

TEZĂ DE ABILITARE

STUDIUL EXTRACTELOR VEGETALE – MAI MULT DECÂT ANALIZE FITOCHIMICE

Conf. Dr. Neli-Kinga Olah

REZUMATUL TEZEI DE ABILITARE

Autoarea și-a desfășurat activitatea științifică și profesională după obținerea titlului de doctor în industria farmaceutică, în domeniul controlului calității respectiv a cercetării speciilor vegetale, a extractelor vegetale, în special a extractelor gemoterapice. Mai târziu a intrat și în mediul academic, în domeniul farmaceutic, activând la disciplinele Industria Medicamentului și Biotehnologii Farmaceutice respectiv Chimie terapeutică.

Principalele direcții în activitatea științifică s-au orientat către dezvoltarea de metode analitice pentru controlul calității unor specii vegetale și a extractelor obținute din diferite specii vegetale. Mai exact în acest domeniu s-a preocupat mult de studiul fitochimic al extractelor gemoterapice. Un alt aspect important în cercetările efectuate s-au orientat asupra posibilităților de corelare a compușilor bioactivi identificați cu posibilele efecte biologice pe care le pot determina.

Mare parte din studiile fitochimice efectuate s-au orientat către evaluarea calitativă și cantitativă a diferitelor clase și compuși cu structură polifenolică. Aceste evaluări s-au realizat prin diferite metode cromatografice și spectrale.

Folosind metode cromatografice moderne, HPLC -UV/MS sau HPLC-MS/MS s-au studiat 12 specii din familia Fabaceae. În aceste specii studiile au relevat prezența izoflavonelor, sub formă de heterozide tip daizină, genistină sau ononină, dar și agliconi ca daidzeină, genisteină, gliciteină respectiv formononetină, surse mai bogate în acești compuși fiind *Genista tinctoria* L., *Genistella sagitallis* (L.) Gam și diferitele specii de Trifoi (*Trifolium sp.*). Datorită efectului fitoestrogenic al izoflavonelor aceste specii au potențial de a reduce riscul de dezvoltarea a unor forme de cancer de origine hormonală, a artritelor sau a unor afecțiuni neurodegenerative. Dintre compușii polifenolici din clasa acizilor fenolici acidul ferulic și acidul p-cumaric sunt prezenți mai ales în *Trifolium pratense* L., *Medicago sativa* L., *Genista tinctoria* L. respectiv *Genistella sagitallis* (L.) Gam. Din clasa de polifenoli tip flavonoide s-au identificat hiperozida, izocvercitrina, apigenina în aceeași specii amintite mai sus, respectiv și rutozidă, cvercitrină și luteolină în speciile *Cytisus nigricans* L. și *Cytisus albus* L. Fiind cunoscut că polifenolii au capacitate mare de neutralizare a radicalilor liberi în multe cazuri s-au realizat și corelații între conținutul de polifenoli și efectul antioxidant determinat prin diferite metode spectrale, *in vitro*: DPPH, TEAC, ORAC, EPR. Corelațiile indică faptul că speciile care s-au dovedit surse bogate de

polifenoli prezintă activitate antioxidantă semnificativă, cum este cazul speciilor de Trifoi și *Cytisus nigricans* L. La speciile de Trifoi bogate în polifenoli s-a putut demonstra și efect antibacterian moderat, dar semnificativ pe *Staphylococcus aureus* și *Salmonella typhimurium*.

Folosind aceleași metode HPLC-UV și HPLC-MS s-au putut identifica o serie de compuși polifenolici: în *Chrysanthemum balsamita* (L.) Baillon acid p-cumaric, rutozidă, cvercitrină, cvercitol și kaempferol; în *Lysimachia nummularia* L. și *Lysimachia vulgaris* L. acid p-cumaric, izocvercitrină, rutozidă, cvercitrină, cvercitol și luteolină; în *Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. et A. Gray acid p-cumaric, izocvercitrină, rutozidă, cvercitrină, kaempferol. Datorită acestor compuși aceste specii pot avea potențial antioxidant semnificativ demonstrat prin diferite metode spectrale *in vitro*: DPPH, TEAC, FRAP, CUPRAC, SNP și EPR.

