



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA



IRINA-IOANA IELCIU

**Comparative pharmacobotanical study
of some species belonging to
Cucurbitaceae family**

Summary of the PhD thesis

Scientific supervisors:

Prof. Laurian Vlase, PhD
Prof. Michel Frédéric

Cluj-Napoca – 11.07.2017

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION.....	13
STATE OF THE ART	
1. BOTANICAL DATA REGARDING CUCURBITACEAE FAMILY	17
1.1. Taxonomic classification	17
1.2. Botanical description of the Cucurbitaceae family.....	18
1.3. Cucurbitaceae species from European and Romanian flora.....	19
1.4. Morphological differentiation of the Cucurbitaceae species.....	21
1.5. Cucurbitaceae species from the Romanian flora	22
1.6. Histo-anatomical characters of the Cucurbitaceae species.....	26
2. PHYTOCHEMICAL DATA ON THE THREE SPECIES BELONGING TO CUCURBITACEAE FAMILY	29
2.1. Introduction	29
2.2. Cucurbitacins.....	30
2.3. Flavonoids.....	32
2.4. Other compounds.....	33
2.5. Toxicity of the three species belonging to Cucurbitaceae family	34
3. PHARMACOLOGICAL DATA ON THE THREE SPECIES BELONGING TO CUCURBITACEAE FAMILY	35
PERSONAL CONTRIBUTIONS	
1. WORK HYPOTHESIS	41
2. GENERAL METHODOLOGY	41
2.1. Plant material	41
2.2. General methodology.....	41
3. STUDY 1. COMPARATIVE BOTANICAL RESEARCHES ON THREE SPECIES BELONGING TO CUCURBITACEAE FAMILY	43
3.1. Introduction	43
3.2. Work hypothesis	43
3.3. Materials and methods.....	44
3.4. Results	45
3.5. Discussions	60
3.6. Conclusions.....	70

4. STUDY 2. COMPARATIVE PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF THREE SPECIES BELONGING TO CUCURBITACEAE FAMILY	71
4.1. Introduction	71
4.2. Work hypothesis	71
4.3. Materials and methods	72
4.4. Results	80
4.5. Discussions	106
4.6. Conclusions.....	116
5. STUDY 3. COMPARATIVE PHARMACOLOGICAL RESEARCHES ON THREE SPECIES BELONGING TO CUCURBITACEAE FAMILY.....	117
5.1. Introduction	117
5.2. Work hypothesis	118
5.3. Materials and methods.....	118
5.4. Results	124
5.5. Discussions	130
5.6. Conclusions.....	137
6. GENERAL DISCUSSIONS.....	139
7. GENERAL CONCLUSIONS	141
8. ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS.....	143
REFERENCES.....	145
ANNEX I. STUDY OF THE CUCURBITACINS IN THE COMPOSITION OF DIFFERENT PARTS BELONGING TO THE THREE SPECIES.....	155
1. TLC studies	155
2. HPLC-DAD.....	156
General discussions.....	158
Conclusions	158
ANNEX II. LIST OF REAGENTS AND SOLVENTS	159
ANNEX III. VEGETAL MATERIAL. TESTED SAMPLES.....	161
ANNEX IV. NMR SPECTRA OF ISOLATED COMPOUNDS FROM THE LEAVES OF <i>B.ALBA</i>.....	164
KEYWORDS: <i>Bryonia alba</i> L., <i>Echinocystis lobata</i> (Michx.) Torr. et A. Gray, <i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich., morphological and histo-anatomical features, vegetative and reproductive organs, flavonoids, HPLC-DAD, MS, NMR, anti-plasmodial, cytotoxicity, HRP, antioxidant, anti-inflammatory, equine neutrophils, human monocytes, zebrafish larvae	

MAIN PARTS OF THE THESIS

INTRODUCTION

Cucurbitaceae family is one of the most important families worldwide, that contains the most well-known and used plants for human alimentation, such as pumpkins, melons, watermelons or cucumbers. Species that provide them belong to the genera *Cucurbita*, *Cucumis* or *Citrullus* and are cultivated all over the world in crops for their fruits or seeds, that not only represent the basis of human alimentation, but also represent important material for other industries (e.g. pharmaceutical industry, cosmetics industry). Besides their economical uses, plants belonging to this family are also known for their medicinal purposes, which have drawn the attention of researchers worldwide, making them therefore important targets for the research in the domain of plants with significant pharmaceutical potential.

Among the plants that belong to Cucurbitaceae family, there are species lesser known and used, due to different reasons, especially related to their toxicity. *Bryonia alba* L., *Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. et A. Gray and *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. are three species belonging to Cucurbitaceae family, spontaneous in the Romanian flora, that are lesser studied by scientists, but which have nevertheless proved significant activities in traditional medicine or homeopathy and appear therefore as having important potential as medicinal plants.

