

**UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN CHIMIE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**CONTRIBUȚII LA IDENTIFICAREA, SEPARAREA ȘI
DOZAREA UNOR PRINCIPII ACTIVE DIN PLANTE
DE INTERES FARMACEUTIC**

**Doctorand,
Iuliana Pșegalinschi
(căs. Stoicescu)**

**Conducător doctorat,
Prof. dr. Camelia Bala**

2013

CUPRINS

| | |
|---|-----|
| INTRODUCERE..... | 1 |
| PARTEA A I-A | |
| PARTEA GENERALĂ ȘI STADIUL CUNOAȘTERII | |
| CAP.1. DATE GENERALE PRIVIND SPECIA <i>TRAPA NATANS</i> L. | 4 |
| CAP.2. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRILOR ÎN DOMENIU | 6 |
| CAP. 3. TEHNICI ȘI METODE ANALITICE ÎN STUDIUL COMPUȘILOR FENOLICI. | 14 |
| PARTEA A II-A | |
| PARTEA EXPERIMENTALĂ | |
| CAP. 4. OBȚINEREA ȘI CONTROLUL CALITĂȚII MATERIEI PRIME VEGETALE..... | 45 |
| CAP. 5. PROCEDEE DE LABORATOR PENTRU OBȚINEREA EXTRACTELOR..... | 57 |
| CAP. 6. DETERMINAREA CANTITATIVĂ A POLIFENOLILOR TOTALI DIN PĂRȚILE COMPONENTE ALE SPECIEI <i>TRAPA NATANS</i> L. PRIN SPECTROMETRIE DE ABSORBȚIE UV-VIS | 59 |
| CAP. 7. IDENTIFICAREA, SEPARAREA, DETERMINAREA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A COMPUȘILOR FENOLICI UTILIZÂND CROMATOGRAFIA DE LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ CU DETECTOR CU REȚEA DE DIODE | 81 |
| CAP. 8. METODA FOTOCHEMILUMINESCENTĂ PENTRU DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE | 191 |
| CAP. 9. DETERMINAREA CAPACITĂȚII ANTIMICROBIENE A PROBELOR | 196 |
| CAP. 10. DETERMINAREA CITOTOXICITĂȚII (TESTUL FITOBIOLÓGIC)..... | 202 |
| CAP. 11. CONCLUZII GENERALE. CONTRIBUȚII ORIGINALE. PERSPECTIVE DE CERCETARE..... | 208 |
| BIBLIOGRAFIA | 213 |
| Anexe | 242 |

| | |
|----------------------------------|-----|
| Lista lucrărilor publicate | 255 |
|----------------------------------|-----|

Numerotarea capitolelor, figurilor, tabelelor și a indicațiilor bibliografice corespunde celei din teza de doctorat.

INTRODUCERE

În ultimii ani se remarcă interesul comunității științifice față de plantele medicinale datorită proprietăților acestora în menținerea stării de sănătate și mai ales pentru că acestea reprezintă surse inepuizabile de materie primă pentru prepararea unor compuși farmaceutici.

În prezenta teză ne-am propus studierea speciei de plantă *Trapa natans* L., din regiunea Delta Dunării.

Alegerea temei de cercetare a avut în vedere următoarele:

- preocuparea constatată, din ultimii ani, a lumii științifice de a identifica noi surse de compuși bioactivi în compoziția plantelor medicinale și de a valorifica remediile din medicina tradițională. Deasemenea, este cunoscută importanța surselor de origine vegetală pe plan mondial: peste 50% din medicamentele prescrise pe continentul american conțin substanțe de origine vegetală iar țări din Europa precum Germania și Franța reprezintă 30% din piața de desfacere a produselor pe bază de plante;
- cercetările anterioare evidențiază prezența unor principii active în fructul plantei care pot avea acțiune antioxidantă și antimicrobiană;
- la nivel internațional părțile acvatică și aeriene ale speciei *Trapa natans* L. nu sunt valorificate, iar la nivel național, după cunoștințele noastre, nu există nici un studiu de cercetare sistematică, până în prezent;

Scopul lucrării a constat în identificarea, separarea, determinarea calitativă și cantitativă a unor principii active din specia *Trapa natans* L. cu potențial terapeutic și validarea metodelor analitice utilizate în acest sens.