S-au putut corela bine și conținutul de polifenoli respectiv efectul antioxidant determinat prin metodele DPPH, TEAC și FRAP a unor tincturi obținute din 13 specii vegetale indigene, dintre care tinctura din scoarța de *Salix alba* L. s-a dovedit a fi cea mai valoroasă. Speciile de Lamiaceae au un polifenol specific, acidul rozmarinic, care s-a putut identifica și doza prin HPLC-MS. Dintre cele șase specii studiate *Origanum vulgare* L. s-a dovedit a avea conținutul de acid rozmarinic cel mai mare și potențialul antioxidant cel mai ridicat, evaluat prin metodele DPPH și EPR. Extractele de *Rosmarinus officinalis* și *Salvia officinalis* au dovedit efect antimicrobian semnificativ pe *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* și *Candida albicans*.

Compuși polifenolici de tipul flavonoidelor și acizilor fenolici s-au putut identifica și prin CSS, iar dozarea s-a realizat ulterior prin fotodensitometrarea plăcilor. Conținutul total de flavonoide respectiv acizi fenolici s-a determinat spectral. Astfel s-au determinat: rutozida și hiperozida din florile și frunzele de *Robinia pseudacacia* L.; în diferite extracte și părți vegetative ale patru specii indigene de *Ranunculus* dintre care extractele din herba de *R. ficaria* și *R. bulbosus* s-au găsit a fi mai valoroase sub aspect terapeutic.

Studiul efectuat pentru determinarea profilului polifenolic al extractelor de *Nigella sativa* L. respectiv *Nigella damascena* L. prin HPLC –MS și HPLC-UV au relevat prezența unor flavonoide și flavonoli care determină efectul antioxidant, mai puternic la extractul din semințe de *N. damascena*, dar efect diuretic și natriuretic mai pronunțat s-a stabilit la extractul din semințe de *N. sativa*.

Produsele apicole la rândul lor sunt surse bogate de polifenoli, mai ales în mostre de diferite origini de propolis s-au putut evidenția prin CSS și HPLC-UV diferiți acizi fenolici (acid cafeic, acid ferulic și acid galic) respectiv flavonoide (crizină, kaempferol).

Autoarea a studiat pe lângă polifenoli și fracțiunile lipofile ale unor extracte de plante identificând prin HPLC tocoferolii din uleiul de *Hippophae rhamnoides* L. respectiv cel de germeni de Grâu, prin GC sau GC-MS componentele de ulei gras din semințele de *Nigella sativa* L., care conține peste 63 % acid linoleic, un acid gras polinesaturat și de ulei volatil din semințele de *Nigella sativa* L. cu un conținut de peste 2 % carvacrol și 1,65 %

timochinonă având efect antiparazitar și imunostimulent. În extracte din Rozmarin, uscat respectiv proaspăt, s-a identificat 1,8-cineolul care este componentul majoritar în uleiul volatil separat prin hidrodistilare și în extractul gemoterapic, pe când în extractele alcoolice α -pinenul este componentul principal, indicând clare procese de degradare și hidroliză care au loc pe parcursul uscării plantelor.