Bryonia alba L. is known in traditional and homeopathic medicine for its antipyretic, diaphoretic, anti-inflammatory, anti-infectious, anti-rheumatic, analgesic, laxative, purgative, relaxing smooth muscle properties. *Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. et A. Gray is a species which is used in traditional medicine for headaches, for the analgesic effect or as a tonic drink for stomach pain, kidney diseases, rheumatism, chills and fever. *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. is a species known for its anti-inflammatory, anti-bacterial, analgesic, laxative, purgative, trypsin inhibitor and cytotoxic activities.

STATE OF THE ART

The chapter is divided into 3 major directions, following the directions of the personal contributions, which concern the botanical, the phytochemical and the pharmacological researches on the three species. Each of these parts describes important data that the scientific literature provides on the botanical, phytochemical and biological point of view on the three species.

The first part describes the **botanical data** on the Cucurbitaceae family in general and on the three species in particular. It offers a taxonomic classification and a botanical description of the Cucurbitaceae family and it introduces the three species that are the subject of the thesis, by classifying them between the species that are spontaneous in the European and Romanian flora. Morphological criteria on the differentiation of the Cucurbitaceae species are also described and a complete description of their morphological characters is provided, as described by the existing floras of Europe and Romania. Not least, the description of the histo-anatomical characters of the three Cucurbitaceae species is provided, as it is studied by the scientific literature.

Second part of the chapter provides data that exist in the scientific literature on the **phytochemical analysis** of these species. The most important classes of compounds that are found in the composition of these species are cucurbitacins, a class of tetracyclic triterpenes, that are

widely known for their cytotoxic activity. The other important class of compounds that are found in the composition of the species are flavonoids, which are not intensively studied, by comparison with cucurbitacins. Few data seem to exist on the flavonoids in Cucurbitaceae species and therefore data on the activities they assign to these plants are limited. A possible explanation can be found in the toxicity of these species, which is also described in the thesis and which seems to be due to the cucurbitacin content.

Pharmacological data on the three species is provided in the last part of this chapter and contains the most important biological activities for which these plants are widely known and studied in scientific literature. The chapter comprises 3 parts, which offer a general view of the bioactivities that are assessed in different scientific studies. For example, *B.alba* is largely known for its cytotoxic activity, that is assigned to its content in cucurbitacins. Other biological activities that are cited for the species and the compounds in its composition are the anti-inflammatory, adaptogen, hepatoprotective and the hypoglycemic ones. The species is also known for its use in homeopathy. *E. elaterium* is known for its anti-microbial, anti-inflammatory, antioxidant or cytotoxic activities. *E. lobata* has lesser known medicinal activities, being known especially in ethno-medicine for its use in menstrual disorders, rheumatisms, chills, fevers, kidney disorders or for stomach troubles.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

The aim of the thesis is to increase knowledge on three species belonging to Cucurbitaceae family, more specifically *Bryonia alba* L., *Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. et A. Gray and *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. It is divided in three major sections, that are meant to offer a complete description of these species from several points of view. The starting point of the study was the premise that plants belonging to Cucurbitaceae family that are not used for human nutrition and are lesser known for their use in medicine may be important sources of potentially active compounds for the treatment of different disorders.

STUDY 1. COMPARATIVE BOTANICAL RESEARCHES ON THREE SPECIES BELONGING TO CUCURBITACEAE FAMILY

Botanical studies are aimed to describe the morphology and anatomy of a species, in order to facilitate its proper taxonomic classification. Moreover, such studies are aimed to provide necessary informations to avoid the possible substitutions or even adulterations of the vegetal products with species having the same features, but different biological activities or even with species with known or unknown toxicity. They can also help for the localization of the most important active principles at a cellular level, in different organs of the species, which can be helpful in the case of new possible vegetal medicinal species, lacking information about the localization of the most important bioactive compounds.

Analysis of botanical features must be directed on two different levels. Firstly, macroscopic studies must be performed in order to properly determine the identity of the species, which can subsequently help for the correct taxonomic classification of the species. Afterwards, it is important to provide a microscopic study of the species in order to confirm its identity by comparison with similar species from the same taxonomic classes. As a first step, microscopic studies must be performed on the grinded powder, to establish the its features, as a possible vegetal medicinal product. This microscopic study is a method described by the 9th Eur Ph for the examination of the powder of herbal drugs. Data provided by the microscopic study must be completed by a proper

histo-anatomical study of the most important parts of the species, namely vegetative and reproductive organs. Thus, the complete description of the species and a correct identification can be provided for each species. All of these represent the first step towards a better understanding of the possible bioactivities of vegetal species, as they can provide the necessary information to further develop pathways for more detailed studies.

Cucurbitaceae plants (also known as cucurbits) are widely known for specific morpho-anatomical features that concern especially the leaves, the tendrils and the sexual organs: trichomes. It appears therefore important to highlight the specific characteristics of these parts of the species to be able to provide information about their taxonomic classification.

