

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

**TEZĂ DE DOCTORAT
- REZUMAT -**

**CERCETĂRI FARMACOBOTANICE COMPARATIVE
ASUPRA UNOR SPECII DE *HYPERICUM* DIN JUDEȚUL
BIHOR**

**Conducător științific
Prof. Dr. MIRCEA TĂMAȘ**

**Doctorand
DANIELA GÎTEA**

CUPRINS

I. INTRODUCERE	6
1.1. Importanța speciei <i>Hypericum perforatum</i> L. pentru fitoterapie.....	6
1.2. Motivarea temei.....	10
II. STADIUL CUNOAȘTERII	12
2.1. Scurt istoric al utilizării speciei <i>Hypericum perforatum</i> L. în fitoterapie.....	12
2.2. Date botanice asupra speciilor de <i>Hypericum</i>	14
2.2.1. Încadrarea sistematică.....	14
2.2.2. Caractere generale ale familiei <i>Hypericaceae</i>	15
2.2.3. Caractere generale ale genului <i>Hypericum</i> L.....	16
2.2.4. Specii de <i>Hypericum</i> din Flora Europei.....	16
2.2.5. Specii de <i>Hypericum</i> din Flora României.....	20
2.2.6. Cheia de determinare a speciilor de <i>Hypericum</i> din Flora României.....	21
2.2.7. Criterii de diferențiere morfologică, anatomică și chimică între speciile de <i>Hypericum</i>	23
2.2.8. Denumiri populare pentru speciile de <i>Hypericum</i>	42
2.3. Specii de <i>Hypericum</i> din flora spontană a Jud. Bihor.....	43
2.3.1. Caracterizarea geografică și climatică a Jud. Bihor.....	43
2.3.2. Caracterizarea vegetației din județul Bihor.....	47
2.3.3. Specii de <i>Hypericum</i> citate în flora spontană a Jud. Bihor.....	48
2.4. Introducerea în cultură a speciei <i>H. perforatum</i> L., condiții de recepție, substituiri.....	50
2.5. Produsul vegetal medicinal obținut din specii de <i>Hypericum</i>	53
2.5.1. <i>Hyperici herba</i> în Farmacopeele Române și Farmacopeea Europeană.....	55
2.6. Date privind compoziția chimică a speciilor de <i>Hypericum</i>	56
2.6.1. Flavonoide.....	56
2.6.2. Diantrone.....	59
2.6.3. Hiperforine.....	62
2.6.4. Uleiul volatil.....	65
2.6.5. Taninuri.....	68
2.7. Date privind acțiunea farmacologică a speciilor de <i>Hypericum</i>	69
2.8. Produse fitoterapeutice obținute din specii de <i>Hypericum</i>	72
2.9. Cercetări românești asupra speciilor de <i>Hypericum</i>	79
III. CERCETĂRI PROPRII	81
3.1. Materialul vegetal utilizat în cercetare.....	81
3.1.1. Recoltarea și conservarea materialului vegetal.....	81
3.2. Analiza morfologică a speciilor de <i>Hypericum</i> recoltate din județul Bihor, la microscopul binocular.....	87
3.2.1. Tehnica de analiză.....	87
3.2.2. Caracterizarea morfologică a organelor florale și vegetative.....	87
3.2.3. Rezultate și discuții.....	104
3.2.4. Concluzii.....	106
3.3. Analiza microscopică a organelor vegetative.....	106
3.3.1. Tehnica efectuării preparatelor microscopice.....	106
3.3.2. Structura anatomică a tulpinii.....	109
3.3.3. Structura anatomică a frunzelor.....	118

3.3.4. Rezultate și discuții	124
3.3.5. Concluzii.....	125
3.4. Determinarea densității buzunarelor (pungilor) secretoare.....	126
3.4.1. Tehnica de lucru.....	126
3.4.2. Rezultate și discuții.....	127
3.4.3. Concluzii.....	129
3.5. Studii fitochimice comparative asupra speciilor de <i>Hypericum</i>.....	129
3.5.1. Analiza calitativă și cantitativă a polifenolilor (flavonoide și derivați de acid cafeic) din specii de <i>Hypericum</i>	130
3.5.1.1. Analiza calitativă a polifenolilor din specii de <i>Hypericum</i> prin cromatografia pe strat subțire (CSS).....	143
3.5.1.1.1. Tehnica de analiză.....	143
3.5.1.1.2. Rezultate și discuții.....	144
3.5.1.1.3. Concluzii.....	147
3.5.1.2. Analiza calitativă și cantitativă a polifenolilor prin HPLC.....	147
3.5.1.2.1. Tehnica de analiză.....	148
3.5.1.2.2. Rezultate și discuții.....	151
3.5.1.2.3. Concluzii.....	169
3.5.1.3. Analiza cantitativă a flavonoidelor prin tehnica spectrofotometrică.....	169
3.5.1.3.1. Tehnica de analiză.....	169
3.5.1.3.2. Rezultate și discuții.....	171
3.5.1.3.3. Concluzii.....	172
3.5.1.4. Analiza comparativă între rezultatele determinărilor cantitative spectrofotometrice și cele obținute prin HPLC.....	172
3.5.2. Analiza calitativă și cantitativă a hipericinilor din specii de <i>Hypericum</i>	173
3.5.2.1 Analiza calitativă a hipericinei prin CSS.....	179
3.5.2.1.1. Tehnica de analiză.....	180
3.5.2.1.2. Rezultate și discuții.....	181
3.5.2.1.3. Concluzii.....	183
3.5.2.2. Analiza calitativă și cantitativă a hipericinilor prin HPLC.....	184
3.5.2.2.1. Tehnica de analiză.....	184
3.5.2.2.2 Rezultate și discuții.....	187
3.5.2.2.3. Concluzii.....	190
3.5.2.3. Determinarea cantitativă a hipericinilor prin tehnica spectrofotometrică.....	190
3.5.2.3.1. Tehnica de analiză.....	191
3.5.2.3.2. Rezultate și discuții.....	192
3.5.2.3.3. Concluzii.....	194
3.5.2.4. Analiza comparativă a rezultatelor obținute prin cele 3 tehnici.....	195
3.5.2.5. Localizarea și repartizarea hipericinilor în organele vegetative și florale ale speciilor de <i>Hypericum</i>	196
3.5.2.5.1. Localizarea și repartizarea hipericinilor în organele florale ale speciei <i>H. hirsutum</i> L.....	196
3.5.2.5.1.1. Tehnica de analiză.....	197
3.5.2.5.1.2. Rezultate și discuții.....	197
3.5.2.5.2. Repartizarea hipericinilor în organele florale și vegetative ale speciei <i>H. maculatum</i> Crantz și <i>H. perforatum</i> L.....	199
3.5.2.5.2.1. Rezultate și discuții.....	199
3.5.2.5.3. Concluzii.....	200
3.5.3. Analiza calitativă și cantitativă a hiperforinei din specii de <i>Hypericum</i>	201

3.5.3.1. Tehnica de analiză.....	201
3.5.3.2. Rezultate și discuții.....	203
3.5.3.3. Concluzii.....	208
3.5.4. Analiza uleiului volatil din specii de <i>Hypericum</i>	208
3.5.4.1. Determinarea cantitativă a uleiului volatil.....	209
3.5.4.1.1. Tehnica de analiză.....	209
3.5.4.1.2. Rezultate și discuții.....	210
3.5.4.1.3. Concluzii.....	210
3.5.4.2. Analiza calitativă prin cromatografia pe strat subțire.....	211
3.5.4.2.1. Tehnica de analiză.....	211
3.5.4.2.2. Rezultate și discuții.....	212
3.5.4.2.3. Concluzii.....	213
3.5.4.3. Analiza calitativă și cantitativă a uleiului volatil prin GC-SM.....	213
3.5.4.3.1. Tehnica de analiză.....	214
3.5.4.3.2. Rezultate și discuții.....	215
3.5.4.3.3. Concluzii.....	220
IV. CONCLUZII FINALE.....	221
V. BIBLIOGRAFIE.....	228

Cuvinte cheie: *H. perforatum* L., *H. maculatum* Crantz, *H. tetrapterum* Fries, *H. hirsutum* L., *Hypericaceae*, județul Bihor, cercetări morfologice și anatomice, structuri secretoare, analize calitative și cantitative, flavonozide, hipericine, hiperforina, ulei volatil, CSS, HPLC-SM, GC-SM.

I. INTRODUCERE

În acest capitol se prezintă importanța speciei *H. perforatum* L. și un scurt istoric al utilizării plantei, din antichitate, peste evul mediu până la medicina modernă, cu indicațiile terapeutice caracteristice și principalele forme farmaceutice (1.1.) precum și motivarea alegerii temei de cercetare (1.2.).

Urmărind evoluția acestei plante în fitoterapie, din antichitate până în prezent, constatăm că produsul *Hyperici herba* este un exemplu elocvent pentru ceea ce înseamnă fitoterapie modernă trecând de la utilizarea empirică la cea științifică, a extractelor standardizate. Acestea sunt caracterizate farmacologic, chimic și clinic, fără efecte secundare dar cu contraindicații bine argumentate și precizate, reprezentând un succes în cadrul terapiei naturale bazate pe plante.

Pornind de la considerentul că proprietățile farmacologice și cele terapeutice ale unei specii sunt date de componentele lor chimice sau așa numitele principii active, specifice fiecărei specii, ne-am propus să studiem, comparativ, caracterele morfoanatomice și chimice diferențiale ale principalelor specii care vegetează în flora spontană a Județului Bihor, pentru a folosi apoi aceste caractere ca un criteriu de diferențiere între specii, pentru identificarea substiturilor speciei oficinale. Menționăm că asemenea cercetări referitoare la speciile de *Hypericum* nu au mai fost efectuate în România.

II. STADIUL CUNOAȘTERII

În prima parte a capitolului (2.1.) *Stadiul cunoașterii* se prezintă o incursiune în istoricul folosirii speciei *H. perforatum* L. în medicină, cea mai cunoscută dintre speciile de *Hypericum* supuse studiului, etimologia numelui de gen și specie, evaluările farmacologice prezente și de perspectivă.