Lipsa de informații despre compuși activi ce pot exista în țesuturile meristemate ale plantelor, folosite pentru obținerea extractelor gemoterapice, lipsa de monografii pentru controlul calității acestor produse vegetale și extracte a dus la o muncă de cercetare continuă de peste 20 de ani. Studiile au vizat în primul rând stabilirea unui profil fitochimic, iar mai târziu corelarea acestor compuși cu efectele biologice observate. Un alt aspect urmărit stabilirea unor parametri care să pună baza unor monografii sau specificații pentru controlul calității materialelor vegetale și a extractelor. Astfel studiile biometrice și corelarea acestora cu profilul fitochimic stabilit prin CSS a dus la stabilirea clară a perioadei de recoltare a mugurilor de *Ribes nigrum* L., acesta fiind la sfârșit de februarie – început de martie când mugurii au între 50 și 140 mm în lungime. Un studiu efectuat pe mai multe tipuri de extracte gemoterapice, pe un termen de 5-6 ani, a reușit să stabilească mai clar condițiile și termenul de recoltare optim a mugurilor și mlădițelor: mugurii trebuie recoltați la sfârșitul iernii – începutul primăverii, iar mlădițele la sfârșitul primăverii – începutul verii. Prin HPLC-UV s-a stabilit profilul polifenolic al extractului din mlădițe de Rozmarin corelat cu efect antioxidant semnificativ, asemănător extractului clasic. Studiul CSS și HPLC-UV al extractelor gemoterapice de la specii de Ericaceae a dus la identificarea hiperozidei, cvercitolului și acidului clorogenic din clasa polifenolilor respectiv a arbutozidei, compusul specific acestei familii de plante, cu efect antiseptic, mai ales a căilor urinare. Analiza HPLC-UV și CSS respectiv spectrofotometria UV-Vis s-a aplicat și la studiul comparativ a diferitelor extracte de Păducel (*Crataegus oxyacantha* L.), extract alcoolic din flori cu frunze, din fructe respectiv extractul gemoterapic din mlădițe. Studiul a relevat o concentrație crescută de flavonoide în extractul gemoterapic care a prezentat un efect antioxidant puternic, de 2,5 ori mai mare față de tinctura din flori și frunze respectiv un efect inhibitor mare al radicalului de oxid nitric, confirmând efectul benefic al acestui extract gemoterapic pe sistemul cardio-vascular și mai ales asupra endoteliului vascular. În cazul extractului de Castan sălbatic (*Aesculus hippocastanum* L.) extractul gemoterapic din muguri conține în special cumarine, de tipul esculetină, pe când tinctura din semințe conține saponozide triterpenice de tipul escinei. Acesta indică extractul gemoterapic mai mult ca și anticoagulant, diferențiindu-l net de extractul clasic. Printre ultimele rezultate publicate în domeniul gemoterapiei este contribuția autoarei la un articol tip monografie a unui extract gemoterapic mai puțin cunoscut, extractul din muguri de Arborele lui Iuda (*Cercis siliquastrum* L.), specie care nu este clasic folosit în fitoterapie.

Începând din 2003, după obținerea titlului de doctor, autoarea a publicat 77 articole în reviste indexate ISI sau BDI, dintre care la 33 este autor principal, dintre care 3 au IF > 1 și 1 articol are IF > 2 respectiv alte 9 articole în reviste neindexate dintre care la 8 este autor

principal. A participat la peste 20 de manifestări științifice naționale și internaționale, având în acest moment indicele Hirsch de 7 conform bazei de date Scopus și Web of Science.

După obținerea titlului de doctor autoarea a participat la 3 granturi: proiectul PN-III-P2-2.1-CI-2017-0406 cu titlul "Metode enzimatică de evaluare *in vitro* a eficacității unor extracte din țesuturi meristemice" la care autoarea a fost director de proiect, a fost câștigat în 2017 și derulat până în 31 decembrie 2017, iar rezultatele urmează să fie publicate respectiv un proiect câștigat în 2016 la care autoarea este responsabil de partener: PN-III-CERC-CO-BG-2016, "Inițierea unei noi game de produse fitoterapeutice în portofoliul de produse al companiei SC PlantExtrakt SRL", care este încă în derulare.