Considering all these, identification of the botanical features for the three species was performed following all these steps. Methods consisted especially in the microscopic examination, with the exception of the macroscopic characters, that were carefully analyzed with a magnifying glass or a stereomicroscope. Magnifying glass was used for the general view of the features of each plant, while stereomicroscope allowed a better observation of the trichomes on the surface of the organs of each plant. Cross sections of the vegetative and reproductive organs were analyzed by an optical microscope and photos were taken using a digital camera. Concerning the sectioning techniques, depending on the type of plant material, the classical and histological techniques were used. The direct classical sectioning through the vegetal material with a manual microtome was used for organs that had an adequate size for sectioning (e.g. stems, petioles, roots), while the histological technique of mounting into paraffin was used for organs that can not be sectioned in the classical way, because of their small sizes (e.g. leaves, ovaries, peduncles, tendrils). Sections were stained using the double technique of coloring, for cellulose and lignin. Sections obtained by classical technique were colored using the mixture of alum carmine (stains cellulose in purple-red) and iodine or malachite green (stain lignin in green), while sections obtained by histological technique were stained using toluidin blue (stains cellulose in purple-blue and lignin in green).

The aim of the botanic studies was to perform the complete botanic description of the three species belonging to Cucurbitaceae family. In this regard, the macroscopic and microscopic features of the main parts of each species were analyzed. Vegetative and reproductive organs of *Bryonia alba* L., *Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. et A. Gray and *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. were studied by specific methods. A special attention was given to one of the most specific features of the species belonging to the Cucurbitaceae family, trichomes, that can be found on the inferior part of the leaves and can be of different types, depending on the organ on which they can be found: tector trichomes or secretory trichomes, having specific structure. Tector trichomes are pluricellular and have pointed bottom, while secretory trichomes are also pluricellular and have round bottom, with one or various secretory cells on top.

STUDY 2. COMPARATIVE PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF THREE SPECIES BELONGING TO CUCURBITACEAE FAMILY

Potential toxicity of species belonging to Cucurbitaceae family, corresponding to the content in cucurbitacins, determined a decrease in the attention of researchers worldwide to the plants of this family, especially if the species are not edible. Recent studies have proved nevertheless that these species may contain important amounts of compounds that are not toxic and may assign them important biological activities. Such compounds are flavonoids and polyphenols. In this context, the

present thesis is aimed to bring a description as complete as possible for the flavonoidic and polyphenolic compounds found in the three species of the Cucurbitaceae family.

After the correct identification of the species, the next step in the complete description of a species is the identification of its active compounds, that are responsible for the biological activity. The main class of compounds that is described in the present thesis are the flavonoids and polyphenols, a class of compounds that is lesser studied in the composition of these species, but which has nevertheless proved important biological activities. They may assign the species significant antioxidant and anti-inflammatory activities.

Tested samples in the present thesis were methanolic and ethanolic extracts, obtained by the maceration of the vegetal powder with the corresponding solvent. Flavonoids in the composition of the species were identified by chromatographic methods. TLC technique and a HPLC-DAD method for the identification of flavonoids were used in order to identify the main flavonoids in the three species. Where available, reference compounds were used in order to compare their parameters with each one of the detected compounds. Afterwards, the compounds were isolated by a HPLC-DAD preparative technique, that was in fact an adaptation of the analytical method. Structure identification was performed by MS and NMR techniques ($^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$). Quantification of compounds in different samples collected in different stages in the development of the species was performed by HPLC-DAD and HPLC-MS techniques. The total flavonoids and total polyphenols could be quantified by spectrophotometric methods, that are provided by existing monographs in the Romanian and European Pharmacopoeias.

STUDY 3. COMPARATIVE PHARMACOLOGICAL RESEARCHES ON THREE SPECIES BELONGING TO CUCURBITACEAE FAMILY

Among the bioactivities that are mostly studied for plants belonging to this family there is the anti-inflammatory, the antioxidant and the cytotoxic one. Most of the existing studies assign these activities to the content of cucurbitacins, but recent studies have proved that other compounds as polyphenols or flavonoids found in the composition of these species may also be the ones that assign them these activities.

In this context, the present study aims to bring a new approach on the three species, bringing evidence that may support their potential as future phytopharmaceuticals. Biological activities that were tested are the anti-plasmodial, cytotoxic and antioxidant ones. *In vitro* tests of the anti-plasmodial and cytotoxic activities showed values of the IC_{50} for the tested samples higher than $50 \mu\text{g/mL}$. Samples were tested on two *Plasmodium falciparum* strains (W2 - cloroquine resistant and 3D7 - cloroquine sensitive) and on two types of cell lines: cancerous (A549 lung cancer and HeLa cervical cancer) and healthy ones (WI38 lung fibroblasts). The antioxidant activity of extracts was tested by chemical assays, as DPPH, CUPRAC, FRAP, TEAC, EPR and SNPAC assays. The global antioxidant activity was assessed to prove the anti-catalytic and anti-enzymatic activity of the samples. Anti-catalytic activity was assessed on a peroxidase extracted from horseradish. The global antioxidant activity was assessed on neutrophils isolated from equine blood *ex vivo*. Anti-enzymatic assays targeted the NADPH oxydase enzyme and were performed on a model of human monocytes that are transformed in macrophages (HL-60). All of these tests were aimed to prove the possible involvement of the samples in the redox processes that are also involved in inflammation. These assays showed a selective activity of the samples for the antioxidant processes, that may also have implications in the anti-inflammatory activity. Moreover, lack of toxicity for the samples is

tested by using the zebrafish larvae model, which shows that tested samples have no special toxicity at different levels, especially in early stages of development. Taken into consideration the fact that antioxidant activity is largely known to be due to the polyphenolic and flavonoidic composition, it becomes clear that the flavonoidic and polyphenolic compounds assign the species new biological activities, not previously tested by authors for these species.

