



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU"
ȘCOALA DOCTORALĂ

FACULTATEA DE FARMACIE

Studiu farmacobotanic al speciei *Inula helenium* L. (Asteraceae) în vederea valorificării în fitoterapie

Rezumatul tezei de doctorat

Doctorand **Monica Aurora Nan**

Conducător științific Prof. Dr. **Mircea Tămaș**

CLUJ-NAPOCA 2011

CUPRINS

INTRODUCERE.	9
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	12
1. Considerații farmacobotanice și fitochimice privind specia <i>Inula helenium</i> L.	12
2. Considerații generale asupra produsului vegetal <i>Inulae radix</i>	27
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Obiective	41
2. Metodologie generală	41
3. Studiul 1. Analiza macro- și microscopică	50
3.1. Introducere	50
3.2. Obiective	50
3.3. Analiza macroscopică	50
3.4. Analiza microscopică a produsului vegetal <i>Inulae radix</i>	53
3.5. Analiza microscopică a părții aeriene a speciei <i>Inula helenium</i> L.	58
3.6. Analiza microscopică a tesutului secretor din rădăcini și dezvoltarea sa	62
3.7. Analiza microscopică a inulinei din rădăcini	65
3.8. Diferențierea <i>Inulae radix</i> față de alte produse vegetale	66
3.9. Discuții	67
3.10. Concluzii	67
4. Studiul 2. Analiza lactonelor sescviterpenice din extracte de rădăcini de <i>Inula helenium</i> L.	68
4.1. Introducere	68
4.2. Obiective	71
4.3. Analiza prin CSS a extractelor	71
4.4. Determinarea prin CSS – densitometrie a lactonelor sescviterpenice din <i>Inulae radix</i>	75
4.5. Extragerea lactonelor sescviterpenice pe baia de ultrasunete	81
4.6. Identificarea alantolactonei în extracte de <i>Inula helenium</i> L.	82
4.7. Concluzii	83
5. Studiul 3. Analiza uleiului volatil din <i>Inulae radix</i>	84
5.1. Introducere	84
5.2. Obiective	84
5.3. Obținerea și dozarea uleiului volatil	84
5.4. Obținerea uleiului volatil prin altă metodă de hidrodistilare	86
5.5. Analiza CSS a uleiului volatil	87
5.6. Analiza gazcromatografică a compușilor volatili obținuți prin hidrodistilare	88
5.7. Concluzii	96
6. Studiul 4. Analiza flavonoidelor din inflorescențele și frunzele de <i>Inula helenium</i> L.	97
6.1. Introducere	97
6.2. Obiective	99
6.3. Identificarea flavonoidelor prin CSS	99
6.4. Determinarea cantitativă a flavonoidelor	103
6.5. Determinarea calitativă și cantitativă a polifenolilor prin HPLC-MS și HPLC-UV	104
6.6. Concluzii	118
7. Studiul 5. Analiza carotenoidelor din inflorescențele și frunzele de <i>Inula helenium</i> L.	120
7.1. Introducere	120
7.2. Obiective	121
7.3. Material și metodă	121
7.4. Rezultate	121
7.5. Discuții	127
7.6. Concluzii	128
8. Studiul 6. Analiza cationilor din extracte apoase de rădăcini și parte aeriană a speciei <i>Inula helenium</i> L.	129
8.1. Introducere	130
8.2. Obiective	130
8.3. Material și metodă	130
8.4. Rezultate	131
8.5. Concluzii	136
9. Studiul 7. Testarea <i>in vitro</i> a acțiunii antibacteriene și antimicotice	137
9.1. Introducere	137
9.2. Preparate farmaceutice	138
9.2. Obiective	140
9.4. Determinarea acțiunii antibacteriene și antifungice a uleiului volatil prin metoda diluțiilor în mediu lichid	140
9.5. Determinarea acțiunii antibacteriene și antifungice a uleiului volatil prin metoda difuzimetrică	142
9.6. Testarea acțiunii antibacteriene a tincturii obținute din <i>Inulae radix</i> prin metoda difuzimetrică	144
9.7. Testarea acțiunii antimicotice a unguentului obținut din <i>Inulae radix</i> prin metoda difuzimetrică	146
9.7. Concluzii	147
10. Concluzii generale	148
11. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	152
REFERINȚE	153

Cuvinte cheie: *Inula helenium* L., lactone sescviterpenice, alantolactona, flavonoide, carotenoide, acțiune antimicrobiană

I. Introducere

Inula helenium L. (iarba-mare), Asteraceae, este dintre plantele medicinale utilizate încă din antichitate. Specia este cunoscută datorită conținutului crescut de inulină, substanță izolată pentru prima oară din rădăcinile acestei specii. Deși numeroase date bibliografice menționează prezența uleiului volatil în rădăcini sunt puține studii privind compoziția sa chimică.

II. Stadiul actual al cunoașterii cuprinde datele farmacobotanice și fitochimice privind specia *Inula helenium* L. și produsul vegetal *Inulae radix* existente până în prezent în literatura de specialitate.

Am prezentat încadrarea sistematică a speciei *Inula helenium* L., caracterele generale ale familiei Asteraceae și ale genului *Inula*. Specia studiată este larg răspândită în flora României, se deosebește de celelalte specii indigene ale genului de talie mai mică. *Inula helenium* este o plantă ierboasă, perenă, ce prezintă rădăcini tuberizate, groase. În primul an de vegetație prezintă doar o rozetă de frunze bazale, din al doilea an apare tulpina floriferă ce poate ajunge până la 2 m înălțime. Prezintă frunze oval-eliptice, de până la 60 cm lungime, pubescente pe ambele fețe. Antodiile au până la 8 cm în diametru cu flori ligulate marginale galben-aurii și flori tubuloase brun-gălbui, inserate pe un receptacol plan mărginit de bractei imbricate.

Produsul vegetal *Inulae radix* a fost oficial în farmacopei europene sub diferite denumiri: **Aunée** (PF X - Farmacopeea Franceză), **Radix Helenii** (Ned 5 - Farmacopeea Olandeză), **Rhizoma Helenii** (EB 6 - Supliment al DAB 6), **Elecampane (Helenii rhizoma)** (BHP - British Herbal Pharmacopoeia). Produsul vegetal conține ulei volatil de consistență solidă, derivați de timol, steroli, hidrocarburi și inulina ca substanță de rezervă. În compoziția uleiului volatil se menționează prezența lactonelor sescviterpenice alantolactona și izoalantolactona. Amestecul cristalizat al lactonelor sescviterpenice este denumit "alantocamforă" sau "helenină".

Inulae radix este utilizat în medicina populară în afecțiuni ale aparatului respirator. Date farmacologice menționează acțiunea expectorantă, antitusivă, colagog - coleretică, diuretică, antihelmintică, antibacteriană, antifungică, antitumorală, antioxidantă și insecticidă. Studiile farmacologice au dovedit că aceste acțiuni se datorează lactonelor sescviterpenice.