Se prezintă apoi în capitolul 2.2. datele botanice asupra speciilor de *Hypericum*, începând cu încadrarea sistematică (2.2.1.) în diferite sisteme de clasificare, caracterele generale ale Familiei *Hypericaceae* (2.2.2), ale genului *Hypericum* (2.2.3), enumerarea speciilor de *Hypericum* din Europa (2.2.4) și din România (2.2.5) și cheile de determinare (2.2.6).

În Europa vegetează 61 specii grupate în 16 secțiuni iar în România sunt citate 11 specii spontane și una cultivată.

În subcapitolul 2.2.7. sunt prezentate principalele criterii de diferențiere morfologică, anatomică și chimică între speciile de *Hypericum* cu sublinierea caracterelor morfologice, ecologia și răspândirea. Datele histoanatomice ale speciilor de *Hypericum* se referă doar la specia oficială *H. perforatum* L. iar cel mai recent studiu este cel al Danielei Ciccarelli (2001) care a arătat prezența unor canale secretoare de 3 tipuri. Caracterele chimice diferențiale sunt prezentate într-un tabel sinoptic pe baza prelucrării datelor din lucrările diferiților autori citați.

Datele etnobotanice și denumirile populare ale speciilor de *Hypericum* supuse studiului sunt prezentate în subcapitolul 2.2.8.

Capitolul 2.3. este consacrat descrierii reliefului, florei și vegetației din Jud. Bihor, din care provin speciile studiate, cu o scurtă caracterizare a condițiilor fizico-geografice și climatice ale zonei. Din analizele datelor floristice și de vegetație a zonei rezultă că în Jud. Bihor sunt menționate 6 specii de *Hypericum*. (2.3.3).

În capitolul 2.4. se prezintă tehnologia de introducere în cultură a speciei oficinale.

Caracterizarea produsului vegetal medicinal este prezentată în capitolul 2.5., la fel și condițiile tehnice de recepție. De remarcat este faptul că produsul *Hyperici herba* a fost inclus în toate edițiile Farmacopeei Române, ceea ce sugerează importanța acestui produs pentru fitoterapie. Subcapitol 2.5.1. prezintă comparativ prevederile Farmacopeei Române și europene (2008) în vigoare. Rezultă că FR X nu prevede decât dozarea substanțelor solubile (min. 20%) față de cea europeană care prevede un conținut minim de 0,08 % hipericine totale în produsul uscat.

Capitolul 2.6. prezintă date privind compoziția chimică a speciilor de *Hypericum*. Cele mai importante principii active ale acestui produs vegetal sunt: flavonoidele, diantronele, hiperforinele, uleiul volatil și taninurile.

Capitolul 2.7. prezintă acțiunea farmacologică a speciilor de *Hypericum*, dintre cele mai importante fiind: acțiunea coleretic-colagogă, antipruriginoasă, capilaro-protectoare, diuretică, antidepresivă, antivirală, antimicrobiană, grăbește procesul de vindecare al plăgilor și arsurilor, antiinflamatoare, antiasmatică.

Capitolul 2.8. prezintă cele mai importante produse fitoterapeutice obținute din specii de *Hypericum*, între care ceaiuri medicinale simple și compuse, tincturi, extracte, comprimate, capsule cu extracte uscate și cremele. Partea generală se încheie cu un capitol ce cuprinde contribuțiile românești în cercetarea speciilor de *Hypericum* (2.9.).

III. CERCETĂRI PROPRII

Cuprinde cercetările personale privind analiza botanică și fitochimică a produselor vegetale obținute de la specii de *Hypericum* recoltate din flora spontană a județului Bihor.

Primul capitol (3.1) prezintă speciile luate în lucru, perioada și locul de recoltare, harta de localizare a stațiunilor citate și a celor din care au fost recoltate probele pentru cercetările proprii și obținerea materiilor prime vegetale. Am folosit ca material de studiu partea aeriană înflorită (*herba*), uscată după recoltare, obținută de la speciile: *H. perforatum* L., *H. tetrapterum* Fries., *H. maculatum* Crantz. cu două subspecii *maculatum* și *immaculatum* și *H. hirsutum* L.

Capitolul 3.2. prezintă rezultatele obținute în analiza morfologică a speciilor de *Hypericum*, realizată la un stereomicroscop la care s-a adaptat un aparat foto digital. Din analiza imaginilor obținute se pot observa caracterele morfologice care pot face foarte ușor diferența între cele 4 specii de *Hypericum*. Cele mai importante sunt: tipul inflorescenței, forma sepalelor, forma tulpinilor, forma frunzelor, prezența sau absența glandelor sau canalelor secretoare de pe sepal, petale și frunze precum și forma lor.

Capitolul 3.3. prezintă cercetările anatomice realizate prin analiza microscopică a tulpinilor și frunzelor de la cele 4 specii de *Hypericum* (*H. perforatum* L., *H. maculatum* Crantz, *H. tetrapterum* Fries, *H. hirsutum* L.). Din analiza acestor secțiuni se evidențiază caracterele diferențiale cu mare valoare în diagnoza speciilor, între care numărul și poziția muchiilor sau creștelor, prezența perilor tectori epidermici și a canalelor și glandelor secretoare localizate în diferite țesuturi ale tulpinilor și frunzelor.

Capitolul 3.4. prezintă determinarea densității buzunarelor secretoare de la nivelul frunzelor prin examinare la microscop, pe unitate de suprafață (mm²), folosind lame micrometrice și micrometre ocular ce au trasate pătrate de 1 mm². Rezultatele obținute prezintă media acestora pe mm² de 13,10, la *H. perforatum*, 7 la *H. maculatum*, 28,4 la *H. tetrapterum* și 21,4 la *H. hirsutum*.

Capitolul 3.5. cuprinde un studiu fitochimic comparativ asupra speciilor de *Hypericum* recoltate din flora spontană a județului Bihor. Studiul a urmărit determinarea cantitativă și calitativă a 4 grupe de principii active: compși polifenolici, hipericine, hiperforina și uleiul volatil din cele 4 specii de *Hypericum* recoltate din flora spontană a jud. Bihor. Pentru fiecare clasă de substanțe se prezintă la început, tehnicile generale și specifice de analiză ale acestora.

Subcapitolul 3.5.1. prezintă analiza calitativă și cantitativă a polifenolilor (flavonoide și derivați de acid cafeic) din specii de *Hypericum* prin trei metode: Cromatografia pe strat subțire (CSS), Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) și prin tehnica spectrofotometrică.

În subcapitol 3.5.1.1. sunt analizate calitativ prin CSS flavonoidele și compușii fenilpropanici din 8 probe de material vegetal de *Hypericum* din cele 4 specii și din comprimate de Remotiv^R (Ewopharma- Bratislava - un comprimat filmat conține 250 mg extract uscat de *Hyperici herba*). Rezultatele analizelor arată că flavonoidele sunt bine reprezentate, identificând 4 glicozide flavonoidice majore din speciile de *Hypericum*: rutozida, hiperozida, izoquercitrozida și quercitrozida. Dintre acestea rutozida este prezentă numai în *H. perforatum*, fapt ce se constituie într-un criteriu de identificare chimică, prin CSS, a speciei oficinale, celelalte trei flavonozide fiind prezente în toate probele și speciile analizate. Pentru comprimatele de Remotiv^R au fost observate zone caracteristice ca și pentru *H. perforatum* confirmând sursa pentru realizarea acestor comprimate.

În subcapitolul 3.5.1.2. sunt analizate cantitativ prin HPLC compușii polifenolici din 4 specii de *Hypericum*, utilizând 18 substanțe etalon. Această tehnică are o rezoluție mai mare de separare dar are și avantajul că poate cuantifica fiecare individ chimic separat cu ajutorul

unor curbe de calibrare cu substanțe etalon. Studiul comparativ al compușilor polifenolici a arătat în special diferențe de ordin cantitativ între speciile de *Hypericum* studiate. Hiperozida este compusul flavonic cel mai bine reprezentat cantitativ la toate speciile de *Hypericum* analizate (*H. perforatum* L - 665,38 mg%, *H. maculatum* Crantz - 976,36mg% ptr. *ssp. typicum* și 905,87mg% ptr. *ssp. immaculatum*, *H. tetrapterum* Fries - 545,14 mg%, *H. hirsutum* L. - 470,5 mg%) iar izoquercitrozida și quercitrozida au fost și ele cuantificate în toate speciile analizate dar în concentrații mai mici. A fost confirmată cantitatea mică de rutozidă din *H. maculatum* Crantz (8,57mg% ptr. *ssp. immaculatum* și 6,49mg% ptr. *ssp. typicum*) și *H. tetrapterum* Fries (10,5mg%) față de cea din *H. perforatum* (462,82mg%).

În ceea ce privește compușii fenil-propanici, *acidul gentisic*, *acidul clorogenic* și *acidul cafeic* au putut fi confirmați prin SM iar *acidul p-cumaric* și *acidul ferulic* au fost cuantificați atât în probele nehidrolizate cât și în cele hidrolizate în concentrații care variază de la 2, 36 mg%, pentru acidul p-cumaric în *H. maculatum ssp. typicum*, până la 17,30 mg% pentru ac. ferulic în *H. tetrapterum*.

Prin această metodă s-au cuantificat și agliconii în probele hidrolizate. Luteolina s-a identificat doar în extractul hidrolizat și nehidrolizat de *H. maculatum ssp. typicum*. Agliconul cu concentrația cea mai mare este quercetolul obținut în urma hidrolizei la toate probele analizate (*H. perforatum* L - 533,03mg%, *H. maculatum* Crantz - *ssp. typicum* 435,58mg% *ssp. immaculatum* 371,71mg%, *H. tetrapterum* Fries - 181,77mg%, *H. hirsutum* L. - 659,66mg%).

În subcapitolul **3.5.1.3.** am determinat cantitativ, prin tehnica oficială, spectrofotometrică, din FR X, flavonoidele totale, exprimate în rutozidă pe baza unei curbe de calibrare construită cu această substanță. Rezultatele arată un conținut foarte ridicat în *H. maculatum* (5,91-6,41 %), în *H. hirsutum* (5,67 %), în *H. perforatum* (3,81 %) și mai scăzut la *H. tetrapterum* (2,98 %), rezultatele confirmând pe cele obținute prin HPLC, dar arată și sensibilitatea mai mare a HPLC, prin această tehnică fiind identificate și urme de rutozidă în celelalte 3 specii.

