



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

**REZUMATUL
TEZEI DE DOCTORAT**

**CONTRIBUȚII LA STUDIUL
FARMACOBOTANIC AL UNOR FABACEE
(*GLYCYRRHIZA SP. ȘI ONONIS SP.*)**

**Conducător științific
Prof. Dr. Mircea TĂMAȘ**

**Doctorand
farm. Carmen-Maximiliana CANCIU (DOBREA)**

2011

CUPRINS

I. INTRODUCERE	1
I.1 Importanța plantelor în medicina contemporană	1
I.2 Motivarea temei	2
II. STADIUL CUNOAȘTERII	5
II.1 Genul <i>Glycyrrhiza</i>	5
II.1.1 Încadrare sistematică	5
II.1.2 Caracterele botanice ale speciilor <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. și <i>G. echinata</i> L.	9
II.1.3 Condiții de cultivare pentru <i>Glycyrrhiza</i> sp.	12
II.1.4 Produsul vegetal medicinal	13
II.1.5 Compoziția chimică a produsului <i>Liquiritiae radix</i>	20
II.1.6 Rolul fiziologic al saponinelor și flavonoidelor la plante	32
II.1.7 Acțiune farmacologică	33
II.1.8 Farmacocinetica acidului glicirizic	40
II.1.9 Interacțiuni	41
II.1.10 Toxicitate	42
II.1.11 Forme farmaceutice	45
II.1.12 Importanță economică	46
II.1.13 Cercetări românești asupra speciilor de <i>Glycyrrhiza</i>	47
II.2 Genul <i>Ononis</i>	49
II.2.1 Încadrare sistematică	49
II.2.2 Caracterele botanice ale speciilor <i>Ononis spinosa</i> L. și <i>Ononis arvensis</i> L.	52
II.2.3 Condiții de cultivare pentru <i>Ononis</i> sp.	55
II.2.4 Produsul vegetal medicinal	56
II.2.5 Compoziția chimică a produsului <i>Ononidis radix</i>	57
II.2.6 Acțiune farmacologică	60
II.2.7 Farmacocinetica substanțelor active din <i>Ononidis radix</i>	61
II.2.8 Interacțiuni	61
II.2.9 Toxicitate	61
II.2.10 Forme farmaceutice	61
II.2.11 Cercetări românești asupra speciilor de <i>Ononis</i>	62
III. CONTRIBUȚII PROPRII	63
III.1 Materialul vegetal utilizat în cercetare	64
III.1.1 Materialul vegetal utilizat pentru studiile anatomice și histochimice	64
III.1.2 Materialul vegetal utilizat pentru studiile fitochimice, farmacognostice și farmacologice	65
III.2 Studii anatomice asupra rădăcinilor speciilor <i>Glycyrrhiza glabra</i> L., <i>G. echinata</i> L., <i>Ononis spinosa</i> L. și <i>O. arvensis</i> L.	66
III.3 Studii histochimice asupra saponinelor din <i>Glycyrrhiza</i> <i>glabra</i> L., <i>G. echinata</i> L., <i>Ononis spinosa</i> L. și <i>O. arvensis</i> L.	106

III.3.1	Investigarea rădăcinilor	106
III.3.2	Investigarea părților aeriene ale <i>Ononis spinosa</i> L. și <i>O. arvensis</i> L.	119
III.4	Studii fitochimice comparative asupra speciilor <i>Glycyrrhiza glabra</i> L., <i>G. echinata</i> L., <i>Ononis spinosa</i> L. și <i>O. arvensis</i> L.	125
III.4.1	Analiza calitativă și cantitativă a saponinelor și a triterpenelor	125
III.4.1.1	Analiza acizilor glicirizic, gliciretic și a onocerinei prin CSS	125
III.4.1.2	Analiza acidului glicirizic prin spectrofotometrie	133
III.4.1.3	Analiza acizilor glicirizic și gliciretic prin HPLC/MS	135
III.4.1.4	Comparația rezultatelor obținute pentru acidul glicirizic prin cele două tehnici	149
III.4.2	Analiza calitativă și cantitativă a polifenolilor	150
III.4.2.1	Analiza calitativă a flavonoidelor prin CSS	150
III.4.2.2	Analiza polifenolilor totali prin spectrofotometrie	154
III.4.2.3	Analiza flavonoidelor totale prin spectrofotometrie	157
III.4.2.4	Analiza polifenolilor prin HPLC/MS	161
III.4.2.5	Determinarea licviritinei, licviritigeninei, isolicviritigeninei și glabridinei în rădăcinile de <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. și <i>G. echinata</i> L. prin HPLC/MS	162
III.4.2.6	Analiza izoflavonelor și a cumestanilor în rădăcinile de <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. și <i>G. echinata</i> L. prin HPLC/MS	199
III.4.2.7	Analiza ononinei și formononetinei prin HPLC/MS <i>Ononis spinosa</i> L. și <i>Ononis arvensis</i> L.	208
III. 5	Caracterizarea produselor vegetale studiate prin indicele de spumefiere și capacitatea hemolitică	219
III.5.1	Determinarea indicelui de spumefiere	219
III.5.2	Determinarea indicelui hemolitic și determinarea concentrației hemolitice medii (CH ₅₀)	221
III.6	Studii farmacologice, <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i>, asupra acțiunii extractelor totale și a substanțelor izolate din extractele speciilor studiate	227
III.6.1	Motivare și obiective	227
III.6.2	Studiul eficacității antimelanomice și antitumorale a extractului total de <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. și a acidului gliciretic pe linii celulare specifice: A431, A2058, B16	228
III.6.3	Determinarea, <i>in vitro</i> , a acțiunii extractului total de <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. și a glicirizatului de amoniu asupra mitocondriilor din hepatocitele de șobolan ...	240
III.6.4	Determinarea acțiunii antimelanomice a extractului total de <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. și a acidului gliciretic, încorporate în noi formulări topice	244
III.6.5	Studiul experimental al efectului depigmentant pentru extractul total de <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	247
III.6.6	Determinarea acțiunii antiinflamatoare a extractului și a saponinelor din <i>Ononis spinosa</i> L.	251
	CONCLUZII GENERALE	255
	BIBLIOGRAFIE	260
	ANEXE	288

Cuvinte cheie: *Glycyrrhiza glabra* L., *Glycyrrhiza echinata* L., *Ononis spinosa* L., *Ononis arvensis* L., cercetări anatomice, histochimie, saponine, flavonoide, polifenoli, glabridină, licviritină, licviritigenină, izolicviritigenină, ononină, formononetină, CSS, spectrofotometrie, HPLC/MS, antimelanomic, depigmentant, antiinflamator.

Abrevieri:

CSS Cromatografie în strat subțire
HPLC/MS Cromatografie de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă

I. INTRODUCERE

Glycyrrhiza glabra L. (lemn dulce) este una dintre cele mai utilizate plante medicinale pe mapamond. În ultimii ani s-au semnalat substituiți între rădăcinile speciei *Glycyrrhiza glabra* și *Glycyrrhiza echinata* L. (ciorânglav) în țara noastră. Calitatea medicamentului de sursă naturală depinde în mare măsură de natura și calitatea materiilor prime. *Ononidis radix*, produsul vegetal provenit de la specia *Ononis spinosa* (osul iepurelui) este recunoscut ca un eficient diuretic și saluretic. Ambele specii vegetează spontan în România, pe zone restrânse. Frecvent se inițiază culturi cu aceste specii medicinale. Răspândire spontană mult mai largă prezintă *Glycyrrhiza echinata* și *Ononis arvensis* (sinonim *Ononis hircina* Jacq.), sălășitoare.

Acest studiu s-a centrat pe analiza comparativă (I.2), din punct de vedere farmacobotic, al speciilor *Glycyrrhiza glabra* – *Glycyrrhiza echinata* și *Ononis spinosa* – *Ononis arvensis*, urmărind studiul histologic al rădăcinilor celor patru specii, localizarea histochimică a saponinelor în organele vegetative, în ontogeneză, caracterizarea fitochimică a extractelor din rădăcinile celor patru specii, caracterizarea produselor vegetale din punct de vedere al capacității de spumefiere și de hemoliză, evaluarea, *in vitro* și *in vivo*, a acțiunii unor extracte din speciile studiate, în vederea stabilirii echivalenței cu speciile medicinale, dacă aceasta poate fi dovedită, sau a unui set de criterii clare de diferențiere a speciilor, a produselor vegetale și a extractelor.

Importanța și actualitatea temei de cercetare este recunoscută la nivel național, unele rezultate din cuprinsul tezei de doctorat fiind posibile cu ajutorul finanțării obținută prin **Grantul 8850 / 05.10.2009** al Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara, cu titlul „Evaluarea, *in vitro* și *in vivo*, a eficacității antimelanomice și antitumorale pentru acidul gliciretic și fitocomplexul din rădăcina de *Glycyrrhiza glabra* L.”, al cărui director de proiect a fost autoarea tezei.

II. STADIUL CUNOAȘTERII

Genul *Glycyrrhiza* (Fabaceae) (II.1) cuprinde aproximativ 18 specii de subarbuști (II.1.1) ce vegetează în Europa, Asia și America. *G. glabra* este specia medicinală consacrată a genului și este puțin răspândită în flora spontană a României, fiind semnalată doar în județele Vrancea, Brăila, Galați și Dâmbovița (II.1.2.1). Rădăcinile, rizomii și stolonii speciei constituie produsul vegetal *Liquiritiae radix* (II.1.4) și conțin, în principal, 4-20% saponine și 0,4-2% flavonoide, ce conferă o culoare galbenă rădăcinilor (II.1.5).