III. Obiective

- Stabilirea criteriilor de identificare la nivel microscopic al rădăcinilor și părților aeriene ale speciei *Inula helenium* L. și evidențierea histochimică a structurilor anatomice specifice
- Analiza lactonelor sesquiterpenice din extracte de rădăcini prin CSS
- Obținerea uleiului volatil și determinarea compoziției chimice prin GC
- Analiza HPLC a compușilor din partea aeriană a speciei: flavonoide și carotenoide
- Cuantificarea principalelor macroelemente din extracte apoase obținute din partea aeriană și din rădăcinile speciei *Inula helenium* printr-o metodă electroforetică.
- Testarea *in vitro* a acțiunii antimicrobiene a extractelor de rădăcini și a preparatelor farmaceutice obținute din *Inulae radix*

IV. Metodologia generală cuprinde descrierea metodelor de analiză și principiile lor de utilizare. Am prezentat metodele cromatografice aplicate la separarea, identificarea și dozarea principiilor active: cromatografia în start subțire (CSS), gazcromatografia (GC) și cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC). De asemenea am descris tehnica de electroforeză capilară (EC) utilizată și metoda de spectrometrie UV/VIS utilizată la dozarea flavonoidelor și a carotenoidelor.

Pentru testarea *in vitro* a acțiunii farmacologice antimicrobiene am utilizat metodele difuzimetrică și a diluțiilor în mediu lichid.

V. Contribuția personală cuprinde analizele efectuate și rezultatele obținute.

Studiul 1. Analiza macro- și microscopică

În prima etapă a fost realizată analiza anatomică și histochimică a produsului vegetal *Inulae radix*. Au fost pregătite secțiuni transversale din rădăcini recoltate în diferite stadii de dezvoltare și produs vegetal achiziționat din comerț. Rădăcinile prezintă structura primară în primele luni de vegetație și secundară începând de la un an de vegetație. Prin colorarea cu floroglucină-acid clorhidric și reactiv genevez am pus în evidență elementele lignificate din preparate. Canalele secretoare de ulei volatil sunt răspândite în toate țesuturile rădăcinii, cu Sudan III s-au colorat în roșu. Studiul histologic în ontogeneză a relevat prezența canalelor secretore din primele luni de vegetație. Inulina a fost vizualizată la microscop în urma precipitării cu alcool sub formă de agregate sticloase cu muchii ascuțite.

În urma analizei microscopice a organelor subterane și aeriene ale speciei *Inula helenium* L. se constată că doar rădăcinile prezintă un aparat secretor intern diferențiat, tulpina, frunzele și florile ligulate prezintă un aparat secretor extern format din peri glandulari.

Produsul *Inulae radix* se diferențiază de *Taraxaci radix* și *Belladonnae radix* prin lipsa laticiferelor și respectiv a nisipului de oxalat de calciu.

Studiul 2. Analiza lactonelor sescviterpenice din extracte de rădăcini de *Inula helenium* L.

Pornind de la datele din literatura de specialitate au fost identificate prin cromatografie pe strat subțire (CSS) lactonele sescviterpenice. Au fost pregătite extracte prin macerarea produsului vegetal în etanol absolut, etanol 70% și acetat de etil:hexan (1:1), după filtrare și concentrare reziduul a fost reluat cu hexan și cloroform. Au fost analizate rădăcini provenite din cultură, produs vegetal achiziționat din comerț și rădăcini recoltate din flora spontană. Lactonele sescviterpenice au fost evidențiate în toate extractele analizate, la $R_f=0,7$; folosind reactivi de pulverizare specifici anisaldehyda/ H_2SO_4 , vanilina/ H_2SO_4 s-au colorat în albastru-violet, respectiv albastru iar cu hidroxilamină/ $FeCl_3$ lactonele s-au colorat în brun. Prin utilizarea etaloanelor alantolactona și izoalantolactona s-a arătat lipsa acestora din organele aeriene ale speciei.

A fost elaborată o metodă CSS-densitometrică pentru determinarea lactonelor sescviterpenice din extracte etanolice, hexanice și cloroformice folosind ca substanță etalon izoalantolactona. Cantitatea de lactone sescviterpenice în cele două produse vegetale analizate (produs cultivat și produs achiziționat din comerț) variază între valorile 0,088 % - 0,16% izoalantolactonă raportată la extract, între 2,69% - 3,99% izoalantolactonă raportată la produsul vegetal uscat și între 49,86% - 91,40% izoalantolactonă raportată la extractul uscat.

Metoda de extracție pe baia de ultrasunete s-a dovedit eficientă pentru extragerea lactonelor sescviterpenice în cantități mai mari, dintre solvenții utilizați hexanul a extras cel mai eficient compuși investigați. Rezultatele obținute pot fi folosite la elaborarea unui preparat farmaceutic cu un conținut crescut de lactone sescviterpenice.

Studiul 3. Analiza uleiului volatil din *Inulae radix*

Uleiul volatil a fost obținut prin metoda oficială în Farmacopea Română X (FRX) din probele analizate. Rădăcinile provenite din culturi conțin 1,2% ulei volatil, produsul vegetal achiziționat din comerț conține 1,86% ulei volatil, iar rădăcinile recoltate din flora spontană conțin 0,56% ulei volatil. Se constată cristalizarea uleiului volatil la temperatura camerei. Prin analiza CSS s-au separat 7 compuși ai uleiului volatil, spotul dominant, este situat la $R_f=0,7$; cu anisaldehydă/ H_2SO_4 s-a colorat în albastru-violet.

Analiza GC a probelor de ulei a arătat prezența a doi compuși principali: alantolactona în concentrație de 52,5% - 63% și izoalantolactona în concentrație de 29,7% - 36,2%. Am constatat diferențe între probele de ulei volatil analizate, în proba provenită din produs vegetal recoltat din culturi am identificat 20 de compuși terpenici, față de 8 în uleiul volatil obținut din produs achiziționat din comerț. Restul compușilor sunt în concentrații mai mici: santolin triena 1,4 %, α -pinen 0,5%, sabinen 0,1%, β -pinen 0,7%, mircen 0,1% , limonen + β -felandren 0,2%,

izopinocamfonă, β -elemen 0,4%, 7-epi-sescvituienă 0,1%, butanoat de linalool 0,5%, β -cariofilen 0,1%, dihidro- β -ionona 0,2%, β -chamigren, valencen 0,2%, α -selinen 0,1%, tans- β -quaien 0,1%, γ -cadinen 0,2% și δ -cadinen.

Studiul 4. Analiza flavonoidelor din inflorescențele și frunzele de *Inula helenium* L.

