

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. GÎRD CERASELA ELENA**

**Student-doctorand:
LUȚĂ EMANUELA ALICE**

**ANUL
2022**

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE**

***STUDIUL FITOSOCIOLOGIC ȘI IMPLICAȚIILE
ACESTUIA ASUPRA BIOSINTEZEI COMPUȘILOR
BIOLOGIC ACTIVI DIN DIFERITE SPECII
MEDICINALE***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. GÎRD CERASELA ELENA**

**Student-doctorand:
LUȚĂ EMANUELA-ALICE**

**ANUL
2022**

CUPRINS

Lista cu lucrările științifice.....	5
LISTA ABREVIERI.....	7
INTRODUCERE.....	8
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	11
1. DATE TEORETICE PRIVIND FITOSOCIOLOGIA.....	11
1.1. Noțiunea de fitosociologie.....	11
1.2. Istoric. Școli de fitosociologie.....	12
1.3. Tipuri de specii vegetale.....	15
2. FITOSOCIOLOGIE CERCETĂRI ȘI STUDII ANTERIOARE.....	20
2.1. Studii fitosociologice pe specii de leguminoase.....	20
2.2. Studii fitosociologice pe specii de copaci.....	22
2.3. Studii fitosociologice pe specii de buruieni.....	24
2.4. Studii fitosociologice pe o comunitate vegetală.....	27
2.5. Studii fitosociologice pe specii de plante parazite.....	32
3. ASPECTE GENERALE DESPRE SPECIILE MEDICINALE UTILIZATE ÎN STUDIUL.....	35
3.1. <i>Mentha x piperita</i> L.	35
3.2. <i>Melissa officinalis</i> L.	36
3.3. <i>Thymus vulgaris</i> L.	36
3.4. <i>Calendula officinalis</i> L.	37
3.5. <i>Matricaria chamomilla</i> L.	38
3.6. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	38
3.7. <i>Hypericum perforatum</i> L.	39
3.8. <i>Achillea millefolium</i> L.	40
PARTEA EXPERIMENTALĂ	
4. STUDIUL FITOSOCIOLOGIC EXPERIMENTAL.....	41
4.1. Proiectarea studiului.....	41
4.2. Realizarea unor proceduri tehnologic-agricole asupra solului și replantarea răsadului în spațiul amenajat.....	42
4.3. Urmărirea evoluției culturii pe perioada derulării cercetării științifice – 2018-2021...44	
5. MODIFICĂRI ANATOMICE ȘI MORFOLOGICE OBSERVATE LA PRODUSELE VEGETALE PROVENITE DIN LOTURILE FITOSOCIOLOGICE.....	83
6. CERCETĂRI FITOCHIMICE ASUPRA LOTURILOR FITOSOCIOLOGICE LUATE ÎN STUDIUL.....	96
6.1. Determinări spectrofotometrice	96
6.1.1. Dozarea conținutului de Flavone	96
6.1.2. Dozarea AFC-urilor	103
6.1.3. Dozarea Polifenolilor totali	110
6.2. Cercetări fitochimice asupra capacității de migrare a principiilor active din <i>Menthae folium</i> într-un interval de 28 ore	116
6.3. Influența biostimulatorilor asupra conținutului în principii active la lotul <i>Menthae- Melissae folium</i>	121

6.3.1. Analiza compoziției solului de control	122
6.3.2. Analiza compoziției solului fertilizat	123
6.3.3. Analiza compoziției oligoelementelor din culturile cultivate atât în sol martor, chimic, cât și ecologic	124
6.3.4. Dozarea principiilor active a celor două specii de plante crescute în sol chimic, cât și ecologic și compararea cu loturile crescute în solul control.....	125
7. OBȚINEREA EXTRACTELOR VEGETALE ȘI DETERMINAREA CALITĂȚII ACESTORA	126
7.1. Obținerea extractelor prin metoda liofilizării.....	126
7.2. Determinarea conținutului în polifenoli.....	127
7.2.1. Dozarea Flavonelor din extractele uscate.....	127
7.2.2. Dozarea AFC-urilor din extractele uscate.....	128
7.2.3. Dozarea Polifenolilor totali din extractele uscate.....	129
7.3. Identificarea și cuantificarea compușilor polifenolici prin cromatografie lichidă de ultra-înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă (UHPLC-MS)	131
7.4. Identificarea compușilor polifenolici prin metoda FT-ICR MS (spectrometru de masă de înaltă rezoluție de tip Fourier –Transform Ion – Cyclotron – Resonance dotat și cu spectru de masă)	145
7.5. Identificarea acizilor triterpenici prin metoda UHPLC MS și FT-ICR MS (ESI+ și ESI -)	158
8. DETERMINAREA ACȚIUNII ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> ȘI <i>IN SILICO</i>	171
8.1. Determinarea acțiunii antioxidante <i>in vitro</i>	171
8.1.1. Capacitatea de scavenger asupra radicalului DPPH.....	171
8.1.2. Capacitatea de scavenger asupra radicalului ABTS ^{•+}	174
8.1.3. Determinarea capacității de reducere a fierului (metoda FRAP).....	176
8.1.4. Rezultate și discuții.....	178
8.2. Studii <i>in silico</i>	190
CONCLUZII GENERALE. ORIGINALITATEA CERCETĂRILOR PERSPECTIVE DE CERCETARE.....	198
Bibliografie.....	201
Anexe.....	221

Lista cu lucrările științifice publicate

Articole publicate în reviste cotate ISI

1. **Emanuela Alice Luță**, Manuela Ghica, Teodora Costea, Cerasela Elena Gîrd. Phytosociological study and its influence on the biosynthesis of active compounds of two medicinal plants *Mentha piperita* L. and *Melissa officinalis* L. (2020). *Farmacia*, 68(5) 919-924, revistă indexată ISI, cu factor de impact **1.433**, ISSN: **2065-0019** (for the On-Line Edition) and **0014-8237** (for the Printed Edition)

link: <https://doi.org/10.31925/farmacia.2020.5.20>

2. **Emanuela Alice Luță**, Manuela Ghica, Cerasela Elena Gîrd. The Initiation of a Phytosociological Study on Certain Types of Medicinal Plants (2022). *Agriculture*, 12(2), 283, revistă indexată ISI, cu factor de impact **3.408**, ISSN: **2077-0472**

link: <https://doi.org/10.3390/agriculture12020283>

Lucrări comunicate la manifestări naționale cu publicarea în volum de rezumate

1. **Emanuela Alice Luță** *, Teodora Costea, Ligia Elena Duțu, Cerasela Elena Gîrd. Studiu Fitosociologic Influența Asupra Conținutului De Principii Active (2021). *Simpozion Aniversar Etnofarmacologia românească la 20 de ani Șirnea*, 17-20 iunie, rezumat rezumat publicat în Book of Abstracts – Romanian Ethnopharmacology On Its 20th Anniversary, Volumul 20, 2021, ISSN 1844-6604, ISSN-L 1844-6604 (Societatea Română de Etnofarmacologie)

2. **Emanuela Alice Luță**, Teodora Deculescu-Ioniță, Cerasela Elena Gîrd. Phytosociology. Case study (2021). *Congresul Universității de Medicină și Farmacie “Carol Davila”, din București, ediția a IX a, desfășurat online în perioada 25-27 noiembrie*, cu participare în cadrul Sesiunii Tânărului Cercetător

3. **Emanuela Alice Luță**, Cerasela Elena Gîrd. Phytosociological observations regarding some crops of *Thymus vulgaris* L. and *Calendula officinalis* (2021). *Symposium with International Participation “Alternative And Complementary Therapies (Homeopathy / Phytotherapy)” 4th Edition*, 26-27 martie, rezumat publicat în Book of abstracts, Volume 4, 2021, ISSN 2601-1476, SSNL 2601-1476

4. **Emanuela Alice Luță**, Cerasela Elena Gîrd. Introduction In a Phytosociology - Study Note I. Comparative Analysis Of *Rosmarinus Officinalis* L. And *Matricaria Chamomilla* L. Growth In Common Lots (2021). *Congresul Național de Farmacie Ediția a-XVIII a, Farmacia: De La Inovare la Bună Practică Farmaceutică, București*, 15-17 septembrie, rezumat publicat în Cartea de rezumate, Volumul 18, 2021, ISBN 978-606-10-2144-4 (Universitatea din Oradea - Facultatea de Medicină și Farmacie Oradea, Editura Universității din Oradea)