Relatări despre utilizarea lemnului dulce datează încă din antichitate, fiind considerat „strămoșul plantelor medicinale” în literatura chineză, cu documentare din secolul II î. Ch.; în medicina ayurvedică este unul dintre cele mai folosite ingrediente; a fost utilizat de sciți, greci și romani ca expectorant, antiinflamator, antiulceros, edulcorant. Recent au fost semnalate noi acțiuni farmacologice ale acestui produs vegetal: hepatoprotectoare, antispastică, antioxidantă, antibacteriană, antivirală, antimicotică, antitumorală, estrogenică, inhibitoare a recaptării serotoninei, depigmentantă (II.1.7).

Liquiritiae radix este întâlnită în compoziția unor ceaiuri, extracte lichide, moi sau uscate, capsule, comprimate, drajeuri, soluții de uz intern sau extern, creme (II.1.11). Pulberea de *Liquiritiae radix* se adaugă pentru aromatizarea preparatelor cu cacao, a dulciurilor și a țigărilor (II.1.12).

Glycyrrhiza echinata (ciorânglav) (II.1.2.2) prezintă rădăcini de culoare alb-cenușie la interior, ce conțin saponine utilizate pentru obținerea amestecurilor spumante din extincitoare. *G. echinata* este mai răspândită decât *G. glabra* în flora spontană a țării noastre.

În literatura universală există numeroase date cu privire la acțiuni terapeutice recent evidențiate ale *G. glabra*, dar se remarcă o lipsă a aprofundării acestora. Se observă necesitatea intensificării studiilor în domeniul morfologiei, anatomiei, formulării unor forme farmaceutice moderne și explorării acțiunilor farmacologice noi.

Genul *Ononis* (II.2) cuprinde 86 de specii pe mapamond, dintre care în România sunt semnalate patru. *Ononis spinosa* (osul iepurelui) prezintă tulpină cu spini duri și vegetează în Oltenia și Moldova, *Ononis arvensis* (sălășitoare) nu prezintă spini pe tulpină și vegetează în Transilvania (II.2.2). Produsul vegetal *Ononidis radix*, reprezentat de rădăcinile speciei *O. spinosa* (II.2.4), ce conține triterpene și izoflavone (II.2.5), este singurul menționat în fitoterapie în acest moment, fiind utilizat pentru acțiunea diuretică, saluretică, antilitiazică, uricozurică (II.2.6).

Cercetările românești și internaționale asupra speciilor de *Ononis* sunt reduse (II.2.11), observându-se lipsa studiilor asupra morfologiei, anatomiei, histochimiei, compoziției speciilor și a noilor utilizări terapeutice.

III. CONTRIBUȚII PROPRII

Partea principală a lucrării prezintă contribuțiile proprii la studiul farmaco-botanic al speciilor *Glycyrrhiza glabra*, *G. echinata*, *Ononis spinosa* și *O. arvensis*.

În capitolul III.1 este prezentat materialul vegetal utilizat pentru cercetările anatomice, histologice, fitochimice, farmacognostice și farmacologice. Am folosit exemplare din culturi proprii ale Facultății de Farmacie din Timișoara și recoltate din flora spontană, prezentând condițiile de cultivare, respectiv caracteristicile și localizarea zonei de recoltare. Au fost păstrate exemplare voucher pentru fiecare specie. Rădăcinile sau părțile aeriene ale speciilor au fost uscate, măcinate și utilizate în continuare.

Capitolul III.2 prezintă studiul anatomic comparativ asupra rădăcinilor (structură primară și structură secundară) celor patru specii, identificând criteriile de diferențiere a speciilor aparținând aceluiași gen, în cazul în care se dispune doar de produsul vegetal, fără a putea compara morfologia organelor vegetale aeriene, ce conferă date suplimentare de identificare (aspectul inflorescențelor și al fructelor). Deosebiri observate la nivelul secțiunilor transversale prin rădăcini cu structură secundară între *Glycyrrhiza echinata* și

G. glabra la nivelul razelor medulare, al numărului de vase lemnoase și a distribuției fibrelor sclerenchimatice din lemnul secundar servesc la diferențierea celor două specii. Deosebiri la nivelul secțiunilor transversale prin rădăcini cu structură secundară între *Ononis arvensis* și *O. spinosa* se observă la nivelul scoarței, al razelor medulare și al dispunerii metaxilemului.

Capitolul **III.3** cuprinde identificarea histochimică a prezenței saponinelor în organele vegetative ale celor patru specii. Studiul, în ontogeneză (**III.3.1**), evidențiază saponinele în cilindrul central din rădăcinile cu structură primară de *Ononis spinosa*, *O. arvensis*, *Glycyrrhiza glabra* și *G. echinata*. În structura secundară a rădăcinilor de *Glycyrrhiza glabra* și *G. echinata* saponinele se acumulează în scoarță, parenchimul liberian și razele medulare. Dintre aceste țesuturi, primele straturi de celule parenchimatice de la exteriorul scoarței sunt mai bogate în saponine. Rădăcinile cu structură secundară de *Ononis spinosa* și *O. arvensis* acumulează saponine preponderent în feloderm, scoarță, parenchim liberian și raze medulare. Cantitatea de saponine acumulată crește proporțional cu vârsta rădăcinii.

Părțile aeriene ale speciilor *Ononis spinosa* și *O. arvensis* (**III.3.2**) prezintă saponine în liber și parenchimul cortical din structura tulpinii și mezofilul palisadic, cel lacunar și liberul din structura frunzelor. Aceste surse ușor regenerabile pot reprezenta o alternativă la utilizarea rădăcinilor.

În capitolul **III.4** sunt prezentate rezultatele analizelor calitative și cantitative efectuate pentru caracterizarea fitochimică a rădăcinilor celor patru specii.

Subcapitolul **III.4.1** este dedicat studiului saponinelor și triterpenelor din extractele metanolice totale. Am realizat inițial cercetări preliminare prin CSS (**III.4.1.1**), utilizând ca standarde acidul glicirizic (saponina reprezentativă a speciei *Glycyrrhiza glabra*), acid gliciretic (agliconul acidului glicirizic) și onocerină (triterpena reprezentativă a speciei *Ononis spinosa*). Acidul glicirizic poate fi identificat în extractele metanolice totale din rădăcinile și tulpinile de *G. glabra* și rădăcinile de *O. spinosa*. În rădăcinile speciei *G. echinata* acidul glicirizic nu este detectat. Acidul gliciretic nu a fost evidențiat în extractele studiate nehidrolizate. Prezența acizilor glicirizic și gliciretic detectată în extractele de *G. glabra*, dar nu și în *G. echinata* constituie un criteriu de diferențiere a speciilor, permițând identificarea eventualelor substituiri. Onocerina este identificată atât în extractele de *O. spinosa*, cât și în extractele de *O. arvensis*, dar nu se extrage prin metoda de izolare a saponinelor propusă de Cucu și Grecu. Prezența acestei substanțe este confirmată prin proba de microsublimare, obținându-se, în cazul ambelor specii de *Ononis*, cristale aciculare suprapuse, ce formează cristale compuse, cu aspect curbat. Profilul chimic al speciilor *Ononis spinosa* și *Ononis arvensis* este asemănător.

În urma determinării spectrofotometrice a concentrației acidului glicirizic (**III.4.1.2**) am obținut valoarea 0,49 % în produsul vegetal din culturi proprii și 2,3 % acid glicirizic în produsul Plafar, cote inferioare minimului acceptate de FR X, de cel puțin 5%. Am comparat datele obținute cu rezultatele metodei HPLC/MS (**III.4.1.3**): 0,54% acid glicirizic în produsul vegetal din culturi proprii, respectiv 2,41% acid glicirizic în produsul Plafar. Cultura proprie nu a atins încă vârsta de recoltare recomandată de 3 ani. Produsul vegetal aparținând Plafar, nu ar trebui comercializat ca atare deoarece nu îndeplinește standardele impuse de farmacopeile în vigoare. Datele obținute prin cele două metode sunt apropiate, validând rezultatele. Se observă superioritatea metodei HPLC/MS ce poate fi utilizată pentru determinarea cantitativă concomitentă a mai multor substanțe în aceeași

soluție. Am propus căi de fragmentare posibile pentru acidul glicirizic și acidul gliciretic, ce explică semnalele obținute prin spectrometrie de masă.

Rezultatele analizei calitative și cantitative a polifenolilor din probe vegetale sunt prezentate în subcapitolul **III.4.2**.

Am analizat calitativ, prin CSS, flavonoidele în extractele metanolice ale celor patru specii. (**III.4.2.1**). Extractul metanolic total din rădăcini de *Glycyrrhiza glabra* conține cea mai mare cantitate de flavonoide, identificându-se două benzi largi, galbene, specifice acestor substanțe. Extractele totale din tulpini și frunze de *G. glabra* conțin flavonoide, dar în cantități mai reduse. *G. echinata* nu conține derivați flavonoidici detectabili prin metoda utilizată. Absența flavonoidelor constituie un criteriu suplimentar de diferențiere între cele două specii aparținând genului *Glycyrrhiza*. Rădăcinile speciilor *Ononis spinosa* și *O. arvensis* prezintă profil asemănător din punct de vedere al flavonoidelor conținute, ononina, izoflavona caracteristică fiind prezentă în ambele specii și ar putea fi echivalente în terapie.