Analiza preliminară prin CSS a flavonoidelor, folosind 3 faze mobile și cromatografia bidimensională, a condus la separarea a 5 flavonoide în extractul hidrolizat de inflorescențe și 4 flavonoide în extractul de frunze. A fost identificat cvercetolul și posibil unii derivați ai acestuia în extractele metanolice și hidrolizate de inflorescențe și frunze de iarbă-mare.

Analiza HPLC –MS a completat rezultatele obținute prin CSS: în extractele metanolice de flori a fost identificat cvercetolul și glicozidele sale izocvercitrina, cvercitrina, în cele de frunze au fost identificate glicozidele rutozida și cvercitrina. Exxtractele hidrolizate de flori și frunze conțin agliconii cvercetol și kaempferol, iar patuletina, un compus metoxilat, este prezentă doar în frunze. Metoda aplicată a permis identificarea și a acizilor polifenolcarboxilici cafeic, clorogenic, p-cumaric, gentisic și ferulic. Dintre cei 11 compuși identificați 6 au fost cuantificați prin HPLC-UV: cvercetina, izocvercitrina, cvercitrina, kaempferol, patuletina și acidul p-cumaric. Cantitativ domină izocvercitrina (cvercetin 3-O- β -D-glucopiranozida) în extractele metanolice de inflorescențe 0,898 mg/g produs vegetal.

În urma dozării spectrofotometrice a flavonoidelor se constată că frunzele conțin cantități mai mari de flavonoide decât inflorescențele, concentrațiile variază între 1,43 % în flori și 1,83 % în frunze. Aceste valori crescute sunt comparabile cu cele ale produselor vegetale cu flavonoide oficinale în Farmacopeea Europeană 6.

Studiul 5. Analiza carotenoidelor din inflorescențele și frunzele de *Inula helenium* L.

Prin analiza HPLC-PDA au fost determinate 7 carotenoide în partea aeriană a speciei *Inula helenium*. Florile ligulate și tubuloase conțin lutein-5,6-epoxid, luteină, neoxantină și violaxantină; anteraxantina este prezentă în florile tubuloase; frunzele conțin luteină, neoxantină, violaxantină, β -criptoxantină și β -caroten. Compușii predominanți sunt lutein-5,6-epoxidul în flori ligulate (73,8%) și inflorescențe (29,2%) și luteina în florile tubuloase (28,4%) și frunze (33,4%).

Conținutul de carotenoide totale determinat prin metoda spectrofotometrică a relevat concentrații de 4,87 mg/100 g în frunze și 47,7 mg/100 g în flori ligulate.

Studiul carotenoidelor a arătat că *Inula helenium* este o sursă importantă de carotenoide. Datorită concentrației mari în florile ligulate lutein-5,6-epoxidul poate fi izolat ca substanță de referință.

Studiul 6. Analiza cationilor din extracte apoase de rădăcini și parte aeriană a speciei *Inula helenium* L.

Studiul macroelementelor a fost realizat printr-o metodă electroforetică pe coloane cuplate

într-un cip. Metoda utilizată este o metodă validată de analiză a ionilor de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ din ape minerale. Am obținut concentrații de Ca^{2+} de 61,06-74,61 $\mu\text{g/g}$ produs vegetal; Mg^{2+} 34,97-39,69 $\mu\text{g/g}$ produs vegetal; Na^+ 30,94-39,46 $\mu\text{g/g}$ produs vegetal; K^+ 225,73-249,19 $\mu\text{g/g}$ produs vegetal; NH_4^+ 1,52-1,64 $\mu\text{g/g}$ produs vegetal în părțile aeriene și Ca^{2+} 8,62-9,63 $\mu\text{g/g}$ produs vegetal; Mg^{2+} 5,99-6,85 $\mu\text{g/g}$ produs vegetal; Na^+ 1,25-1,58 $\mu\text{g/g}$ produs vegetal; K^+ 146,64-155,37 $\mu\text{g/g}$ produs vegetal în rădăcinile de *Inula helenium*.

Concentrațiile crescute de potasiu din infuzia și decoctul din partea aeriană, respectiv rădăcinile de *Inula helenium* favorizează acțiunea diuretică.

Studiul 7. Testarea *in vitro* a acțiunii antibacteriene și antimicotice

Studiul farmacologic s-a axat pe testarea acțiunii antimicrobiene a lactonelor sescviterpenice din uleiul volatil și din extractul etanolic și hexanic de rădăcini. Acțiunea antimicrobiană uleiului volatil a fost testată prin metoda diluțiilor și prin metoda difuzimetrică.

Pentru a testa uleiul volatil prin metoda diluțiilor a fost realizată o soluție de ulei volatil în dimetilsulfoxid (pH - ul soluției a fost ajustat la 7 cu tampon MOPS (acid 3-(N-morfolino)propansulfonic)), seria de diluții fiind efectuată prin înjumătățirea soluției de ulei volatil în mediul RPMI (mediul Roswell Park Memorial Institute conține vitamine, aminoacizi, săruri, glucoză, glutatation și un indicator de pH). După incubare a fost evaluată turbiditatea soluțiilor din eprubete. Au fost determinate concentrațiile minime inhibitorii (CMI) ale uleiului volatil pe 6 tulpini de fungi și pe 7 tulpini bacteriene de referință (ATCC). Uleiul volatil este activ pe toate microorganismele testate: *Staphylococcus aureus* CMI = 100 $\mu\text{g/ml}$, *MRSA* CMI = 100 $\mu\text{g/ml}$, *Streptococcus pyogenes* CMI = 25 $\mu\text{g/ml}$, *Bacillus subtilis* CMI = 100 $\mu\text{g/ml}$, *Escherichia coli* CMI = 100 $\mu\text{g/ml}$, *E. coli* D31 CMI = 25 $\mu\text{g/ml}$, *Pseudomonas aeruginosa* CMI > 100 $\mu\text{g/ml}$, *Candida albicans* CMI > 100 $\mu\text{g/ml}$, *Candida glabrata* CMI = 100 $\mu\text{g/ml}$, *Candida kruzei* CMI = 100 $\mu\text{g/ml}$, *Candida parapsilosis* CMI = 100 $\mu\text{g/ml}$, *Saccharomyces cerevisiae* CMI = 50 $\mu\text{g/ml}$, *Aspergillus niger* CMI = 50 $\mu\text{g/ml}$.

Prin metoda difuzimetrică a fost testată acțiunea inhibitoare a uleiului volatil pe 5 tulpini bacteriene de referință: *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* și 6 tulpini de fungi: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr* (sursă clinică), *Rhodotorula glutinis* (sursă clinică). Au putut fi stabilite CMI ale uleiului volatil și a substanței etalon, alantolactona, doar pe două tulpini bacteriene, valorile obținute fiind mai mari față de metoda diluțiilor: *Staphylococcus aureus* CMI = 250 $\mu\text{g/ml}$ și *Streptococcus pyogenes* CMI = 125 $\mu\text{g/ml}$.