LISTA ABREVIERI

ABTS = acid benzotiazolin sulfonic	ML Bio – melisă lot îmbogățit cu îngrășământ Bio
AFC = acizi fenolcarboxilici	ML NPK – melisă lot îmbogățit cu îngrășământ NPK
BA = acid betulinic	MLF = melisă lot fitosociologic
CAF = acid cafeic	MLM = melisă lot martor
CF = cimbru lot fitosociologic	MM = mentă lot martor
CHL = acid clorhidric	MS = spectrometru de masă
CM = cimbru lot martor	MUF = mușețel lot martor
CODF = codița șoricelului lot fitosociologic	MUM = mușețel lot martor
CODM = codița șoricelului lot martor	OA = acid oleanolic
COU = acid p-cumaric	p.a. = principiu activ
DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidrazil	PRO = acid protocatecuic
ESI +/- = ionizare pozitivă/negativă	QUE = quercetin
F = găsit, necuantificabil	Res. Cond. = determinarea conductivității electrice
FER = acid ferulic	RF = rozmarin lot fitosociologic
FRAP = metoda de reducere a fierului	RM = rozmarin lot martor
GF = gălbenele lot fitosociologic	ROS = acid rozmarinic
GM = gălbenele lot martor	RUT = rutozida
HUM = humus	SF = sunătoare lot fitosociologic
ISO = isoquercitrină	SI = indice de asemănare
KAE = kaempferol	SIRT = sirtuină
LUT = luteolina	SM = sunătoare lot martor
M = lipsește	TFL = total conținut flavone
M Bio – mentă lot îmbogățit cu îngrășământ Bio	TPAC = total conținut acizi fenolcarboxilici
M NPK – mentă lot îmbogățit cu îngrășământ NPK	TPC = conținut polifenoli totali
MF = mentă lot fitosociologic	UA = acid ursolic

INTRODUCERE

Fitosociologia este o ramură a științei vegetației care se ocupă cu comunitățile actuale de plante studiate la o mărime cuprinsă în domeniul de investigație. Principalele sale obiective sunt delimitarea și caracterizarea tipurilor de vegetație bazate pe compoziția floristică completă (specia). În analogie cu taxonomia plantelor, clasificarea fitosociologică (sintaxonomia) plasează unitățile de vegetație într-un sistem ierarhic bazat pe grade diferite de asemănare floristică.

În special în domeniul științific anglo-american, valoarea unei tipologii a comunităților de plante a fost fundamental pusă la îndoială la un moment dat, pe baza unui concept de comunitate individualistă.

Retrospectiv, este evident că doar fitosociologia a reușit să creeze clasificări cuprinzătoare și aplicate pe scară largă ale vegetației, tipuri pentru zone spațiale mai mari, în timp ce toate celelalte abordări au rămas regionale sau au încetat să mai existe.

Primii cercetători, conștienți de existența grupărilor de plante, nu apărute întâmplător, ci cu o anumită constanță a caracterelor și a fizionomiei, au încercat să le delimiteze ca și areal, să le descrie pe baza caracteristicilor de mediu care se repetă la reproducerea grupărilor în sine, dependent de condițiile pedoclimatice dar și de factorii endogeni implicați în perpetuarea speciilor.

În zilele noastre, fitosociologia este metoda principală utilizată în întreaga Europă, se aplică și în nordul Asiei și în diferite regiuni din Africa și America Latină. În timp ce aplicația sa în America de Nord a rămas limitată, relativ recent a fost lansată Clasificarea Națională a Vegetației (USNVC-US National Vegetation Classification), care recunoaște importanța sistemelor de clasificare ierarhice consistente și adoptă idei ale abordării Braun-Blanquet într-o terminologie modificată.

În timp ce fitosociologii tradiționali au crezut că se poate reprezenta un ansamblu întreg (porțiuni) de vegetație cu o singură relevanță „tipică”, fitosociologia actuală este văzută ca o abordare statistică care urmărește caracterizarea tipurilor de vegetație prin informațiile combinate din mai multe parcele diferite.

Prin urmare, este, în general, mai bine să eșantionăm mai multe parcele mai mici decât mai puține parcele mai mari. Strategiile de eșantionare vizează în mod normal acoperirea variabilității complete a vegetației în limitele geografice și ecologice definite ale unui studiu, minimizând în același timp eterogenitatea în cadrul parcelei.

În trecut, fitosociologii credeau că se poate determina o „zonă minimă” pentru fiecare tip de vegetație peste care numărul speciilor nu va crește în continuare. Eșantionarea vegetației pe

parcele corespunzătoare sau mai mari decât suprafața minimă specifică ar produce rezultate comparabile, indiferent de dimensiunile diferite ale zonei studiate.

Conform cunoștințelor empirice și teoretice moderne, totuși, bogăția medie a speciilor crește monoton cu suprafața, iar o zonă minimă este o deziluzie cauzată de natura neliniară a relațiilor specie-zonă. Deoarece majoritatea abordărilor pentru clasificarea vegetației sunt sensibile la diferite dimensiuni ale parcelei, recomandarea este să se aplice dimensiuni uniforme ale parcelei în formațiuni delimitate structural [1].

Aplicațiile majore ale fitosociologiei sunt:

- evaluarea ecologică (de exemplu, valorile indicatorilor Ellenberg, instrument util pentru a delimita relația dintre plante și mediu, recunoscând fiecărei specii un rol funcțional ca indicator biologic);
- maparea vegetației;
- monitorizarea schimbărilor de mediu.

Utilitatea filogeniei moleculare și a filogenomiei în predicția chemodiversității și bioprospectării este evidențiată în contextul descoperirii și dezvoltării medicamentului natural pe bază de produs vegetal sau de extract.



Justificarea alegerii temei de cercetare s-a bazat pe potențiala înnobilare în compuși activi biologic a unor specii de plante medicinale cultivate în loturi comune, versus loturile singulare, cât și generarea unei producții de masă vegetală mult mai mare. Potențial ca biosinteza anumitor clase de metaboliți secundari să conducă la noi tipuri de efecte terapeutice încă neevidențiate.

Impactul preconizat asupra dezvoltării cunoașterii în domeniu:

- 🌱 se poate genera o masă mai mare de materie primă vegetală industriei producătoare de suplimente sau fitomedicamente;
- 🌱 se pot genera materii prime vegetale înnobilate în principii active.

Ipoteza de lucru a acestei cercetări a plecat de la următorul fundament:

- două plante medicinale ce coexistă în același sol, având aproximativ aceleași principii active, dar făcând parte din specii sau familii diferite, se pot influența reciproc;
- acestea își pot modifica în sens pozitiv conținutul în principiile active, cu influențe directe asupra valorilor terapeutice.

Obiectivele cercetării au fost:

- ✓ selectarea unor plante medicinale care pot fi cultivate în loturi comune, specii care pot aparține aceleiași tip de familie sau pot proveni din familii botanice diferite;
- ✓ stabilirea parametrilor agro-tehnici de înființare a respectivelor culturi;
- ✓ monitorizarea culturilor pe o perioadă de 4 ani;
- ✓ stabilirea caracterelor morfologice pentru anumite tipuri de organe vegetale provenite de la speciile incluse în acest studiu fitosociologic extins;
- ✓ determinarea conținutului în principii active al produselor vegetale recunoscute pentru asocierea în fitoterapie cu punctarea diferențelor între loturile fitosociologice și cele de referință;
- ✓ evaluarea conținutului în ulei volatil pentru unele speciile aromatice;
- ✓ determinarea acțiunii antioxidante și evidențierea efectului antiradicalar, corelat cu conținutul în metaboliți secundari și în special în polifenoli;
- ✓ urmărirea cursului ascendent-descendent al concentrației principiilor active la o specie de plante medicinale în sensul: frunze bazale > frunze mijloc > frunze vârf și invers, pe parcursul a 28 de ore;
- ✓ determinarea producției de masă și urmărirea dezvoltării pe orizontală și verticală a plantelor medicinale din loturile luate în studiu;
- ✓ studiu comparativ al dezvoltării paralele a unui lot de plante amplasat într-un sol îmbogățit cu îngrășământ bio versus îngrășământ sintetic;
- ✓ diseminarea rezultatelor în reviste din fluxul științific internațional, precum și comunicarea la diferite sesiuni de profil.

Menționez, că toate plantele medicinale din loturile fitosociologice au fost comparate cu plante martor, ce au fost supuse aceleiași monitorizări (umiditate, soare, temperatură, pH sol, etc.).

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. DATE TEORETICE PRIVIND FITOSOCIOLOGIA

Fitosociologia sau fitocenologia este un subgrup al științei vegetației care se ocupă cu studiul comunităților de plante existente și pune un accent deosebit pe clasificarea structurii acestora și a repartiției lor geografice [2].

Dacă ar fi să sintetizăm datele de literatură până în acest moment, din punct de vedere al cronologiei, fitosociologia a cunoscut în evoluție, trei perioade distincte [3] și anume:



Perioada **1400-1921**



Perioada **1921-2000**



Perioada **2000....**

☼ Linné distinge majoritatea taxonilor vegetali de rang specie, creează nomenclatura binară și clasifică speciile respective în taxonii de rang superior: familie, clasă, ordin.

☼ Studiile floristice devin principalul interes al activității de cercetare.

☼ Speciile sunt revizuite, numele sunt schimbate și sunt descoperite noi specii descrise de diferiți taxonomiști.

☼ Braun-Blanquet înființează școala franceză și oferă bazele sociologiei plantelor (fitosociologiei).

Școala rusă este fondată de Bîkov și Soceava.