Din 2009 autoarea a intrat și în mediul academic devenind prima dată șef de lucrări și apoi din 2012 conferențiar universitar la Facultatea de Farmacie a Universității de Vest Vasile Goldiș din Arad. Din 2009 a predat cursul și lucrările practice de Industria Medicamentului și Biotehnologiei Farmaceutice, urmând ca din 2012 să susțină cursul de Chimie terapeutică la studenții de la specializarea Farmacie. Din 2013 a predat și cursul opțional de Suplimente alimentare la specializarea Farmacie și din 2016 la specializarea Nutriție și dietetică.

Planul de dezvoltare a cariei urmăresc continuarea direcțiilor de cercetare în care autoarea s-a implicat și până acum, respectiv dezvoltarea ariei de cercetare a extractelor gemoterapice cu studii microscopice, de UHPLC, genetice și farmacologice prin integrarea într-un grup de cercetare complex cu profesioniști din diverse domenii. Principala direcție se dorește a rămâne gemoterapia în care autoarea dorește să realizeze studii care să explice efecte observate, respectiv să identifice noi potențiale terapeutice și să publice cât mai multe rezultate pentru popularizarea acestor noi tipuri de extracte. În acest sens va propune și proiecte de cercetare și va urmări dezvoltarea continuă și modernizarea laboratoarelor de controlul calității ale firmei la care activează. Pe plan didactic are în vedere modernizarea, actualizarea și perfecționarea continuă a cursurilor predate, dorește să propună introducerea de noi cursuri opționale, post-universitare și dacă este posibil chiar un masterat în domeniul gemoterapiei. Autoarea dorește ca prin perfecționarea cursurilor să publice cărți de specialitate în sprijinul studenților, dar și a profesioniștilor din domeniul sănătății.

ABSTRACT

After the PhD graduation the author has carried out her scientific and professional activity in pharmaceutical industry, in the quality control and research of vegetal materials, plant extracts, being involved especially in the field of gemmotherapeutic extracts. Later she has begun the academic activity, teaching Industrial Pharmacy and Pharmaceutical Biotechnologies respectively Therapeutic (Medical) Chemistry.

The main research directions of her scientific activity include the development of analytical methods for quality control of some vegetal materials respectively plant extracts. More deeply was preoccupied by the phytochemical study of the gemmotherapeutic extracts. Another important task of her researches were directed on the correlation possibilities of the identified bioactive compounds with their potential biological effects.

A main part of the phytochemical studies were made to evaluate, both qualitatively and quantitatively, the different classes and compounds with polyphenol structure, using different chromatographic and spectral methods.

Using modern chromatographic methods, HPLC-UV/MS or HPLC-MS/MS were studied 12 species from Fabaceae family. The studies revealed the presence of izoflavones, as heterosides: daidzine, genistine or ononine respectively as aglyca: daidzeine, genisteine, glyciteine or formononetine. The richest izoflavone source was found to be the species *Genista tinctoria* L., *Genistella sagittalis* (L.) Gam and the different Clover species (*Trifolium* sp.). Due by the isoflavones phytoestrogenic effect these species could have the potential to reduce the risk of hormonal dependent cancer development, respectively to develop arthritis or different neurodegenerative diseases. From the class of polyphenols were identified the ferulic acid and p-coumaric acid (class of phenolic acids) respectively hyperoside, isoquercitrine and apigenine (class of flavonoids) mainly in *Trifolium pratense* L., *Medicago sativa* L., *Genista tinctoria* L. and *Genista sagittalis* (L.) Gam. Beside these the rutoside, cvercitrine and luteoline, from class of flavonoids, were identified in *Cytisus nigricans* L. and *Cytisus albus* L. Due by the radical scavenging property of polyphenols in many cases the high polyphenol content could be correlated with significantly high antioxidant capacity, demonstrated by different spectral, *in vitro*, methods: DPPH, TEAC, ORAC, EPR. These was confirmed especially at Clover species and at *Cytisus nigricans* L. At polyphenol rich Clover species the bioactive compounds content could be correlated also with a mild, but significant antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* și *Salmonella typhimurium*.