Au fost realizate două preparate pe bază de *Inulae radix*: tinctura 10% și unguent cu extract hexanic 10%. Extractul alcoolic testat prin metoda difuzimetrică s-a dovedit activ doar pe tulpina

de *Staphylococcus aureus* la concentrația de 40 mg/ml. Metoda difuzimetrică nu a fost potrivită pentru testarea unguentului cu extract 10%.

În urma testării antimicrobiene se poate concluziona că atât uleiul volatil cât și tinctura obținute din *Inulae radix* prezintă acțiune antifungică și antibacteriană, în special asupra *Saphylococcus aureus*. Acțiunea antimicrobiană poate fi evaluată pe viitor *in vivo*.

VI. CONCLUZII GENERALE

În urma cercetărilor realizate în cadrul acestei teze au fost îndeplinite obiectivele propuse. Au fost aduse contribuții noi privind morfologia și anatomia, fitochimia și farmacologia speciei *Inula helenium* L.

Am stabilit caracterele de identificare și diferențiere, am determinat calitativ și cantitativ principalii compuși bioactivi din rădăcini și partea aeriană: lactone sesquiterpenice, flavonoide, carotenoide, minerale. Am arătat acțiunea antifungică și antibacteriană *in vitro* a uleiului volatil și acțiunea antibacteriană a tincturii obținute din *Inulae radix*.

Datorită conținutului bogat în flavonoide și potasiu partea aeriană a speciei *Inula helenium* poate fi testată și utilizată pentru acțiunea diuretică. Rezultatele obținute la analizele efectuate asupra părții aeriene sunt contribuții originale, fiind date neraportate până acum în literatura de specialitate.

VII. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Blaschek W, Ebel S, Hackenthal E, Holzgrabe U, Keller K, Reichling J et al. Hagers Enzyklopädie. 6. Auflage. Band 8. Stuttgart: Springer Verlag 2007:988–1003.
2. Bohlmann F, Mahanta KP, Jakupovic J, Rastogi RC, Natu AA. New sesquiterpene lactones from *Inula* species. *Phytochemistry* 1978;7:1165-72.
3. Benigni R, Capra C, Cattorini PE. *Pianti medicinale*. Milano: Inverni della Beffa 1964:549-55.
4. Bisset NG, Wichtl M (editors). *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basis*, 2nd edition. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers 2001:254-6.
5. Vajs V, Jeremic D, Milosavijevic S, Macura S. Sesquiterpene lactones from *Inula helenium*. *Phytochemistry* 1989;28(6):1763-4.
6. Tămaș M, Popescu H. Identificarea componentelor volatile din extractul fluid de *Inulae radix*. *Farmacia* 1982;30(30):169-72.
7. Deriu A, Zanetti S, Sechi LA, Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Tuveri E. Antimicrobial activity of *Inula helenium* L. essential oil against Gram-positive and Gram-negative bacteria and *Candida* spp. *Letters to the Editor / International Journal of Antimicrobial Agents* 2008;31: 581–92.
8. Konishi T, Shimada Y, Nagao T et al. Antiproliferative Sesquiterpene Lactones from the Roots of *Inula helenium* L.. *Biol. Pharm. Bull.* 2002;25(10):1370-72.
9. Fraga BM. Natural sesquiterpenoids, *Nat. Prod. Rep.* 2003;20:392–413.
10. Wagner S, Merfort I. Skin penetration behaviour of sesquiterpene lactones from different *Arnica* preparations using a validated GC-MSD method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007;43: 32–8.

CURRICULUM VITAE

Date biografice

Nume: Nan

Prenume: Monica Aurora

Data și locul nașterii: 13-12-1983, Baia Mare, Maramureș

nan_monica@yahoo.com

Studii

2007 – prezent: Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca – specializarea Botanică Farmaceutică – studii doctorale

2002 – 2007: Universitatea de Medicină și Farmacie din Târgu-Mureș, Facultatea de Farmacie – Farmacist

1998 – 2002: Colegiul Național “Gheorghe Șincai”, Baia Mare - profil informatică – Bacalaureat

Cursuri de perfecționare postuniversitară

2009: Universitatea de Medicină și Farmacie, Târgu-Mureș, „Actualități ale farmacologiei și toxicologiei în practica medicală și farmaceutică”

2008: Universitatea de Medicină și Farmacie Târgu-Mureș, „Fitoterapie modernă”

Experiență profesională

2008 februarie – în prezent: preparator universitar - Universitatea de Medicină și Farmacie din Târgu-Mureș, Facultatea de Farmacie, Disciplina de Farmacognozie - Fitoterapie

2007 octombrie – 2008 ianuarie: angajat la plata cu ora pe postul vacant de preparator- Universitatea de Medicină și Farmacie din Târgu-Mureș, Facultatea de Farmacie, Disciplina de Farmacognozie - Fitoterapie

2007 octombrie – 2010 decembrie: farmacist Farmaciile Dona, Tg Mureș

Limbi străine cunoscute: engleza - nivel C1 (avansat) Certificat PROFEX (2009); franceza; maghiara.

Activitatea științifică

Lucrări științifice publicate ca prim autor:

1. Nan M, Pinte A, Bunea A, Eșianu S, Tămaș M. HPLC analysis of carotenoids from *Inula helenium* L. flowers and leaves. Farmacia 2011(*acceptat pentru publicare*).
2. Nan M, Vlase L, Eșianu S, Tămaș M. The analysis of flavonoids from *Inula helenium* L. flowers and leaves. Acta Medica Marisiensis 2011;57(4):319-323.
3. Nan M, Veres K, Hohmann J. TLC-densitometric determination of sesquiterpene lactones from *Inula helenium* roots. Acta Medica Marisiensis 2010;56(3): 269-271.
4. Nan M, Eșianu S, Laczkó - Zöld E, Tămaș M, Darkó B. Studiul macro- și microscopic al rădăcinii speciei *Inula helenium* L. Note botanice 2010;Fasc XXXVI:42-47.

Lucrări științifice publicate în volume de rezumate:

1. Nan M, Vlase L, Eșianu S, Tămaș M. The analysis of flavonoids from *Inula helenium* L. flowers and leaves. A 4-a Conferință a Doctoranzilor în Medicină și Farmacie, Târgu-Mureș, 6-8 iulie 2011 Acta Medica Marisiensis 2011;57(Supplement 3):15.
2. Nan M, Veres K, Hohmann J, Eșianu S, Tămaș M. Quantitative and qualitative analysis of

volatile oil from *Inula helenium* L. roots. Congresul Național de Farmacie din România ediția a XIV-a, Târgu-Mureș, 13-16 octombrie 2011, Acta Medica Marisiensis 2010;56(Supplement 2):59.

