivization, carbohydrates were analyzed (glucidic alcohols, mono- and bi-sacharides) from the composition of the tincture of *Rubi caesii folium*, based on fragmentation patterns from standard mass spectra and starting from Kováts retention indices. Considering that the extraction of oze and glucidic alcohols from natural products provides the use of a hydroalcoholic environment, the relatively high concentrations of fructose and dulcitol from the tincture of *Rubii caesii folium* could be correlated with the presence of these compounds in high concentrations in the vegetal product undergoing extraction.

Phyobiological action was tested on germination and average radicular elongation of

wheat germinated caryopsis, for three extracts (etheric, methanolic and aqueous), resulted from the leaves and stems of *R. caesius*. The analysis of experimental data has revealed the inhibition of average radicular elongation towards the witness, for all tested extracts. The most powerful inhibiting effect was recorded in the case of methanolic extract from stems.

Microbiological testing of the tinctures of *Rubi caesii folium* și *Rubi caesii cauli* was made on stems of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*. Microbiological tests results have revealed poor antimicrobial and antimycotic of the two tinctures. Nonetheless, we notice the bacteriostatic effect of medium intensity on the stems of *Escherichia coli*.

Final conclusions

Rubus caesius is a common species from the Romanian flora, in the steppe areas to the beech level, on balks, through plough lands, orchards, bush-like trees.

Specialized papers include very few data regarding the chemical composition and pharmacological action of *R. Caesius* species.

For the first time, the microphotographic technique was used to render transversal sections through the stem, foliar rachis and the leaf of *R. caesius* var. *mitissimus*. For the first time as well, quantitative microscopy researches were made on the leaves coming from *R. caesius* species var. *mitissimus*, regarding the determination of the stomatic index and the number of the vascular island.

In order to identify the groups of active principles, a preliminary phytochemical analysis of the product *Rubi caesii folium* was made, taken from *R. caesius* species var. *mitissimus*, of the Romanian flora, in the Oltenia area.

High-performance liquid chromatography was used to determine the content in some metallic cations (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$, Ni^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+}) of leaves and stems taken from *R. Caesius* species.

The polyphenols of *Rubi caesii folium* were analyzed through high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC/MS). Two samples of every vegetal extract were analyzed in parallel, one as such and the other hydrolyzed.

The tinctures of *Rubi caesii folium* and *Rubi caesii cauli* were achieved through simple percolation, according to F.R. X, and then physically and chemically analyzed. From qualitative point of view, the flavonosides were analyzed through thin layer chromatography, and quantitatively through spectrophotometric method, in VIZ. Carbohydrates (glucidic alcohols, mono- and bi-sacharides) from the composition of the tincture of *Rubi caesii folium* were analyzed through GC-MS, after deritivization, based on fragmentation patterns from standard mass spectra and starting from Kováts retention indices.

Phytobiological action was tested on germination and average radicular elongation of wheat germinated caryopsis, for three extracts (etheric, methanolic and aqueous), resulted from the leaves and stems of *R. caesius*.

Tinctures of *Rubi caesii folium* and *Rubi caesii cauli* were tested from the point of view of their antimicrobial action, on stems of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* and *Pseudomonas aeruginosa*, as well as their anti-fungi action on stems of *Candida albicans*.

Taking into consideration that there have not been any advanced researches on *R. Caesius* species, the results achieved within the doctoral thesis refer to the pharmacognostic characterization and standardization of the medicinal vegetal product of *Rubi caesii folium*.

Selective references

- ***: Romanian Flora, Romanian Academy Press, vol. IV, Bucharest, 1956, 161, 276, 277, 532–539.
GUDEJ J., TOMCZYK M.: Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus* L. species, Archives of Pharmacal Research, 2004, 27(11):1114–1119.
IONCICĂ RUXANDRA, BUBULICĂ MARIA-VIORICA, CHIRIGIU L., MOGOȘANU G. D., POPESCU R., POPESCU H.: Researches upon the heavy metals content of *Rubus caesius* L. (*Rosaceae*), Current

Health Sciences Journal, January–March, 2010, 36(1):51–54.

IONCICĂ RUXANDRA, MOGOȘANU G. D., POPESCU H.: Microscopic researches on *Rubus caesius* L. (*Rosaceae*) species, Craiova Medicală, 2006, 8(Supl 1):250–253.

LEUCUTA S., VLASE L., GOCAN S., RADU L., FODOREA C.: Determination of phenolic compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2005, 28(19):3109–3117.

LIMBAN CARMEN, DINU MIHAELA, MISSIR AL., MIHĂILĂ CLAUDIA: Testing the action of some new compounds, O-acil-oximino-dibenz-[b,e]-oxepine, on the vegetal cell, Farmacia, 1998, 46(5):3–15.

