

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN  
CRAIOVA**

**ȘCOALA DOCTORALĂ**



# **REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**STUDII CHIMICE ASUPRA PLANTELOR DIN  
SPECIA *CIRSIIUM ARVENSE***

**Conducător de doctorat:  
Prof. univ. dr. RADU STELIAN**

**Student doctorand:  
Farm. RADU FLORENTINA MIHAELA**

**CRAIOVA  
2014**

**Cuvinte cheie:** *Cirsium arvense*, caracteriari fitochimică, activitate farmaceutică

Contextul actual al cercetărilor din domeniul farmaciei cunoaște o reorientare spre medicina naturistă și implicit spre produsele vegetale cu proprietăți deosebite. Volumul informațiilor științifice în domeniul fitofarmaciei s-a dublat în ultimul deceniu, concomitent cu perfecționarea metodelor de analiză și a aparatului necesară unor astfel de determinări a principiilor active din plante. Această dezvoltare ultrarapidă a metodelor de investigație este susținută de cercetări intense prin care se caută noi resurse neinvestigate încă.

Deși medicina tradițională folosește din plin potențialul terapeutic al unor plante indigene care sunt extrem de răspândite în flora țării noastre, acestea sunt foarte puțin valorificate terapeutic la nivel farmaceutic industrial.

Aceste specii, dacă se dovedesc a fi bogate în metaboliți secundari și sunt răspândite în flora indigenă, pot constitui resurse alternative ieftine.

Specia propusă, *Cirsium arvense* este o plantă extrem de cunoscută pe teritoriul țării noastre, asupra căreia studiile sunt extrem de reduse.

Se cunoaște totuși în etnomedicină că aceasta poate fi utilizată pentru tratarea varicelor și a hemoroizilor.

Deoarece nu există studii asupra compoziției chimice a acesteia, este necesară realizarea unui astfel de studiu care să cuprindă o metodologie cât mai detaliată. Un alt argument care a stat la baza alegerii acestei teme a fost răspândirea ei pe teritoriul țării noastre precum și accesibilitatea acestei plante extrem de ridicate.

În această lucrare a fost realizat un studiu interdisciplinar în urma căruia au fost stabiliți parametri de identitate și calitativi ai speciei *Cirsium arvense*, specie indigenă întâlnită frecvent în flora spontană a țării noastre și complet neinvestigată până în prezent. Studiul nostru a vizat de asemenea și caracterizarea chimică a acestei specii, precum și evaluarea anumitor activități farmaceutice pe care le-ar putea avea specia *Cirsium arvense*.

Materialul este structurat în două părți: o parte teoretică alcătuită din două capitole și o parte de contribuții originale alcătuită din 6 capitole.

## **PARTEA INTAI – STADIUL ACTUAL AL CUNOASTERII**

1. Primul capitol prezintă câteva considerații cu caracter general în ceea ce privește specia *Cirsium Arvense*: de la descrierea botanică a acesteia, răspândire și utilizări în etnomedicină.

2. Cel de-al doilea capitol este dedicat aspectelor teoretice ale principalelor metode de analiză a principiilor active din compoziția chimică a acestei specii.

### **CONTRIBUȚII ORIGINALE**

#### **CAPITOLUL 3. ANALIZA MACRO ȘI MICROSCOPICĂ A ORGANELOR VEGETATIVE PROVENIND DE LA SPECIA CIRSIUM ARVENSE**

În cel de-al treilea capitol a fost realizat un studiu macroscopic și microscopic al organelor vegetative în scopul stabilirii caracteristicilor de identitate ale speciei investigate.

Specia propusă, *Cirsium arvense* este o plantă extrem de cunoscută pe teritoriul țării noastre, asupra căreia studiile sunt extrem de reduse.

De aceea trebuie să se stabilească anumite caracteristici morfologice ce pot fi observate cu ochiul liber.

Prin analiza macroscopică s-au descris elemente legate de formă, aspect, dimensiuni și culoare, precum și particularități legate de miros și gust.

Au fost luate în studiu următoarele produse fitofarmaceutice: frunzele, tulpina și rădăcina în diferite momente ale anului când conținutul de substanțe active este la cel mai ridicat nivel.

Deoarece nu există studii asupra compoziției chimice a acesteia, a fost necesară realizarea unui astfel de studiu care să cuprindă o metodologie cât mai detaliată.

Pentru analiza microscopică a fost folosit un microscop Bel Photonics model BIO3 cu cameră video Bel Photonics Model BVM-100 și soft Bel MicroImage Analyser.