The originality of this study concerns not only in the activities that are assessed, but also in the fact that it shows that the compounds that are involved in these activities are flavonoids, compounds that are lesser studied for these species. A supplementary reason to support this is found in some complementary work of this thesis, that evaluated the content of cucurbitacins in these plants and proved results that could not support their presence in the tested samples. Because of this reason and because of the fact that all assays were performed by comparing the isolated compounds with their available references and results proved to have similar profiles, important evidence on the involvement of flavonoids in these activities could be brought. All these allowed to establish the potential of these species and of their active compounds for the use in the treatment of certain disorders.

GENERAL CONCLUSIONS

B. alba, *E. lobata* and *E. elaterium* are three species belonging to Cucurbitaceae family that are known for their allopathic and homeopathic use, in traditional or modern medicine. Scientific literature brings data on these species, but information is not enough to establish the potential of these species as medicinal plants. This is the main reason for directing the studies in this thesis towards different approaches, that may finally offer important information in order to complete existing data and confirm their importance in this field. The three approaches that are studied hereby refer to the botanical, phytochemical and biological study of these species.

The comparative study of the three species allows to bring important data on each of them and, at the same time, on the similarities and differences between them. Study of these plants brings new and important data, both on the composition of these species in flavonoidic compounds, but also on the biological activities that they are responsible for. The present study is the first of a kind that treats these plants in this manner.



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA



IRINA-IOANA IELCIU

Studiul farmacobotanic comparativ al unor specii aparținând familiei Cucurbitaceae

Rezumatul tezei de doctorat

Conducători științifici:

Prof. Laurian Vlase, PhD

Prof. Michel Frédéric

Cluj-Napoca – 11.07.2017

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. DATE BOTANICE PRIVIND FAMILIA CUCURBITACEAE	17
1.1. Încadrare sistematică.....	17
1.2. Descrierea botanică a familiei Cucurbitaceae.....	18
1.3. Specii de Cucurbitaceae din flora Europei și a României.....	19
1.4. Diferențierea morfologică a speciilor de Cucurbitaceae	21
1.5. Specii de Cucurbitaceae din flora României	22
1.6. Caractere histo-anatomice ale speciilor de Cucurbitaceae	26
2. DATE FITOCHIMICE ASUPRA A TREI SPECII APARTINÂND FAMILIEI CUCURBITACEAE	29
2.1. Introducere	29
2.2. Cucurbitacine.....	30
2.3. Flavonoide.....	32
2.4. Alți compuși.....	33
2.5. Toxicitatea celor trei specii aparținând familiei Cucurbitaceae	34
3. DATE FARMACOLOGICE LEGATE DE CELE TREI SPECII APARTINÂND FAMILIEI CUCURBITACEAE.....	35
CONTRIBUȚII PERSONALE	
1. IPOTEZĂ DE LUCRU	41
2. METODOLOGIE GENERALĂ	41
2.1. Material vegetal	41
2.2. Metodologie generală.....	41
3. STUDIUL 1. CERCETĂRI BOTANICE COMPARATIVE ASUPRA A TREI SPECII APARTINÂND FAMILIEI CUCURBITACEAE	43
3.1. Introducere.....	43
3.2. Ipoteză de lucru	43
3.3. Materiale și metode	44
3.4. Rezultate	45
3.5. Discuții	60
3.6. Concluzii.....	70