Subcapitolul **3.5.1.4.** prezintă o analiză a rezultatelor obținute în determinarea cantitativă și calitativă a flavonoidelor prin cele trei metode (CSS, HPLC, spectrofotometric). Analizele HPLC cuplate cu spectrometria de masă, pentru flavonoide confirmă atât rezultatele obținute în analiza calitativă prin CSS cât și cele cantitative obținute prin determinarea spectrofotometrică.

Subcapitolul **3.5.2.** prezintă analiza calitativă și cantitativă a hipericinilor din cele 4 specii de *Hypericum* recoltate din flora spontană a județului Bihor, prin CSS, HPLC și tehnica spectrofotometrică după Ph.Eu (2008). Grupul hipericinilor reprezintă principiul activ cel mai studiat din compoziția chimică a speciilor de *Hypericum*. Interesul pentru cunoașterea cât mai exactă a compoziției chimice a speciilor de *Hypericum*, este justificat întrucât aceasta poate reprezenta un criteriu suplimentar de diferențiere a speciilor, pe de o parte, iar pe de altă parte pentru a stabili o legătură între compoziția chimică și acțiunile sale farmacologice.

Subcapitolul **3.5.2.1** prezintă analiza calitativă a hipericinilor din specii de *Hypericum* și preparatul farmaceutic Remotiv^R prin CSS o metodă oficială în Farmacopeea Europeană. Prin această metodă am pus în evidență hipericinele (hipericina la R_f = 0,85 și pseudohipericina la R_f = 0,80) de culoare și fluorescență roșie, alături de flavone, într-un extract alcoolic obținut din părțile aeriene ale celor 4 specii de *Hypericum* studiate. Din cromatogramă se poate constata că un conținut mai ridicat prezintă speciile *H. tetrapterum* și *H. maculatum ssp. typicum*, în timp ce speciile *H. maculatum ssp. immaculatum*, *H. hirsutum* și *H. perforatum* prezintă un conținut mai scăzut pentru ambele hipericine. Examinând cromatoplaca la lumina zilei am observat la *H. maculatum ssp. typicum* și *H. tetrapterum*, în partea inferioară a cromatogramei două pete de culoare roșie-violacee care ar putea fi protohipericinele citate în specii de *Hypericum*. Ar fi prima evidențiere a acestora prin CSS.

În preparatul Remotiv^R hipericinele sunt identice cu cele din *H. perforatum*, astfel că această analiză poate servi pentru stabilirea originii materiei prime utilizate la prepararea medicamentelor din speciile de *Hypericum*.

Subcapitolul 3.5.2.2. prezintă analiza calitativă și cantitativă a hipericinei prin HPLC. Din analiza rezultatelor se poate constata că *H. tetrapterum* prezintă cel mai ridicat conținut de hipericină (0,21 %), urmată de *H. perforatum* (0,16 %), *H. hirsutum* (0,05 %), iar cel mai scăzut conținut se înregistrează la *H. maculatum* ssp. *typicum* (0,03 %).

Subcapitolul 3.5.2.3. prezintă rezultatele obținute din determinarea cantitativă a hipericinelor prin tehnica spectrofotometrică din 4 specii de *Hypericum* (*H. perforatum* L., *H. maculatum* Crantz, *H. tetrapterum* Fries, *H. hirsutum* L.) și preparatul farmaceutic Remotiv^R. Conținutul cel mai ridicat de hipericine a fost înregistrat pentru *H. maculatum* ssp. *typicum* cu 0,496 % hipericine, de 5 ori mai ridicat decât prevederile Ph.Eu. (0,08 %), urmată de *H. maculatum* ssp. *immaculatum* (0,211%), *H. tetrapterum* (0,189%), *H. perforatum* (0,163 %), cel mai scăzut conținut fiind înregistrat la *H. hirsutum* (0,096%). Conținutul mai scăzut în hipericine la *H. hirsutum* poate fi corelat cu prezența glandelor secretoare de hipericină doar pe fimbriile sepalelor, în timp ce acestea lipsesc pe petale și, de asemenea, cu conținutul scăzut de flori din inflorescențele acestei specii. La această specie lipsesc țesuturile secretoare de hipericină, atât pe tulpini cât și pe frunze, pe aceste organe fiind prezente doar perii tectori simpli. S-a realizat și cuantificarea hipericinelor din preparatul farmaceutic Remotiv^R. Comprimatele de Remotiv^R au un conținut de 0,448 mg hipericine/comprimat, valoare foarte apropiată de cea declarată (0,500 mg).

Subcapitolul 3.5.2.4. prezintă o analiză a rezultatelor obținute în determinarea cantitativă și calitativă a flavonoidelor prin cele trei metode (CSS, HPLC, spectrofotometric). Prin aplicarea tehnicii spectrofotometrice se determină hipericinele totale în timp ce prin tehnica HPLC numai hipericina, aceasta explicând rezultatele mai scăzute obținute prin această tehnică.

Subcapitolul 3.5.2.5. aduce informații despre localizarea și repartizarea hipericinelor în organele vegetative și florale ale speciilor de *Hypericum*. S-a efectuat o localizare histologică a hipericinei în glandele secretoare din diferite organe vegetale (tulpină, frunze, sepale și petale) ale celor 4 de *Hypericum* din flora spontană a județului Bihor. Localizarea hipericinelor a fost efectuată pentru sepalele de *H. hirsutum* care prezintă glande secretoare negre în vârful lobilor. După o tehnică originală, prin presarea acestor glande cu un vârf de ac spatulat pe hârtie de filtru și apoi eluarea cu metanol a acestor pete și analiză CSS am identificat hipericinele în conținutul acestor glande. De asemenea am urmărit repartizarea hipericinelor în tulpini, frunze, sepale și petale de la cele 4 specii. Urmărind repartizarea hipericinelor am constatat că la specia *H. hirsutum* L. cantitatea cea mai mare de hipericină este prezentă în sepale iar la speciile *H. maculatum* Crantz și *H. perforatum* L. hipericina este prezentă în cantitatea cea mai mare în petale.

Subcapitolul 3.5.3. prezintă rezultatele analizei calitative și cantitative a hiperforinei din specii de *Hypericum*. Hiperforina, o substanță cu structură fluoroglucinică, a fost mai recent descoperită în compoziția speciilor de *Hypericum*, dar se consideră că ea imprimă în mare parte acțiunea antidepresivă. Această substanță nu a fost, până în prezent, cercetată în România. Hiperforina este prezentă în toate speciile analizate, dar conținutul este variabil, funcție de specie, cel mai ridicat conținut fiind prezent în specia oficială, 7,89 mg %, rezultat ce se încadrează în limitele raportate pentru această specie. În celelalte 3 specii conținutul este de 0,0771% la *H. maculatum* Crantz, de 0,0103% la *H. tetrapterum* L. și de 0,6702% la *H. hirsutum* L., concentrații net inferioare față de *H. perforatum* L.

Capitolul 3.5.4. prezintă analiza uleiului volatil din specii de *Hypericum*. Deși despre uleiul volatil din speciile de *Hypericum* se cunoaște că este localizat în buzunarele secretoare, acele zone transparente din frunză, până în prezente aceste substanțe nu au mai fost analizate

la speciile indigene. Pentru izolare și determinare cantitativă a uleiurilor volatile am utilizat tehnica oficială în FR X, prin antrenare cu vapori de apă în aparatul Neo-Clevenger metodă descrisă în subcapitolul 3.5.4.1. Am determinat un conținut considerat destul de scăzut pentru plante aromatice (0,1-0,2 %). Conținutul cel mai ridicat l-am înregistrat la *H.perforatum* (0,20 %), mai scăzut la *H.maculatum* (0,14 %) și la *H.hirsutum* (0,10 %). Analizând aceste rezultate pentru primele două specii se poate face o corelare între densitatea buzunarelor secretoare/mm² și conținutul în ulei volatil.

Subcapitolul 3.5.4.2. prezintă analiza calitativă prin CSS a uleiului volatil obținut din părțile aeriene ale speciilor: *H. perforatum* L., *H. maculatum* Crantz varietatea *typicum* și *H. hirsutum* L. Uleiurile volatile din speciile de *Hypericum* analizate sunt asemănătoare calitativ dar diferă în ceea ce privește conținutul în componentele majore. Cele mai multe componente din uleiul volatil au fost puse în evidență la specia *H. maculatum* și cele mai puține la *H. hirsutum*.

Subcapitolul 3.5.4.3. prezintă analiza calitativă și cantitativă a uleiului volatil prin GC-SM. După numărul de componente ale uleiurilor volatile *H. maculatum* are 39 de componente, *H. hirsutum* are 31 iar *H. perforatum* are 25 de componente. Prin GC/SM s-au separat și identificat mai multe componente dintre cele principale ale fiecărui ulei volatil: alfa pinenul (6,40%), transcariofilenul (30,97%), germacrenul D (16,26%) pentru *H.perforatum*, izocariofilenul (25,67%), transcariofilenul (8,39%), alfa pinen (3,69%) și germacrenul D (19,89%) pentru cel de *H.maculatum*, transcariofilenul (33,42%), undecan (13,44%), trans-beta-farnesen (14,26%) și spathulenol (13,11%) pentru uleiul volatil de *H.hirsutum*. Cele trei uleiuri volatile analizate sunt asemănătoare în privința unor componenți principali (ex.transcariofilenul) dar diferă proporția lor și de asemenea se aseamănă prin prezența unor hidrocarburi terpenice (alfa-pinen).

IV. CONCLUZII FINALE

Prezenta teză de doctorat și-a propus un studiu botanic și fitochimic comparativ al speciei oficinale *Hypericum perforatum* (sunătoare) cu alte specii de *Hypericum* răspândite în flora spontană a județului Bihor (*H. maculatum* Crantz, *H. tetrapterum* Fries, *H. hirsutum* L.). Acest studiu a pus în evidență caracterele comune și diferențiale dintre speciile de *Hypericum* recoltate din flora spontană a județului Bihor în vederea stabilirii cu precizie a identității speciilor.