☼ Borza și Boșcaiu fac o analiză critică a principiilor celor două școli din România adoptând într-o proporție destul de mare principiile școlii franceze.

☼ Cercetările floristice continuă la scală globală și națională.

☼ Se încearcă găsirea unei relații între structura vegetației și biomasa vegetală.

☼ Studiile punctiforme încep să recapete interesul cercetătorilor, acestea examinând relația dintre indivizii unei specii vegetale și polenizatori, de exemplu.

☼ Este examinată concurența între indivizii a două specii vegetale.

☼ Se reduc ca număr studiile referitoare la comunitatea vegetală în ansamblu în interrelație cu factorii de comandă.

☼ Reîncep reviziile la specii.

☼ Unitatea sintaxonomică specifică habitatului respectiv este utilizată pentru definirea diferitelor tipuri de habitate.

2. FITOSOCIOLOGIE. CERCETĂRI ȘI STUDII ANTERIOARE

Studii fitosociologice pe specii de leguminoase. În anul 2016 a fost realizat un studiu prin care s-a evaluat efectul asupra dinamicii buruienilor și a randamentului boabelor de fasole în urma aplicării de erbicide cu ajutorul pulverizatorului Heightson printr-un experiment de teren. A fost utilizat un design factorial $3 \times 4 + 1$, cuprinzând o combinație de trei erbicide (fomesafen, fluazifop-p-butil și un amestec de ambele) cu patru înălțimi diferite de pulverizare (0.20; 0.30; 0.40; 0.50 m deasupra țintei) și unul de control (fără verificarea buruienilor) [4].

Studii fitosociologice pe specii de copaci. O lucrare publicată în 2017 prezintă un studiu fitosociologic despre comunitatea de copaci dintr-o pădure montană inferioară situată pe Muntele Batulanteh, Sumbawa, Indonezia [5]. Deși pădurile din Indonezia sunt cunoscute la nivel mondial pentru diversitatea lor mare de specii, multe regiuni rămân puțin cunoscute [6,7,8]. Au fost alese parcele de 1.800 m² fiecare, două din pădurile secundare și una dintr-o pădure primară defrișată. Fiecare parcelă a fost împărțită în continuare în 18 patrate de 100 m² (10m × 10m) fiecare. Diviziunea 1 a fost luată în studiu pe un sol argilos, iar Diviziunea 3 pe un sol negru friabil, fiind localizate în pădurile secundare. Diviziunea 2 situată tot pe sol negru friabil era localizată într-o pădure primară afectată. Fiecare parcela a fost așezată pe o zonă mai mult sau mai puțin plană, înclinată ușor. Prin acest studiu s-au realizat măsuri cantitative de compoziție și structură floristică și a fost estimată și stocarea de carbon [9].

Studii fitosociologice pe specii de buruieni. În 2018 a fost publicată o lucrare științifică prin care s-a realizat un sondaj fitosociologic al comunității buruienilor în două tipuri de sisteme de

legume: ecologice (management cu produse naturale) și convenționale (management cu produse sintetice) în statul Alagoas, Brazilia [10].

Studii fitosociologice pe o comunitate vegetală. O lucrare din 2019 publicată de Ilie Silvestru Nuță și Mariana Niculescu, prezintă noi descoperiri fitosociologice și ecologice privind distribuția comunității vegetale formate din *Myricaria germanica* L. (fals tamarisk) și specii de salcie - *Salix purpurea* L. în Valea Lotrului (Munții Carpați) [11].

Studii fitosociologice pe specii de plante parazite. Un alt studiu publicat în 2019 prezintă fitosociologia și câteva atribuții ecologice ale florei care infestază cerealele din Tehsil Charsadda, provincia Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. Pentru realizarea acestei lucrări, Fawad Ali împreună cu restul echipei a efectuat o anchetă pe teren prin metoda Cuadratelor (metodă prin care se studiază frecvența unei populații) în lunile martie și aprilie 2013 [12].

3. ASPECTE GENERALE DESPRE SPECIILE MEDICINALE UTILIZATE ÎN STUDIU

Cercetarea științifică a pornit cu alegerea unui material vegetal de interes fitoterapeutic. În culturi s-au asociat specii care aparțin aceleiași familii (*Mentha x piperita* L. și *Melissa officinalis* L.) dar și diferite (*Calendula officinalis* L. și *Thymus vulgaris* L.; *Hypericum perforatum* L. și *Melissa officinalis* L., etc.). Pentru fiecare specie vegetală am redat sintetic câteva aspecte referitoare la importanța terapeutică. Menționez că toate fotografiile cu speciile medicinale prezentat în acest capitol sunt originale.

PARTEA EXPERIMENTALĂ

4. STUDIUL FITOSOCIOLOGIC EXPERIMENTAL

Etapele cercetării. În acest studiu fitosociologic au fost selectate materiale prime vegetale cu principii active silimare, dar făcând parte din specii sau familii diferite. Pentru realizarea cercetării științifice a fost necesară întocmirea unui plan structurat în etape derulat pe parcursul câtorva ani, cuprinzând atât parte practică, cât și teoretică.

Proiectarea studiului. Cercetarea a debutat cu amenajarea unui spațiu destinat plantării diferitelor specii medicinale. Înainte de realizarea acestui prim pas, au fost confecționate indicatoare din lemn, vopsite în alb, cu denumirea științifică și populară a tuturor materiilor prime vegetale. Experimentul științific s-a desfășurat în zona suburbană a orașului Turnu Măgurele, județul Teleorman, România (43 44044,1600 N, 24 52053,4000 E), începând cu anul 2018. Temperatura medie anuală în Turnu Măgurele este de 11,5°C, media în lunile calde este de 23°C, iar media în lunile reci scade sub 2°C. Se caracterizează printr-un potențial caloric ridicat, amplitudini mari ale temperaturii aerului, cantități reduse de precipitații adesea în regim torențial vara, și perioade frecvente de secetă [13]. Această investigație fitosociologică a pornit

de la alegerea de materii prime vegetale cu ingrediente active aproximativ identice, dar din specii sau familii distincte. Pe baza beneficiilor terapeutice, în culturi au fost asociate următoarele categorii de plante medicinale: *Rosmarinus officinalis* L. și *Matricaria chamomilla* L. - sursă de ulei volatil; *Hypericum perforatum* L. și *Chelidonium majus* L. - asociate în afecțiuni hepatobiliare; *Mentha x piperita* L. și *Melissa officinalis* L. - plante medicinale aromatice din familia Lamiaceae; *Thymus vulgaris* L. și *Calendula officinalis* L. - asociate în afecțiuni gastrointestinale. Fiecare cultură fitosociologică a fost însoțită de martorii corespunzători [14].

Urmărirea evoluției culturii pe perioada derulării cercetării științifice – 2018-2021

În anul 2018 s-a desfășurat doar pregătirea spațiului pentru studiu și a avut loc urmărirea evoluției plantelor medicinale.

Rezultate și discuții. Exemplificăm doar cu un singur an experimental, toate rezultatele extinse se regăsesc în teză. În urma analizei macroscopice și a dezvoltării pe verticală și orizontală a tuturor loturilor fitosociologice se poate observa: extindere interesantă a lotului Mentă – Melisă dar și a lotului Gălbenele – Cimbru în momentul de dinaintea recoltării din luna iunie, la 3 luni după cultivarea răsadului. În compararea cu martorii, toate plantele din studiu s-au dezvoltat mai mult și au crescut mai înalte împreună: MF - menta din lotul fitosociologic a ajuns la o înălțime de 39 cm, față de MM - menta din lotul martor cu o înălțime de numai 23 cm, crescând împreună cu MLF - melisa din lotul fitosociologic cu o înălțime de 42 cm, față de MLM - melisa din lotul martor cu o înălțime de numai 33 cm; lotul Rosmarin – Mușețel a prezentat câteva particularități de asemenea: RF - rosmarinul din lotul fitosociologic s-a dezvoltat frumos măsurând 60 cm în comparație cu RM - rosmarinul martor, unde înălțimea lotului a fost de numai 45 cm, însă mușețelul chiar dacă a pornit promițător, s-a uscat pe parcursul celor 2 luni de studiu; diferențe s-au întâlnit și în lotul Sunătoare – Rostopască: SF- sunătoarea din lotul fitosociologic ajunge la o înălțime de 83 de cm față de martor - 68 cm ; iar ROF - rostopasca din lotul fitosociologic măsoară tot în iunie 29 cm, față de ROM - rostopasca martor cu o înălțime de numai 17 cm; cu toate că nu sunt prezente diferențe atât de evidente legate de înălțime în cele 2 luni, sunt în același timp foarte pregnante cele legate de întinderea pe orizontală în lotul Gălbenele – Cimbru. Acesta prezintă ca și restul loturilor fitosociologice, modificări față de cel martor: GF- gălbenelele din lotul fitosociologic ajung în iunie la o înălțime de 39 cm, comparativ cu GM - gălbenelele din lotul martor, unde înălțimea este de 29. În luna mai, valorile erau 32 cm, respectiv 26 cm.