4. STUDIUL 2. ANALIZE FITOCHIMICE COMPARATIVE ASUPRA A TREI SPECII APARTINÂND FAMILIEI CUCURBITACEAE	71
4.1. Introducere.....	71
4.2. Ipoteză de lucru	71
4.3. Materiale și metode	72
4.4. Rezultate	80
4.5. Discuții.....	106
4.6. Concluzii.....	116
5. STUDIUL 3. CERCETĂRI FARMACOLOGICE COMPARATIVE ASUPRA A TREI SPECII APARTINÂND FAMILIEI CUCURBITACEAE	117
5.1. Introducere.....	117
5.2. Ipoteză de lucru	118
5.3. Materiale și metode	118
5.4. Rezultate	124
5.5. Discuții.....	130
5.6. Concluzii.....	137
6. DISCUȚII GENERALE.....	139
7. CONCLUZII GENERALE	141
8. ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI	143
REFERINȚE.....	145
ANEXA I. STUDIUL CUCURBITACINELOR DIN COMPONENTA DIFERITELOR PĂRȚI APARTINÂND CELOR TREI SPECII.....	155
1. CSS.....	155
2. HPLC-DAD.....	156
Discuții generale.....	158
Concluzii.....	158
ANEXA II. LISTA DE REACTIVI ȘI SOLVENȚI	159
ANEXA III. MATERIAL VEGETAL. PROBE LUATE ÎN LUCRU.....	161
ANEXA IV. SPECTRELE RMN ALE COMPUȘILOR IZOLAȚI DIN FRUNZELE SPECIEI <i>B.ALBA</i>.....	164
KEYWORDS: <i>Bryonia alba</i> L., <i>Echinocystis lobata</i> (Michx.) Torr. et A. Gray, <i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich., caractere morfologice și histo-anatomice, organe vegetative și de reproducere, flavonoide, HPLC-DAD, MS, NMR, activitate anti-plasmodială, activitate citotoxică, HRP, activitate antioxidantă, activitate anti-inflamatoare, neutrofile cabaline, monocite umane, embrioni de zebrafish	

PĂRȚILE PRINCIPALE ALE TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE

Familia Cucurbitaceae este una dintre cele mai importante familii din întreaga lume, care conține cele mai cunoscute și utilizate plante în alimentația umană precum dovleci, pepenii sau castraveții. Aceste specii aparțin genurilor *Cucurbita*, *Cucumis* sau *Citrullus* și sunt cultivate în lumea întreagă în culturi pentru fructe sau semințe, care nu numai că reprezintă baza alimentației umane, dar reprezintă de asemenea importante resurse pentru numeroase alte industrii (ex. industria farmaceutică, industria cosmetică). Pe lângă utilizările economice, speciile aparținând acestei familii sunt de asemenea cunoscute pentru utilizările medicinale, care au atras atenția cercetătorilor din întreaga lume, făcându-le astfel ținte importante pentru cercetarea în domeniul plantelor cu potențial farmaceutic semnificativ.

Printre speciile aparținând familiei Cucurbitaceae, există specii care sunt mai puțin cunoscute și utilizate, din diferite motive, în special legate de toxicitate. *Bryonia alba* L., *Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. et A. Gray și *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. sunt trei specii aparținând familiei Cucurbitaceae, spontane în flora României, care sunt mai puțin cunoscute și studiate de către cercetători, dar care, cu toate acestea, au demonstrat numeroase activități în medicina tradițională sau homeopată și apar așadar ca specii vegetale cu important potențial ca specii medicinale.

Bryonia alba L. este cunoscută în medicina tradițională și homeopată pentru proprietățile antipiretice, diaforetice, anti-inflamatoare, anti-infecțioase, anti-reumatice, analgezice, laxative, purgative și relaxante ale musculaturii netede. *Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. et A. Gray este o specie utilizată în medicina tradițională pentru tratamentul durerilor de cap, pentru efectul analgezic sau ca o băutură tonică pentru durerile de stomac, bolile de rinichi, reumatism, frisoane și febră. *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. este o specie cunoscută pentru activitățile anti-inflamatoare, anti-bacteriene, analgezice, laxative, purgative, inhibitoare ale tripsinei și citotoxice.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Capitolul este împărțit în 3 direcții majore, care urmăresc direcțiile contribuțiilor personale și care sunt legate de cercetările botanice, fitochimice și farmacologice asupra celor trei specii. Fiecare dintre aceste părți descriu date importante pe care literatura de specialitate le oferă din punct de vedere botanic, fitochimic și biologic despre cele trei specii.

Prima parte descrie **datele botanice** despre familia Cucurbitaceae în general și despre cele trei specii în particular. Această parte oferă o încadrare sistematică și o descriere botanică a familiei Cucurbitaceae și introduce cele trei specii care reprezintă subiectul tezei, încadrându-le printre speciile care sunt spontane în flora Europei și a României. Criteriile morfologice de diferențiere a speciilor de Cucurbitaceae sunt de asemenea descrise și o descriere completă a caracterelor lor morfologice este furnizată, așa cum este descrisă de floarele existente ale Europei și României. Nu în ultimul rând, descrierea caracterelor celor trei specii de Cucurbitaceae este furnizată, așa cum se regăsește și este studiată în literatura de specialitate.

A doua parte a acestui capitol oferă datele existente în literatura de specialitate despre **analiza fitochimică** a celor trei specii. Cele mai importante clase de compuși care sunt regăsite în compoziția acestor specii sunt cucurbitacinele, o clasă de triterpene tetraciclice, care sunt cunoscute în lumea întreagă pentru activitatea lor citotoxică. Alte clase importante de compuși care

se regădesc în compoziția acestor specii sunt flavonoidele, o clasă de compuși mai puțin studiată, în comparație cu cucurbitacinele. Există date puține legate de flavonoidele regăsite în speciile de Cucurbitaceae și așadar datele despre activitățile pe care acestea le imprimă acestor plante sunt limitate. O explicație posibilă se poate găsi în toxicitatea acestor specii, care este de asemenea descrisă în cadrul tezei și care apare să fie datorată conținutului de cucurbitacine.