Efectul antidepresiv al produsului vegetal *Hyperici herba* este dat de complexul fitochimic format din hipericină, hiperforină și flavone. Datorită conținutului crescut în hipericine și compuși flavanolic ai speciei *H. maculatum* propunem introducerea ei în produsul oficial *Hyperici herba*. De asemenea CSS poate să constituie o metodă de identificare ușoară pentru speciile care intră în produsul oficial *Hyperici herba*.

V. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. BARNES J., ANDERSON LA, PHILLIPSON JD.: St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J. Pharmacol*, 53(5), 2001, p.583-600;
2. STĂNESCU URSULA, MIRON ANCA, HĂNCIANU MONICA, APROTOSOAI CLARA: Plante medicinale de la A la Z, Vol I, Ed. „ Gr. T. Popa” UMF Iași, 2004, p.297-305;

3. SĂVULESCU T.: Flora Republicii Populare Române, Editura Academiei R.P.R., Vol. IV, 1956, p.23-45;
4. ***Flora Europaea, Rosaceae to Umbelliferae, vol.2, Cambridge, University Press, 1968, p.261-269;
5. MATHIS C., OURISSON G.: Etude chemo-taxonomique du genre *Hypericum*. Repartition de l'hypericine, *Phytochemistry*, 2, 1964, p.157-171;
6. KITANOV M.K.: Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species, *Biochim. Syst. Ecol.*, 29, 2001, p.171-178;
7. CIOCÂRLAN V.: Flora ilustrată a României, Editura Ceres, București, 2000, p.498-501;
8. *** Farmacopeea Română Ediția a X-a, Editura Medicală, București, 1993, p.483-484;
9. ISTUDOR VIORICA: Farmacognozie, Fitochimie și Fitoterapie, vol I, Editura Medicală 1998, p.233-235;
10. WICHTL M., BISSET N.G.: Herbal drugs and phytopharmaceuticals, Medfarm Publ. Stuttgart, 1994, p. 273-275;
11. METCALFE C.R., CHALK L.: Anatomy of the dicotyledons, Oxford Clarendon Press, 1957, p.165-169;
12. CICCARELLI DANIELA, ANDREUCCI ANDREA CESARE, PAGINI ANNA MARIA: Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis, *Annals of Botany*, 88, 2001, p.637-644;
13. EDZARD E.: *Hypericum*. The genus *Hypericum*, Taylor & Francis Inc., London, 2003, p.77-94;
14. *** European Pharmacopoeia ed. VI, vol. 2, Council of Europe Strasbourg, 2008, p.2958-2959;
15. DOROSSIIEV I.: Determination of flavonoids in *Hypericum perforatum*, *Pharmazie*, 40, 1985, p.585-586;
16. TĂMAȘ M., DRĂGULESCU C., ONIGA ILIOARA, GLIGA FLORINA: Comparative phytochemical research on some species of *Hypericum* and populations of *H. perforatum* L. in România, *Acta oecologica*, vol. VIII, 2001, p.25-33;
17. ONIGA ILIOARA, TĂMAȘ M., VLASE L., TOIU A., BENEDEC DANIELA, JULA R.: Botanical and phytochemical studies of *Hypericum perforatum* L. and *H. maculatum* Crantz from Romania, Preceding of the Vth Conf. AMAPSEEC, Bruno 2008, p.1-6;
18. ÇIRAK C., RADUȘIENĖ JOLITA, ÇAMAS N.: Pseudohypericin and hyperforin in two Turkish *Hypericum* species: Variation among plant parts and phenological stages, *Biochemical Systematics and Ecology*, 2008, p.377-38;
19. JOSEPH E., PIZZORNO, MIGHAEL T., MURRAY: Textbook of Natural Medicine (2- Volume Set) 2nd edition, 1999, p.797- 80;
20. BRUNETON J.: Pharmacognosic, Phytochimic, Plants medicinals, Ed. Tec&Doc, 1993, p.265-301;
21. BOJIȚĂ M., ROMAN L., SĂNDULESCU R., OPREAN R.: Analiza și controlul medicamentelor, Vol. II. Metode instrumentare în analiza și controlul medicamentelor Ed. Intercredo Deva, 2003, p.65-77, p.173-198, p.198-240, p.296;
22. **GÎTEA DANIELA**, PAȘCA BIANCA, FEKETE N.V., IOVAN C.V.: Identificarea și dozarea hipericinei și flavonelor din produsul vegetal și forme farmaceutice de *Hypericum perforatum*, *Rev. medico-chirurgicală a soc. de medici și naturaliști din Iași*, vol.III, 2(supl.2), 2007, p.93-95;

CURRICULUM VITAE

1. Nume și prenume: **GÎTEA DANIELA**

2. Data și locul nașterii: 17.07.1976, București

3. Starea civilă: căsătorită, 2 copii

4. Adresa: Oradea, Târnavelor nr.12, bloc AN6, ap.23.

5. Telefon/ adresa mail: 0744472434, gitea_daniela@yahoo.co.uk

6. Studii:

Nr. crt.	Instituția de învățământ superior	Domeniul	Perioada	Titlul acordat Grade/diplome obținute
1.	Universitatea de Medicină și Farmacie Carol Davila București	Sănătate - Farmacie	2009	Farmacist primar
2.	Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu din Cluj-Napoca	Farmacie	2006-prezent	Doctorand
3.	Universitatea din Oradea	Formarea profesorilor	2004-2005	Diplomă de Master
4.	Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu din Cluj-Napoca	Studiul și analiza medicamentului	2003-2004	Diplomă de Master
5.	Universitatea din Oradea	Sănătate - Farmacie	2001 - 2003	Farmacist specialist
6.	Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, Oradea	Sănătate - Farmacie	1994-1999	Diplomă de Licență
7.	Liceul Sanitar, Oradea	Sănătate	1990-1994	Diplomă de bacalaureat

7. Experiența profesională:

Nr. crt.	Instituția	Domeniul	Perioada	Postul didactic/postul profesional
1.	Universitatea din Oradea	Farmacie/Chimie fizică	2004-prezent	Asistent universitar
2.	Universitatea din Oradea	Farmacie/Chimie fizică	2000-2004	Preparator universitar
3.	Farmacia MEDICA PLUS	Sănătate	2001-prezent	Farmacist șef

8. Activitatea științifică:

❖ **Coautor la 1 suport de curs electronic și 3 îndrumătoare de laborator în domeniul de Chimie-Fizică și Chimie Sanitară.**

1. Vasile Iovan (coordonator), **Daniela Gîtea**, Vasile Fekete-Novak, Ciprian V. Iovan; „*CHIMIA-FIZICĂ A SUPRAFETEȚELOR ȘI COLOIZILOR* - note de curs”, ISBN 978-973-759-931-5, Ed. Universității din Oradea, 2009, 195 pag;

2. Vasile Iovan, **Daniela Gîtea**, Vasile Fekete-Novak; „*Lucrări practice de chimie sanitară, pentru studenții de la specializarea Farmacie*” vol. II, Editura Universității din Oradea, 2008; ISBN 978-973-759-637-6, 79 pag;
 3. Vasile Iovan, **Daniela Gîtea**, Vasile Fekete-Novak; „*Lucrări practice de chimie-fizică, pentru studenții de la specializarea Farmacie*” vol. II, ISBN 978-973-759-636-9, Editura Universității din Oradea, 2008; 79 pag;
 4. Vasile Iovan, Vasile Fekete-Novak, **Daniela Gîtea**; „*CHIMIE FIZICĂ îndrumător practic pentru studenții de la farmacie*” ISBN 973-613-493-8 Editura Universității din Oradea, 2004; 58 pag.
- ❖ **Capitol publicat în volume colective.**
1. Iovan Vasile, **Daniela Gîtea** „*Îndrumător de practică în farmacie pentru studenții anului V*”, coordonator prof.univ.dr.farm. Laura Vicaș, *cap.11: Alimente cu destinație nutrițională specială. Suplimente alimentare*, Editura Universității din Oradea, ISBN 978-973-759-735-9, pag.89-100, 2009.
- ❖ **12 lucrări publicate în extenso în reviste din țară dintre care cele mai reprezentative sunt:**
1. Bianca Pașca, **Daniela Gîtea**, Honorius Popescu, *Farmacile bihorene din afara Oradei în secolele al XVIII-lea și al XIX-lea*, Revista Clujul Medical vol. 83/nr. 1, Editura Medicală Universitară Iuliu Hațieganu, pag. 190-193, 2010;
 2. **Gîtea Daniela**, Șipoș Monica, Tămaș Mircea, Pașca Bianca, Iovan Ciprian, „*Analiza gaz-cromatografică a uleiurilor volatile din trei specii de Hypericum*”, Noi provocări în practica farmaceutică, Editura Universității din Oradea, ISBN 978-973-759-891-2, pag. 71-75, 2009;
 3. **Gîtea Daniela**, Șipoș Monica, Tămaș Mircea, Pașca Bianca, Iovan Ciprian, „*Determinarea cantitativă și izolarea uleiurilor volatile din trei specii de Hypericum din flora spontană a județului Bihor*”, Noi provocări în practica farmaceutică, Editura Universității din Oradea, ISBN 978-973-759-891-2, pag. 82-84, 2009;
 4. Ciprian V. Iovan, Vasile Fekete-Novak, Vasile Iovan, **Gîtea Daniela** „*Studii spectrale asupra derivaților de benzimidazol (albendazol)*” Timișoara Medical Journal, supliment nr.2, pag.31-35, 2008;
 5. **Gîtea Daniela**, Pașca Bianca, Fekete N.V., Iovan C.V.: *Identificarea și dozarea hipericinei și flavonelor din produsul vegetal și forme farmaceutice de Hypericum perforatum*, Rev. medico-chirurgicală a soc. de medici și naturaliști din Iași, vol.III, 2(supl.2), 2007, p.93-95;
- ❖ **13 participări cu lucrări la congrese și manifestări științifice dintre care cele mai reprezentative sunt:**
1. **Daniela Gîtea**, Pașca Bianca, V.Iovan, N.V.Fekete, C.V.Iovan, „*Medicația antihistaminică (pseudoefedrina și clorfeniramina) contraindicată în sarcină, metode de dozare*”, Conferința româno-germană de obstetrică-ginecologie, Concepte actuale în obstetrică-ginecologie, sub redacția Petru Chitulea, Editura Universității din Oradea, ISBN 978-606-10-0006-7, pag. 295-300, 2010;
 2. **Gîtea Daniela**, Pașca Manuela-Bianca, C.V.Iovan: „*Sunătoarea și anticoncepționalele*”, Congresul româno-german de obstetrică –ginecologie, ediția a VIII-a , sub redacția Petru Chitulea , Editura Universității din Oradea , ISBN 978-973-759-776-2 , pag.482-489 , 2009;
 3. Iovan Ciprian, **Gîtea Daniela**, Pașca Bianca, Manole Felicia, Florea Octavian, Iovan Vasile, „*Indicii farmacologici în tratamentul antibiotic*”, Zilele Farmaceutice Orădene ediția a-III-a, ISBN 978-973-759-891-2, pag. 125-130, 2009;