Using the same HPLC-UV and HPLC-MS methods were identified a lot of polyphenols: in *Chrysanthemum balsamita* (L.) Baillon the p-coumaric acid, the rutoside, quercitrine, quercetol and kaempferol; in *Lysimachia nummularia* L. and *Lysimachia vulgaris* L. p-coumaric acid, izoquercetrin, rutoside, quercitrin, quercetol and luteoline; in *Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. et A. Gray the p-coumaric acid, izoquercitrin, rutoside, quercitrine and kaempferol. Due by these compounds these species have significant antioxidant potential,

demonstrated by different *in vitro* spectral methods: DPPH, TEAC, FRAP, CUPRAC, SNP and EPR.

It have been correlated the polyphenols content of 13 tinctures obtained from indigenous species with the antioxidant capacity determined by DPPH, TEAC and FRAP methods. From these the *Salix alba* L. bark tincture was proved to be the most valuable. At Lamiaceae species exist a special polyphenol, the rosmarinic acid, that could be identified and quantitatively determined by HPLC-MS. From 6 Lamiaceae species studied *Origanum vulgare* L. had the highest rosmarinic acid content and antioxidant capacity, determined by DPPH and EPR methods. The extracts from *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* proved significant antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*.

The polyphenols like flavonoids and phenolic acids could be identified also by TLC, then the quantitative determination was made by photodensitometry. The total flavonoid respectively phenolic acids contents were determined by UV-Vis spectrophotometry. Using these methods were identified from the *Robinia pseudacacia* L. flowers and leaves the hyperoside and rutoside respectively different polyphenols from different extracts and parts of plant from 4 different indigenous *Ranunculus* species, from that the most valuable for therapeutic use were found the extracts of *R. ficaria* și *R. bulbosus* herb.

The polyphenols profile of the *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. extracts were performed by HPLC-MS and HPLC-UV, be found some flavonoids and flavonols, due that the *N. damascena* seed extract is a powerful antioxidant and the *N. sativa* seed extract has diuretic and natriuretic effects.

The bee products are rich sources of polyphenols, especially in different propolis samples of different origins have been identified by TLC and HPLC-UV different phenolic acids (caffeic acid, ferulic acid, gallic acid) respectively flavonoids (chrysin, kaempferol).

The author of this thesis studied beside the polyphenols also the lipophilic fraction of some extracts identifying by HPLC-FD the tocopherols from *Hippophae rhamnoides* L. oil and wheat germ oil, by GC and GC-MS the fatty oils components of *Nigella sativa* L. seeds, that contains more than 63 % linoleic acid, an unsaturated fatty acid respectively the volatile oil components of *Nigella sativa* L. seeds, that contain more than 2 % carvacrole and 1,65 % thymoquinone with antiparasitary and immunostimulating effects. The volatile oil components were identified also from different Rosemary extracts obtained from dry and fresh vegetal material and was found that the main compound from hydrodistilled volatile oil and gemmotherapeutic extract is the 1,8-cineole respectively from hydroalcoholic extracts is the alpha-pinene, clearly indicating that during the drying process in plant material take place degradation and hydrolytic processes.

The lack of information regarding the bioactive compounds from meristematic tissues, used to obtain the gemmotherapeutic extracts, the lack of monographs for the quality control of the vegetal raw materials and extracts lead the authors to a research work that during in last 20 years. The studies regard mainly the establishing of the phytochemical