Analiza microscopică a organelor vegetative a relevat detalii structurale caracteristice speciei, corespunzând datelor existente până în prezent, și oferind și detalii noi ce indică deosebiri structurale între speciile aparținând aceluiași gen.

## **CAPITOLUL 4. ANALIZA CHIMICĂ PRELIMINARĂ A ORGANELOR VEGETATIVE DE LA SPECIA *CIRSIIUM ARVENSE***

În acest capitol au fost efectuate mai multe analize care să releve compoziția fitochimică preliminară a acestei specii. Astfel, în primul subcapitol s-a urmărit determinarea umidității și a cenușii brute pentru fiecare organ vegetative al specie *Cirsium arvense*, constatându-se că în cazul speciei analizate, procentele se încadrează în limitele prevăzute de Farmacopee (de 10-13% pentru conținutul de apă și mai mic de 5% pentru cenușa brută). Subcapitolul 4.2 include evaluarea prin spectroscopiei în infraroșu a principalelor grupe funcționale din extracte.

În subcapitolul 4.3. concentrația metalelor în probele de *Cirsium arvense* a fost determinată prin spectrometria de absorbție atomică cu flacăra și cuptor de grafit. Elementele Ca, Cr, Ni, Fe, Mn, Zn și Pb au fost găsite a fi prezente în diferite organe ale plantei în proporții variate. Deviația relativă standard pentru toate concentrațiile metalelor măsurate a fost de sub 10%. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu datele raportate în literatură.

În subcapitolul 4.4. au fost extrase principiile active prin metoda de extracție continuă Soxhlet cu ajutorul a doi solvenți de polarități diferite: eterul etilic și alcoolul etilic. Această metodă de extracție s-a dovedit a fi eficientă, obținându-se randamente bune de extracție.

Cel mai mare procent de compuși extractibili în alcool l-au avut frunzele speciei (12,9%), urmate de rădăcinile speciei (10,06%). În ceea ce privește compușii extractibili din soluția eterică, tot frunzele speciei sunt mai bogate în astfel de principii active (7,54%), urmate tot de rădăcinile speciei (4,96%).

În subcapitolul 4.5. s-a realizat analiza chimică calitativă a frunzelor, tulpinilor și rădăcinilor acestei specii, în urma căreia s-a constatat prezența unor grupe de principii active de tipul fitosterolilor, terpenoidelor, flavonoidelor, taninurilor catehice.

## **CAPITOLUL 5. ANALIZA METABOLIȚILOR SECUNDARI DIN SPECIA *CIRSIIUM ARVENSE* PRIN GC-MS ȘI HPLC**

Capitolul 5 prezintă analiza unor metaboliți secundari din specia *Cirsium arvense* prin tehnici moderne de analiză cuplate (gaz-cromatografie cuplată cu spectrometria de masă) sau necuplate (cromatografia de lichide de înaltă performanță).

Analiza prin GC-MS (subcapitolul 5.1) a evidențiat în profilul chimic al speciei investigate prezența a trei fitosteroli cu proprietăți curative extrem de semnificative precum scăderea colesterolului din sânge, prevenirea bolilor cardiace, prevenirea formării radicalilor liberi în organism.

Prin analiza HPLC (subcapitolul 5.2) au fost găsiți în această specie doisprezece polifenoli: trei acizi polifenolici derivați de la acidul hidroxicinamic, opt flavonoide și un compus aparținând clasei taninurilor catehice (catechina). Toți compușii prezenți sunt metaboliți secundari extrem de studiați pentru proprietățile lor remarcabile avute asupra sănătății omului.

Metoda propusă s-a dovedit a fi selectivă, picurile analiților fiind bine separate, fără interferențe semnificative cauzate de compuși endogeni. Totodată timpul de analiză este destul de redus, de până la 30 de minute, reușindu-se pe acest interval separarea simultană a treisprezece compuși distincți.