În subcapitolul **III.4.2.2** am determinat cantitativ, prin spectrofotometrie, polifenolii totali, rezultatul a fost exprimat în acid galic: *Glycyrrhiza glabra* - 4,6849%, *G. echinata* 0,9071%, *Ononis spinosa* - 4,1531%, *O. arvensis* - 2,3833%. *Glycyrrhiza echinata* nu poate înlocui *G. glabra*, conținând polifenoli totali în cantitate de zece ori mai redusă decât specia medicinală. Pentru *Ononis spinosa* și *O. arvensis* cantitatea de polifenoli totali este mai apropiată, dar și în acest caz specia medicinală este superioară.

Analiza a continuat, în subcapitolul **III.4.2.3**, cu determinarea cantitativă, prin spectrofotometrie, a flavonoidelor totale, rezultatul a fost exprimat în rutozidă. *Glycyrrhiza glabra* conține cea mai mare cantitate de flavonoide 0,58%. *G. echinata* conține doar 0,13% flavonoide în produsul vegetal. Pentru *Ononis spinosa* și *O. arvensis* cantitatea de flavonoide este foarte apropiată 0,45% respectiv 0,41%.

Prin metoda HPLC am investigat prezența a 18 polifenoli (**III.4.2.4**): acidul caftaric, acidul genistic, acidul cafeic, acidul clorogenic, acidul p-cumaric, acidul ferulic, acidul sinapic, hiperozida, isocvercitrina, rutina, miricetolul, fisetina, cvercitrina, cvercitolul, patuletina, luteolina, kampferolul și apigenina în extractele din rădăcinile speciilor studiate. *Glycyrrhiza glabra* conține acizii cumaric, ferulic și clorogenic, iar *G. echinata* nu prezintă nici unul dintre compușii analizați. Prezența rutozidei în *Ononis spinosa* (identificată anterior prin CSS în capitolul **III.4.2.1**) este confirmată prin analiza HPLC. *Ononis arvensis* conține luteolină, acid p-cumaric, acid ferulic. Cvercitolul și kampferolul se întâlnesc în structura unor glicozide, aceste standarde fiind identificate doar după hidroliză. Caracterizarea extractelor impune și analiza unor substanțe specifice genurilor *Glycyrrhiza* și *Ononis*.

Pentru prima dată în România, am cuantificat licviritina, licviritigenina, isolicviritigenina, glabridina, daidzeina, daidzina, genisteina, genistina, formononetina, ononina și cumestrolul în produsele vegetale autohtone prin HPLC/MS (**III.4.2.5-III.4.2.7**). Rădăcinile speciei *Glycyrrhiza glabra* conțin licviritină, licviritigenină, isolicviritigenină, glabridină, daidzină, genistină, ononină, formononetină și cumestrol, în concentrații superioare întâlnindu-se licviritina (0,051 %) și glabridina (0,109 %). *Glycyrrhiza echinata* nu conține glabridină, daidzina, genistina și cumestrol iar concentrația licviritinei (0,001 %) și licviritigeninei (0,004 %) sunt mult inferioare celor din *G. glabra*. Deși prezentă în extractele de *Glycyrrhiza echinata*, concentrația ononinei (0,009 %) este cu un ordin de mărime inferioară celei din extractele de *G. glabra*

(0,068 %). Rădăcinile de *Ononis spinosa* și *O. arvensis* conțin ononină (0,025 % respectiv 0,017 %) și formononetină (0,006 %, respectiv 0,008 %) în concentrații similare.

Fiind produse vegetale bogate în saponine (**III.5**), am identificat indicele de spumefiere ($IS_{G. glabra} = 250$, $IS_{G. echinata} = 400$, $IS_{O. spinosa} = 125$, $IS_{O. arvensis} = 333$), indicele hemolitic și am cuantificat prin metoda spectrofotometrică concentrația hemolitică medie ($CH_{50 G. glabra} = 12,38$ mg/ml, $CH_{50 G. echinata} = 9,15$ mg/ml, $CH_{50 O. spinosa} = 7,06$ mg/ml, $CH_{50 O. arvensis} = 10,90$ mg/ml). Cele patru produse vegetale testate, saponinele izolate din rădăcinile de *Ononis spinosa* și glicirizatul de amoniu prezintă capacitate hemolitică scăzută, ce nu constituie un impediment în utilizarea terapeutică.

Capitolul **III.6** prezintă rezultatele studiilor farmacologice ale extractelor sau substanțelor existente în speciile studiate. Inițial am obținut formulări topice inovatoare în care am încorporat extract total și substanțe active. Am realizat creșterea solubilității acidului gliciretic în apă, cu ajutorul hidroxi-propil-gamaciclodextrinei, în vederea îmbunătățirii biodisponibilității.

Testele, *in vitro*, efectuate pe liniile celulare A431 (cancer de piele), A2058 (melanom uman) și B16 (melanom la șoarece) (**III.6.2**) demonstrează acțiunea inhibitoare asupra proliferării celulare a extractului total de *Glycyrrhiza glabra*, a complexului acid gliciretic - ciclodextrină și a acidului gliciretic.

Capacitatea respiratorie a mitocondriilor izolate din hepatocite de șobolan (Indice respirator _{martor} 8,64) este influențată de extractul total de *Glycyrrhiza glabra* (Indice respirator 1,92) într-o manieră superioară glicirizatului de amoniu (Indice respirator 5,08), flavonele prezente în extract manifestându-și puternic caracterul antioxidant (**III.6.3**). Indicele respirator desemnează raportul între consumul de oxigen al respirației bazale și consumul de oxigen necesar fosforilării oxidative a ADP-ului în stadiul III al respirației la nivelul complexului I mitocondrial.

Extractul total de *Glycyrrhiza glabra*, acid gliciretic și complex acid gliciretic – hidroxipropil-gama ciclodextrină, încorporate în formule topice originale, reduc cu până la 20 % pigmentarea și cu până la 30 % eritemul leziunilor melanomice la șoareci C57BL/6J cu patologie indusă (**III.6.4**). Acțiunea depigmentantă a extractului de *G. glabra* (încorporat în forme farmaceutice cu aplicare topică ce conțin 5-20 % extract) se manifestă asupra maculelor hiperchrome de diverse cauze, dar nu se asociază cu efectul antiaging. Avantajul acestui extract comparativ cu un peeling este metoda depigmentantă non-invazivă, datorită substanțelor inhibitoare ale tirozinazei (**III.6.5**).

S-a testat acțiunea antiinflamatoare a extractului alcoolic 1,4 % și a saponinelor izolate din *Ononidis radix* 0,088 %, utilizând modelul experimental al edemului labei de șobolan indus cu caolin 10 %. Atât extractul alcoolic cât și saponinele izolate din *Ononidis radix* au prezentat efecte antiinflamatoare superioare lotului martor, dar inferioare lotului control, tratat cu diclofenac. Saponinele izolate din *Ononidis radix* sunt principalele componente responsabile de efectul antiinflamator (**III.6.6**).

CONCLUZII GENERALE

A. *Ononis* sp.: Rezultatele cercetărilor fitochimice proprii indică o concentrație apropiată de flavonoide și saponine în rădăcinile de *O. spinosa* și *O. arvensis*. Viitoare cercetări farmacologice conduse în vederea stabilirii echivalenței efectelor diuretic, saluretic și uricozuric a celor două produse vegetale, vor putea recomanda în perspectivă includerea rădăcinilor de *O. arvensis* în compoziția produsului vegetal medicinal

Ononidis radix. Cercetările histochemice indică prezența saponinelor și în părțile aeriene ale ambelor specii de *Ononis* studiate. Studii viitoare ar putea confirma utilitatea terapeutică a părților aeriene, care au avantajul de a fi regenerabile.

B. *Glycyrrhiza* sp.: Rădăcinile speciei *G. echinata* nu prezintă substanțele caracteristice produsului vegetal consacrat *Liquiritiae radix* și nu pot fi utilizate în vederea obținerii aceluiași efect terapeutic.

În lucrare sunt prezentate multiple alternative pentru identificarea substituirilor sau a falsificărilor produsului vegetal *Liquiritiae radix*: criterii morfologice, particularitățile din anatomia rădăcinii, metode spectrofotometrice (identificarea acidului glicirizic) și metode cromatografice (CSS, HPLC) de identificare și de dozare a substanțelor active reprezentative. Principalele diferențe fitochimice evidențiate ce permit discriminarea rădăcinilor de *G. glabra* și *G. echinata* se referă la prezența exclusivă a saponinei acid glicirizic, a izoflavanului glabridină, a chalconei izolicviritigenă, a acizilor fenol-carboxilici clorogenic, cumaric și ferulic, a izoflavonelor daidzină și genistină respectiv a cumestanului cumestrol în rădăcina de *G. glabra*.

Lucrarea cuprinde și determinarea cantitativă prin HPLC/MS a numeroși fitocompuși din speciile de *Glycyrrhiza* și *Ononis*, unele cuantificări fiind făcute în premieră pe produse autohtone.