profile of the plants and extracts, and later also to establish a correlation of the found compounds with the observed biological effects. Other task that was of interest was the establishing some quality parameters that could be the base of some monographs and quality specification used at quality control of vegetal raw materials and extracts. The correlation of the biometrical studies and the phytochemical profile obtained by TLC lead to the establishing of the optimal harvesting time of *Ribes nigrum* L. buds as being at the end of February – begin of March, when the size of buds are from 50 to 140 mm in length. A study that compare the different gemmotherapeutic extracts, obtained during the last 5-6 years, succeed to establish the optimal harvesting time of the buds and young shoots: the buds must be collected at the end of the winter – begin of the springtime, the young shoots must be collected at the end of springtime – begin of summer. By HPLC-UV was established the polyphenols profile of the Rosemary young shoots gemmotherapeutic extract that is correlated with a significant antioxidant capacity, similiary with those of classical extract. Using TLC and HPLC-UV on gemmotherapeutic extracts obtained from Ericaceae family young shoots were identified in them the hyperoside, quercetol and chlorogenic acid, respectively a family specific compound, the arbutoside, due by that these extracts have antiseptic effect, mainly on urinary tract. The TLC, HPLC-UV and UV-Vis spectrophotometry was used to made a comparative study on different Hawthorn extracts (*Crataegus oxyacantha* L.) made from flowers with leaves, fruits and young shoots. The study revealed that the gemmotherapeutic extract from young shoots have a high flavonoid content correlated with a significantly high antioxidant effect, with 2,5 more than those observed at the tincture from flowers and leaves. It show also a high inhibition of the nitric oxid radicals, confirming the beneficial effect of the Hawthorn young shoots extract on cardio-vascular system and mainly on vascular endothelium. In case of *Aesculus hippocastanum* L. the gemmotherapeutic extract obtained from buds contains mainly coumarins, like esculetine, the classical extract from seeds, contains mostly triterpenic saponins, like escine. This propose the gemmotherapeutic extract more as anticoagulant, making a clear difference from the classic extract. One of the last publication of the author is her contribution to a monograph article regarding the *Cercis siliquastrum* L. buds gemmotherapeutic extract, a specie that is not used in classical phytotherapy.

From 2003, after the PhD graduation, the author has published 77 articles in different ISI and BDI indexed journals, from these at 33 is main author and from these 3 have the IF>1 and 1 has IF>2. She published also other 9 articles in not indexed journals from that at 8 is main author. She attended to more than 20 national and international scientific conferences, having in this moment the Hirsch index of 7 (Scopus database and Web of Science).

After the PhD graduation the author participated at 3 research projects: the project PN-III-P2-2.1-CI-2017-0406 with title “In vitro enzymatic methods to evaluate the efficacy of some meristematic tissues extracts” at that the author was project manager, won in 2017 and ended in 31st of December 2017, the results will be published in next time respectively

a project won in 2016 at that the author is partner responsible: PN-III-CERC-CO-BG-2016, having as title "Initiation of a new phytotherapeutic products brand in SC PlantExtrakt SRL portofolio", that is in progress.

In 2009 the author was involved in academic work, being first time lecturer and than, from 2012, associated professor at the Faculty of Pharmacy, Vasile Goldiș Western University from Arad. From 2009 taught the course and laboratory applications to Industrial Pharmacy and Pharmaceutical Biotechnologies, than from 2012 supports also the course of Therapeutic (Medical) Chemistry at the students from Pharmacy. From 2013 supports also the optional course of Food supplements at student from Pharmacy and from 2016 also at the students from Nutrition and dietetics.

The university career development wish to continue the research directions in that the author was involved in last years, respectively she wish to develop the research area of gemmotherapeutic extracts with microscopic, UHPLC, genetic and pharmacologic studies by involving into a complex research team of professionals from different domains. The main research direction will remain the gemmotherapy in that field the author wish to explain the observed effects, to identify new potential therapeutic uses and to publish more results to inform the people regarding these new extracts. She will propose research projects and will help to the continuous development and modernization of the quality control laboratories of the company where is activating. On teaching field the author wish to develop, update and perfecting continuously the courses, to propose new optional courses for curricula, to propose post-university and, if is possible, master school courses, mainly in the field of gemmotherapy. The author wish that by updating of courses to publish books to sustain the teaching process at students, but also to be a help for the professionals.