## **CAPITOLUL 6. DETERMINAREA CONȚINUTULUI TOTAL DE POLIFENOLI A TOTALULUI FLAVONOIDIC ȘI A SUBSTANȚELOR OXIDABILE PRIN METODE SPECTROFOTOMETRICE**

În studiul efectuat în capitolul șase, cercetarile s-au axat pe o valorificare a speciei *Cirsium Arvense*, procedându-se la evaluarea totalului polifenolic, totalului flavonoidic și al substanțelor oxidabile a părților aeriene și subterane provenite de la specia investigată. Dintre cele trei probe, frunzele speciei *Cirsium Arvense* au cel mai ridicat conținut polifenolic (42.07 mg/100 mL în alcool 30%, 52.83 mg/100 mL în alcool 50% și respectiv 47.35 mg/100 mL în alcool 70%) și totodată și cel mai mare conținut flavonoidic (34.22 mg/100 mL în alcool 50% și respectiv 32.36 mg/100 mL în alcool 70%). După frunzele speciei, cel mai ridicat conținut polifenolic și respectiv flavonoidic îl au rădăcinile de *Cirsium arvense*, urmate de tulpini.

Se poate concluziona că pentru utilizarea în scopuri medicinale a tincturilor din această specie, etanolul 50-70% poate fi folosit pentru a sigura tincturii conținut cât mai bogat în principii active antioxidante (polifenoli și respective flavonoide). Dintre mixturile hidroetanolicе de concentrații diferite (70°C , 50°C , 30°C) s-a constatat că extractul în etanol 50°C este cel mai bogat în polifenoli, în timp ce extractul etanolic cu concentrația 70°C s-a dovedit a fi cel mai bogat în flavonoide.

## **CAPITOLUL 7. ANALIZA FITOTOXICITĂȚII SPECIEI *CIRSIIUM ARVENSE* PRIN TESTUL *TRITICUM***

Pentru analiza fitotoxicității extractelor obținute de la *Cirsium Arvense* a fost ales testul *Triticum*. Extractele au arătat la concentrații scăzute un efect stimulator deosebit, radicele principale a cariopselor tratate cu extract de concentrație 0,25-0,5% depășind în elongație pe cea a cariopselor tratate cu apă distilată, din proba martor. Astfel, extractul 0,25% obținut din rădăcinile speciei *Cirsium Arvense* a stimulat creșterea rădăcinii principale cu 18%, în timp ce extractul 0,25% din tulpini a stimulat creșterea rădăcinii principale cu 13%. La concentrații mai ridicate, de 1-2%, efectul este invers, inhibitor, cea mai mare inhibiție, de 87%, obținându-se pentru extractul 2% din frunzele speciei.

## **CAPITOLUL 8. PREPARAREA ȘI CARACTERIZAREA UNOR TINCTURI DIN SPECIA *CIRSIIUM ARVENSE***

În ultimul capitol au fost evaluate tincturile obținute de la această specie, acestea fiind caracterizate din punct de vedere organoleptic, determinându-se indicii de refracție, densitatea relativă și conținutul total de metale grele. Conform rezultatelor obținute, tincturile se încadrează în normele prevăzute de farmacopee.

În teză sunt incluse o serie de **contribuții cu caracter de originalitate**:

- analiza macro și microscopică a caracteristicilor anatomice ale speciei *Cirsium Arvense* din flora spontană a țării noastre;

- a fost realizat profilul anorganic al speciei, determinându-se nivelul de Mo, Pb, Zn, Ni, Ca, Cr și Fe prin spectrometrie de absorbție atomică cu cuptor de grafit;

- prin GC-MS și HPLC au fost determinați o serie de metaboliți secundari aparținând claselor fitosteroli, polifenoli și taninuri catehice.

Specia *Cirsium Arvense* merită o atenție deosebită din partea cercetătorilor datorită abundenței acesteia în flora spontană, și așa cum au arătat analizele efectuate în cadrul acestei teze, datorită diversității metaboliților secundari din compoziția acestei specii, aceasta putându-se dovedi o sursă nelimitată de compuși care să fie ulterior utilizați în industria farmaceutică.

#### **Perspective viitoare de cercetare:**

Deoarece la ora actuală materia primă este furnizată de materialul vegetal recoltat din flora spontană, în cazul utilizării controlate a materialului vegetal, ar trebui să se treacă la cultura convențională pe care se vor face studii de specialitate, în acest caz potențialul biosintetic fiind influențat de condițiile pedoclimatice din arealul de prelevare a plantelor.