Concluzii parțiale. Acest an a adus schimbări și în evoluția pe orizontală și verticală a plantelor, acestea fiind influențate direct și de diferențele pedo-climatice față de anul anterior [14].

Cantitatea de precipitații cât și proporția zilelor cu precipitații a fost mai scăzută în anul 2019, față de anul 2018, ducând și la anumite modificări în culturile luate în studiu.

5. MODIFICĂRI ANATOMICE ȘI MORFOLOGICE OBSERVATE LA PRODUSELE VEGETALE PROVENITE DIN LOTURILE FITOSOCIOLOGICE

Având în vedere rezultatele obținute anterior, dezvoltarea pe orizontală și verticală diferențiată dependent de tipul de lot fitosociologic, am decis ca cercetarea să continue cu evaluarea particularităților morfologice și anatomice a produselor vegetale recoltate de la materiile vegetale care fac obiectul acestui studiu. Analiza materiilor prime vegetale (flori, frunze) s-a realizat cu ajutorul unui stereomicroscop (ZEISS Stemi 508 Greenough Stereo Microscope cu 8:1 Zoom, detalii până la 50× mărire) [14,15,16].

Concluzii finale. Modificările apărute inclusiv în structura morfologică și anatomică a produselor vegetale este în corelație directă cu tipul de cultură și tipul de specie medicinală folosită în lotul fitosociologic. Este foarte evident că sunt specii medicinale care se influențează în sens pozitiv foarte bine, își diversifică prezența anumitor țesuturi anatomice, fapt care ar trebui să se concretizeze în secreția de metaboliți secundari în cantitate mai mare.

6. CERCETĂRI FITOCHIMICE ASUPRA LOTURILOR FITOSOCIOLOGICE LUATE ÎN STUDIU

În acest capitol sunt prezentate cercetările fitochimice derulate pe toate tipurile de produse vegetale recoltate din loturile fitosociologice și comparate cu probele martor. Am efectuat determinări cantitative folosind metode specifice fitochimiei, spectrotimetrice, urmând ca în capitolul următor să fie prezentate și metodele FT-ICR și UHPLC-MS. Scopul acestor determinări este de a stabili dacă există o influență în ceea ce privește biosinteza principiilor active dependentă de tipul de plante medicinale asociate în cultură. Posibil să existe loturi fitosociologice în care să observăm o influențare pozitivă, în sensul secreției unei concentrații mai mari de metaboliți secundari și de ce nu, posibil și una chiar negativă.

Concluzii finale. Pe baza studiului derulat pe parcursul anilor 2019 – 2021 am constatat:ca și în cazul flavonelor și AFC-urilor, tipul de alcool folosit în extracție este dependent de natura materiei prime vegetale, deși discutăm despre același tip de principiu activ; există o diferență netă între concentrațiile de polifenoli totali determinați în probele provenite din loturile fitosociologice comparativ cu loturile martor; dinamica conținutului de polifenoli totali este dependentă de tipul de materie primă vegetală, de condițiile pedoclimatice și de tipul de asociere în loturile fitosociologice.

Cercetări fitochimice asupra capacității de migrare a principiilor active din *Menthae folium* într-un interval de 28 ore

Pentru a evidenția capacitatea de migrare a principiilor active într-o plantă medicinală, am urmărit pentru frunzele de mentă recoltate din 3 zone diferite (frunze situate în zona bazală – fr. bază, frunze situate în zona centrală a plantei – fr. centrale și frunze situate în zona din vârf a plantei – frunze vârf), migrarea principiilor active bazându-ne pe dozarea spectrofotometrică a flavonelor, AFC – urilor și polifenolilor totali [17]. Metodologia de lucru aplicată a fost identică cu cea descrisă la analiza diferitelor tipuri de loturi.

Influența biostimulatorilor asupra conținutului în principii active la lotul *Menthae-Melissae folium*

În acest subcapitol am urmărit influența unui fertilizant chimic (NPK) și a unui fertilizant ecologic (BIO) asupra biosintezei de principii active în lotul Mentă – Melisă. Cercetarea a vizat analiza solului și analiza materiilor prime vegetale.

Concluzie finală. Deși speciile medicinale provenite din solul fertilizat chimic sunt mai dezvoltate, acest fapt nu a dus la o concentrație mai mare de principii active.

7. OBȚINEREA EXTRACTELOR VEGETALE ȘI DETERMINAREA CALITĂȚII ACESTORA

Acest capitol cuprinde cercetările fitochimice realizate pe toate extractele uscate obținute din produsele vegetale recoltate din loturile fitosociologice și analizate comparativ cu loturile de control.

Concluzii parțiale. Rezultatele obținute pe extractele vegetale erau previzibile, comportamentul este asemănător cu cel al materiilor prime vegetale din care acestea s-au obținut. Diferențele semnificativ mari între diferitele tipuri de produse vegetale arată relația de cauzalitate care s-a stabilit între plantele medicinale crescute în lotul fitosociologic, fapt care confirmă influențele pozitive dintre acestea. Desigur sunt și mici excepții, cimbrul în lot cu gălbenelele, unde există o influență negativă în biosinteza anumitor tipuri de principii active.

Identificarea și cuantificarea compușilor polifenolici prin cromatografie lichidă de ultra-înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă (UHPLC-MS)

După stabilirea metodei de analiză și evaluarea cromatogramelor pentru compușii standard față de care s-a făcut raportarea, au fost injectate și soluțiile obținute din extractele uscate provenite de la toate speciile medicinale cultivate în anul 2021. În tabelul VII.1 se observă toți compușii polifenolici determinați atât în loturile fitosociologice, cât și în martori.

Tabelul VII.1. Concentrațiile de polifenoli din extractele vegetale (μg compus/g extract)

Nr. Probă	Nume Probă	PRO [µg/g]	RUT [µg/g]	CAF [µg/g]	CHL [µg/g]	LUT [µg/g]	KAE [µg/g]	ROS [µg/g]	QUE [µg/g]	ISO [µg/g]	FER [µg/g]	COU [µg/g]
1	Mentă Lot (MML)	48.62	68.00	345.45	75.42	87.03	0.94	51.027	116.38	170.67	M	20.78
2	Melisă Lot (MML)	98.54	205.82	1296.55	397.91	547.50	3.13	64.317	76.84	270.91	M	54.64
3	Mentă Martor (MML)	57.13	27.36	321.44	56.09	99.68	M	43.950	5.93	176.48	M	28.81
4	Melisă Martor (MML)	78.82	28.74	84.15	73.99	121.19	1.22	48.591	4.62	170.67	M	10.32
5	Rosmarin Lot (RC)	39.44	M	357.74	68.02	53.35	2.48	33.204	19.79	167.29	M	39.83
6	Cimbru Lot (RC)	47.58	11.78	684.23	46.34	341.92	2.31	35.947	20.06	151.54	M	8.02
7	Rosmarin Martor (RC)	16.82	M	524.43	21.51	87.17	4.93	34.681	M	143.86	M	61.68
8	Cimbru Martor (RC)	32.74	12.73	356.00	23.87	29.28	1.49	27.485	18.93	85.78	M	5.17
9	Sunătoare Lot (SM)	250.40	4278.16	26.24	F	40.71	41.12	M	11789.84	1813.92	24.00	1.20
10	Melisă Lot (SM)	60.14	112.00	254.67	101.07	137.45	F	62.492	178.63	263.83	M	F
11	Sunătoare Martor (SM)	83.33	4205.48	21.37	F	38.77	24.30	M	7632.44	1421.70	16.46	77.91
12	Gălbenele Lot (CG)	50.02	491.32	167.98	3805.70	F	F	0.252	24.17	153.23	M	9.58
13	Cimbru Lot (CG)	62.72	8.82	713.52	23.01	433.53	F	32.162	27.76	167.05	M	16.03
14	Gălbenele Martor (CG)	61.83	396.88	139.73	4008.29	F	F	0.095	45.74	156.12	M	M
15	Muşeţel Lot (MCo)	94.22	9.60	47.65	4547.89	9.52	4.23	M	395.39	361.49	3236.80	32.40
16	Coada şoricelului Lot (MCo)	21.97	341.16	77.59	4620.89	1000.62	3.48	0.073	131.28	320.36	M	F
17	Muşeţel Martor (MCo)	113.19	17.49	92.92	3909.07	52.93	4.45	M	110.33	281.53	2410.47	32.61
18	Coada şoricelului Martor (MCo)	27.32	438.95	121.32	5541.75	1352.84	4.55	M	220.27	516.98	M	9.37

Legendă: PRO – Acid protocatecic, RUT – Rutină, CAF – Acid cafeic, CHL – Acid clorogenic, LUT – Luteolină, KAE – Kaempferol, ROS – Acid rosmarinic, QUE – Quercetină, ISO – Isoquercitrină, FER – Acid ferulic, COU – p-Cumaric acid; MML – lot fitosociologic mentă – melisă; RC – lot fitosociologic rozmarin – cimbru; SM – lot fitosociologic sunătoare – melisă; CG – lot fitosociologic cimbru – gălbenele; MCo – lot fitosociologic muşeţel – coada şoricelului; F – găsit, dar nu cuantificabil, M – lipseşte.