4. **Gîtea D.**, Pașca B., Szabo I., Bungău S.: „*Chemical and physical stability of Hibiscus Trionum L. (Malvaceae) alcoholic extractive solutions*”, Congresul național de farmacie, ediția a XIII-a, Cluj-Napoca, 28-30 sept., 110 pp., 2006;

9. Cursuri postuniversitare:

Nr. crt.	Instituția de învățământ superior	Titlul cursului	Perioada	Ore EMC/EFC
1.	Colegiul farmaciștilor din România	<i>Actualități privind terapia anti-aging</i>	2009	40
2.	Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie,	<i>Farmacoterapia în BRGE și ulcer peptic</i>	2008	40
4.	Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie,	<i>Forme farmaceutice cu eliberare transdermică</i>	2007	20
5.	Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, Oradea	<i>Adaptarea farmaciei în vederea integrării în Uniunea Europeană</i>	2006	20
6.	Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, Oradea	<i>Tratamentul hipertensiunii arteriale. Diuretice de actualitate</i>	2006	8
7.	Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, Oradea	<i>Formularea ,prepararea și evaluarea biofarmaceutică a medicamentelor</i>	2005	10
8.	Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, Oradea	<i>Perspective în practica farmaceutică</i>	2005	30
9.	Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu din Cluj-Napoca;	<i>Rolul farmacistului în asistența bolnavului hipertensiv</i>	2004	30
10.	Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, Oradea	<i>Farmacogenomica și terapia genică</i>	2004	10
11.	Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, Oradea	<i>Actualități în fitoterapie și legislație</i>	2004	40
12.	Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, Oradea	<i>Actualități în practica farmaceutică</i>	2001	10

10. Membru al asociațiilor profesionale:

- ❖ 2001 - Membru al Colegiului Farmaciștilor din jud. Bihor;
- ❖ 2002 - Membru în Societatea de Chimie din România ;
- ❖ 2002 - Membru în Societatea de Științe Farmaceutice din România ;
- ❖ 2009 - Membru în Societatea de Etnofarmacologie din România ;
- ❖ 2009 - Membru în Societatea de Istoria Farmaciei ;

11. Limbă străină cunoscută:

- ❖ Engleza nivel mediu.

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

**DOCTORAL THESIS
- ABSTRACT -**

**COMPARATIVE PHARMACOBOTANICAL RESEARCH
REGARDING SOME *HYPERICUM* SPECIES
IN THE BIHOR COUNTY**

**Scientific Leader
Prof. Dr. MIRCEA TĂMAȘ**

**PhD Attendant
DANIELA GÎTEA**

CONTENTS

I. INTRODUCTION	6
1.1. The importance of the <i>Hypericum perforatum</i> L. species in phytotherapy.....	6
1.2. Motivation of the theme.....	10
II. STATE OF KNOWLEDGE	12
2.1. Short history of <i>Hypericum perforatum</i> L. use in phytotherapy.....	12
2.2. Botanical data regarding <i>Hypericum</i> species.....	14
2.2.1. Systematic structure.....	14
2.2.2. General features of the <i>Hypericaceae</i> family.....	15
2.2.3. General features of the <i>Hypericum</i> L. genus.....	16
2.2.4. Species of <i>Hypericum</i> in European flora.....	16
2.2.5. Species of <i>Hypericum</i> in Romanian flora.....	20
2.2.6. Key of determining the <i>Hypericum</i> species in Romanian flora.....	21
2.2.7. Criteria of morphological, anatomical and chemical differentiation between various species of <i>Hypericum</i>	23
2.2.8. Common names of <i>Hypericum</i> species.....	42
2.3. Species of <i>Hypericum</i> in the spontaneous flora of the Bihor County.....	43
2.3.1. Geographical and climatic characterization of the Bihor County.....	43
2.3.2. Characterization of vegetation in the Bihor County.....	47
2.3.3. Species of <i>Hypericum</i> cited in the spontaneous flora of the Bihor County.....	48
2.4. Introduction into culture of the <i>H. perforatum</i> L. species, conditions of reception, substitutions.....	50
2.5. The medicinal plant product obtained from species of <i>Hypericum</i>	53
2.5.1. <i>Hyperici herba</i> in the Romanian Pharmacopoeiae and in the European Phamacopoeia.....	55
2.6. Data regarding the chemical composition of <i>Hypericum</i> species.....	56
2.6.1. Flavonoids.....	56
2.6.2. Dianthrones.....	59
2.6.3. Hyperforins.....	62
2.6.4. Essential oil.....	65
2.6.5. Tannins.....	68
2.7. Data regarding the pharmacological action of <i>Hypericum</i> species.....	69
2.8. Phytotherapeutical products obtained from <i>Hypericum</i> species.....	72
2.9. Romanian research regarding <i>Hypericum</i> species.....	79
III. PERSONAL RESEARCH	81
3.1. Plant material used in the research.....	81
3.1.1. Harvest and conservation of the plant material.....	81
3.2. Morphological analysis with the binocular microscope of <i>Hypericum</i> species harvested in the Bihor County.....	87
3.2.1. Analysis technique.....	87
3.2.2. Morphological characterization of floral and vegetative organs.....	87
3.2.3. Results and discussions.....	104
3.2.4. Conclusions.....	106
3.3. Microscopic analysis of the vegetative organs.....	106
3.3.1. Technique of preparing the microscope samples.....	106
3.3.2. Anatomical structure of the stem.....	109
3.3.3. Anatomical structure of the leaves.....	118

3.3.4. Results and discussions.....	124
3.3.5. Conclusions.....	125
3.4. Determining the density of secretory pockets (bags).....	126
3.4.1. Work technique.....	126
3.4.2. Results and discussions.....	127
3.4.3. Conclusions.....	129
3.5. Comparative phytochemical studies regarding <i>Hypericum</i> species.....	129
3.5.1. Qualitative and quantitative analysis of polyphenols (flavonoids and caffeic acid derivatives) from <i>Hypericum</i> species.....	130
3.5.1.1. Qualitative analysis of polyphenols from <i>Hypericum</i> species by thin layer chromatography (TLC).....	143
3.5.1.1.1. Analysis technique.....	143
3.5.1.1.2. Results and discussions.....	144
3.5.1.1.3. Conclusions.....	147
3.5.1.2. Qualitative and quantitative analysis of polyphenols by HPLC.....	147
3.5.1.2.1. Analysis technique.....	148
3.5.1.2.2. Results and discussions.....	151
3.5.1.2.3. Conclusions.....	169
3.5.1.3. Quantitative analysis of flavonoids by the spectrophotometric technique.....	169
3.5.1.3.1. Analysis technique.....	169
3.5.1.3.2. Results and discussions.....	171
3.5.1.3.3. Conclusions.....	172
3.5.1.4. Comparative analysis between the results of the quantitative spectrophotometric determinations and those obtained through HPLC.....	172
3.5.2. Qualitative and quantitative analysis of hypericin in <i>Hypericum</i> species.....	173
3.5.2.1. Qualitative analysis of hypericin by TLC.....	179
3.5.2.1.1. Analysis technique.....	180
3.5.2.1.2. Results and discussions.....	181
3.5.2.1.3. Conclusions.....	183
3.5.2.2. Qualitative and quantitative analysis of hypericin by HPLC.....	184
3.5.2.2.1. Analysis technique.....	184
3.5.2.2.2. Results and discussions.....	187
3.5.2.2.3. Conclusions.....	190
3.5.2.3. Quantitative determination of hypericin through the spectrophotometric technique.....	190
3.5.2.3.1. Analysis technique.....	191
3.5.2.3.2. Results and discussions.....	192
3.5.2.3.3. Conclusions.....	194
3.5.2.4. Comparative analysis of results obtained through the 3 techniques.....	195
3.5.2.5. Localization and allocation of hypericin in the vegetative and floral organs of <i>Hypericum</i> species.....	196
3.5.2.5.1. Localization and allocation of hypericin in the floral organs of the <i>H. hirsutum</i> L. species.....	196
3.5.2.5.1.1. Analysis technique.....	197
3.5.2.5.1.2. Results and discussions.....	197
3.5.2.5.2. Allocation of hypericin in the vegetative and floral organs of the <i>H. maculatum</i> Crantz and <i>H. perforatum</i> L. species.....	199
3.5.2.5.2.1. Results and discussions.....	199

3.5.2.5.3. Conclusions.....	200
3.5.3. Qualitative and quantitative analysis of hyperforin in <i>Hypericum</i> species.....	201
3.5.3.1. Analysis technique.....	201
3.5.3.2. Results and discussions.....	203
3.5.3.3. Conclusions.....	208
3.5.4. Analysis of the essential oil of <i>Hypericum</i> species.....	208
3.5.4.1. Quantitative determination of essential oil.....	209
3.5.4.1.1. Analysis technique.....	209
3.5.4.1.2. Results and discussions.....	210
3.5.4.1.3. Conclusions.....	210
3.5.4.2. Qualitative analysis through thin layer chromatography.....	211
3.5.4.2.1. Analysis technique.....	211
3.5.4.2.2. Results and discussions.....	212
3.5.4.2.3. Conclusions.....	213
3.5.4.3. Qualitative and quantitative analysis of essential oil by GC-SM.....	213
3.5.4.3.1. Analysis technique.....	214
3.5.4.3.2. Results and discussions.....	215
3.5.4.3.3. Conclusions.....	220
IV. FINAL CONCLUSIONS.....	221
V. REFERENCES.....	228

Key words: *H. perforatum* L., *H. maculatum* Crantz, *H. tetrapterum* Fries, *H. hirsutum* L., *Hypericaceae*, Bihor County, morphological and anatomical research, secretory structures, qualitative and quantitative analyses, flavonosides, hypericin, hyperforin, essential oil, TLC, HPLC-SM, GC-SM.