Obiectivele cercetărilor au fost:

- stabilirea identității, purității și calității produselor vegetale obținute din specia *Trapa natans* L.;
- obținerea unor extracte din partea acvatică, aeriană, din pulpa și pericarpul fructelor speciei *Trapa natans* L. cu scopul de a obține un concentrat în principii active;
- separarea și determinarea conținutului în principii active din extractele obținute din partea acvatică, aeriană, din pulpa și pericarpul fructelor speciei luate în studiu;
- elaborarea și validarea unei metode HPLC pentru identificarea, separarea și determinarea principiilor active din specia *Trapa natans* L.;
- caracterizarea efectelor principiilor active identificate, separate și cuantificate din extractele obținute din toate părțile componente ale speciei luate în studiu;

- evaluarea acțiunii citotoxice și mutagene a acestor extracte concentrate în principii active.

Teza de doctorat cuprinde o parte de literatură și, o parte experimentală care conține contribuțiile originale obținute pe perioada derulării cercetării pentru elaborarea tezei de doctorat.

În prima parte sunt prezentate aspecte referitoare la date din literatură cu privire la specia *Trapa natans* L. (capitolul 1), la stadiul actual al cercetărilor în domeniu legat de cercetările farmacochemice, farmacologice și importanța speciei demonstrate științific (capitolul 2), date teoretice privind tehnicile de extracție utilizate pentru obținerea extractelor vegetale, importanța compușilor fenolici studiați, metode utilizate în literatură pentru identificarea, separarea, determinarea calitativă și cantitativă a acestora, o scurtă prezentare a tehnicilor de analiză, utilizate în teză și noțiuni de validare a metodelor analitice (capitolul 3).

În partea originală a lucrării sunt prezentate date cu privire la obținerea și controlul calității materiei prime vegetale (capitolul 4), prepararea extractelor hidroalcoolice din partea acvatică, aeriană, din pulpa și pericarpul fructelor prin extracție Soxhlet și macerare (capitolul 5), precum și determinarea cantitativă a conținutului în polifenoli totali prin metoda spectrofotometrică (capitolul 6),

În literatura de specialitate există puține date cu privire la metodele de separare, identificare, determinare calitativă și cantitativă a compușilor de tip fenolic în diferite specii ale genului *Trapaceea* [32,67]. Deși în numeroase articole este menționată prezența compușilor fenolici, responsabili de anumite efecte asupra organismului, nu există date cu privire la identificarea compușilor fenolici de la nivelul părții aeriene a speciei *Trapa natans* L.

Astfel, Capitolul 7, cel mai amplu capitol al lucrării cuprinde aplicarea unei metode HPLC standardizate din literatură pentru identificarea, separarea, determinarea calitativă a acizilor galic, metilgalic, clorogenic, cafeic, ferulic și a E-resveratrolului, validarea acestei metodei HPLC și aplicarea acestei metodei standardizate pentru identificarea, separarea, determinarea cantitativă și calitativă a compușilor fenolici din extractele hidroalcoolice obținute din specia *Trapa natans*.

Identificarea și determinarea calitativă a compușilor fenolici din soluțiile de analizat s-a realizat pe baza timpilor de retenție specifici fiecărui acid fenolic și prin compararea spectrelor de absorbție pentru fiecare compus fenolic separat din cromatogramele obținute din fiecare soluție obținută a părților componente ale speciei studiate cu amestec de compuși puri și a spectrelor de absorbție pentru fiecare compus fenolic separat din cromatogramele obținute din fiecare soluție obținută a părților componente ale speciei studiate fără amestec de compuși puri, la lungimile de undă la care acești compuși prezintă maxime de absorbție. Determinarea

cantitativă a acizilor 3-O-metilgalic, clorogenic, cafeic și ferulic s-a făcut pe baza curbelor de calibrare prezentate în subcapitolul 7.1.4.3.