3. Nan M, Eșianu S, Tămaș M. Studiul macro- și microscopic al rădăcinii speciei *Inula helenium* L. Zilele Universității de Medicină și Farmacie din Târgu-Mureș, 10-12 decembrie 2008, Revista de Medicină și Farmacie (Orvosi és Gyógyszerészeti Szemle) 2008;54(Supliment 6):213.

4. Nan M, Laczkó-Zöld E, Eșianu S. Flavonoidok vékonyréteg kromatográfiás azonosítása *Galium verum* L. és *Galium mollugo* fajokból. A XIX-a Sesiune Stiințifică a Muzeului Ardelean, Târgu-Mureș, 23-25 aprilie 2009, Buletin de Științe Medicale (Orvositudományi Értesítő) 2009;82(Supliment 1):42.

Coautor la cărți:

Eszter Laczkó-Zöld, Sigrid Eșianu, Monica Nan - *Cap. 3.14. Cunoașterea fitopreparatelor*, în Activitatea în farmacie, Coordonator Adriana Ciurba, University Press, Târgu Mureș, 2010, ISBN 987-973-169-133-6.

Coautor la cursuri:

Laczkó-Zöld Eszter, Eșianu Sigrid, Nan Monica - *Produse vegetale medicinale*. Îndrumător de lucrări practice pentru specializarea Asistență de farmacie. Litografia UMF Târgu Mureș, 2011, 76 p.

Burse obținute:

Bursa CEEPUS pentru doctoranzi la Universitatea Comenius din Bratislava, Facultatea de Științe ale Naturii, Disciplina de Chimie Analitică, Slovacia, 2010.

Bursa Domus Hungarica pentru doctoranzi la Universitatea din Szeged, Facultatea de Farmacie, Institutul de Farmacognozie, Ungaria, 2010.

Membră în grant național: 32-151/2008, "Genul Veronica – identificarea interrelațiilor între diversitatea biologică și cea ecologică a speciilor identificate în arii protejate și la nivel național, în scopul caracterizării, conservării și gestionării durabile a resurselor genetice", Programul Parteneriate în Domeniile Prioritare, categoria de proiect: PC, instituția coordonatoare: Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Științe Biologice/Centrul de Cercetări Biologice "Stejarul" Piatra-Neamț. Partener 2 - U.M.F Tg. Mureș.

Membră în asociații profesionale: Colegiul Farmaciștilor din România, Societatea de Științe Farmaceutice din România



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY "IULIU HAȚIEGANU"

DOCTORAL SCHOOL

FACULTY OF PHARMACY

Pharmacobotanical study of *Inula helenium* L. (Asteraceae) species regarding its use in phytotherapy

Summary of doctoral thesis

PhD student **Monica Aurora Nan**

Scientific advisor **Prof. Mircea Tămaș, PhD**

CLUJ-NAPOCA 2011

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	9	leaves	
PRESENT STAGE OF KNOWLEDGE	12	6.1. Introdudere	97
1. Pharmacobotanical and phytochemical considerations on <i>Inula helenium</i> L. species	12	6.2. Objectives	99
2. General consideration on <i>Inulae radix</i> medicinal vegetable product	27	6.3. TLC identification of flavonoids	99
PERSONAL CONTRIBUTIONS		6.4. Quantitaive analysis of flavonoids	103
1. Objectives	41	6.5. Qualitative and quantitative analysis of poliphenols by HPLC-UV and HPLC-MS	104
2. General methodology	41	6.6. Conclusions	118
3. Study 1. Macro- and microscopic analysis	50	7. Study 5. Carotenoid analysis from <i>Inula helenium</i> L. flowers and leaves	120
3.1. Introduction	50	7.1. Introduction	120
3.2. Objective	50	7.2. Objectives	121
3.3. Macroscopical analysis	50	7.3. Material and method	121
3.4. Microscopical analysis of <i>Inulae radix</i> medicinal vegetable product	53	7.4. Results	121
3.5. Microscopical analysis of the aerial part of <i>Inula helenium</i> L. species	58	7.5. Discutions	127
3.6. Microscopical analysis of the secretory tissue from roots	62	7.6. Conclusions	128
3.7. Microscopical analysis of inuline from roots	65	8. Study 6. Cation analysis from aqueous extracts from roots and aerial part of <i>Inula helenium</i> species	129
3.8. Differentiation of <i>Inulae radix</i> from other medicinal vegetable products	66	8.1. Introduction	130
3.9. Discutions	67	8.2. Objectives	130
3.10. Conclusions	67	8.3. Material and method	130
4. Study 2. The analysis of sesquiterpene lactones from <i>Inula helenium</i> L. extracts	68	8.4. Results	131
4.1. Introduction	68	8.5. Conclusions	136
4.2. Objective	71	9. Study 7. Antibacterial and antifungal <i>in vitro</i> testing	137
4.3. TLC analysis of extracts	71	9.1. Introduction	137
4.4. TLC-Densitometric determination of sesquiterpene lactones from <i>Inulae radix</i>	75	9.2. Pharmaceutical preparations	138
4.5. Ultrasound-assisted extraction of sesquiterpene lactones	81	9.2. Objectives	140
4.6. Alanatolactone identification in <i>Inula helenium</i> L. extracts	82	9.4. Determination of antibacterial and antifungal action of the volatile oil by liquid medium dilution method	140
4.7 Conclusions	83	9.5. Determination of antibacterial and antifungal action of the volatile oil by diffusion method	142
5. Study 3. Analysis of the volatile oil from <i>Inulae radix</i>	84	9.6. Antibacterial testing of the <i>Inulae radix</i> tincture by diffusion method	144
5.1. Introduction	84	9.7. Antifungal testing of the <i>Inulae radix</i> – based ointment by diffusion method	146
5.2. Objectives	84	9.7. Conclusions	147
5.3. Extraction and quantitative analysis of the volatile oil	84	10. General conclusions	148
5.4. Extraction of volatile oil by another method of hydrodistillation	86	11. Thesis' s originality and innovative contributions	152
5.5. TLC analysis of volatile oil	87	REFERENCES	153
5.6. Gascromatographic analysis of volatile compounds extracted by hidrodistillation	88		
5.7. Conclusions	96		
6. Study 4. Analysis of flavonoids from <i>Inula helenium</i> L. inflorescences and	97		

Keywords: *Inula helenium* L., sesquiterpene lactones, alantolactone, flavonoids, carotenoids, antimicrobial action

I. Introduction

Inula helenium L. (elecampane), Asteraceae, is one of the medicinal plants used since ancient times. The species is known because of the high content in inuline a natural substance isolated for the first time from it's roots. Although numerous bibliographical sources cite volatile oil in the composition of the roots, there are few studies detailing the chemical composition of this volatile oil.

II. Present stage of knowledge contains the pharmacobotanical and phytochemical informations regarding *Inula helenium* L. species and *Inulae radix* medicinal vegetable product found in scietific literature until now.