I. INTRODUCTION

This chapter presents the importance of the *H. perforatum* L. species and a short history of this plant's usage since ancient times, in the middle Ages and up to modern medicine, with its characteristic therapeutic indications and its main pharmacological forms (1.1.) as well as a motivation for choosing this research theme (1.2.).

If we were to follow the evolution of this plant in phytotherapy from ancient times to the modern day, we would notice that the *Hyperici herba* product is an eloquent example of what modern phytotherapy means, going from the empirical to the scientific usage of standardized extracts. The latter are characterized pharmacologically, chemically and clinically, without side effects but with solid and well motivated contra-indications, representing a success in natural plant-based therapy.

Starting from the assertion that the pharmacological and therapeutic properties of a species are rendered by its chemical compounds, or the so-called active principles, characteristic for every species, we decided to study, comparatively, the differential morpho-anatomical and chemical features of the main species that are present in the spontaneous flora of the Bihor County, in order to subsequently use these features as a criterion for differentiating species, for identifying the substitutes of the officinal species. It must also be mentioned that such research regarding the species of *Hypericum* has never been conducted in Romania before.

II. STATE OF KNOWLEDGE

The first part of the chapter (2.1.) *State of Knowledge* presents an incursion in the history of using *H. perforatum* L. in medicine, this being the most famous of the *Hypericum* species taken into study, the etymology of the genus' and species' names, present and prospective pharmacological evaluations.

Afterwards, chapter 2.2. presents the botanical data of the *Hypericum* species, starting with the systematic structure (2.2.1.) in various classification systems, the general characteristics of the *Hypericaceae* Family (2.2.2), of the *Hypericum* genus (2.2.3), the enumeration of *Hypericum* species found in Europe (2.2.4) and in Romania (2.2.5) as well as the determination keys (2.2.6).

In Europe there are 61 species grouped in 16 sections, whereas in Romania 11 spontaneous species and a cultivated one are cited.

Subchapter 2.2.7. presents the main criteria for the morphological, anatomical and chemical differentiation between *Hypericum* species, underlining morphological features, ecology and spreading. The histo-anatomical data of *Hypericum* species refer only to the officinal *H. perforatum* L. species, and the most recent study is that of Daniela Ciccarelli (2001), who showed the presence of 3 types of secretory channels. The differential chemical features are presented in a synoptic table based on the processing of data from the works of the various quoted authors.

Ethnobotanical data and the common names of the *Hypericum* species taken into study are presented in subchapter 2.2.8.

Chapter 2.3. is assigned to describing the surroundings, flora and vegetation of the Bihor County, from which the studied species come, with a short characterization of the physico-geographical and climatic conditions of the area. The analysis of the data concerning flora and vegetation indicates that 6 species of *Hypericum* are mentioned in the Bihor County (2.3.3).

Chapter 2.4. presents the technology of introducing the officinal species into culture.

The characterization of the medicinal plant product is presented in chapter 2.5., as well as the technical conditions of reception. It is worth mentioning the fact that the *Hyperici herba* product has been included in all the editions of the Romanian Pharmacopoeia, which suggests the importance of this product in phytotherapy.

Subchapter 2.5.1. presents in a comparative manner the provisions of the current Romanian and European Pharmacopoeias (2008). It shows that the X Pharmacopoeia only stipulates the dosages of soluble substances (min. 20%) compared to the European one, which stipulates a minimal content of 0.08 % total hypericin in the dry product.

Chapter 2.6. presents data regarding the chemical composition of *Hypericum* species. The most important active principles of this plant product are: flavonoids, dianthrones, hyperforin, essential oil and tannins.

Chapter 2.7. presents the pharmacological activity of *Hypericum* species, the most important of which being: its choleric-cholagogic, anti-pruriginous, capillary protective, diuretic, antidepressant, antiviral, antimicrobial actions, along with the fact that it speeds up the healing process in case of wounds and burns and its anti-inflammatory and anti-asthmatic actions.

Chapter 2.8 presents the most important phytotherapeutical products obtained from *Hypericum* species, such as simple and mixed medicinal teas, infusions, extracts, tablets, capsules with dry extracts and creams. The general part of the thesis ends with a chapter that comprises the Romanian contributions to the study of *Hypericum* species (2.9.).

III. PERSONAL RESEARCH

This part comprises personal research regarding the botanical and phytochemical analysis of the plant products obtained from *Hypericum* species harvested from the spontaneous flora of the Bihor County.

The first chapter (3.1) presents the species taken into study, the period and place of harvest, a map for locating the cited stations and the ones from which the samples for personal research were harvested and finally obtaining the plant raw material. The study material consisted of the aerial blossomed part (*herba*), dried after harvest, obtained from the species: *H. perforatum* L., *H. tetrapterum* Fries., *H. maculatum* Crantz. with two subspecies *maculatum* and *immaculatum* and *H. hirsutum* L.

Chapter 3.2. presents the results obtained in the morphological analysis of *Hypericum* species, an analysis performed with a stereomicroscope to which a digital camera was linked. The analysis of the obtained images reveals that there are morphological features that easily and clearly differentiate the 4 species of *Hypericum*. The most important of them are: type of inflorescence, shape of sepals, shape of stems, shape of leaves, presence or absence of secretory glands or channels on the sepals, petals and leaves as well as their shape.

Chapter 3.3. presents the anatomical research performed through the microscopic analysis of the stems and leaves of the 4 *Hypericum* species (*H. perforatum* L., *H. maculatum* Crantz, *H. tetrapterum* Fries, *H. hirsutum* L.). The analysis of these sections draws out the differential characters of great value in diagnosing the species, such as the number and position of edges and ridges, the presence of epidermal trichomes and secretory glands and channels located in various tissues of the stems and leaves.

Chapter 3.4. presents the determination of the leaves secretory pockets' density by microscope examination, on surface unit (mm²), using micrometric slides and ocular micrometers with 1 mm² squares drawn. The obtained results present their average on mm² of 13.10 for *H. perforatum*, 7 for *H. maculatum*, 28.4 for *H. tetrapterum* and 21.4 for *H. hirsutum*.

Chapter 3.5. contains a comparative phytochemical study of the *Hypericum* species harvested from the spontaneous flora of the Bihor County. The study regarded the quantitative and qualitative determination of 4 groups of active principles: polyphenolic compounds, hypericin, hyperforin, and essential oils contained by the 4 *Hypericum* species harvested from the spontaneous flora of the Bihor County. For each class of substances, general and specific analysis techniques are first presented.

Subchapter 3.5.1. presents the qualitative and quantitative analysis of polyphenols (flavonoids and caffeic acid derivatives) in species of *Hypericum* using three methods: thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC) and the spectrophotometric technique.

Subchapter 3.5.1.1. presents the qualitative analysis by TLC of flavonoids and phenylpropanoid compounds in 8 samples of *Hypericum* plant material from the 4 species and from tablets of Remotiv^R (Ewopharma- Bratislava – one coated tablet contains 250 mg dry extract of *Hyperici herba*). The results of the analyses show that flavonoids are well represented, identifying 4 major flavonoid glycosides in the *Hypericum* species: rutoside, hyperoside, isoquercitroside and quercitroside. Of these, rutoside is present only in *H. perforatum*, which recommends it as a criterion of chemical identification by TLC of the officinal species, the other three flavonosides being found in all the analyzed samples and species. For the Remotiv^R tablets, characteristic areas were noticed, as for *H. perforatum* confirming the source for the manufacture of these tablets.

Subchapter 3.5.1.2. presents the quantitative analysis by HPLC of the polyphenolic compounds of the 4 *Hypericum* species, using 18 standard substances. This technique has a

higher separation resolution, but it also presents the advantage that it can quantify each chemical item separately with the aid of some calibration curves with standard substances. The comparative study of the polyphenolic compounds showed especially quantitative differences between the studied *Hypericum* species. Hyperoside is the flavonoid compound with the best quantitative representation in all the analyzed *Hypericum* species (*H. perforatum* L – 665.38 mg%, *H. maculatum* Crantz – 976.36mg% for *ssp. typicum* and 905.87mg% for *ssp. immaculatum*, *H. tetrapterum* Fries – 545.14 mg%, *H. hirsutum* L. – 470.5 mg%) while isoquercitroside and quercitroside were also quantified in all the analyzed species, but in smaller concentrations. The small quantity of rutoside was confirmed in *H. maculatum* Crantz (8.57mg% for *ssp. immaculatum* and 6.49 mg% for *ssp. typicum*) and *H. tetrapterum* Fries (10.5mg %) compared to that in *H. perforatum* (462.82mg%).

As to phenyl-propanoid compounds, *gentisic acid*, *chlorogenic acid* and *caffeic acid* could be confirmed through SM whereas *p-cumaric acid* and *ferulic acid* were quantified in both unhydrolyzed and hydrolyzed samples in concentrations that range from 2.36 mg%, for *p-cumaric acid* in *H. maculatum ssp. typicum*, to 17.30 mg% for *ferulic acid* in *H. tetrapterum*.

Aglycones in hydrolyzed samples were also quantified using this method. Luteolin was identified only in the hydrolyzed and unhydrolyzed *H. maculatum ssp. typicum* extract. The aglycone with the highest concentration is the quercetol obtained after hydrolysis in all the analyzed samples (*H. perforatum* L – 533.03mg%, *H. maculatum* Crantz - *ssp. typicum* 435.58mg% *ssp. immaculatum* 371.71mg%, *H. tetrapterum* Fries – 181.77mg%, *H. hirsutum* L. – 659.66mg%).

In subchapter 3.5.1.3. total flavonoids expressed in rutoside were determined quantitatively, using the officinal spectrophotometric technique according to FR X, based on a calibration curve created with the previously mentioned substance. The results show a very high content in *H. maculatum* (5.91-6.41 %), in *H.hirsutum* (5.67 %), in *H.perforatum* (3.81 %) and a lower one in *H.tetrapterum* (2.98 %), the results thus confirming those obtained through HPLC, but also demonstrating the greater sensitivity of HPLC, as this latter method also identified traces of rutoside in the other 3 species.