Identificarea, separarea, determinarea calitativă și cantitativă a compușilor fenolici din soluția de analizat se face prin compararea cromatogramelor soluției de analizat cu amestec de 6 compuși fenolici puri (Figurile 7.52, 7.54, 7.56), a soluției de analizat cu amestec de 4 compuși fenolici puri (Figurile 7.53, 7.55) și a soluției de analizat fără amestec de compuși puri.

În urma analizei cromatogramelor obținute s-au identificat următorii compuși fenolici: la 216 nm acidul galic care eluează la 1.44 min, la 324 nm acizii cafeic la 4.61 min și ferulic la 8.60 min. Concentrațiile acizilor cafeic și ferulic au fost calculate pe baza dreptelor de calibrare efectuate în subcapitolul 7.1.4.3.1., iar rezultatele obținute și prelucrarea statistică a ariilor măsurate (mAU x sec), a timpilor de retenției și a concentrațiilor (mg/g p.v.) sunt prezentate în Tabelul 7.34.

Tabelul 7.34. Rezultatele înregistrate la determinarea cantitativă a compușilor fenolici din extractul hidroalcoolic 10% obținut din partea acvatică a speciei *Trapa natans* L. prin extracție Soxhlet

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{x} | SD | SDx | RSD (%) | $\bar{x} \pm t_{\alpha/2} \times SD_x$ |
|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------|------|------|---------|--|
| acid cafeic | | | | | | | | | | | |
| aria pic analit (mAU x sec) | 46.44 | 46.99 | 41.56 | 45.74 | 44.34 | 46.15 | 45.20 | 1.99 | 0.81 | 4.40 | 45.20 ± 91.09 |
| conc.experim (mg/g p.v.) | 0.48 | 0.48 | 0.43 | 0.47 | 0.46 | 0.48 | 0.47 | 0.01 | 0.01 | 4.03 | 0.47 ± 0.01 |
| timp de retenție (min) | 4.61 | 4.61 | 4.6 | 4.61 | 4.61 | 4.60 | 4.61 | 0.01 | 0.01 | 0.13 | 4.61 ± 0.01 |
| acid ferulic | | | | | | | | | | | |
| aria pic analit (mAU x sec) | 284.51 | 278.19 | 272.42 | 281.44 | 273.13 | 280.40 | 278.35 | 4.77 | 1.95 | 1.71 | 278.35 ± 3.93 |
| conc.experim (mg/g p.v.) | 1.33 | 1.30 | 1.28 | 1.32 | 1.28 | 1.31 | 1.31 | 0.02 | 0.01 | 1.72 | 1.31 ± 0.01 |
| timp de retenție (min) | 8.60 | 8.62 | 8.58 | 8.61 | 8.57 | 8.62 | 8.60 | 0.01 | 0.01 | 0.23 | 8.60 ± 0.01 |

p.v. – produs vegetal

Un aspect pe care l-am avut în vedere îl constituie verificarea purității picurilor analiților de interes. Rezultatele prezentate în Tabelul 7.35. ne arată că impuritățile nu coeluează cu picurile analiților cercetați. S-au analizat curbele de puritate a picurilor corespunzătoare compușilor fenolici prezenți în soluții (Figurile 7.57.-7.60.). Factorul de puritate al picurilor analiților identificați a fost mai mare de 95%.

În extractul hidroalcoolic obținut din partea acvatică a speciei *Trapa natans* L. prin extracție Soxhlet au fost identificați, separați, determinați calitativ acidul galic, acidul cafeic,

acidul ferulic și determinați cantitativ acidul ferulic (1.13 mg/g p.v.) în cantitate mai mare comparativ cu acidul cafeic (0.47 mg/g p.v.). Nu au fost identificați acizii 3-O-metilgalic și clorogenic.

În extractul hidroalcoolic obținut din partea aeriană a speciei *Trapa natans* L. prin extracție Soxhlet au fost identificați, separați, determinați calitativ acidul galic, acidul cafeic, acidul ferulic și determinați cantitativ acidul cafeic (4.64 mg/g p.v.), acidul ferulic (2.04 mg/g p.v.). Nu au fost identificați acidul 3-O-metilgalic la 216 nm, acidul clorogenic la 324 nm și E-resveratrolul la 310 nm.