Concluzii parțiale. Metoda de analiză aplicată a permis identificarea compușilor polifenolici, concentrația acestora fiind dependent de natura materiei prime vegetale din care s-a obținut extractul.

Identificarea compușilor polifenolici prin metoda FT-ICR MS (spectrometru de masă de înaltă rezoluție de tip Fourier – Transform Ion – Cyclotron – Resonance dotat și cu spectru de masă)

S-au utilizat două metode diferite în funcție de tipul de ionizare: ionizarea ESI pozitivă (**ESI +**) și ionizarea ESI negativă (**ESI -**). Pentru a verifica și prin această metodă prezența polifenoliilor în extractele obținute din loturile fitosociologice și martorii lor am utilizat ambele ionizări, atât cea pozitivă, cât și ionizarea negativă (folosită și la UHPLC - MS), iar rezultatele sunt prezentate în tabelele VII.2. și VII.3. Ceea ce s-a obținut interesant a fost faptul că în funcție de metoda aleasă, unii compuși vor ioniza și se vor vedea în spectru, însă unii nu.

Tabelul VII.2. Identificarea prezenței polifenolilor din extractele vegetale, ESI+

Nr. Probă	Nume Probă	PRO	RUT	CAF	CHL	LUT	KAE	ROS	QUE	ISO	FER	COU
1	Mentă Lot (MML)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2	Melișă Lot (MML)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Mentă Martor (MML)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4	Melișă Martor (MML)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Rosmarin Lot (RC)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
6	Cimbru Lot (RC)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M	+
7	Rosmarin Martor (RC)	+	+	+	+	+	+	+	M	+	+	-
8	Cimbru Martor (RC)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M	+
9	Sunătoare Lot (SM)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
10	Melișă Lot (SM)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	Sunătoare Martor (SM)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
12	Gălbenele Lot (CG)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M	-
13	Cimbru Lot (CG)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M	+

Nr. Probă	Nume Probă	PRO	RUT	CAF	CHL	LUT	KAE	ROS	QUE	ISO	FER	COU
14	Gălbenele Martor (CG)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M	M
15	Mușețel Lot (MCo)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	Coada șoricelului Lot (MCo)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	F
17	Mușețel Martor (MCo)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
18	Coada șoricelului Martor (MCo)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Legendă: PRO – Acid protocatecuic, RUT – Rutozida, CAF – Acid cafeic, CHL – Acid clorogenic, LUT – Luteolină, KAE – Kaempferol, ROS – Acid rosmarinic, QUE – Quercetin, ISO – Isoquercitrină, FER – Acid ferulic, COU – p-Cumaric acid; MML – lot fitosociologic mentă – melisă; RC – lot fitosociologic rozmarin – cimbru; SM – lot fitosociologic sunătoare – melisă; CG – lot fitosociologic cimbru – gălbenele; MCo – lot fitosociologic mușețel – coada șoricelului; M – lipsește

Tabelul VII.3. Identificarea prezenței polifenolilor din extractele vegetale, ESI-

Nr. Probă	PRO	RUT	CAF	CHL	LUT	KAE	ROS	QUE	ISO	FER	COU	PRO
1	Mentă Lot (MML)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Melisă Lot (MML)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Mentă Martor (MML)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Melisă Martor (MML)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Rozmarin Lot (RC)	+	M	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Cimbru Lot (RC)	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
7	Rozmarin Martor (RC)	+	M	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	Cimbru Martor (RC)	+	+	+	-	+	+	+	+	+	M	+
9	Sunătoare Lot (SM)	+	+	+	+	+	+	M	+	+	+	+
10	Melisă Lot (SM)	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
11	Sunătoare Martor (SM)	+	+	+	+	+	+	M	+	+	+	+
12	Gălbenele Lot (CG)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	Cimbru Lot (CG)	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-

Nr. Probă	PRO	RUT	CAF	CHL	LUT	KAE	ROS	QUE	ISO	FER	COU	PRO
14	Gălbenele Martor (CG)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	Mușețel Lot (MCo)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
16	Coadă șoricelului Lot (MCo)	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	F
17	Mușețel Martor (MCo)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
18	Coadă șoricelului Martor (MCo)	-	+	+	+	+	+	-	-	+	M	-

În figurile 7.1 – 7.2 sunt prezentate spectrele de masă pentru lotul rozmarin fitosociologic prin ambele tipuri de ionizări.

Ionizare ESI +

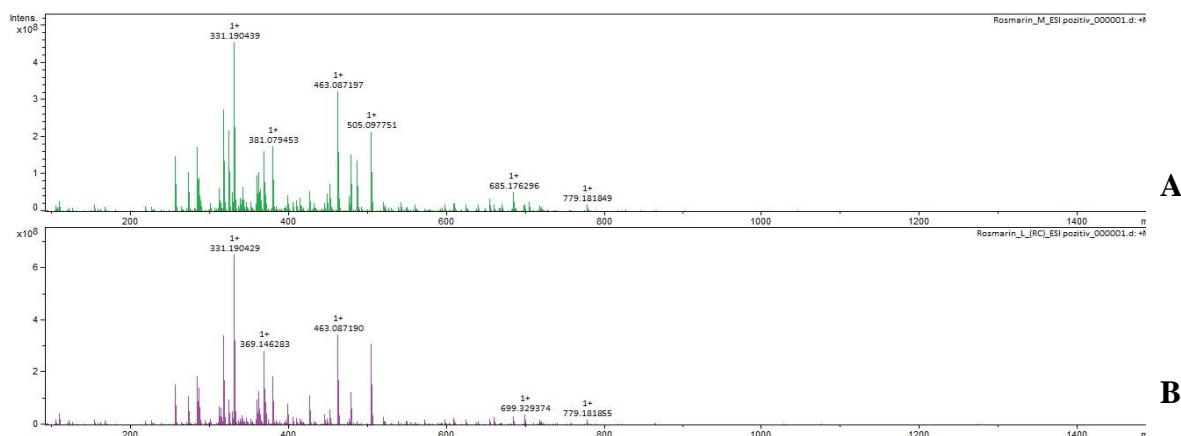


Figura 7.1. Spectrul de masă, ionizare ESI+
(A) Extract Rozmarin Lot Martor, (B) Extract Rozmarin Lot Fitosociologic

Ionizare ESI -

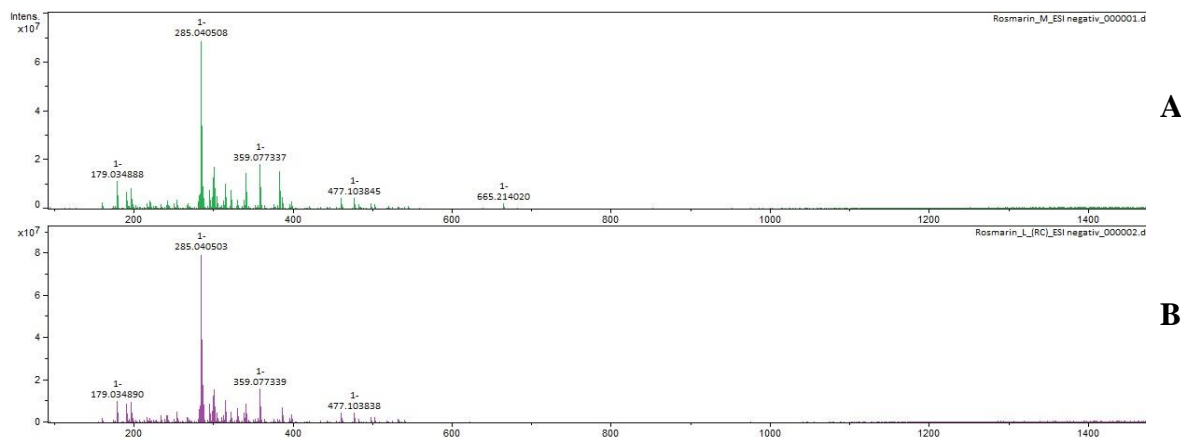


Figura 7.2. Spectrul de masă, ionizare ESI-
(A) Extract Rozmarin Lot Martor, (B) Extract Rozmarin Lot Fitosociologic

Identificarea acizilor triterpenici prin metoda UHPLC MS și FT-ICR MS (ESI+, ESI -)

Determinarea triterpenelor pentaciclice dar și a concentrațiilor acestora în extractele uscate din culturile din cercetarea noastră sunt prezentate în tabelul VII.4.