Subchapter 3.5.1.4. presents an analysis of the results obtained in the quantitative and qualitative determination of flavonoids using the three methods (TLC, HPLC, spectrophotometry). HPLC analyses correlated with mass spectrometry for flavonoids confirm both the results obtained in the qualitative TLC analysis and the quantitative ones obtained through spectrophotometric determination.

Subchapter 3.5.2. presents the qualitative and quantitative analysis of hypericin in the 4 *Hypericum* species harvested from the spontaneous flora of the Bihor County, using TLC, HPLC and the spectrophotometric technique according to the European Pharmacopoeia (2008). The group of hypericin represents the most studied active principle in the chemical composition of all *Hypericum* species. The increased interest for knowing as exactly as possible the chemical composition of *Hypericum* species is justified because this could constitute an additional criterion for the differentiation of the species, on one hand, and a link between chemical composition and pharmacologic action on the other hand.

Subchapter 3.5.2.1 presents the qualitative analysis of hypericin in *Hypericum* species and in the pharmaceutical product Remotiv^R using TLC, an officinal method from the European Pharmacopoeia. By using this method, we revealed hypericins (hypericin in $R_f = 0.85$ and pseudohypericin in $R_f = 0.80$) of a red color and fluorescence, along with flavones, in an alcoholic extract obtained from the aerial parts of the 4 studied *Hypericum* species. The chromatogram shows that a higher content is present in the case of *H.tetrapterum* and *H. maculatum ssp.typicum* species, whereas *H. maculatum ssp.immaculatum*, *H.hirsutum* and *H.perforatum* show a lower content for both hypericins. By examining the chromatoplate in

daylight, we noticed two spots of a red-violet color for *H.maculatum* ssp. *typicum* and *H.tetrapterum* in the lower part of the chromatogram, which could be the protohypericins cited for *Hypericum* species. This would be the first time they are revealed through TLC. In the **Remotiv^R** product, hypericins are identical to those from *H. perforatum*, therefore this analysis may prove useful to establishing the origins of the raw material used in the preparation medicine based on *Hypericum* species.

Subchapter **3.5.2.2.** presents the qualitative and quantitative analysis of hypericin by using HPLC. The analysis of the results shows that *H.tetrapterum* has the highest content of hypericin (0.21 %), followed by *H.perforatum* (0.16 %), *H.hirsutum* (0.05 %), while the lowest content is that of *H.maculatum* ssp. *typicum* (0.03 %).

Subchapter **3.5.2.3.** presents the results obtained in the quantitative determination of hypericins through the spectrophotometric technique applied to 4 species of *Hypericum* (*H. perforatum* L., *H. maculatum* Crantz, *H. tetrapterum* Fries, *H. hirsutum* L.) and to the pharmaceutical product Remotiv^R. The highest content of hypericin was recorded for *H.maculatum* ssp.*typicum* which contains 0.496 % hypericin, five times more than in the stipulations of the European Pharmacopoeia (0.08 %), followed by *H .maculatum* ssp. *immaculatum* (0.211%), *H.tetrapterum* (0.189%), *H.perforatum* (0.163 %), *H.hirsutum* having the lowest content (0.096%). This low content of hypericin in the case of *H. hirsutum* can be correlated with the presence of secretory glands only on the fimbriae of the sepals, their lack on the petals and also with the low content of flowers in the inflorescences of this species. This species lacks hypericin secreting tissues both on stems and leaves, these organs only containing simple trichomes. The quantification of hypericin in the Remotiv^R pharmaceutical product was also performed. Remotiv^R tablets contain 0.448 mg of hypericin per tablet, a very close value to the stated one (0.500 mg).

Subchapter **3.5.2.4.** presents an analysis of the results obtained in the quantitative and qualitative determination of flavonoids through the three methods (TLC, HPLC, spectrophotometry). The spectrophotometric technique determines total hypericin while the HPLC technique only hypericin, thus explaining the lower results obtained through this method.

Subchapter **3.5.2.5.** provides information about the location and distribution of hypericins in the vegetative and floral organs of *Hypericum* species. A histological localization of hypericin in the secretory glands of various organs (stem, leaves, sepals and petals) was performed for the 4 *Hypericum* species gathered from the spontaneous flora of the Bihor County. Hypericins were located in the case of *H.hirsutum* sepals, which present dark secretory glands on top of the lobes. Using an original technique, which implied pressing these glands with the tip of a spatula needle on filter paper and then the elution with methanol of these spots and TLC analysis, we identified the hypericins in the content of these glands. Furthermore, the distribution of hypericins in the stems, leaves, sepals and petals of the 4 species was also examined. The analysis of the distribution revealed that the highest content of hypericin in the *H. hirsutum* L. species is located in the sepals, whereas in the case of *H. maculatum* Crantz and *H. perforatum* L. the highest amount of hypericin is present in the petals.

Subchapter **3.5.3.** presents the results of the qualitative and quantitative analysis of hyperforin in *Hypericum* species. Hyperforin, a substance with a phloroglucinic structure, is a more recent discovery in the composition of *Hypericum* species, but it is considered to be the main carrier of the antidepressant action. This substance has not been studied in Romania yet. Hyperforin is present in all the analyzed species, but the content varies depending on the species, the highest content being found in the officinal species, 7.89 mg %, a result that fits into the limits reported for this species. For the other 3 species, the content is 0.0771% in

H. maculatum Crantz, 0.0103% in *H. tetrapterum* L. and 0.6702% for *H. hirsutum* L., concentrations that are clearly inferior to *H. perforatum* L.

Chapter 3.5.4. presents the analysis of the essential oil in *Hypericum* species. Although it is known that the essential oil contained by *Hypericum* species is located in the secretory pockets, those transparent areas on the leaf, these substances have not been previously analyzed in indigenous species. For the isolation and quantitative determination of essential oils we employed the officinal technique stipulated by FR X, using water vapor distillation in the Neo-Clevenger apparatus, the method being described in subchapter 3.5.4.1. The determined content is considered rather low for aromatic plants (0.1-0.2 %). The highest content was recorded in the case of *H. perforatum* (0.20 %), lower in *H. maculatum* (0.14 %) and in *H. hirsutum* (0.10 %). The analysis of these results for the first two species can indicate a connection between the density of secretory pockets/mm² and the content of essential oil.

Subchapter 3.5.4.2. presents the qualitative analysis by TLC of the essential oil obtained from the aerial parts of the species: *H. perforatum* L., *H. maculatum* Crantz the *typicum* variety and *H. hirsutum* L. The essential oils of the analyzed *Hypericum* species are similar qualitatively, but they differ when it comes to content of major components. Most of the components in the essential oil were evident in the *H. maculatum* species and the least of them in *H. hirsutum*.

Subchapter 3.5.4.3. presents the qualitative and quantitative analysis of essential oils using GC-SM. According to the number of components of the essential oils, *H. maculatum* has 39 components, *H. hirsutum* has 31 and *H. perforatum* has 25 components. By using GC/SM several main components of each essential oil were separated and identified: alpha-pinene (6.40%), trans-caryophyllene (30.97%), germacrene D (16.26%) for *H. perforatum*, iso-caryophyllene (25.67%), trans-caryophyllene (8.39%), alpha-pinene (3.69%) and germacrene D (19.89%) for *H. maculatum*, trans-caryophyllene (33.42%), undecan (13.44%), trans-beta-farnesene (14.26%) and spathulenol (13.11%) for the essential oil of *H. hirsutum*. The three analyzed essential oils are similar as to some of their main components (for example trans-caryophyllene), but their proportions differ; moreover, they are alike when it comes to the presence of some terpenic hydrocarbons (alpha-pinene).

IV. FINAL CONCLUSIONS

The present doctoral thesis has intended to present a comparative botanical and phytochemical study between the officinal *Hypericum perforatum* species (St. John's Wort) and other *Hypericum* species that can be found in the spontaneous flora of the Bihor County (*H. maculatum* Crantz, *H. tetrapterum* Fries, *H. hirsutum* L.).

This study has pointed out the common and differential characteristics of the *Hypericum* species gathered from the spontaneous flora of the Bihor County in order to precisely establish the identity of the species.

The antidepressant effect of the *Hyperici herba* plant product is given by the phytochemical complex composed of hypericin, hyperforin and flavones. Due to the high content of hypericin and flavanoid compounds of the *H. maculatum* species, we recommend its introduction in the officinal *Hyperici herba* product. Moreover, thin layer chromatography (TLC) can constitute an easy method of identification for the species that go into the officinal *Hyperici herba* product.