MEDEIROS P. M., SIMONEIT B. R. T.: Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography–mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 2007, 1141(2):271–278.

NIKITINA V. S., KUZ'MINA L. IU., MELENT'EV A. I., SHENDEL' G. V.: Antibacterial activity of polyphenolic compounds isolated from plants of *Geraniaceae* and *Rosaceae* families, Applied Biochemistry and Microbiology, 2007, 43(6):629–634.

TUTIN T. G., HEYWOOD V. H., BURGESS N. A. *et al.*: *Flora Europaea*. Volume 2: *Rosaceae* to *Umbelliferae*, Cambridge University Press, 2001, 7, 25.

WAGNER H., BLADT SABINE: *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd edition, Springer Verlag, Berlin–Heidelberg, 1996, 210, 211.

CURRICULUM VITAE

I. BIOGRAPHIC DATA

- Surname and first name: IONCICĂ MIHAELA RUXANDRA (married BISCHIN)
- Birth date: July, 26th 1979
- Birth place: Craiova, Dolj County
- Residence: Craiova, Păltiniș street, Building. K20, Ap. 7
- Nationality: Romanian
- Citizenship: Romanian
- Civil status: married

II. SECONDARY AND POST-SECONDARY EDUCATION

- 1986–1990: “Nicolae Bălcescu” Theoretical High-School, Craiova (1st – 4th grades).
- 1990–1994: “Nicolae Bălcescu” Theoretical High-School, Craiova (5th – 8th grades).
- 1994–1998: “Nicolae Bălcescu” Theoretical High-School, Craiova, humanistic profile, foreign languages; high-school graduation diploma - 1998.

III. ACADEMIC STUDIES

- 1998–2003: Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy of Craiova; bachelor's degree – September 2003.

IV. MAIN FIELD OF STUDY

- Pharmacy with duration of studies of 5 years.

VI. POSITIONS OCCUPIED

- 2003–2004: intern pharmacist at the Neurology Hospital (Hospital no. 4) from Craiova.
- 2004–2008: part-time pharmacist at “Lilifarm” Pharmacy, Craiova.
- 2004–2011: chief pharmacist at the Ambulance Service Pharmacy, Dolj, Craiova.

VII. SCIENTIFIC AND PROFESSIONAL ACTIVITY

VII. 1. PhD studies

On November 1st 2003, I was admitted for PhD studies at the University of Medicine and Pharmacy of Craiova, under the scientific guidance of Mr. University Professor Honorius Popescu PhD.

Between 2003 and 2010, I took all the exams and essays stipulated in the individual plan of the doctoral training activity.

Since 2008, I have continued my research activity in order to complete my doctoral thesis called “Pharmacognostic researches of *Rubus caesius* L. (Rosaceae) species”, at the University of Medicine and Pharmacy “Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, under the scientific guidance of Mr. University Professor Honorius Popescu, PhD.

VII. 2. Symposiums and professional training courses

1. “Teaching Staff Training” Course, Teaching Staff Training Department, U.M.F. Craiova – June 28th 2003.
2. Post-academic course “Analytical Methods in Pharmaceuticals Control”, U.M.F. Craiova, 10–20 November 2003.
3. Post-academic course “French for Pharmacists Lim”, U.M.F. Craiova, 18.I.–18.II.2005.
4. Post-academic course “Updates in Pharmaceutical Legislation”, Faculty of Pharmacy, Bucharest, March 2005.

5. Symposium “Prospects and Pharmacological Confirmations of Benefits Resulting from Vegetal Extracts”, July 2006.
6. Symposium “Faculty of Pharmacy – 10 years of Craiova academic education”, Craiova, May 2006.
7. Symposium “Gedeon Richter România Products – Tradition and Continuity”, September 2006.
8. Symposium “Pharmacist’s role in Recommending Food Supplements and Dermo-Cosmetics”, Braşov, May 2007.
9. Post-academic course “New Therapeutic Strategies. Modern Ophthalmological Forms”, March 2007.
10. Post-academic course “Alzheimer Therapy”, 2007.

VII. 3. Publications

1. Ionică Ruxandra, Mogoşanu G. D., Popescu H.: Microscopic Researches of *Rubus caesius* L. (Rosaceae) species, Craiova Medicală, 2006, 8(Supl 1):250–253.
2. Ionică Ruxandra, Bubulică Maria-Viorica, Chirigiu L., Mogoşanu G. D., Popescu R., Popescu H.: Researches upon the heavy metals content of *Rubus caesius* L. (Rosaceae), Current Health Sciences Journal, January–March, 2010, 36(1):51–54.