Tabel VII.4. Cuantificarea triterpenelor pentaciclice în extractele vegetale (mg compus/g extract)

Probă ID	Numele probei	BA [mg/g]	OA [mg/g]	UA [mg/g]
1	Mentă Lot (MML)	F	5.66	5.64
2	Melisă Lot (MML)	0.30	5.21	9.78
3	Mentă Martor (MML)	F	3.38	3.47
4	Melisă Martor (MML)	F	3.17	5.94
5	Rosmarin Lot (RC)	8.75	8.51	6.22
6	Cimbru Lot (RC)	M	1.95	4.91
7	Rosmarin Martor (RC)	10.97	11.45	11.67
8	Cimbru Martor (RC)	M	1.30	3.50
9	Sunătoare Lot (SM)	F	M	F
10	Melisă Lot (SM)	0.13	4.89	9.56
11	Sunătoare Martor (SM)	F	M	F
12	Gălbenele Lot (CG)	M	M	M
13	Cimbru Lot (CG)	M	3.72	8.70
14	Gălbenele Martor (CG)	M	M	M
15	Mușețel Lot (MCo)	M	M	M
16	Coadă șoricelului Lot (MCo)	M	M	F
17	Mușețel Martor (MCo)	M	M	M
18	Coadă șoricelului Martor (MCo)	M	M	F

Legendă: F-găsit, dar nu cuantificabil, M-lipsește.

8. DETERMINAREA ACȚIUNII ANTIOXIDANTE *IN VITRO* ȘI *IN SILICO*

Determinarea acțiunii antioxidante *in vitro*

Pentru descrierea profilului antioxidant al extractelor liofilizate obținute din *Rosmarini folium*, *Thymi herba*, *Hyperici herba*, *Melissae folium*, *Menthae folium*, *Calendulae flores*, *Chamomillae flos* și *Millefolii herba* am folosit mai multe metode antioxidante (DPPH, ABTS,

FRAP), care presupun mecanisme diferite și sunt foarte des folosite în determinarea profilului antioxidant al produselor vegetale [18].

Rezultate și discuții. Efectele antioxidante induse de extractele testate au fost direct corelate cu concentrația metaboliților secundari. IC₅₀ a vitaminei C a fost determinată prin utilizarea DPPH și valoarea sa este de 0,0165 mg/mL. Comparând datele, s-a descoperit că substanțele care au generat cele mai puternice activități antioxidante au fost găsite în MLF E din lotul fitosociologic cu sunătoarea (valoarea IC₅₀ cea mai scăzută prin toate cele trei metode, comparativ cu celelalte extracte – tabel VIII.1.). Faptul că valorile IC₅₀/EC₅₀ pentru MLF E sunt, dintre toate extractele studiate, substanțial mai apropiate de valorile antioxidante ale standardului utilizat, ceea ce subliniază acțiunea antioxidantă superioară a MLF E față de celelalte probe, este de remarcat în special.

Tabel VIII.1. Analiza acțiunii antioxidante a extractelor prin cele 3 metode

Nr.	PLANTE MEDICINALE	METODA ANTIOXIDANTA		
		IC ₅₀ [mg/ml]		
		DPPH	ABTS	FRAP
1	MENTĂ LOT EXTRACT 2021	0,0563	0,0287	0,6198
2	MENTĂ MARTOR EXTRACT 2021	0,0827	0,0371	0,8079
3	MELISĂ LOT EXTRACT MM 2021	0,0424	0,0255	0,5914
4	MELISĂ MARTOR EXTRACT 2021	0,0488	0,0270	0,7561
5	ROZMARIN LOT EXTRACT 2021	0,0620	0,0305	0,6206
6	ROZMARIN MARTOR EXTRACT 2021	0,0861	0,0464	0,8310
7	CIMBRU LOT EXTRACT RC 2021	0,0773	0,0419	0,8208
8	CIMBRU MARTOR EXTRACT 2021	0,0993	0,0546	0,9795
9	CIMBRU LOT EXTRACT GC 2021	0,0848	0,0437	0,8959
10	MELISĂ LOT EXTRACT SM 2021	0,0349	0,0244	0,5735
11	SUNĂTOARE LOT EXTRACT 2021	0,0495	0,0300	0,5961
12	SUNĂTOARE MARTOR EXTRACT 2021	0,0643	0,0312	0,6248
13	GĂLBENELE LOT EXTRACT 2021	0,4834	0,2224	3,6837
14	GĂLBENELE MARTOR EXTRACT 2021	0,5205	0,2371	4,3640
15	MUȘEȚEL LOT EXTRACT 2021	0,1995	0,089	2,5685
16	MUȘEȚEL MARTOR EXTRACT 2021	0,2363	0,1178	3,2472
17	COADA ȘORICELULUI LOT EXTRACT 2021	0,2523	0,1208	2,0945
18	COADA ȘORICELULUI MARTOR EXTRACT 2021	0,3877	0,1335	3,3712

Studii *in silico*. S-au efectuat simulări de docking molecular pentru compușii identificați în scopul evaluării potențialelor activități biologice asupra izoformelor sirtuinei. Structurile cristaline ale sirtuinei umane 1 (PDB ID: 5BTR, rezoluție de 3,20 Å [19]), sirtuinei 5 (PDB ID: 4HDA, rezoluție de 2,60 Å [20]) în complex cu substraturi peptidice și activatorul resveratrol,

și ale sirtuinei 6 în complex cu ADP-riboză și activatorul quercetină (PDB ID: 6QCD, 1.84 Å rezoluție) și respectiv inhibitorul catechin galatul (PDB ID: 6QCJ, 2,01 Å rezoluție) [21], au fost preluate din baza de date RCSB PDB. Deoarece există structuri determinate experimental disponibile atât pentru derivații polifenolici activatori, cât și pentru cei inhibitori ai SIRT6, am ales să efectuăm experimente de docking pe ambele structuri de receptori, pentru a diferenția între potențiali activatori și inhibitori. Un set de 11 liganzi polifenolici au fost fixați în situsurile de legare a 3 izoforme de sirtuină pentru a evalua potențialul acestor compuși de a acționa ca activatori direcți. Protocolul de andocare implementat a fost validat cu succes, iar pozițiile de legare precise suprapuse peste conformațiile experimentale sunt prezentate în Figura 8.1. S-au observat doar mici variații în orientarea ligandului pentru toate cele 4 controale pozitive. Activatorul SIRT1 și SIRT5 resveratrol a prezentat o energie de legare de -9,332 kcal/mol și o eficiență a ligandului de 0,549 pentru SIRT1 și o energie de legare mult mai mare de -5,220 pentru SIRT5 (0,307 eficiență a ligandului). Activatorul SIRT6, quercetina, a avut o energie de legare de -6,899 kcal/mol și o eficiență a ligandului de 0,314, în timp ce inhibitorul SIRT6, galatul de catehină, un derivat al quercetinei, a avut un scor de andocare de -8,732 kcal/mol și o eficiență a ligandului de 0,273. Deși galatul de catehină este similar din punct de vedere structural cu quercetina și împărtășește același situs de legare, studiile anterioare au arătat că diferențele de orientare a ligandului și a catenei laterale a proteinei în cadrul situsului de legare sunt responsabile de o schimbare totală a activității biologice [186]. Astfel, polifenolii din studii au fost andocați în ambele conformații proteice, pentru a discrimina între potențialele activități stimulative și inhibitoare. Energiile de legare și eficiența ligandului obținute în urma simulărilor de docking sunt prezentate în Tabelul VIII.1. Energiile de legare după docking pe SIRT1 au variat de la -9,827 kcal/mol la -5,858 kcal/mol, cu o valoare medie de $-8,430 \pm 1,337$ kcal/mol. Pentru SIRT5, scorurile de andocare au variat între -8,764 și -5,720 kcal/mol, cu o valoare medie de $-7,217 \pm 1,104$ kcal/mol. Energiile de legare după docking pe conformația specifică activatorului de SIRT5 au variat între -7,775 și -5,721 kcal/mol ($-6,698 \pm 0,602$ kcal/mol), în timp ce energiile pentru conformația receptorului specific inhibitorului au fost cuprinse între -8,287 și -5,703 kcal/mol ($-6,774 \pm 0,860$ kcal/mol).