V. SELECTED BIBLIOGRAPHY

1. STĂNESCU URSULA, MIRON ANCA, HÂNCIANU MONICA, APROTOSOAIIE CLARA: Plante medicinale de la A la Z, Vol I, Ed. „ Gr. T. Popa” UMF Iași, 2004, p.297-305;
2. SĂVULESCU T.: Flora Republicii Populare Române, Editura Academiei R.P.R., Vol. IV, 1956, p.23-45;
3. ***Flora Europaea, Rosaceae to Umbelliferae, vol.2, Cambridge, University Press, 1968, p.261-269;
4. MATHIS C., OURISSON G.: Etude chemo-taxonomique du genre *Hypericum*. Repartition de l'hypericine, *Phytochemistry*, 2, 1964, p.157-171;
5. KITANOV M.K.: Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species, *Biochm. Syst. Ecol.*, 29, 2001, p.171-178;
6. CIOCĂRLAN V.: Flora ilustrată a României, Editua Ceres, București, 2000, p.498-501;
7. *** Farmacopeea Română Ediția a X-a, Editura Medicală, București, 1993, p.483-484;
8. ISTUDOR VIORICA: Farmacognozie, Fitochimie și Fitoterapie, vol I, Editura Medicală 1998, p.233-235;
9. WICHTL M., BISSET N.G.: Herbal drugs and phytopharmaceuticals, Medfarm Publ. Stuttgart, 1994, p. 273-275;
10. METCALFE C.R., CHALK L.: Anatomy of the dicotyledons, Oxford Clarendon Press, 1957, p.165-169;
11. CICCARELLI DANIELA, ANDREUCCI ANDREA CESARE, PAGINI ANNA MARIA: Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis, *Annals of Botany*, 88, 2001, p.637-644;
12. EDZARD E.: *Hypericum*. The genus *Hypericum*, Taylor & Francis Inc., London, 2003, p.77-94;
13. *** European Pharmacopoeia ed. VI, vol. 2, Council of Europe Strasbourg, 2008, p.2958-2959;
14. TĂMAȘ M., DRĂGULESCU C., ONIGA ILIOARA, GLIGA FLORINA: Comparative phytochemical research on some species of *Hypericum* and populations of *H. perforatum* L. in România, *Acta oecologica*, vol. VIII, 2001, p.25-33;
15. ONIGA ILIOARA, TĂMAȘ M., VLASE L., TOIU A., BENEDEC DANIELA, JULA R.: Botanical and phytochemical studies of *Hypericum perforatum* L. and *H. maculatum* Crantz from Romania, *Proceeding of the Vth Conf. AMAPSEEC*, Bruno 2008, p.1-6;
16. JOSEPH E., PIZZORNO, MIGHAEL T., MURRAY: *Textbook of Natural Medicine* (2- Volume Set) 2nd edition, 1999, p.797- 80;
17. BRUNETON J.: *Pharmacognosic, Phytochimic, Plants medicinals*, Ed. Tec&Doc, 1993, p.265-301;
18. BOJIȚĂ M., ROMAN L., SĂNDULESCU R., OPREAN R.: *Analiza și controlul medicamentelor*, Vol. II. Metode instrumentare în analiza și controlul medicamentelor Ed. Intercredo Deva, 2003, p.65-77, p.173-198, p.198-240, p.296;
19. GÎTEA DANIELA, PAȘCA BIANCA, FEKETE N.V., IOVAN C.V.: Identificarea și dozarea hipericinei și flavonelor din produsul vegetal și forme farmaceutice de *Hypericum perforatum*, *Rev. medico-chirurgicală a soc. de medici și naturaliști din Iași*, vol.III, 2(supl.2), 2007, p.93-95;

CURRICULUM VITAE

1. Name and surname: GÎTEA DANIELA

2. Date and place of birth: 17.07.1976, București

3. Marital status: married, 2 children

4. Address: Oradea, 12 Târnavelor Str., bl. AN6, ap.23.

5. Telephone/ e-mail address: 0744472434, gitea_daniela@yahoo.co.uk

6. Studies/Education:

Nr. crt.	Institution of higher education	Field	Period	Title/Degree/Diploma Granted
1.	Universitatea de Medicină și Farmacie Carol Davila București	Healthcare - Pharmacy	2009	Farmacist primar
2.	“Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca	Pharmacy	2006-present	PhD Attendant
3.	University of Oradea	Teacher Training	2004-2005	Master’s Degree
4.	“Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca	Study and analysis of medicine	2003-2004	Master’s Degree
5.	University of Oradea	Healthcare - Pharmacy	2001 - 2003	Specialist pharmacist
6.	University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, Oradea	Healthcare - Pharmacy	1994-1999	Bachelor’s Degree
7.	Liceul Sanitar, Oradea	Healthcare	1990-1994	Baccalaureat Diploma

7. Professional Experience:

Nr. crt.	Institution	Field	Period	Teaching/professional position
1.	University of Oradea	Pharmacy/Physical chemistry	2004-present	Teaching Assistant
2.	University of Oradea	Pharmacy/Physical chemistry	2000-2004	Junior Teaching Assistant
3.	MEDICA PLUS Pharmacy	Healthcare	2001-present	Chief Pharmacist

8. Scientific Activity:

❖ **Coauthor of an electronic la 1 suport de curs electronic și 3 îndrumătoare de laborator în domeniul de Chimie-Fizică și Chimie Sanitară.**

1. Vasile Iovan (coord.), **Daniela Gîtea**, Vasile Fekete-Novak, Ciprian V. Iovan; „*THE PHYSICAL-CHEMISTRY OF SURFACES AND COLLOIDS – lecture notes*”, ISBN 978-973-759-931-5, Ed. Universității din Oradea, 2009, 195 pages;

2. Vasile Iovan, **Daniela Gîtea**, Vasile Fekete-Novak; „*Practical courses of sanitary chemistry for students of the Pharmacy Department*” vol. II, Editura Universității din Oradea, 2008; ISBN 978-973-759-637-6, 79 pag;
 3. Vasile Iovan, **Daniela Gîtea**, Vasile Fekete-Novak; „*Practical courses of physical chemistry for students of the Pharmacy Department*” vol. II, ISBN 978-973-759-636-9, Editura Universității din Oradea, 2008; 79 pag;
 4. Vasile Iovan, Vasile Fekete-Novak, **Daniela Gîtea**; „*PHYSICAL CHEMISTRY – practical course guide for Pharmacy students*” ISBN 973-613-493-8 Editura Universității din Oradea, 2004; 58 pag.
- ❖ **Chapters published in collective volumes.**
1. Iovan Vasile, **Daniela Gîtea** „*Practice guide in Pharmacy for Vth year students*”, coordinator prof.univ.dr.farm. Laura Vicaș, *chapter 11: Foods with special nutritional destination. Alimentary supplements*”. Editura Universității din Oradea, ISBN 978-973-759-735-9, pag.89-100, 2009.
- ❖ **12 papers published in extenso in Romanian magazines, the most representative being:**
1. Bianca Pașca, **Daniela Gîtea**, Honorius Popescu, *Pharmacies in Bihor outside Oradea in the XVIIIth and XIXth centuries*, Clujul Medical Magazine, vol. 83/nr. 1, Editura Medicală Universitară Iuliu Hațieganu, pag. 190-193, 2010;
 2. **Gîtea Daniela**, Șipoș Monica, Tămaș Mircea, Pașca Bianca, Iovan Ciprian, „*The gas-chromatographic analysis of the essential oils of three Hypericum species*”, New challenges in pharmaceutical practices, Editura Universității din Oradea, ISBN 978-973-759-891-2, pag. 71-75, 2009;
 3. **Gîtea Daniela**, Șipoș Monica, Tămaș Mircea, Pașca Bianca, Iovan Ciprian, „*The quantitative determination and the isolation of essential oils in three Hypericum species from the spontaneous flora of the Bihor County*”, New challenges in pharmaceutical practices, Editura Universității din Oradea, ISBN 978-973-759-891-2, pag. 82-84, 2009;
 4. Ciprian V. Iovan, Vasile Fekete-Novak, Vasile Iovan, **Gîtea Daniela** „*Spectral studies regarding benzimidazole (albendazole) derivatives*” Timișoara Medical Journal, supplement nr.2, pag.31-35, 2008;
 5. **Gîtea Daniela**, Pașca Bianca, Fekete N.V., Iovan C.V.: *Identification and dosage of hypericin and flavones in the plant product and pharmaceutical forms of Hypericum perforatum*, Rev. medico-chirurgicală a soc. de medici și naturaliști din Iași, vol.III, 2(supl.2), 2007, p.93-95;
- ❖ **13 participations with papers to congresses and scientific manifestations, the most representative being:**
1. **Daniela Gîtea**, Pașca Bianca, V.Iovan, N.V.Fekete, C.V.Iovan, „*Antihistaminic medication (pseudoephedrine and chlorpheniramine) counter-indicated in pregnancy, methods of dosage*”, Romanian-German conference of Obstetrics-gynecology, Present concepts in Obstetrics-gynecology, edited by Petru Chitulea, Editura Universității din Oradea, ISBN 978-606-10-0006-7, pag. 295-300, 2010;
 2. **Gîtea Daniela**, Pașca Manuela-Bianca, C.V.Iovan: „*St. John’s Wort and birth control pills*”, Romanian-German congress of Obstetrics-gynecology, VIIIth edition, edited by Petru Chitulea, Editura Universității din Oradea, ISBN 978-973-759-776-2, pag.482-489, 2009;
 3. Iovan Ciprian, **Gîtea Daniela**, Pașca Bianca, Manole Felicia, Florea Octavian, Iovan Vasile, „*Pharmacological indices in antibiotic treatments*”, Oradea Pharmaceutical Days IIIrd edition, ISBN 978-973-759-891-2, pag. 125-130, 2009;

4. **Gîtea D.**, Pașca B., Szabo I., Bungău S.: „*Chemical and physical stability of Hibiscus Trionum L. (Malvaceae) alcoholic extractive solutions*”, National Pharmacy Congress, XIIIth edition, Cluj-Napoca, 28-30 sept., 110 pp., 2006;

9. Postuniversity studies:

Nr. crt.	Institution of higher education	Title of course	Period	Classes EMC/EFC
1.	Romanian College of Pharmacists	<i>News in anti-aging therapy</i>	2009	40
2.	University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy,	<i>Pharmacotherapy in BRGE and peptic ulcer</i>	2008	40
4.	University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy,	<i>Pharmaceutical forms with transdermal release</i>	2007	20
5.	University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, Oradea	<i>Adaptation of pharmacy in view of joining the European Union</i>	2006	20
6.	University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, Oradea	<i>Treatment of high blood pressure. Present diuretics</i>	2006	8
7.	University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, Oradea	<i>Biopharmaceutical formulation, preparation and evaluation of medicine</i>	2005	10
8.	University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, Oradea	<i>Perspectives in pharmaceutical practices</i>	2005	30
9.	“Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca;	<i>The role of the pharmacist in assisting hypertensive patients</i>	2004	30
10.	University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, Oradea	<i>Pharmacogenomics and gene therapy</i>	2004	10
11.	University of Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, Oradea	<i>News in phytotherapy and legislation</i>	2004	40
12.	University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, Oradea	<i>News in pharmaceutical practices</i>	2001	10

10. Membership in professional associations:

- ❖ 2001 - Member of the Bihor College of Pharmacists;
- ❖ 2002 - Member of the Romanian Society of Chemistry ;
- ❖ 2002 - Member of the Romanian Society of Pharmaceutical Sciences;
- ❖ 2009 - Member of the Romanian Society of Ethnopharmacology;
- ❖ 2009 - Member of the History of Pharmacy Society;

11. Foreign languages:

- ❖ English – intermediate level.