C. Studii farmacologice originale au relevat pentru extractele din rădăcini de *G. glabra*, efectele antimelanomic (*in vivo* pe șoareci C57BL/6J, *in vitro* pe liniile celulare A431, A2058, B16), depigmentant și antierytematos (*in vivo* pe șoareci C57BL/6J). Au fost obținute forme farmaceutice moderne de uz topic, pentru care au fost determinate stabilitatea și cedarea substanței active.

Extractul total de *G. glabra* influențează capacitatea respiratorie a mitocondriilor izolate din hepatocite de șobolani Wistar în manieră superioară glicirizatului de amoniu, flavonoidele prezente în extract manifestându-și caracterul antioxidant. Pentru prima dată fost investigat efectul acestora pe complexul I al respirației, în condiții de lucru modificate față de cele cunoscute în literatură.

Pentru extractele din rădăcini de *O. spinosa* a fost evidențiat pe șobolan prin pletismometrie efectul antiinflamator, comparabil cu al diclofenacului, pe termen scurt.

Referințe bibliografice reprezentative (dintr-un total de 301 titluri)

- NASSIRI AM, HOSSEINZADEH H. Review of Pharmacological Effects of Glycyrrhiza sp. and its Bioactive Compounds. *Phytother Res*. 2008;22:709–724.
- ISBRUCKER RA, BURDOCK GA. Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2006;46:167–192.
- MARTINO R, MALET-MARTINO M, GILARD V, BALAYSSAC S. Counterfeit drugs: analytical techniques for their identification. *Anal Bioanal Chem*. 2010; 398:77-92.
- WOJCIECHOWSKI MF, LAVIN M, SANDERSON MJ. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. *Am J Bot*. 2004;91(11):1846-62.
- AMMOSOV AS, LITVINENKO VI. Phenolic compounds of the genera *Glycyrrhiza* L. and *Meristotropis* Fisch. et Mey. (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2007;7(41):30-52.
- GOL'DBERG ED, AMOSOVA EN, ZUEVA EP, RAZINA TG, KRYLOVA SG, ZORIKOV PS. Licorice Preparations Improve Efficiency of Chemotherapy and Surgical Treatment of Transplanted Tumors. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2008;2(154): 322-336.
- VOȘTINARU O. Studiul comparativ al efectului diuretic al unor plante medicinale-Teză de doctorat. UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca 2007;
- TENG HM, FANG MF, CAI X, HU ZH. Localization and dynamic change of saponin in vegetative organs of *Polygala tenuifolia*. *J Integrat Pl Biol*. 2009;51(6): 529–536.

CURRICULUM VITAE

1. **Nume, prenume CANCIU (căs. DOBREA) Carmen Maximiliana**

2. **Adresa:** Str. Circumvalațiunii, Nr. 25, Timișoara, jud. Timiș

3. **Telefon, e-mail:** 0724 578305; cmcanciu@umft.ro

4. **Data și locul nașterii:** 15.01.1982, Sibiu, jud. Sibiu

5. **Educație și formare:**

2006-prezent Doctorand al Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, Facultatea de Farmacie, conducător științific prof., dr. Mircea Tămaș.

2010 Farmacist specialist - Farmacie clinică

2007-2010 Farmacist rezident în specialitatea Farmacie clinică

2006 Licența în Științe farmaceutice

2001-2006 Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș”, Timișoara, Facultatea de Farmacie – șef de promoție

2001 Diploma de Bacalaureat

1996-2001 Colegiul Național „Coriolan Brediceanu”, Lugoj

6. **Cursuri postuniversitare:**

2010 Plante medicinale utilizate condimentar: interes profilactic, terapeutic și nutrițional, curs organizat de Facultatea de Farmacie, Disciplina Botanică farmaceutică din cadrul UMF „Victor Babeș”, Timișoara

2009 Plante medicinale de interes dermatocosmetic, curs organizat de Facultatea de Farmacie, Disciplina Botanică farmaceutică din cadrul UMF „Victor Babeș”, Timișoara

2008-2010 Modulul psiho-pedagogic postuniversitar – Departamentul Pentru Perfecționarea Personalului Didactic, Universitatea „Aurel Vlaicu”, Arad

2007 Forme farmaceutice cu eliberare modificată, curs organizat de Facultatea de Farmacie, Disciplina Tehnică farmaceutică din cadrul UMF „Victor Babeș”, Timișoara

7. **Premii:**

Premiul **Student eminent 2003 – Pentru rezultate excepționale în activitatea universitară** – oferit de Asociația Orizonturi Universitare Timișoara

8. **Experiența profesională: 2007-prezent** preparator la disciplina Botanică farmaceutică a Facultății de Farmacie din cadrul UMF „Victor Babeș”, Timișoara

9. **Programe de cercetare:**

Director de proiect: Grant de cercetare 8850/05.10.2009, cu tema „Evaluarea, *in vitro* și *in vivo*, a eficacității antimelanomice și antitumorale pentru acidul gliciretic și fitocomplexul din rădăcina de *Glycyrrhiza glabra*”, al Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș”, Timișoara

10. **Limbi străine:** engleză avansat, franceză avansat

11. Membru al societăților profesionale:

Societatea de Științe Farmaceutice din România

Societatea Română de Biochimie

Colegiul Farmaciștilor Timiș

12. Activitatea științifică:

Studiile efectuate în domeniul morfologiei, anatomiei, compoziției chimice și acțiunii farmacologice a plantelor medicinale au fost diseminate prin:

Lucrări publicate *in extenso*:

1. **Canciu CM**, Șoica C, Dehelean CA, Kasa P, Ambrus R, Antal DS (2010) - Hydro soluble glycyrrhetic acid complexes using hydroxypropyl- γ -cyclodextrin and randomly-methylated- β -cyclodextrin: preparation and multiple experimental characterisation of the complexes. *Acta Medica Marisiensis*; 4(56):384-386.
2. **Canciu CM**, Șoica C, Dehelean CA, Antal DS, Aigner Z, Ambrus R (2009) - Glycyrrhetic acid from *Glycyrrhiza glabra* L.: phase solubility analysis in the presence of natural and semisynthetic cyclodextrins. *Oradea University Annals section Chemistry*; 16:25-30.
3. **Canciu CM**, Antal DS, Peev C, Dehelean CA, Manfred Anke (2009) - *Ononidis radix*: caracterizarea constituenților anorganici din produsul uscat și extractul apos, *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat.*, 2(113), supl. 4:64-66.
4. **Canciu CM**, Todea S, Tămaș M (2008) – Criterii de identificare a substituirilor pentru *Liquiritiae radix*, *Revista de Medicină și Farmacie Orvosi es Gyogyszereszeti Szemle*, 54, supl. 3: 94-97.
5. **Canciu CM**, Voștinăru O, Tămaș M (2008)- The determination of the anti-inflammatory action of the extract and isolated saponin from *Ononidis radix*, *Timișoara Medical Journal*, 58, supl. 2: 413-415.
6. **Canciu CM**, Vlase L, Peev C, Dehelean C, Feflea Ș, Antal DS (2008) - HPLC analysis of polyphenols from ethanolo extract of *Liquiritiae radix*, phytochemical and antiproliferative *in vitro* tests, *Timișoara Medical Journal*, 58, supl. 2: 416-420.
7. Antal DS, **Canciu CM**, Dehelean CA, Anke M (2010) - How much selenium do medicinal plants contain? Results of a research on wild-growing species from Western Romania. *Oradea University Annals section Biology* 17(1):23-28.
8. Antal DS, Dehelean CA, **Canciu CM**, Anke M (2009) – Vanadium in medicinal plants: new data on the occurrence of an element both essential and toxic to plants and man, *Analele Universității din Oradea – Fascicula Biologie*, 2: 5-9.
9. Antal DS, Brezoczki A, **Canciu CM** (2009) - Crassulaceae din România: cercetări anatomice asupra unor reprezentanți cu potențial fitoterapeutic, *Rev. Med. Chir. Soc., Med., Nat.*, 2 (113), supl. 4:11-15.
10. Dumache R., **Canciu CM**, Serban C., Puiu M. (2008) – Challenges of biotechnology in medicine, *Timișoara Medical Journal*, 58, supl. 2 : 157-159.
11. Dragomirescu A, **Canciu CM**, Peev C, Dehelean CA, Feflea Ș, Moldovan M (2008). – Experimental study of depigmenting effect of a *Glycyrrhiza glabra* L. extract, *Timișoara Medical Journal*, 58, supl. 2: 392-395.
12. Feflea Ș, Kaycsa A, Peev C, Dehelean CA, **Canciu CM** (2008) – Citrus aurantium peel: preliminary analysis of three types of extracts *Timișoara Medical Journal*, 58, supl. 2 :461-464.