Date farmacologice legate de cele trei specii sunt furnizate în ultima parte a acestui capitol care conține cele mai importante activități biologice pentru care aceste specii sunt cunoscute în întreaga lume și studiate în literatura de specialitate. Capitolul cuprinde 3 părți, care oferă o vedere generală a bio-activităților care sunt evaluate în diverse studii științifice. De exemplu, *B.alba* este cunoscută în întreaga lume pentru activitatea sa citotoxică, care este datorată conținutului său de cucurbitacine. Alte activități biologice care sunt citate pentru această specie și pentru compușii din compoziția sa sunt activitățile anti-inflamatoare, adaptogene, hepatoprotectoare și hipoglicemiante. Specia este de asemenea cunoscută pentru utilizarea în homeopatie. *E. elaterium* este cunoscută pentru activitatea anti-microbiană, anti-inflamatoare, antioxidantă și citotoxică. *E. lobata* este o specie mai puțin cunoscută pentru activitățile biologice, fiind cunoscută în mod special pentru utilizările în afecțiuni menstruale, reumatismale, frisoane, febră, afecțiuni renale și ale tractului gastro-intestinal.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Scopul tezei de doctorat este de a îmbunătăți cunoștințele legate de cele trei specii ale familiei Cucurbitaceae, mai specific *Bryonia alba* L., *Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. et A. Gray și *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. Teza este structurată pe trei mari secțiuni, care sunt menite să ofere o descriere completă a acestor specii din diferite puncte de vedere. Punctul de plecare al acestui studiu a fost premisa că plantele aparținând familiei Cucurbitaceae care nu sunt utilizate pentru nutriția umană și sunt mai puțin cunoscute pentru utilizările medicinale, ar putea să fie surse importante de compuși cu potențial de a fi activi în tratamentul numeroaselor patologii.

STUDIUL 1. CERCETĂRI BOTANICE COMPARATIVE ASUPRA A TREI SPECII APARTINÂND FAMILIEI CUCURBITACEAE

Obiectivul principal al studiilor botanice este de a descrie morfologia și anatomia unei specii, pentru a facilita încadrarea sa sistematică. Mai mult, acest tip de studii sunt menite să ofere informațiile necesare pentru a evita posibilele substituirii sau chiar falsificări ale produselor vegetale cu specii care au aceleași caractere, dar activități biologice diferite sau chiar cu specii cu toxicitate cunoscută sau mai puțin cunoscută. Acest tip de studii poate de asemenea să ajute la localizarea celor mai importante principii active la nivel celular, în diverse organe ale speciei, ceea ce poate fi util în cazul unui produs vegetal medicinal nou, căruia îi lipsesc informațiile legate de localizarea celor mai importanți compuși bioactivi.

Analiza caracterelor botanice trebuie să fie realizată pe două direcții. În primul rând, studiile macroscopice trebuie să fie realizate pentru a determina în mod corect identitatea speciei, ceea ce poate ulterior să ajute pentru o încadrare sistematică corectă a speciei. Mai apoi, este important să se ofere un studiu microscopic adecvat al speciei pentru a confirma identitatea speciei, prin comparație cu specii similare din aceleași unități sistematice. Un prim pas este reprezentat de studiile microscopice care se realizează pe materialul vegetal pulverizat, pentru a stabili caracterele acestuia, în cazul în care acesta devine un produs vegetal medicinal. Acest studiu

microscopic al pulberii este o metodă descrisă de Farmacopeea Europeană ediția a IX-ape pentru examinarea produselor vegetale medicinale. Datele oferite de studiul microscopic al pulberii trebuie completate de o descriere histo-anatomică adecvată pentru cele mai importante părți ale speciei, mai exact organele vegetative și de reproducere. Astfel, o descriere completă a speciei studiate și o identificare corectă poate fi realizată pentru fiecare specie. Toate acestea reprezintă un prim pas înspre o mai bună înțelegere a posibilelor bio-activități ale unei specii vegetale deoarece pot să ofere informațiile necesare pentru a dezvolta căi de studiu mai aprofundate.

Plantele din familia Cucurbitaceae sunt cunoscute pentru prezența unor caractere morfo-anatomice specifice, care sunt legate în special de frunze, cârcei și organe de reproducere: perii. Așadar, devine importantă sublinierea caracterelor specifice ale acestor părți de specie pentru a furniza informații importante legate de încadrarea sistematică.