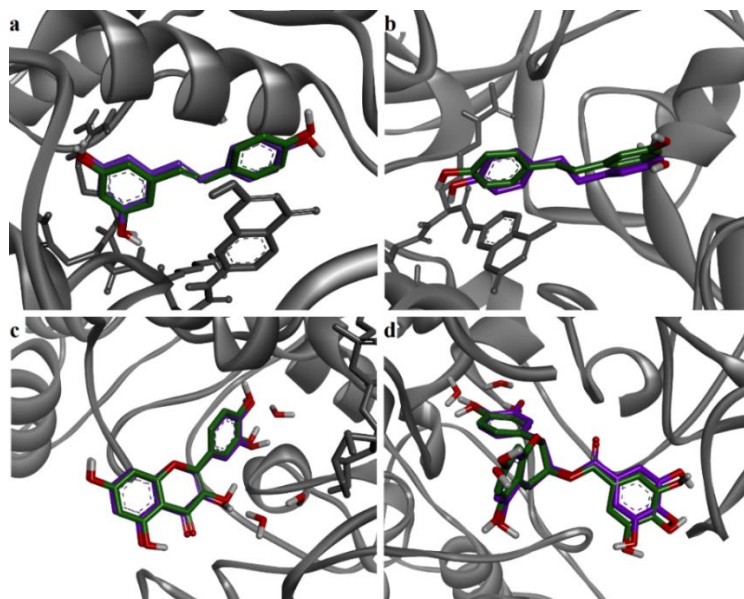


FIGURA 8.1. Suprapunerea pozițiilor prezise (violet) peste conformațiile inițiale (verde). (a) – SIRT1–resveratrol; (b) – SIRT5–resveratrol; (c) – SIRT6–quercetină; (d) – SIRT6–catechin galatul

Tabel VIII.1. Rezultatele docking-ului molecular pentru anumite izoforme de sirtuină

Ligand	SIRT1 (activator)		SIRT5 (activator)		SIRT6 (activator)		SIRT6 (inhibitor)	
	ΔG (kcal/mol)	LE	ΔG (kcal/mol)	LE	ΔG (kcal/mol)	LE	ΔG (kcal/mol)	LE
Acid cafeic	-7.186	0.553	-6.224	0.479	-6.274	0.483	-6.411	0.493
Acid clorogenic	-8.027	0.321	-7.212	0.289	-6.609	0.264	-7.262	0.291
Acid ferulic	-7.334	0.524	-6.057	0.433	-5.721	0.409	-6.172	0.441
Isoquercitrin	-8.995	0.273	-8.205	0.249	-6.460	0.196	-5.865	0.178
Kaempferol	-9.827	0.468	-7.583	0.361	-6.690	0.319	-6.787	0.323
Luteolin	-9.520	0.453	-7.962	0.379	-6.419	0.306	-7.279	0.347
Acid p-Cumaric	-7.376	0.615	-5.720	0.477	-6.977	0.581	-5.900	0.492
Acid Protocatehuic	-5.858	0.533	-5.750	0.523	-6.232	0.567	-5.703	0.519
Quercetin	-9.259	0.421	-7.554	0.343	-6.899*	0.314*	-6.912	0.314
Acid Rozmarinic	-9.638	0.371	-8.357	0.321	-7.775	0.299	-8.287	0.319
Rutozidă	-9.709	0.226	-8.764	0.204	-7.623	0.177	-7.940	0.185
Resveratrol*	-9.332	0.549	-5.220	0.307	-	-	-	-
Catechin galat*	-	-	-	-	-	-	-8.732	0.273

ΔG – energia de legătură; LE – eficiența ligandului; * – control pozitiv.

În ceea ce privește interacțiunile moleculare dintre liganzii andocați și proteinele țintă, am ales să discutăm interacțiunile prezise pentru un anumit compus, acidul rozmarinic, care a prezentat atât scoruri bune de andocare, cât și conformații bune ale ligandului. Acidul rozmarinic a format 4 legături de hidrogen cu situsul de legare SIRT1, implicând reziduurile Asn226, Glu230 și Phe414. În plus, ligandul a format o legătură de hidrogen suplimentară cu

Lys3, care face parte din substratul peptidic, stabilizând astfel complexul sirtuină-substrat. Mai mult, acidul rozmarinic a format interacțiuni pi-alchilice hidrofobe cu Pro212, Leu215, Arg446 și Pro447 și interacțiuni Van der Waals cu alte rezistențe (Figura 8.2.a – b). Complexul dintre acidul rozmarinic și SIRT5 este stabilizat prin legături de hidrogen cu Gln140, Asp143 și His158. Două reziduuri de arginină sunt implicate într-o punte de sare cu fracțiunea carboxilică și o interacțiune relațională cu inelul fenilic. Interacțiunile hidrofobe, cum ar fi interacțiunile pi-alchil și forțele slabe Van der Waals, sunt observate cu alte reziduuri din situsul de legare. Din păcate, s-a format o interacțiune acceptor-acceptor nefavorabilă între un grup hidroxil și Asp143 (Figura 8.2.c – d).

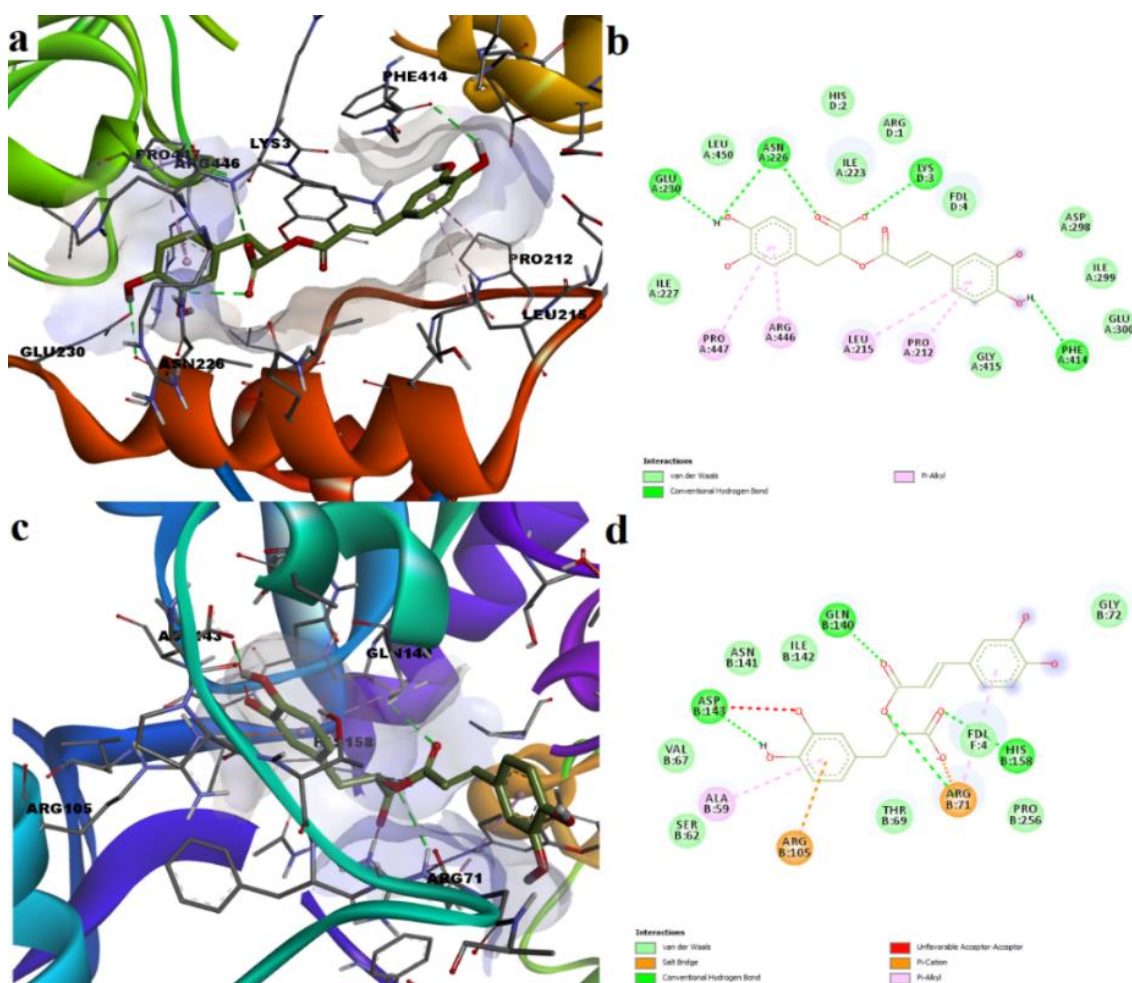


Figura 8.2. Poziții ale ligandului și interacțiuni moleculare preconizate între acidul rozmarinic și SIRT1 și SIRT5. (a) - Conformația 3D a complexului prezis acid rozmarinic-SIRT1; (b) - Reprezentarea 2D a interacțiunilor proteină-ligand pentru complexul prezis acid rozmarinic-SIRT1; (c) - Conformația 3D a complexului prezis acid rozmarinic-SIRT5; (d) - Reprezentarea 2D a interacțiunilor proteină-ligand pentru complexul prezis acid rozmarinic-SIRT5

Concluzii parțiale. Studiile de docking molecular au susținut ipoteza că extractele obținute au potențialul de a activa direct SIRT1, 5 și 6 prin intermediul mai multor compuși polifenolici, completând astfel activitatea de eliminare a radicalilor liberi cu stimularea potențială a mecanismelor de apărare antioxidantă endogene.

Concluzii finale. Concentrația de polifenoli este în corelație directă cu acțiunea antioxidantă. Cu cât concentrația de polifenoli este mai mare, cu atât acțiunea antioxidantă este mai reprezentativă. Studiile *in vitro* sunt susținute și de rezultatele obținute *in silico*. Activarea sirtuinelor completează acțiunea antioxidantă a extractelor.