\*\*\*\*\*

Teza de doctorat cuprinde 8 capitole, 55 figuri și 17 tabele.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- <sup>1</sup> **Radu M.**, Chirigiu L., Bubulică M.V., Biomedical compounds identified in *Cirsium arvense* by GC-MS; *Analele Universității din Craiova Seria- Biologie, Horticultură, Tehnologia Prelucrării Produselor Agricole, Ingineria Mediului*; 2012; XVII (LIII): 811-814;
- <sup>2</sup> Panda S., Jafri M., Kar A., Meheta B.K. Tzroid inhibitorz, antiperoxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Butea monosperma*. *Fitoterapia*, 80:123-126, 2009.
- <sup>3</sup> **Radu M.**, Popescu M.R, Chirigiu L., Averis M.L., Bubulică M.V. Analysis of secondary metabolites from the *Cirsium Arvense* species by FT-IR and HPLC, *Current Health Sciences Journal*, 39(15):30-34, 2013.
- <sup>4</sup> Butnaru C, Mircea C, Aprotosoai AC, Butnaru E, Lazăr MI, Determinarea polifenolilor totali și flavonoidelor din unele plante din familia Solanaceae, *Rev Med Chir Soc Med Nat Iași*, 2007, 111(2, supl 2): 108-111.
- <sup>5</sup> Ibtissem B., Abdelly C., Sfar S., Antioxidant and Antibacterial Properties of *Mesembryanthemum crystallinum* and *Carpobrotus edulis* Extracts, *Advances in Chemical Engineering and Science*, 2012, Vol. 2 No. 3:359-365.
- <sup>6</sup> Samanta S.K., Bhattacharya K., Mandal C., Chandra Pal B., 2010 - Identification and quantification of the active component quercetin 3-O-rutinoside from *Barringtonia racemosa*, targets mitochondrial apoptotic pathway in acute lymphoblastic leukemia, *Journal of Asian Natural Products Research*, vol. 12, 639 – 648.
- <sup>7</sup> Calabresi P., Chabner B.A. *Chemotherapy of neoplastic diseases*. Goodman & Gilman`s-The pharmacological basis of therapeutics, Ed Joel G Hardman, Lee E. Limbird Tenth Edition, International Edition. 2001;1381-1460.
- <sup>8</sup> Yu L, Zhao M, Wang JS, Cui C, Yang B, Jiang Y, Zhao Q. Antioxidant, immunomodulatory and anti-breast cancer activities of phenolic extract from pine (*Pinus massoniana* Lamb) bark. *Inno Food Sci Emer Technol* 2008; 9: 122-128.



- <sup>9</sup> Waterhouse, A.L., 2001. Determination of Total Phenolics, in Current Protocols in Food Analytical Chemistry, Wrolstad, R.E., Wiley
- <sup>10</sup> Chang C., Yang H., Chern J., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, Journal of Food and Drug Analysis, 10 (3): 178-182.
- <sup>11</sup> L. Johansson, P. Johansson, H. Millerpodraza, *Analytical Biochemistry*, 1999, 267 (1), p. 239 – 241.
- <sup>12</sup> Popovici Iuliana, Lupuleasa D. : *Tehnologie farmaceutică*, vol. I, Ed. Polirom, Iași, 1997, 359–389.
- <sup>13</sup> Ionescu-Stoian P., Savopol E. : *Extracte farmaceutice vegetale*, Ed. Medicală, București, 1977, 85–87, 115–121, 441–442.
- <sup>14</sup> xxx - European Pharmacopoeia, 5 th edition, Council of Europe, Strassbourg, 2006
- <sup>15</sup> Istudor V. - Farmacognozie, Fitochimie, Fitoterapie, Editura Medicală, București, 1998, vol.1, p. 145 – 170.
- <sup>16</sup> Ciulei I., Istudor V., Palade M., Niculete E., Gîrd C. - Analiza farmacognostică și fitochimică a produselor vegetale, vol. II, Company Tehnoplast SRL, București, 1995.
- <sup>17</sup> Bucur L., Arcuș M., Popescu A., Vameșu S., Istudor V. - Pharmacobotanical characterisation of *Elaeagnus*
- <sup>18</sup> J. A. Adamovics, Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, Marcel Dekker, New York, 1990.
- <sup>19</sup> C. Jimenez, R. Ventura, and J. Segura, J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 767(2), 341 (2002).
- <sup>20</sup> Fowlis I.A. Gas-Chromatography Analytical Chemistry by Open Learning, Ed. John Wiley and Sons, Chichester, England, 1995.
- <sup>21</sup> I.W.Wainer, Drug stereochemistry, in I.W.Wainer (ed.), Analytical Methods and Pharmacology, 2nd edition, Marcel Dekker, New York, 1993.

<sup>22</sup> J. C. Giddings and R. A. Keller (eds.) *Advances in Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 1974, pp. 99–172.

<sup>23</sup> Lee, K. H. Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads. *J. Nat. Prod.*, 2004, 67: 273–283.