Având în vedere toate acestea, identificarea caracterelor botanice pentru cele trei specii s-a realizat urmărind toate aceste etape. Metodele utilizate au constat în special în examinarea microscopică, cu excepția caracterelor microscopice, care au fost analizate cu atenție cu ajutorul unei lupe sau a unui stereomicroscop. Lupa a fost utilizată pentru a avea o vedere de ansamblu a caracterelor fiecărei specii, în timp ce stereomicroscopul a permis o mai bună observare a perilor de pe suprafața organelor fiecărei specii. Secțiuni transversale ale organelor vegetative și de reproducere au fost analizate utilizând o cameră foto digitală. În ceea ce privește tehnicile de secționare, în funcție de tipul materialului vegetal, au fost utilizate tehnica clasică sau cea histologică. Tehnica de secționare directă prin materialul vegetal cu ajutorul unui microtom manual a fost utilizată pentru organe care au prezentat o mărime adecvată pentru secționare (ex. tulpini, pețiole, rădăcini), în timp ce tehnica histologică de includere în parafină a fost utilizată pentru organe care nu au putut fi secționate clasic, datorită mărimii mici (ex. frunze, ovare, pedunculi, cârcei). Secțiunile au fost colorate utilizând tehnica dublă de secționare, pentru celuloză și lignină. Secțiunile obținute prin tehnica clasică au fost colorate utilizând un amestec de carmin alaunat (colorează celuloza în roșu-violet) și verde de iod sau verde malachit (colorează lignina în verde), în timp ce secțiunile obținute prin tehnica histologică au fost colorate utilizând albastru de toluidină (colorează celuloza în albastru-violet și lignina în verde).

Scopul studiilor botanice a fost de a realiza o descriere botanică completă a celor trei specii aparținând familiei Cucurbitaceae. În acest sens, caracterele macroscopice și microscopice au fost analizate. Organele vegetative și de reproducere ale speciilor *Bryonia alba* L., *Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. et A. Gray și *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. au fost studiate cu ajutorul unor metode specifice. O atenție specială s-a acordat unora dintre cele mai specifice caractere ale plantelor aparținând familiei Cucurbitaceae, perii sau trihomii, care pot să se găsească pe suprafața organelor vegetative sau de reproducere și pot să fie de mai multe feluri, în funcție de organul pe suprafața căruia se găsesc: peri tectori sau peri secretori, cu structură specifică. Perii tectori sunt pluricelulari și au vârful ascuțit, în timp ce perii secretori sunt pluricelulari și au vârful rotunjit cu una sau mai multe celule secretoare în vârf.

STUDIUL 2. ANALIZE FITOCHIMICE COMPARATIVE ASUPRA A TREI SPECII APARTINÂND FAMILIEI CUCURBITACEAE

Toxicitatea potențială a speciilor aparținând familiei Cucurbitaceae, care este datorată conținutului de cucurbitacine, a determinat o scădere a atenției cercetătorilor din întreaga lume pentru plantele aparținând acestei familii, mai ales dacă aceste specii nu sunt utilizate pentru

alimentație. Studii recente au demonstrat, cu toate acestea, că aceste specii pot să conțină cantități importante de compuși care nu sunt toxici și pot să imprime acestor plante importante activități biologice. Acești compuși sunt flavonoidele și polifenolii. În acest context, prezenta teza de doctorat își propune să aducă o descriere pe cât de completă posibil a compușilor flavonoidici regăsiți în componența celor trei specii aparținând familiei Cucurbitaceae.

După identificarea corectă a speciilor, următorul pas înspre o descriere completă a unei specii este identificarea compușilor săi activi care sunt responsabili de activitatea biologică. Principala clasă de compuși care este descrisă în teza de doctorat sunt flavonoidele și polifenolii, clase de compuși care sunt mai puțin studiate în compoziția acestor specii, dar care au demonstrat cu toate acestea activități biologice importante. Acești compuși pot să imprime speciilor importante activități antioxidante și anti-inflamatoare.

Probele testate în prezenta teză au fost reprezentate de extracte metanolice și etanolice, obținute prin macerarea pulberii vegetale, cu solventul corespunzător. Flavonoidele din compoziția acestor specii au fost identificate prin metode cromatografice. Au fost utilizate tehnicile CSS și HPLC-DAD pentru identificarea flavonoidelor, având ca scop identificarea principalelor flavonoide din componența celor trei specii. Unde au fost disponibile, compușii de referință au fost utilizați pentru a compara parametrii fiecăruia dintre aceștia cu fiecare dintre compușii identificați. Mai apoi, compușii au fost izolați prin tehnici preparative HPLC-DAD, care au reprezentat adaptări ale metodelor analitice utilizate. Identificarea structurală s-a realizat prin tehnici MS și RMN ($^1\text{H-NMR}$ și $^{13}\text{C-NMR}$). Dozarea compușilor din diferite probe colectate în diferite perioade de dezvoltare s-a realizat de asemenea prin tehnici HPLC-DAD și HPLC-MS. Totalurile flavonoidice și polifenolice au putut fi cuantificate prin metode spectrofotometrice, care sunt furnizate de monografiile existente în Farmacopeea Europeană sau Farmacopeea Română.