Systematic classification of *Inula helenium* L., characterization of the Asteraceae family and *Inula* genus are presented. The studied species is common in Romanian flora and it differs from the rest of indigenous species of the genus that have smaller dimensions. *Inula helenium* is a perrenial herbaceous plant, with tuberous, thick roots. In the first year of its vegetation the plant develops only basal leaves, in the second year the plant grows the flowering stem that can reach up to 2 m in hight. It has oval-elliptical leaves, up to 60 cm long, pubescent on both sides. The inflorescences have up to 8 cm in diameter with yellow-gold ligulate flowers and yellow-brownish tubular flowers inserted on a flattened receptacle lined with many rows of bracts.

Inulae radix medicinal vegetable product was included under different names in european pharmacopoeias: **Aunée** (PF X - French Pharmacopoeia), **Radix Helenii** (Ned 5 - Dutch Pharmacopoeia), **Rhizoma Helenii** (EB 6 - Supplement to the DAB 6), **Elecampane (Helenii rhizoma)** (BHP - British Herbal Pharmacopoeia). The medicinal vegetable product contains volatile oil, of solid consistency, thymol derivatives, sterols, hydrocarbons and inulin as reserve substance. The volatile oil is known to contain the sesquiterpene lactones alantolactone and isoalantolactone. The crystallized mixture of sesquiterpene lactones is called "alantcamphor" or "helenine".

Inulae radix has been used in folk medicine to treat respiratory diseases. The medicinal vegetable product has expectorant, antitussive, cholagogue - cholaretic, diuretic, antihelminthic, antibacterial, antifungal, citotoxic, antioxidant and insecticidal actions. Pharmacological studies have shown that these actions are due to sescviterpene lactones.

III. Objectives

– Establishing criteria for identifying at the microscopic level the roots and aerial part of the

species *Inula helenium* L. and histochemical evidence of specific anatomical structures.

- Analysis of sesquiterpene lactones from root extracts by TLC
- Volatile oil extraction and GC analysis of its chemical composition
- HPLC analysis of the main compounds from the aerial part of the species: flavonoids and carotenoids
- Quantification of main macroelements from aqueous extracts obtained from the aerial and roots of *Inula helenium* L. by an electrophoretic method
- *In vitro* testing of antimicrobial action of root extracts and pharmaceutical preparations obtained from *Inulae radix*

IV. General methodology includes a description of the analytical methods and their principles of use. We presented methods applied in chromatographic separation, identification and determination of active ingredients: thin layer chromatography (TLC), gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC). We also described capillary electrophoresis technique (EC) and UV/VIS spectrometry method used for quantitative determination of flavonoids and carotenoids.

For the pharmacological *in vitro* testing of the antimicrobial action we used agar-diffusion method and dilutions in liquid medium method.

V. Personal contribution contains the analyses and obtained results.

Study 1. Macro- and microscopic analysis

We performed the anatomical and histochemical analysis of *Inulae radix* medicinal vegetable product. Cross-sections were prepared from cultivated roots harvested at different stages of development and from commercially available vegetable product. During the first months of its vegetation, roots have primary structure and after a year of vegetation they have secondary structure. Phloroglucinol - chlorhidric acid and Geneva reactive staining highlighted the lignified elements in the microscopical preparations. Volatile oil canals are found in all root tissues, Sudan III stains them red. The histological in ontogenesis study revealed the presence of volatile oil canals beginning from the first months of vegetation. Inulin was visualised microscopically after alcohol precipitation in the form of glassy sharp-edged aggregates.

The microscopic analysis of the underground and aerial organs of *Inula helenium* species L. showed that roots have a differentiated secretory apparatus, stem, leaves and ligulate flowers have external elements consisting of glandular hairs. *Inulae radix* differs from *Taraxaci radix* and *Belladonnae radix* because of the lack of laticifer ducts and calcium oxalate.

Study 2. Analysis of sesquiterpene lactones from *Inula helenium* L. extracts

Based on data from the literature sesquiterpene lactones were identified by a thin-layer chromatography (TLC) method. Extracts were prepared by macerating the vegetable product in absolute ethanol, 70% ethanol and ethyl acetate: hexane (1:1) mixture, after filtration and concentration the residue was dissolved with hexane and chloroform. We analyzed cultivated roots, vegetable product commercially available and roots harvested from spontaneous flora. Sesquiterpene lactones were found in all analyzed extracts at $R_f = 0.7$, using specific spray reagents anisaldehyde/ H_2SO_4 , vaniline/ H_2SO_4 were colored blue-violet, and respectively blue and hydroxylamine/ $FeCl_3$ coloured lactones in brown. By using standard substances alantolactone and isoalantolactone we showed their lack in the aerial organs of the species.

A TLC - densitometric method was developed for determining sesquiterpene lactones in ethanolic, hexanic and chloroformic extracts, using isoalantolactone as a standard substance. The amount of lactones sesquiterpenic in the two plant products analyzed (product grown in cultures and commercially available product) varies between 0.088% - 0.16% isoalantolactone reported to extract, from 2.69% - 3.99% isoalantolactone in dry plant product and between 49.86% - 91.40% isoalantolactone reported in dry extract. The extraction method on a ultrasonic bath proved effective to obtain sesquiterpene lactones, hexane proved to be the most effective extraction solvent for the investigated compounds. The results can be used to obtain a pharmaceutical preparation with high content of sesquiterpene lactones.

Study 3. Analysis of the volatile oil from *Inulae radix*

Volatile oil was extracted by the method described in the Romanian Pharmacopeia Xth edition (FRX) from the analyzed samples. Cultivated roots contain 1.2% volatile oil, commercially available vegetable product contains 1.86% volatile oil, and roots harvested from spontaneous flora contain 0.56% volatile oil. The volatile oil crystallizes at room temperature. TLC analysis separated seven compounds in the volatile oil, the main spot is found at $R_f = 0.7$ of blue-violet color with anisaldehyde/ H_2SO_4 .

GC analysis of volatile oil samples showed the presence of two major compounds: alantolactone in concentration of 52.5% - 63% and isoalantolactone in a concentration of 29.7% - 36.2%. We found differences in the volatile oil samples analyzed, in the sample obtained from vegetable products harvested from cultures we identified 20 terpene compounds, compared with 8 in the volatile oil obtained from commercially available product. The remaining compounds are in lower concentrations: santolina triene 1.4%, α -pinene 0.5%, sabinene 0.1%, β -pinene 0.7%, mircene 0.1%, limonene + β -felandrene 0.2%, isopinocampone, β -elemene 0.4%, 7-epi-sesquiterpene 0.1%, linalool butanoate 0.5%, β -caryophyllene 0.1%, β -dihydro-ionone 0.2%, β -chamigrene, valencene 0.2%, α -selinen 0.1%, trans- β -quaiene 0.1%, and γ cadinene 0.2%, δ -

cadinene.