Lucrări prezentate la conferințe internaționale și naționale, publicate în rezumat:

1. **Canciu CM**, Dehelean CA, Csányi E, Mureșan A, Antal DS, Tămaș M (2010) - *Glycyrrhiza glabra* L. extract and glycyrrhetic acid: efficient antineoplastic agents in

- new topical formula. *Pharmacognosy Magazine*; 6, supplim. 22: 60, prezentat în cadrul 6th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Antalya 2010
2. **Canciu CM**, Șoica C, Dehelean CA, Ambrus R, Csányi E, Antal DS (2010) - Effects of Rameb complexation on aqueous solubility and bioavailability of glycyrrhetic acid from *Glycyrrhiza glabra* L. and two methods characterisation of the complex. *Pharmacognosy Magazine*; 6, supplim 22: 146-147, prezentat în cadrul 6th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Antalya 2010
 3. Antal DS, Borchescu P, **Canciu CM** (2010) - Anatomical investigations on Euphorbia species with phytotherapeutical potential. *Pharmacognosy Magazine* 6, supplim. 22: 156, prezentat în cadrul 6th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Antalya 2010
 4. **Canciu CM** (2010) - PhD education in health sciences from Romania: conclusions from a decade of perpetual transitions. The advancement of European Biomedical and Health Science PhD Education by Cooperative Networking - abstract book: 29, prezentat în cadrul 5th Organisation for PhD Education in Biomedicine and Health Sciences in the European System Conference, Vienna
 5. **Canciu CM**, Antal DS, Tămaș M (2010) - Saponins in the epigeal part of *Ononis spinosa* L.: results of a histochemical analysis. *Acta Medica Marisiensis* 56, supplim 2: 56, prezentat în cadrul Congresului Național de Farmacie din România, ediția a XIV-a, Târgu-Mureș
 6. Antal DS, **Canciu CM** (2010) - Anatomical and histochemical investigations of *Punica granatum* L. *Acta Medica Marisiensis* 56, supplim 2: 67, prezentat în cadrul Congresului Național de Farmacie din România, ediția a XIV-a, Târgu-Mureș
 7. Antal DS, Biriescu S, **Canciu CM** (2010) - Traditional medicine in Banat region (Romania): results of an ethnobotanical survey, prezentat în cadrul 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Berlin, publicat în *Planta Medica* 2010; 76(12):1223.
 8. **Canciu CM**, Șoica C, Dehelean CA, Antal DS, Aigner Z, Ambrus R (2009)– Glycyrrhetic acid from *Glycyrrhiza glabra* L. phase solubility analysis in the presence of natural and semisynthetic cyclodextrins. *International Conference On Sciences, Abstracts booklet*: 26.
 9. Bumbăcilă B, **Canciu CM**, Dumache R, Kaycsa A (2008) – The accuracy of the GC-MS determination of capsaicin in rat blood samples using two different derivatization techniques. *Romanian Journal Of Biochemistry*, 45, Suplim. 2: 30, prezentat în cadrul Congresului Național de Biochimie 2008.
 10. Dragomirescu A, **Canciu CM**, Peev C, Dehelean CA, Feflea Ș, Ciurelea S, Bumbăcilă B (2008). – Experimental study of depigmenting effect of a *Glycyrrhiza glabra* L. extract, 5th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries Abstract Book: 63.
 11. Feflea Ș, Kaycsa A, Peev C, Dehelean CA, **Canciu CM** (2008) – Citrus peel extracts phytochemical analysis, 5th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries Abstract Book:161.
 12. **Canciu CM**, Vlase L, Peev C, Dehelean CA, Feflea Ș, Tămaș M (2008)- HPLC analysis of polyphenols from ethanlo extract of *Liquiritiae radix*, phytobiological and antiproliferative *in vitro* tests, 5th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries Abstract Book: 163.



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

ABSTRACT of the DOCTORAL THESIS

**CONTRIBUTIONS TO THE
PHARMACO-BOTANICAL STUDY OF
SOME FABACEAE
(*GLYCYRRHIZA* SP. AND *ONONIS* SP.)**

Scientific supervisor:

Prof. univ. Mircea TĂMAȘ

PhD student:

Carmen-Maximiliana CANCIU

2011

CONTENTS

I. INTRODUCTION	1
I.1 Plants in contemporaneous medicine	1
I.2 Argument	2
II. STATE OF KNOWLEDGE	5
II.1 <i>Glycyrrhiza</i> GENUS	5
II.1.1 Scientific classification	5
II.1.2 Botanical characterization: <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. and <i>Glycyrrhiza echinata</i> L.	9
II.1.3 Cultivation techniques	12
II.1.4 Medicinal plant drug	13
II.1.5 Chemical composition of <i>Liquiritiae radix</i>	22
II.1.6 The physiological functions of flavonoids and saponins in plants	33
II.1.7 Pharmacological actions	34
II.1.8 Glycyrrhizic acid – pharmacokinetics	42
II.1.9 Drug interactions	43
II.1.10 Toxicity	44
II.1.11 Pharmaceutical forms	47
II.1.12 Economical importance	49
II.1.13 Romanian research on <i>Glycyrrhiza</i> sp.	49
II.2 <i>Ononis</i> GENUS	51
II.2.1 Scientific classification	51
II.2.2 Botanical characterization: <i>Ononis spinosa</i> L. and <i>Ononis arvensis</i> L.	54
II.2.3 Cultivation techniques	57
II.2.4 Medicinal plant drug	58
II.2.5 Chemical composition of <i>Ononidis radix</i>	59
II.2.6 Pharmacological actions	62
II.2.7 Pharmacokinetics	62
II.2.8 Drug interactions	62
II.2.9 Toxicity	62
II.2.10 Pharmaceutical forms	63
II.2.11 Romanian research on <i>Ononis</i> sp.	63
III. PERSONAL CONTRIBUTIONS	65
III.1 Plant materials	66
III.1.1 Plant material used in anatomical and histological studies	66
III.1.2 Plant material used in phytochemical, pharmacognostic and pharmacological studies	67
III.2 Anatomical studies on <i>Glycyrrhiza glabra</i> L., <i>G. echinata</i> L., <i>Ononis spinosa</i> L. and <i>O. arvensis</i> L. roots	68
III.3 Histochemical studies on saponin localization in <i>Glycyrrhiza glabra</i> L., <i>G. echinata</i> L., <i>Ononis spinosa</i> L. and <i>O. arvensis</i> L.	108
III.3.1 Investigation on roots	108

III.3.2 Investigation on <i>Ononis spinosa</i> L. and <i>O. arvensis</i> L. aerial parts	122
III.4 Comparative phytochemical studies on <i>Glycyrrhiza glabra</i> L., <i>G. echinata</i> L., <i>Ononis spinosa</i> L. and <i>Ononis arvensis</i> L.	128
III.4.1 Qualitative and quantitative analysis of saponins and triterpenes	128
III.4.1.1 Analysis of glycyrrhizic acid, glycyrrhetic acid and onocerin by TLC ..	128
III.4.1.2 Analysis of glycyrrhizic acid by spectrophotometry	136
III.4.1.3 Analysis of glycyrrhizic and glycyrrhetic acid by HPLC/MS	138
III.4.1.4 Comparison between the results obtained by spectrophotometry and HPLC	152
III.4.2 Qualitative and quantitative analysis of polyphenols	152
III.4.2.1 Qualitative analysis of flavonoids by TLC	152
III.4.2.2 Analysis of total polyphenols by spectrophotometry	156
III.4.2.3 Analysis of total flavonoids by spectrophotometry	159
III.4.2.4 Analysis of polyphenols by HPLC/MS	161
III.4.2.5 Qualitative analysis of liquiritin, liquiritigenin, isoliquiritigenin and glabridin in <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. and <i>G. echinata</i> L. by HPLC	162
III.4.2.6 Analysis of isoflavones and coumestans in <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. and <i>G. echinata</i> L. roots by HPLC	199
III.4.2.7 Analysis of ononin and formononetin in <i>Ononis spinosa</i> L. and <i>O. arvensis</i> L. roots by HPLC	208
III.5 Characterization of the four medicinal drug products by their foam index and hemolytic capacities	219
III.5.1 Determination of foaming index	219
III.5.2 Determination of hemolytic activity	221
III.6 Pharmacological, <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>, studies on total extracts and isolated active compounds from <i>Glycyrrhiza</i> and <i>Ononis</i> species	227
III.6.1 Argument and objectives	227
III.6.2 The anti-melanoma and anti-tumoral activities of <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. total extract and of glycyrrhetic acid on A431, A2058 and B16 cell lines..	237
III.6.3 <i>In vitro</i> assessments of <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. total extract and of ammoniacal glycyrrhizin on rat hepatocytes mitochondrial function	240
III.6.4 <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. extract and glycyrrhetic acid: efficient antineoplastic agents in new topical formula	244
III.6.5 Experimental study on depigmenting effects of a <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. extract	247
III.6.6 The determination of the anti-inflammatory action of the extract and isolated saponin from <i>Ononidis radix</i>	251
GENERAL CONCLUSIONS	255
BIBLIOGRAPHY	260
ANNEXES	288

Key words: *Glycyrrhiza glabra* L., *Glycyrrhiza echinata* L., *Ononis spinosa* L., *Ononis arvensis* L., root anatomy, histochemistry, saponins, flavonoids, isoflavones, polyphenols, thin layer chromatography, spectrophotometry, high performance liquid chromatography, mass spectrometry, anti-melanoma, depigmenting, anti-inflammatory.