STUDIUL 3. CERCETĂRI FARMACOLOGICE COMPARATIVE ASUPRA A TREI SPECII APARTINÂND FAMILIEI CUCURBITACEAE

Printre activitățile biologice care sunt cele mai studiate pentru plantele acestei familii este activitatea anti-inflamatoare, antioxidantă și citotoxică. Cele mai multe studii existente arată că aceste activități sunt datorate cucurbitacinelor, dar studii recente au demonstrat că există și alți compuși ca polifenolii sau flavonoidele regăsiți în componența acestor specii care pot să fie responsabili de imprimarea acestor activități.

În acest context, studiul de față își propune să aducă o abordare nouă asupra celor trei specii, aducând dovezi științifice care pot să susțină potențialul lor ca viitoare produse fitofarmaceutice. Activitățile biologice care au fost testate au fost activitatea anti-plasmodială, citotoxică și antioxidantă. Testele *in vitro* care evaluează activitatea anti-plasmodială și citotoxică au demonstrat valori ale IC_{50} pentru probele testate care au depășit valoarea de $50 \mu\text{g/mL}$. Probele au fost testate pe două tulpini de *Plasmodium falciparum* (W2 – rezistentă la clorochină și 3D7 – sensibilă la clorochină) și pe două tipuri de linii celulare canceroase (A549 cancer de plămân și HeLa cancer cervical) și sănătoase (WI38 fibroblaste pulmonare fetale). Activitatea antioxidantă a extractelor a fost testată prin teste chimice, precum testele DPPH, CUPRAC, FRAP, TEAC, EPR și SNPAC. Activitatea antioxidantă globală a fost evaluată pentru a demonstra activitatea anti-catalitică și anti-enzimatică a acestor probe. Activitatea anti-catalitică a fost evaluată pe o peroxidază extrasă din hrean. Activitatea antioxidantă globală a fost evaluată pe neutrofile izolate *ex vivo* din sânge de cal. Testele anti-enzimatice au vizat enzima NADPH oxidaza și au fost realizate

pe un model de monocite umane care au fost transformate în macrofage (HL-60). Toate aceste teste au fost menite să arate o activitate selectivă a acestor probe în procesele redox care sunt implicate în inflamație. Aceste teste au demonstrat de asemenea că există o selectivitate a probelor pentru procesele antioxidative, care pot să demonstreze implicațiile în activitatea anti-inflamatoare. Mai mult, lipsa toxicității probelor a fost testată utilizând un model de embrioni de zebrafish, care arată că probele testate nu prezintă o toxicitate specială la diferite nivele, în special în stafiile incipiente de dezvoltare. Luând în considerare faptul că activitatea antioxidantă este cunoscută în lumea întregă ca fiind datorată compoziției în polifenoli și flavonoide, devine clar că acești compuși sunt cei care imprimă speciilor noi activități biologice, care nu au fost testate anterior de alți autori pentru aceste specii.

Originalitatea acestui studiu este legată nu numai de activitățile biologice care sunt evaluate, dar de asemenea de faptul că se arată că flavonoidele sunt compușii care sunt implicați în aceste activități, acestea fiind clase de compuși care sunt mai puțin studiate în cazul acestor specii. Un motiv suplimentar pentru a susține aceste lucruri se găsește într-un studiu complementar acestei teze, care a evaluat conținutul de cucurbitacine în aceste specii și a arătat rezultate care nu au putut confirma prezența lor în probele testate. Datorită acestui fapt și datorită faptului că toate testele realizate au fost desfășurate în comparație pentru compușii izolați și pentru referințele disponibile comercial iar rezultatele s-au dovedit a avea profile similare, dovezi importante despre implicarea flavonoidelor în aceste activități au putut fi aduse. Toate acestea au permis stabilirea potențialului acestor specii și a compușilor lor activi pentru utilizarea în tratamentul diverselor afecțiuni.

CONCLUZII GENERALE

B. alba, *E. lobata* și *E. elaterium* sunt trei specii aparținând familiei Cucurbitaceae care sunt cunoscute pentru utilizările alopate și homeopate, în medicina tradițională sau modernă. Literatura de specialitate aduce date importante despre aceste specii, dar informațiile nu sunt suficiente pentru a stabili potențialul acestor specii ca specii vegetale medicinale. Acesta este motivul principal pentru a îndrepta studiile din cadrul acestei teze înspre diversele abordări, care pot să ofere la final informații importante pentru a completa datele existente și pentru a confirma importanța lor în domeniul plantelor medicinale. Cele trei abordări studiate în cadrul tezei se referă la studiile botanice, fitochimice și biologice asupra celor trei specii.

Studiul comparativ a celor trei specii a permis aducerea de date noi și importante despre fiecare din aceste specii și, în același timp, despre similaritățile și diferențele dintre acestea. Studiul acestor plante aduce date noi și importante, atât despre compoziția acestor specii în compuși flavonoidici, dar și despre activitățile biologice de care acestea sunt responsabile. Studiul de față este primul studiu de acest fel care tratează cele trei specii în această manieră.