În extractul hidroalcoolic obținut din pulpa fructului speciei *Trapa natans* L. prin extracție Soxhlet au fost identificați, separați, determinați calitativ acizii galic, 3-O-metilgalic și ferulic și determinați cantitativ acidul 3-O-metilgalic (0.54 mg/g p.v.) și acidul ferulic (0.09 mg/g p.v.) La lungimea de undă de 324 nm nu au fost identificați acidul clorogenic și cafeic, iar la lungimea de undă de 310 nm nu a fost identificat E-resveratrolul.

În extractul hidroalcoolic obținut din pericarpul fructului speciei *Trapa natans* L. prin extracție Soxhlet au fost identificați, separați, determinați calitativ acizii galic, cafeic, ferulic și determinați cantitativ acidul cafeic (4.25 mg/g p.v.), acidul ferulic (1.78 mg/g p.v.). Nu au fost identificați acidul 3-O-metilgalic la 216 nm, acidul clorogenic la 324 nm și E-resveratrolul la 310 nm [390].

Dintre compușii decelați de noi, doar acizii galic, 3-O-metilgalic și ferulic au fost citați anterior în literatura de specialitate ca fiind prezenți în pulpa fructului din această specie, ei au fost identificați, separați și determinați cantitativ tot prin metoda cromatografiei de lichide, în condiții cromatografice diferite din extracte metanolice obținute din pulpa fructului în stare proaspătă, în stare congelată și din probe uscate la aer cald [32].

De asemenea, pentru separarea, identificarea, determinarea calitativă și cantitativă a compușilor fenolici s-a elaborat o metodă HPLC nouă, care a fost optimizată și validată. Aceasta a fost aplicată pentru determinarea compușilor polifenolici din extractele hidroalcoolice obținute prin cele două metode de extracție.

Întrucât compușii pe care vrem să-i separăm prezintă grupări acide, retenția separărilor va crește o dată cu scăderea pH-ului fazei mobile, deoarece disocierea grupărilor -OH va fi blocată și moleculele vor interacționa pregnant cu faza staționară pe baza hidrofobității sale. Principiul metodei a constat în identificarea, separarea și determinarea cantitativă a acizilor galic, 3-O-metilgalic, clorogenic, cafeic, cinamic, ferulic și a E-resveratrolului din soluțiile hidroalcoolice prin metoda cromatografiei de lichide de înaltă performanță cu detector cu rețea de diode, pe baza timpilor de retenție și a spectrelor de absorbție în UV-Vis.

Identificarea, separarea, determinarea calitativă și cantitativă a compușilor fenolici din soluția de analizat se face prin compararea cromatogramelor soluției de analizat cu amestec de substanțe pure formată din cei 7 compuși fenolici și a soluției de analizat fără amestec de substanțe pure.

Analiții separați în metoda HPLC standardizată au fost regăsiți în metoda elaborată, dar în concentrații mai mici. Rezultatele au coincis la probele obținute prin macerare. Avantajul acestei metode a constat în timpul de analiză mai scurt, limite de detecție și cuantificare mult mai reduse în comparație cu rezultatele obținute cu metoda standardizată.

Noua metodă propusă este adecvată pentru separarea și evaluarea cantitativă a compușilor fenolici din produse vegetale.

Analizele HPLC utilizând atât metoda standardizată din Farmacopeea Americană cât și noua metodă elaborată au permis separarea și identificarea compușilor fenolici din extractele vegetale pe baza timpilor de retenție și a spectrelor de absorbție în UV și determinarea cantitativă pe baza ecuațiilor dreptelor de regresie validate.

Rezultatele obținute la separarea și determinarea cantitativă a polifenolilor totali prin metoda spectrofotometrică și identificarea, separarea și dozarea prin HPLC a unor compuși ne-au determinat să continuăm studiul prin cuantificarea activității antioxidante a extractelor hidroalcoolice obținute din părțile componente ale plantei *Trapa natans* L. prin metoda fotochemiluminescentă produsă prin reacția speciilor radicalice cu luminol. Datele experimentale și interpretarea acestora este prezentată în Capitolul 8.