Abbreviations:

TLC thin layer chromatography

HPLC-MS high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry

I. INTRODUCTION

Glycyrrhiza glabra L. (licorice) is one of the most frequently used herbs in the world. In recent years several substitutions between *Glycyrrhiza glabra* and *Glycyrrhiza echinata* L. (Russian licorice) roots have been reported in Romania. Quality of drugs from natural sources depends largely on the nature and quality of raw materials. *Ononidis radix*, the plant product derived from *Ononis spinosa* L. (spiny restharrow), is recognized as an effective diuretic and saluretic. Both species vegetate spontaneously in Romania, in restricted areas. Medicinal crops of these species are often initiated. *Glycyrrhiza echinata* and *Ononis arvensis* (synonym *Ononis hircina* Jacq.) have wider spontaneous distributions than *G. glabra* and *O. spinosa*.

This study focused on comparative pharmaco-botanical analysis of four species *Glycyrrhiza glabra* - *Glycyrrhiza echinata* and *Ononis spinosa* - *Ononis arvensis* (I.2), regarding several levels of interest: histology of the roots; histochemical location of saponins in different plant organs during ontogenesis; phytochemical characterization of the root extracts; characterization, in terms of foam index and hemolytic capacity of the four plant products; *in vitro* and *in vivo* evaluation of the pharmacological activity of extracts, in order to establish the equivalence to the recognized medicinal species, if it can be proven, or to identify a set of criteria for differentiation of species, plant products and extracts.

The importance and current interest of the research theme is nationally recognized, and received funding through **Grant 8850 / 05.10.2009** of the University of Medicine and Pharmacy "Victor Babes" Timișoara, entitled " *In vitro* and *in vivo* evaluation of the antitumor and antimelanoma efficacy of glycyrrhetic acid and *Glycyrrhiza glabra* L. root phytocomplex", whose director was the author of this thesis.

II. STATE OF KNOWLEDGE

The genus *Glycyrrhiza* (Fabaceae) (II.1) includes approximately 18 species of shrubs (II.1.1) that vegetate in Europe, Asia and America. *Glycyrrhiza glabra* (licorice) is the main medicinal species of the genus; it is less common in Romanian wild flora and only grows in Vrancea, Brăila, Galați and Dâmbovița counties (II.1.2.1). The roots and rhizomes are known as the medicinal drug *Liquiritiae radix* (II.1.4). It contains mainly saponins (4-20 %) and flavonoids (0.4 to 2%). The flavonoids give the roots their characteristic yellow color (II.1.5).

Data about the use of licorice go back to antiquity. Licorice is considered the "grandfather of medicinal plants" in Chinese materia medica, documented from the second century b. Chr. It is as well one of the most frequently used ingredients of Ayurvedic medicine. Licorice was used by Scythians, Greeks and Romans as an expectorant, inflammation, anti-ulcer, and sweetener. New pharmacological actions have been recently reported: hepatoprotector, antispasmodic, antioxidant, antibacterial,

antiviral, antimycotic, anti-tumor, estrogen, serotonin reuptake inhibiting, depigmenting (II.1.7).

Liquiritiae radix is present in the composition of teas, dried or liquid extracts, capsules, tablets, dragees, solutions for internal and external use, ointments (II.1.11). *Liquiritiae radix* powder is added in order to flavor products containing cocoa, sweets and cigarettes (II.1.12).

Glycyrrhiza echinata roots have white-gray interior; they contain saponins which are used to obtain foaming mixtures for fire extinguishers. *Glycyrrhiza echinata* is more widespread than *G. glabra* in the wild flora of our country.

Although the current literature provides data on numerous newly identified therapeutic actions of *G. glabra*, more profound researches are needed in order to document them. More data are as well required in the fields of plant anatomy, pharmaceutical formulation and modern pharmacological exploration.

The genus *Ononis* (II.2) includes 86 species worldwide, of which four are reported in Romania. *Ononis spinosa* (spiny restharrow) has thorns and vegetates in Oltenia and Moldova, *Ononis arvensis* (field restharrow) does not have thorns on the stem and vegetates in Transylvania (II.2.2). *Ononidis radix*, the plant drug, is currently represented by the roots of *Ononis spinosa* only (II.2.4). They contain triterpenes and isoflavones (II.2.5), and are currently used for their diuretic, saluretic and uricosuric actions (II.2.6).

Romanian and international research on *Ononis* species are reduced (II.2.11). The lack of studies on plant anatomy, histochemistry, chemical composition and new therapeutic uses is observed.

III. PERSONAL CONTRIBUTIONS

The main part of the present thesis presents personal pharmaco-botanical research on *Glycyrrhiza glabra*, *Glycyrrhiza echinata*, *Ononis spinosa* and *Ononis arvensis*.

The plant material used for anatomical, histological, phytochemical and pharmacological research is presented in chapter III.1. Specimens from the cultures of the Botanical garden of the Faculty of Pharmacy Timisoara and plants harvested from the spontaneous flora were used. Voucher specimens were kept for each species. Roots and aerial parts were dried, ground and then used.

Chapter III.2 presents the comparative anatomical study on the roots (primary structure and secondary structure) of the four species, identifying criteria for the differentiation of species within the same genus if the only available product is the drug. The differences observed between *Glycyrrhiza glabra* and *G. echinata* in transverse sections through roots with secondary structure concern: the aspect of medullar rays, the number of xylem vessels and the distribution of sclerenchyma fibers in the secondary wood. These characteristics allow the differentiation of the two species. Significant differences between *Ononis arvensis* and *O. spinosa* secondary root structure could be noted in the cortex, medullar rays and the arrangement of metaxylem vessels.

Chapter III.3 includes the histochemical identification of saponins in the vegetative organs of the four species. Investigations during ontogenesis show that saponins are present in the central cylinder of roots with primary structure of *Ononis spinosa*, *O. arvensis*, *Glycyrrhiza glabra* and *G. echinata*. In the roots of *Glycyrrhiza glabra* and *G. echinata* with secondary structure, saponins are accumulated in the cortex, phloem

parenchyma and medullar rays. Of these tissues, the first layers of parenchymatous cells on the outside of the cortex are the richest in saponins. The roots of *Ononis spinosa* and *O. arvensis* accumulated saponins mainly in phelloderm, bark, medullar ray parenchyma and phloem. Accumulated amount of saponins increases with root age.

Histochemical identification of saponins was as well performed in aerial parts of *Ononis spinosa* and *O. arvensis* (III.3.2). Phloem and cortical parenchyma stem tissues are rich in saponins. The leaves contain saponins in the phloem aerea of the mixt bundels and in both the palisade and the spongy tissue. These rapidly renewable sources can provide an alternative to the use of roots.

Chapter III.4 presents the results of qualitative and quantitative analysis performed for the phytochemical characterization of the roots of the four species.

Subchapter III.4.1 presents the study of saponins and triterpenes of total methanolic extracts. Preliminary research was initially conducted by TLC (III.4.1.1), using as standards glycyrrhizic acid (the representative saponin for *Glycyrrhiza glabra*), glycyrrhetic acid (the aglycon of glycyrrhizic acid) and onocerin (the representative triterpene of *Ononis spinosa*). Glycyrrhizic acid can be identified in total methanolic extracts of roots and stems of *Glycyrrhiza glabra* and *Ononis spinosa*. Glycyrrhizic acid is not detected in *G. echinata* roots. Glycyrrhetic acid has not been identified in unhydrolyzed extracts. The absence of glycyrrhizic acid from *Glycyrrhiza echinata* roots is a criterion for the differentiation of species, and allows identification of possible substitutes. Onocerin is well represented in *O. arvensis* roots, but it is not extracted through the isolation method for saponins proposed by Cucu and Grecu. The presence of this substance is confirmed by microsublimation; this procedure afforded in both *Ononis* species the obtainment of acicular superposed crystals, forming curved compound crystals. The chemical profiles of *Ononis spinosa* and *O. arvensis* are similar.

Spectrophotometric determination of glycyrrhizic acid content (III.4.1.2) showed 0.49 % in our own plant product and 2.3 % glycyrrhizic acid in the Plafar product, both values lower than the minimum acceptable rate of FR X of at least 5 % glycyrrhizic acid. These results were compared the data obtained by HPLC/MS (III.4.1.3): 0.54 % glycyrrhizic acid in plant product of our own culture, and 2.41 % glycyrrhizic acid in Plafar product. Our own culture has not yet reached the age of 3 years recommended for harvesting. Plafar plant product should not be marketed as such because it does not meet the standards imposed by the current pharmacopoeia. Data obtained by the two methods are close, validating the results. The superiority of the HPLC/MS is observed, as this method is suitable for the quantitative determination of multiple substances in the same solution. Possible fragmentation ways were proposed for glycyrrhetic acid and glycyrrhizic acid, explaining the signals obtained by mass spectrometry.

The results of qualitative and quantitative analysis of polyphenols in plants are presented in section III.4.2.

The presence of flavonoids in methanolic root extracts was analyzed by TLC (III.4.2.1). The methanolic extract of *Glycyrrhiza glabra* roots contains the highest amount of flavonoids, two broad, yellow bands, specific to these substances were detected. Total extracts of stems and leaves of *Glycyrrhiza glabra* contain flavonoids, but in smaller quantities. *G. echinata* dose not contain flavonoids detectable through this method. The absence of flavonoids is another criterion used for distinguishing between the two species belonging to *Glycyrrhiza* genus. *Ononis spinosa* and *O. arvensis* roots

have similar profile in terms of flavonoid content; ononin, the major isoflavone is present in both species.