Study 4. Analysis of flavonoids from *Inula helenium* L. inflorescences and leaves

Preliminary analysis of flavonoids by TLC using three mobile phases and bidimensional chromatography led to the separation of five flavonoids in the hydrolyzed extracts of flowers and four flavonoids in the extract of leaves. We identified quercetol and possibly some of its derivatives in methanolic and hydrolysed extracts of flowers and leaves of elecampane.

HPLC-MS analysis completed the TLC results, in the inflorescences methanolic extract quercetol and its glycosides quercitrin and isoquercitrin were identified and in the leaves glycosides quercitrin and rutoside were identified. Hydrolysed extracts of inflorescences and leaves contain the aglycones kaempferol and quercetol, patuletin a methoxylated compound is present only in leaves. The applied method allowed the identification the polyphenolcarboxylic acids: caffeic, chlorogenic, p-coumaric, gentisic and ferulic. Of the eleven compounds identified six could be quantified by HPLC-UV: quercetol, isoquercitrin, quercitrin, kaempferol, patuletin and p-coumaric acid. Isoquercitrin (3-O- β quercetin-D-glucopyranoside) dominates quantitatively the methanolic extracts of inflorescences 0.898 mg/g vegetable product. Following spectrophotometric quantitative determination of flavonoids we found that leaves contain higher levels of flavonoids than inflorescences, concentrations range from 1.43% in inflorescences and 1, 83% in leaves. These high concentrations are comparable to those of officinal vegetable products with flavonoids in European Pharmacopoeia 6.

Study 5. Analysis of carotenoids from *Inula helenium* L. inflorescences and leaves

By HPLC-PDA analysis seven carotenoids were determined in the aerial part of *Inula helenium* species. Ligulate flowers and tubular flowers contain lutein-5,6-epoxide, lutein, violaxanthine, and neoxanthine; anteraxanthine is present only in tubular flowers; leaves contain lutein, neoxanthin, violaxanthine, β -cryptoxanthin and β -carotene. Major compounds are lutein-5,6-epoxide in ligulate flowers (73.8%) and inflorescences (29.2%) and lutein in tubular flowers (28.4%) and leaves (33.4%). Total carotenoid content determined by a spectrophotometric method showed concentrations of carotenoids ranging from 4.87 mg/100 g in leaves to 47.7 mg/100 g in ligulate flowers. The study showed that *Inula helenium* is an important source of carotenoids. Because ligulate flowers contain a high concentration of lutein-5,6-epoxide it can be considered to use for the isolation of this reference substance.

Study 6. Analysis of cation from aqueous extracts from roots and aerial part of *Inula helenium* species

The study of macroelements was conducted by an electrophoretic method on a column-coupling chip. The method we used is a validated method for the analysis of calcium, magnesium, sodium, potassium and ammonium in drinking waters. We determined concentrations of the ions

in the aerial part of the plant: Ca²⁺ 61.06 - 74.61 µg/g medicinal vegetable product, Mg²⁺ 34.97 - 39.69 µg/g medicinal vegetable product, Na⁺ 30.94 to 39.46 µg/g medicinal vegetable product; K⁺ 225.73 - 249.19 µg/g medicinal vegetable product, NH⁴⁺ 1.52 - 1.64 µg/g medicinal vegetable product; and in the roots: Ca²⁺ 8.62 - 9.63 µg/g medicinal vegetable product; Mg²⁺ 5.99 - 6.85 µg/g medicinal vegetable product; Na⁺ 25-1.58 µg/g medicinal vegetable product; K⁺ 146.64 - 155.37 µg/g medicinal vegetable product.

High levels of potassium in infusions and decoctions of the aerial part and roots of *Inula helenium* favors their diuretic action.

Study 7. Antibacterial and antifungal *in vitro* testing

Pharmacological studies focused on testing the antimicrobial action of sesquiterpene lactones from the volatile oil and ethanolic and hexanic extracts of roots. Antimicrobial activity of the essential oil was tested using disk-diffusion method and broth dilution method.

To test the volatile oil by broth dilution method we prepared a volatile oil solution in dimethylsulfoxid (pH - the solution was adjusted to 7 with mops buffer (acid 3 - (N-morfolino) propansulfonic)), serial dilution were made by halving the solution of volatile oil in RPMI medium (Roswell Park Memorial Institute medium containing vitamins, amino acids, salts, glucose, glutathione, and a pH indicator). After incubation, we evaluated the turbidity of the solutions in tubes. We determined minimum inhibitory concentrations (MIC) of the essential oil on six reference (ATCC) strains of fungi and seven strains of bacteria. The volatile oil is active against all microorganisms tested: *Staphylococcus aureus* MIC = 100 mg / ml, *MRSA* MIC = 100 mg / ml, *Streptococcus pyogenes* MIC = 25 mg/ml, *Bacillus subtilis* MIC = 100 mg/ml, *Escherichia coli* MIC = 100 mg/ml, *E. coli* D31 MIC = 25 mg/ml, *Pseudomonas aeruginosa* MIC > 100 mg/ml, *Candida albicans* MIC > 100 mg/ml, *Candida glabrata* MIC = 100 mg/ml, *Candida kruzei* MIC = 100 mg/ml, *Candida parapsilosis* MIC = 100 mg/ml, *Saccharomyces cerevisiae* MIC = 50 mg/ml, *Aspergillus niger* MIC = 50 mg/ml.

Diffusion method was applied to test the volatile oil against five reference strains of bacteria: *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* and six strains of fungi: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr* (clinical source), *Rhodotorula glutinis* (clinical source). Results could be established only on two bacterial strains and MIC values obtained for the volatile oil and reference substance, alantolactone, are higher than those of the dilutions method: *Staphylococcus aureus* MIC = 250 mg/ml and *Streptococcus pyogenes* MIC = 125 mg/ml.

Two preparations were made based on *Inulae radix*: tincture 10% and 10% hexane extract ointment. The alcoholic extract tested by diffusion method proved active only on the

Staphylococcus aureus strain at a concentration of 40 mg/ml. The 10% ointment could not be tested by the diffusion method.

It can be concluded that both the volatile oil and the tincture obtained from *Inulae radix* have antifungal and antibacterial action, specially on *Saphylococcus aureus*. The antimicrobial action can be further evaluated *in vivo*.

VI. GENERAL CONCLUSIONS

Researches made during these studies led to the achievement of the thesis's objectives. New information was provided on the morphology and anatomy, phytochemistry and pharmacology of *Inula helenium* L. species.

We have established elements of identification and differentiation, we determined qualitatively and quantitatively the main bioactive compounds from roots and aerial part: sesquiterpene lactones, flavonoids, carotenoids, minerals. We determined the antifungal and antibacterial *in vitro* action of the volatile oil and the antibacterial action of the *Inulae radix* tincture.