Pe baza rezultatelor obținute și a corelației compoziției chimice – acțiune antioxidantă, putem afirma că concentrate în principii active de tip polifenoli extrase din partea aeriană, acvatică, din pulpa sau pericarpul speciei pot fi utilizate în medicină pentru acțiunea antioxidantă.

Determinarea activității antimicrobiene a extractelor hidroalcoolice vegetale cercetate este prezentată în Capitolul 9. Activitatea antimicrobiană a fost evaluată pentru trei specii bacteriene respectiv *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATTC 25922, *Proteus vulgaris* ATTC 13315, precum și pentru o specie de fungi de *Candida albicans* ATTC 10239, iar metoda utilizată a fost cea difuzimetrică în gel de agar. Cele mai largi zone de inhibiție ale activității antibacteriene au fost obținute în cazul extractelor hidroalcoolice realizate în extractorul Soxhlet pentru probele obținute din pericarp, urmate de cele obținute din partea aeriană și partea acvatică. Zone de inhibiție mici, mai puțin semnificative, au fost înregistrate pentru probele obținute din pulpa fructelor. Tulpinile cele mai sensibile la acțiunea probelor obținute prin extracție Soxhlet au fost bacteriile Gram + *S. aureus*. Tulpinile Gram + au fost mai sensibile la acțiunea extractelor hidroalcoolice testate comparativ cu bacteriile Gram -.

Rezultatele obținute privind acțiunea antibacteriană a extractelor hidroalcoolice au fost comparabile cu cele raportate în literatura de specialitate.

În vederea aprofundării studiilor asupra potențialului terapeutic al extractelor din planta *Trapa natans* L. în Capitolul 10 sunt prezentate rezultatele obținute privind evaluarea citotoxicității și genotoxicității extractelor asupra germinării cariopselor de grâu. S-a observat că toate extractele obținute din partea acvatică, aeriană, din pulpa și pericarpul fructului prezintă efecte citostatice evidente. Răspunsul citostatic cel mai accentuat este dat de extractul provenit din partea acvatică și din pericarpul fructelor, fapt explicat și de funcțiile morfologice ale acestor componente ale plantei.

Nu au fost observate elemente de genotoxicitate, cromozomi modificați sau punți cromozomiale. Trebuie menționat faptul că, deși sunt reduse diviziunile, apar toate etapele ciclului celular, în proporții diferite funcție de extract (Tabel 10.3.), ceea ce denotă faptul că diviziunile normale sunt posibile, dar semnalul de declanșare a ciclului celular este întrerupt.

Având în vedere că extractele hidroalcoolice obținute din partea acvatică, aeriană, din pulpa și pericarpul fructului speciei *Trapa natans* L., au acțiune antioxidantă, antimicrobiană și citostatică putem orienta cercetările ulterioare pentru crearea unui produs standardizat în polifenoli totali și compuși polifenolici identificați prin metoda cromatografică, cu efecte terapeutice demonstrate clinic. Perspectiva utilizării acestor extracte hidroalcoolice din produsele vegetale obținute din planta *Trapa natans* L. în industria alimentară și în cea farmaceutică este evidentă.

LISTA LUCRĂRILOR ELABORATE ÎN CADRUL TEZEI

1. Simultaneous determination of phenolic acids in water caltrop by HPLC-DAD
Iuliana Stoicescu, Antoanela Popescu, Rodica Sirbu, Camelia Bala
Analytical Letters, **2012**, 45(17), 2519-2529.
2. Spectrophotometric method for polyphenols analysis: validation and application on *Trapa natans* L. species
Iuliana Stoicescu, Antoanela Popescu, Rodica Sirbu, Cosmin Rosca, Dragoș Nicolae Doicescu, Vasile Bendic, Camelia Bala
Revista de Chimie, **2012**, 63(9), 865-868.
3. In vitro antioxidant and antibacterial activity of *Trapa natans* L. Aquatic plant from Danube Delta area
Iuliana Stoicescu, Rodica Sirbu, Ticuța Negreanu-Pirjol, Monica Cociașu, Doina Paula Balaban, Camelia Bala
Revue Roumaine de Chimie, **2012**, 57(7-8), acceptată în iulie 2012, in press.