In section **III.4.2.2** total polyphenols were determined quantitatively by spectrophotometry. The result was expressed as gallic acid equivalents: *Glycyrrhiza glabra* – 4.6849 %, *G. echinata* 0.9071 %, *Ononis spinosa* – 4.1531%, *O. arvensis* – 2.3833%. *G. echinata* is no substitute, in terms of polyphenols, for *Glycyrrhiza glabra*, as it contains tenfold lower quantities than the medicinal species. For *Ononis spinosa* and *O. arvensis* the amount of total polyphenols is similar, in this case the medicinal species is also slightly superior.

The analysis continued in subchapter **III.4.2.3**, with quantitative determination of total flavonoids by spectrophotometry. Results were expressed in rutoside equivalents. *Glycyrrhiza glabra* contains the highest amount of flavonoids 0.58 %, while *G. echinata* only contains 0.13 % flavonoids. Amounts of flavonoids in *Ononis spinosa* and *O. arvensis* are almost identical (0.45 % and 0.41 %, respectively); the two species can be considered equivalent in terms of flavonoid content.

By HPLC, 18 polyphenols have been quantified (**III.4.2.4**): caftaric acid, genistic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, p-cumaric acid, ferulic acid, sinapic acid, hyperoside, isoquercitrin, rutin, miricetin, fisetin, quercitrin, quercetol, patuletin, luteolin, kaempferol and apigenin. *Glycyrrhiza glabra* contains cumaric, ferulic and chlorogenic acid and *G. echinata* showed none of the analyzed compounds. The presence of rutoside in *Ononis spinosa* (previously identified by TLC) is confirmed by HPLC analysis. *Ononis arvensis* contains luteolin, p-cumaric acid and ferulic acid. Kaempferol and quercetol are identified only after hydrolysis, when they are released from various glycosides. In order to have a relevant chemical characterization of the extracts, further investigations on specific substances of *Glycyrrhiza* and *Ononis* genus are required.

For the first time in Romania, liquiritin, liquiritigenin, isoliquiritigenin, glabridin, daidzein, daidzin, genistein, genistin, formononetin, ononin and cumestrol were quantified by HPLC/MS in autochthonous plant material (**III.4.2.5**, **III.4.2.7**). *Glycyrrhiza glabra* roots contain all the analyzed substances, glabridin (0.109 %) and liquiritin (0.051 %) present higher concentrations. *G. echinata* does not contain glabridin, daidzin, genistin and cumestrol; liquiritin (0.001 %) and liquiritigenin (0.004 %) contents are below those in *Glycyrrhiza glabra*. Although ononin is present in *G. echinata*, its concentration (0.009 %) is significantly lower than that of *G. glabra* root extracts (0.068 %). *Ononis spinosa* and *O. arvensis* roots contain similar amounts of formononetin (0.006 %, respectively 0.008 %) and ononin (0.025 %, respectively 0.017%).

Being plant products rich in saponins, the foam index (FI $G. glabra$ = 250, FI $G. echinata$ = 400, FI $O. spinosa$ = 125, FI $O. arvensis$ = 333) and the haemolytic index were identified and the mean haemolytic concentration (HC₅₀ $G. glabra$ = 12.38 mg/ml, HC₅₀ $G. echinata$ = 9.15 mg/ml, HC₅₀ $O. spinosa$ = 7.06 mg/ml, HC₅₀ $O. arvensis$ = 10.90 mg/ml) was quantified by a spectrophotometric method (**III.5**). The four tested vegetal drugs, as well as the saponins isolated from *Ononis spinosa* roots and ammonium glycyrrhizate have a very low haemolytic capacity which does not create an obstacle to therapeutic use.

Chapter **III.6** presents the results of pharmacological studies on extracts or substances existing in the studied species. Innovative topical formulations, which have incorporated total extract and active substances, were used. The increasing of water

solubility of glycyrrhetic acid was obtained using hydroxy-propyl-gamma-cyclodextrin, in order to improve the bioavailability

In vitro tests were performed on cell lines A431 (skin cancer), A2058 (human melanoma) and B16 (mouse melanoma) (III.6.2). *Glycyrrhiza glabra* total extract, the complex glycyrrhetic acid – cyclodextrin and glycyrrhetic acid showed inhibitory action on cellular proliferation.

Respiratory capacity of mitochondria isolated from rat hepatocytes was influenced by the total extract of *Glycyrrhiza glabra* (Index 1,92) in a higher way to ammonia glycyrrhizin (Index 5,08). As such, flavonoids present in the extract show their strong antioxidant character (III.6.3). The index represents the ratio between basal respiration oxygen consumption and consumption of oxygen during ADP oxidation in stage III of complex I mitochondrial respiration.

Glycyrrhiza glabra total extract, glycyrrhetic acid alone, and the complex of glycyrrhetic acid with hydroxypropyl-gamma cyclodextrin were incorporated in original topical formulations. Products reduced by up to 20 % the pigmentation and by up to 30 % the erythema in C57BL/6J mice with melanoma lesions (III.6.4). The depigmenting action of *Glycyrrhiza glabra* extract (in topical pharmaceutical forms containing 5-20 % active ingredients) on hyperchrome macules of different causes is not associated with anti-aging effect. The tested extract (containing tyrosinase inhibitory substances) offer the advantage of being non-invasive when compared to peeling procedures (III.6.5).

Total dry methanolic extract of *Ononidis radix* displayed *in vivo* anti-inflammatory action. Saponins isolated from *Ononidis radix* are the main components responsible for the anti-inflammatory effect (III.6.6).

GENERAL CONCLUSIONS

A. *Ononis* sp.: Results of phytochemical researches indicate a similar concentration of flavonoids and saponins in the roots of *O. spinosa* and *O. arvensis*. In perspective, future pharmacological researches are needed to establish the equivalence of diuretic and uricosuric effects of *O. spinosa* and *O. arvensis* roots. Positive results may recommend the inclusion of *O. spinosa* roots in the medicinal drug *Ononidis radix*. Histochemical investigations indicate the presence of saponins in aerial parts of both *Ononis* species. Future studies could confirm the therapeutic usefulness of aerial parts, which have the advantage of being renewable.

B. *Glycyrrhiza* sp.: *G. echinata* roots do not contain several characteristic substances for *Liquiritiae radix* and cannot be used to obtain the same therapeutic effect.

The thesis presents multiple alternatives to identify product substitutions or counterfeit *Liquiritiae radix*: morphological criteria, features of root anatomy, spectrophotometric methods (identification of glycyrrhizic acid) and chromatographic methods (TLC, HPLC) used for identification and quantification of representative active substances. The main phytochemical differences identified which allow discrimination between *G. glabra* and *G. echinata* roots refer to the exclusive presence of the saponin glycyrrhizic acid, the isoflavan glabridin, the chalcone isoliquiritigenin, the phenol-carboxylic acids chlorogenic, ferrulic and cumaric, the isoflavones genistin and daidzin, and the coumestan coumestrol in the root of *G. glabra*.

The thesis includes quantitative determination by HPLC/MS of various phytocomplexes of *Glycyrrhiza* and *Ononis* species, some quantification being made for the first time on autochthon products.

C. Pharmacological studies revealed anti melanoma effects (*in vivo* - C57BL/6J mice, *in vitro* - A431, A2058, B16 cell lines), anti-erythematous and depigmenting effects (*in vivo* - C57BL/6J) for extracts from *G. glabra* roots. Modern topical formulations were obtained, and the release of the active substance was determined.

Total extract of *G. glabra* affects the respiratory capacity of mitochondria isolated from Wistar rat hepatocytes; its effect is stronger than that of ammonium glycyrrhizate. This effect can probably be attributed to flavonoids with antioxidant effects present in the extract. This is the first research of *G. glabra* extract and compound on the complex I of mitochondrial respiration in new experimental conditions.

Plethysmometric studies of *O. spinosa* extracts on rat paws highlighted their anti-inflammatory effect comparable to that of diclofenac.

Bibliographic references (from a total of 301 titles)

- NASSIRI AM, HOSSEINZADEH H. Review of Pharmacological Effects of Glycyrrhiza sp. and its Bioactive Compounds. *Phytother Res.* 2008;22:709–724.
- ISBRUCKER RA, BURDOCK GA. Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2006;46:167–192.
- MARTINO R, MALET-MARTINO M, GILARD V, BALAYSSAC S. Counterfeit drugs: analytical techniques for their identification. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 398:77-92.
- WOJCIECHOWSKI MF, LAVIN M, SANDERSON MJ. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. *Am J Bot.* 2004;91(11):1846-62.
- AMMOSOV AS, LITVINENKO VI. Phenolic compounds of the genera *Glycyrrhiza* L. and *Meristotropis* Fisch. et Mey. (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2007;7(41):30-52.
- GOL'DBERG ED, AMOSOVA EN, ZUEVA EP, RAZINA TG, KRYLOVA SG, ZORIKOV PS. Licorice Preparations Improve Efficiency of Chemotherapy and Surgical Treatment of Transplanted Tumors. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2008;2(154): 322-336.
- VOȘTINARU O. Studiul comparativ al efectului diuretic al unor plante medicinale-Teză de doctorat. UMF “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca 2007;
- TENG HM, FANG MF, CAI X, HU ZH. Localization and dynamic change of saponin in vegetative organs of *Polygala tenuifolia*. *J Integrat Pl Biol.* 2009;51(6): 529–536.
- DI MAMBRO VM, FONSECA MJ. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. *J Pharmaceut Biomed Anal.* 2005;37:287-95.