Due to the high content of flavonoids and potassium, the aerial part of the *Inula helenium* species could be further tested and used for diuretic action. The results of the analyses made on the aerial part of the species are original data, unreported in the scientific literature given so far.

VII. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Blaschek W, Ebel S, Hackenthal E, Holzgrabe U, Keller K, Reichling J et al. Hagers Enzyklopädie. 6. Auflage. Band 8. Stuttgart: Springer Verlag 2007:988–1003.
2. Bohlmann F, Mahanta KP, Jakupovic J, Rastogi RC, Natsu AA. New sesquiterpene lactones from *Inula* species. *Phytochemistry* 1978;7:1165-72.
3. Benigni R, Capra C, Cattorini PE. *Pianti medicinale*. Milano: Inverni della Beffa 1964:549-55.
4. Bisset NG, Wichtl M (editors). *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basis*, 2nd edition. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers 2001:254-6.
5. Vajs V, Jeremic D, Milosavijevic S, Macura S. Sesquiterpene lactones from *Inula helenium*. *Phytochemistry* 1989;28(6):1763-4.
6. Tămaş M, Popescu H. Identificarea componentelor volatile din extractul fluid de *Inulae radix*. *Farmacia* 1982;30(30):169-72.
7. Deriu A, Zanetti S, Sechi LA, Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Tuveri E. Antimicrobial activity of *Inula helenium* L. essential oil against Gram-positive and Gram-negative bacteria and *Candida* spp. *Letters to the Editor / International Journal of Antimicrobial Agents* 2008;31: 581–92.
8. Konishi T, Shimada Y, Nagao T et al. Antiproliferative Sesquiterpene Lactones from the Roots of *Inula helenium* L.. *Biol. Pharm. Bull.* 2002;25(10):1370-72.
9. Fraga BM. Natural sesquiterpenoids, *Nat. Prod. Rep.* 2003;20:392–413.
10. Wagner S, Merfort I. Skin penetration behaviour of sesquiterpene lactones from different *Arnica* preparations using a validated GC-MSD method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007;43: 32–8.

Personal information

Name: Nan

Surname: Monica Aurora

Date of birth and birthplace: 13-12-1983, Baia Mare, Maramureş

nan_monica@yahoo.com

Education

2007 – present: „Iuliu Haţieganu” University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca – PhD student in Pharmaceutical Bothany

2002 – 2007: University of Medicine and Pharmacy from Târgu-Mureş, Faculty of Pharmacy – Bachelor of Pharmacy

1998 – 2002: “Gheorghe Şincai” National College Baia Mare - Informatics – Bacalaureate Degree

Postgraduate courses

2009: University of Medicine and Pharmacy, Târgu-Mureş, „Actualities of pharmacology and toxicology in medical and pharmaceutical practice”

2008: University of Medicine and Pharmacy, Târgu-Mureş, „Modern Phytotherapy”

Work experiece

2008 February – present: junior teaching assistant – University of Medicine and Pharmacy from Târgu-Mureş, Faculty of Pharmacy, Discipline of Pharmacognosy and Phytotherapy

2007 October – 2008 January: employed on the vacant position of junior teaching assistant - University of Medicine and Pharmacy from Târgu-Mureş, Faculty of Pharmacy, Discipline of Pharmacognosy and Phytotherapy

2007 October – 2010 December: pharmacist at Farmaciile Dona, Târgu-Mureş

Foreign langauges: English - C1 level (advanced) PROFEX Certificate (2009); French; Hungarian.

Scientific activities

Publications:

1. Nan M, PinteA A, Bunea A, Eşianu S, Tămaş M. HPLC analysis of carotenoids from *Inula helenium* L. flowers and leaves. *Farmacia (accepted for publication)*.
2. Nan M, Vlase L, Eşianu S, Tămaş M. The analysis of flavonoids from *Inula helenium* L. flowers and leaves. *Acta Medica Marisiensis* 2011;57(4):319-323.
3. Nan M, Veres K, Hohmann J. TLC-densitometric determination of sesquiterpene lactones from *Inula helenium* roots. *Acta Medica Marisiensis* 2010;56(3):269-271.
4. Nan M, Eşianu S, Laczkó - Zöld E, Tămaş M, Darkó B. Macro- and microscopic study of *Inula helenium* L. roots. *Note botanice* 2010;Fasc.XXXVI:42-47.

Publications în books of abstracts:

1. Nan M, Vlase L, Eşianu S, Tămaş M. The analysis of flavonoids from *Inula helenium* L. flowers and leaves. The IV-th Conefence of PhD Students in Medicine and Pharmacy Târgu-Mureş, 11-13 July 2011, *Acta Medica Marisiensis* 2011, 57(4):
2. Nan M, Eşianu S, Tămaş M. Studiul macro- și microscopic al rădăcinii speciei *Inula helenium* L. University of Medicine and Pharmacy from Tîrgu-Mureş, 10-12 December 2008, *Medicine and*

Pharmacy Journal (Revista de Medicină și Farmacie /Orvosi és Gyógyszerészeti Szemle) 2008;54(Supplement 6):213.

3. Nan M, Laczkó-Zöld E, Eșianu S. TLC analysis of flavonoids from *Galium verum* L. and *Galium mollugo* species (Flavonoidok vékonyréteg kromatográfiás azonosítása *Galium verum* L. és *Galium mollugo* fajokból). The XIX-th Scientific Session of the Transylvanian Museum, Târgu-Mureș, 23-25 April 2009, Bulletin of medical Sciences (Buletin de Științe Medicale / Orvositudományi Értesítő) 2009;82(Supplement 1):42.

Books:

Eszter Laczkó-Zöld, Sigrid Eșianu, Monica Nan - *Cap. 3.14. Cunoașterea fitopreparatelor*, în *Activitatea în farmacie*, Coordonator Adriana Ciurba, University Press, Târgu Mureș, 2010, ISBN 987-973-169-133-6.

Courses:

Laczkó-Zöld Eszter, Eșianu Sigrid, Nan Monica - *Produce vegetale medicinale*. Litografia UMF Târgu Mureș, 2011, 76 pages

Scholarships:

CEEPUS mobility at Comenius University from Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Discipline of Analytical Chemistry, Slovakia, 2010.

Domus Hungarica scholarship for PhD students at the University of Szeged, Faculty of Pharmacy, Pharmacognosy Institute, Hungary, 2010.

Member of the research team of grant: 32-151/2008, "Veronica genus- identification of interrelations between biological and ecological diversity of species found in protected areas and nationwide with the purpose of characterization, conservation and sustainable management of the genetic resources. Partnership in Priority Domains Program, project category: PC, coordinating institution: National Institute for Research-Development for Biological Sciences/ „Stejarul” Center for Biological Research Piatra-Neamț. Partener 2 - U.M.F Tg. Mureș.

Membership in professional associations: College of Pharmacists from Romania, Society of Pharmaceutical Sciences from Romania