CURRICULUM VITAE

1. **Surname, name CANCIU (married DOBREA) Carmen Maximiliana**
2. **Address:** Str. Circumavalațiunii, Nr 25, Timișoara, jud. Timiș
3. **Telephone, e-mail:** 0724 578305; cmcanciu@umft.ro
4. **Date and place of birth:** 15.01.1982, Sibiu, jud. Sibiu
5. **Studies/Education:**
 - 2006-present PhD student - University of Medicine and Pharmacy „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, Faculty of Pharmacy, scientific supervisor Prof., PhD Mircea Tămaș
 - 2010 Specialist pharmacist – Clinical pharmacy
 - 2007-2010 Resident pharmacists – Clinical pharmacy
 - 2006 Bachelor of Pharmaceutical sciences
 - 2001-2006 University of Medicine and Pharmacy „Victor Babeș”, Timișoara, Faculty of Pharmacy, Head of class of 2001.
 - 2001 Baccalaureat Diploma
 - 1996-2001 National College „Coriolan Brediceanu”, Lugoj
6. **Postuniversity studies:**
 - 2010 Spicy herbs: interest in prophylaxy, therapy and nutrition, organized by the Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany of UMF "Victor Babes", Timișoara
 - 2009 Medicinal plants of dermatocosmetic interest, organized by the Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany of UMF "Victor Babes", Timișoara
 - 2008-2010 Psychological and pedagogical postgraduate module – Department for Teacher Improvement, University "Aurel Vlaicu", Arad
 - 2007 Modified release formulations, organized by the Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Thechology of UMF "Victor Babes", Timișoara
7. **Awards:**
 - Outstanding student award 2003** – For excellent results in academic work – awarded by the Association University Horizons Timisoara
8. **Professional experience:**
 - 2007-present: Teaching assistant, Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy „Victor Babeș”, Timișoara
9. **Research programs:**
 - Director of Research grant 8850/05.10.2009**, of the University of Medicine and Pharmacy "Victor Babes" Timișoara, entitled " In vitro and in vivo evaluation of the antitumor and antimelanoma efficacy of glycyrrhetic acid and *Glycyrrhiza glabra* L. root phytocomplex"
10. **Foreign languages:** English advanced, French advanced
11. **Membership in professional associations:**
 - Member of the Romanian Society of Pharmaceutical Sciences
 - Member of the Romanian Society of Biochemistry
 - Member of Timiș College of Pharmacists
12. **Scientific activity:**

Studies on medicinal plant morphology, anatomy, chemical composition and pharmacological activity have been disseminated through:

Publications in extenso:

1. **Canciu CM**, Şoica C, Dehelean CA, Kasa P, Ambrus R, Antal DS (2010) - Hydro soluble glycyrrhetic acid complexes using hydroxypropyl- γ -cyclodextrin and randomly-methylated- β -cyclodextrin: preparation and multiple experimental characterisation of the complexes. *Acta Medica Marisiensis*; 4(56):384-386.
2. **Canciu CM**, Şoica C, Dehelean CA, Antal DS, Aigner Z, Ambrus R (2009) - Glycyrrhetic acid from *Glycyrrhiza glabra* L.: phase solubility analysis in the presence of natural and semisynthetic cyclodextrins. *Oradea University Annals section Chemistry*; 16:25-30.
3. **Canciu CM**, Antal DS, Peev C, Dehelean CA, Manfred Anke (2009) - *Ononidis radix*: caracterizarea constituenţilor anorganici din produsul uscat și extractul apos, *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat.*, 2(113), supl. 4:64-66.
4. **Canciu CM**, Todea S, Tămaş M (2008) – Criterii de identificare a substituirilor pentru *Liquiritiae radix*, *Revista de Medicină și Farmacie Orvosi es Gyogyszereszeti Szemle*, 54, supl. 3: 94-97.
5. **Canciu CM**, Voştinaru O, Tămaş M (2008)- The determination of the anti-inflammatory action of the extract and isolated saponin from *Ononidis radix*, *Timișoara Medical Journal*, 58, supl. 2: 413-415.
6. **Canciu CM**, Vlase L, Peev C, Dehelean C, Feflea Ş, Antal DS (2008) - HPLC analysis of polyphenols from ethanlo extract of *Liquiritiae radix*, phytochemical and antiproliferative *in vitro* tests, *Timișoara Medical Journal*, 58, supl. 2: 416-420.
7. Antal DS, **Canciu CM**, Dehelean CA, Anke M (2010) - How much selenium do medicinal plants contain? Results of a research on wild-growing species from Western Romania. *Oradea University Annals section Biology* 17(1):23-28.
8. Antal DS, Dehelean CA, **Canciu CM**, Anke M (2009) – Vanadium in medicinal plants: new data on the occurrence of an element both essential and toxic to plants and man, *Oradea University Annals section Biology*, 2: 5-9.
9. Antal DS, Brezoczki A, **Canciu CM** (2009) - Crassulaceae din România: cercetari anatomice asupra unor reprezentanți cu potențial fitoterapeutic, *Rev. Med. Chir. Soc., Med., Nat.*, 2 (113), supl. 4:11-15.
10. Dumache R., **Canciu CM**, Serban C., Puiu M. (2008) – Challenges of biotechnology in medicine, *Timișoara Medical Journal*, 58, supl. 2 : 157-159.
11. Dragomirescu A, **Canciu CM**, Peev C, Dehelean CA, Feflea Ş, Moldovan M (2008). – Experimental study of depigmenting effect of a *Glycyrrhiza glabra* L. extract, *Timișoara Medical Journal*, 58, supl. 2: 392-395.
12. Feflea Ş, Kaycsa A, Peev C, Dehelean CA, **Canciu CM** (2008) – Citrus aurantium peel: preliminary analysis of three types of extracts *Timișoara Medical Journal*, 58, supl. 2 :461-464.

Papers presented at international and national conferences, published in abstract

1. **Canciu CM**, Dehelean CA, Csányi E, Mureşan A, Antal DS, Tămaş M (2010) - *Glycyrrhiza glabra* L. extract and glycyrrhetic acid: efficient antineoplastic agents in new topical formula. *Pharmacognosy Magazine*; 6, supl. 22: 60. 6th

- Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Antalya
2. **Canciu CM**, Şoica C, Dehelean CA, Ambrus R, Csányi E, Antal DS (2010) - Effects of Rameb complexation on aqueous solubility and bioavailability of glycyrrhetic acid from *Glycyrrhiza glabra* L. and two methods characterisation of the complex. *Pharmacognosy Magazine*; 6, supplim 22: 146-147. 6th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Antalya
 3. Antal DS, Borchescu P, **Canciu CM** (2010) - Anatomical investigations on Euphorbia species with phytotherapeutical potential. *Pharmacognosy Magazine* 6, supplim. 22: 156. 6th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Antalya
 4. **Canciu CM** (2010) - PhD education in health sciences from Romania: conclusions from a decade of perpetual transitions. The advancement of European Biomedical and Health Science PhD Education by Cooperative Networking - abstract book: 29. 5th Organisation for PhD Education in Biomedicine and Health Sciences in the European System Conference, Vienna
 5. **Canciu CM**, Antal DS, Tămaş M (2010) - Saponins in the epigeal part of *Ononis spinosa* L.: results of a histochemical analysis. *Acta Medica Marisiensis* 56, supplim 2: 56. XIVth National Congress of Pharmacy from Romania, Târgu-Mureş
 6. Antal DS, **Canciu CM** (2010) - Anatomical and histochemical investigations of *Punica granatum* L. *Acta Medica Marisiensis* 56, supplim 2: 67. XIVth National Congress of Pharmacy from Romania, Târgu-Mureş
 7. Antal DS, Biriescu S, **Canciu CM** (2010) - Traditional medicine in Banat region (Romania): results of an ethnobotanical survey. *Planta Medica* 2010; 76(12):1223.
 8. **Canciu CM**, Şoica C, Dehelean CA, Antal DS, Aigner Z, Ambrus R (2009)– Glycyrrhetic acid from *Glycyrrhiza glabra* L. phase solubility analysis in the presence of natural and semisynthetic cyclodextrins. *International Conference On Sciences, Abstracts booklet*: 26.
 9. Bumbăcilă B, **Canciu CM**, Dumache R, Kaycsa A (2008) – The accuracy of the GC-MS determination of capsaicin in rat blood samples using two different derivatization techniques. *Romanian Journal Of Biochemistry*, 45, Suplim. 2: 30. *Romanian Congress of Biochemistry* 2008.
 10. Dragomirescu A, **Canciu CM**, Peev C, Dehelean CA, Feflea Ş, Ciurelea S, Bumbăcilă B (2008). – Experimental study of depigmenting effect of a *Glycyrrhiza glabra* L. extract, 5th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries Abstract Book: 63.
 11. Feflea Ş, Kaycsa A, Peev C, Dehelean CA, **Canciu CM** (2008) – Citrus peel extracts phytochemical analysis, 5th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries Abstract Book:161.
 12. **Canciu CM**, Vlase L, Peev C, Dehelean CA, Feflea Ş, Tămaş M (2008)- HPLC analysis of polyphenols from ethanolo extract of *Liquiritiae radix*, phytobiological and antiproliferative *in vitro* tests, 5th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries Abstract Book: 163.