CONCLUZII GENERALE. ORIGINALITATEA CERCETĂRILOR PERSPECTIVE DE CERCETARE

CONCLUZII GENERALE

Cercetările efectuate asupra produselor vegetale luate în studiu ne-au condus la următoarele concluzii:

- 🌱 În studiul nostru pe o perioadă de 4 ani am analizat și urmărit modul în care se pot influența un grup de plante medicinale, fiind crescute împreună, fără să intervenim în vreun mod pentru lotul comun cum ar fi: îmbogățirea solului cu vreun tip de îngrășământ, aplicarea unei cantități diferite de apă față de martor, etc.
- 🌱 Am observat apariția unor diferențe morfo-anatomice, în distribuția frecvența, densitatea, și abundența acestora în lotul comun față de lotul martor.
- 🌱 Majoritatea au fost specii medicinale care s-au dezvoltat armonios împreună, au produs cantități diferite de produs vegetal, dar au existat și specii medicinale care s-au autodistrus în culturile fitosociologice (comune).
- 🌱 Tipurile de culturi și specii medicinale dezvoltate în lotul fitosociologic sunt direct corelate cu modificările care au loc în produsele vegetale, inclusiv cele ale structurilor morfologice și anatomice ale acestora. Este clar că sunt specii medicinale cu interacțiuni pozitive puternice între ele. De asemenea, ele diversifică prezența anumitor țesuturi anatomice, care ar trebui să se manifeste prin creșterea secreției de metaboliți secundari.
- 🌱 În urma analizelor realizate pentru a determina din punct de vedere calitativ și cantitativ principiile active sintetizate au fost relevate următoarele: tipul de alcool utilizat în extracție este dependent de tipul de materie primă vegetală, deși vorbim de același tip de principiu activ; există o diferență clară între concentrațiile de flavone

determinate în probele din loturile fitosociologice față de loturile martor; dinamica conținutului de flavone este dependentă de tipul de materie primă vegetală.

- ✿ Există o diferență clară între concentrațiile de AFC – uri determinate în probele din loturile fitosociologice față de loturile martor; dinamica conținutului de acizi fenolcarboxilici este dependentă de tipul de materie primă vegetală, de condițiile pedoclimatice și de tipul de analiză; și, ca și în cazul flavonelor, tipul de alcool folosit în extracție este dependent de natura materiei prime vegetale, în ciuda faptului că discutăm despre același tip de principiu activ.
- ✿ Există o diferență clară între concentrațiile de polifenoli totali determinate în probele din loturile fitosociologice față de loturile martor; dinamica conținutului de polifenoli totali este dependentă de tipul de materie primă vegetală, de condițiile pedoclimatice și, ca și în cazul flavonelor și AFC– urilor, tipul de alcool utilizat în extracție este dependent de natura materiei prime vegetale.
- ✿ Urmărirea capacității de migrare a principiilor active din *Menthae folium* într-un interval de 28 de ore a dus la rezultate interesante: în funcție de oră și perioadă a zilei acestea se găsesc într-o concentrație mai mare într-o zonă diferită din plantă iar acest proces este ciclic.
- ✿ Influența biostimulatorilor asupra conținutului de compuși polifenolici din lotul *Menthae -Melissae folium* a determinat diferite cantități de principii active sintetizate în funcție de tipul de fertilizant. Deși speciile medicinale provenite din solul fertilizat chimic sunt mai dezvoltate, acest fapt nu a dus la o concentrație mai mare de principii active.
- ✿ Rezultatele obținute în urma analizei extractelor din plante au fost previzibile, deoarece s-au comportat într-o manieră compatibilă cu comportamentul plantelor din care au fost derivate. Asocierea cauzală stabilită între plantele medicinale cultivate în lotul fitosociologic este demonstrată de diferențele deosebit de mari dintre diferitele tipuri de produse vegetale; acest fapt arată influențele benefice dintre ele. Există, desigur, câteva excepții, cum ar fi la lotul cimbru și gălbenele, în care biosinteza unui anumit tip de principiu activ este afectată negativ.
- ✿ Identificarea și cuantificarea compușilor polifenolici prin cromatografie lichidă de ultra-înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă (UHPLC-MS) a permis identificarea compușilor polifenolici, concentrația acestora fiind dependent de natura materiei prime vegetale din care s-a obținut extractul.

- ✿ Identificarea compușilor polifenolici prin metoda FT-ICR MS (spectrometru de masă de înaltă rezoluție de tip Fourier – Transform Ion – Cyclotron – Resonance dotat și cu spectru de masă) a dus la validarea rezultatelor obținute prin metoda UHPLC-MS, cu diferențe însă la ionizarea pozitivă (unii compuși au putut fi depistați tocmai de folosirea unei ionizări diferite).
- ✿ Acizii triterpenici identificați în probe prin ambele metode au putu fi găsiți doar în anumite extracte.
- ✿ Determinarea potențialului antioxidant a fost probat prin 3 metode distincte de testare în urma cărora s-a observat o creștere a capacității antioxidante a plantelor ce se găsesc în loturile fitosociologice.
- ✿ Teoria conform căreia extractele obținute au potențialul de a activa direct SIRT1, 5 și 6 printr-un număr de compuși polifenolici a fost susținută de studiile de andocare moleculară. Acest lucru ar completa capacitatea extractelor de a elimina radicalii liberi cu stimularea potențială a mecanismelor de apărare antioxidante endogene.

ORIGINALITATEA CERCETĂRILOR

Consider că originalitatea acestei teze este dată de:

- ✿ Înființarea loturilor fitosociologice și urmărirea acestora pe o perioadă de 4 ani.
- ✿ Evaluarea și analiza comportamentului în urma creșterii în comun a anumitor plante medicinale aparținând la genuri diferite și provenite din familii identice sau diferite, într-un studiu pilot.
- ✿ Stabilirea diferențelor chimice cantitative între toate loturile luate în studiu prin metode specifice fitochimiei;
- ✿ Studii privind migrația de principii active într-un interval de 28 de ore la frunzele de mentă.
- ✿ Studii in silico asupra interacțiunii dintre polifenoli și diferite tipuri de sirtuine.

PERSPECTIVE DE CERCETARE

- ✿ Extinderea studiilor fitosociologice și asupra altor tipuri de plante medicinale.
- ✿ Extinderea arealului de cultivare al loturilor fitosociologice.
- ✿ Extinderea studiilor in silico și pe alte tipuri de proteine/enzime.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Dengler J, International Encyclopedia of Geography, 15 Volume Set: People, the Earth. Environment and Technology; John Wiley & Sons:Hoboken, NJ, USA, 2017
2. Cristea V, Gafta D, Pedrotti F, Fitosociologie. editura Presa Universitară Clujeană, Cluj Napoca, 2004; 40-56
3. Gheorghe IF, Fitocenologie și Vegetația României, editura Didactică și Pedagogică, București 2008
4. Heringer Barcellos Jr. L, Gustavo AMP, Pereira Capobianco N, Valadão Silva D, Rodrigues Braga R, Alves Ferreira E, Phytosociology of weeds in bean crops with different herbicides control, Revista Brasileira de Herbicidas, 2016; 15(3): 221-231
5. Mansur M, Kartawinata K, Phytosociology Of A Lower Montane Forest On Mt. Batulanteh, Sumbawa, A Journal On Taxonomic Botany, Plant Sociology And Ecology, 2017; 16(2): 49 -110. <https://doi.org/10.14203/reinwardtia.v16i2.3369>
6. Monk K, De Fretes Y, Reksodiharjo-Lille G, The ecology of Nusa Tenggara and Maluku. Periplus Editions, Hong Kong, 1997
7. Van Steenis CGGJ, Schippers-Lammertse AF, General part: Concise plant geography of Java, In: BACKER, C. A. & BAKHUIZEN VAN DEN BRINK, R. C. Flora of Java, 1965; 2:3–72
8. Whitmore TC, Tropical rain forest of the Far East. 2nd edition. Clarendon Press. Oxford, 1984
9. Whitmore TC, The forest ecosystem of Malaysia, Singapore and Brunei: description, functioning and research needs. In: Tropical Forest Ecosystems, Natural Resource Research XIV, UNESCO, Paris, 1978; 639–651
10. Pessoa De Barros R, Sampaio Reis L, Santos Magalhães IC, Wanderson Ferreira DS, Gomes Da Costa J, Feitosa Dos Santos A, Phytosociology of weed community in two vegetable growing systems, African Journal of Agricultural Research, 2018; 13(6): 288-293
11. Nuță IS, Niculescu M, Phytosociology, Distribution and Ecology of a Willow Community with False Tamarisk from the Lotru Valley (Romanian Carpathians), Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2019; 47(3): 621-628

12. Ali F, Hassan G, Akhtar N, Babar MJ, Jan A, Phytosociology And Some Ecological Attributes Of Weed Flora Of Wheat In Tehsil Charsadda Khyber Pakhtunkhwa Pakistan. *J. Weed Sci. Res.*, 2019; 25(2): 121-136
13. https://ro.wikipedia.org/wiki/Turnu_M%C4%83gurele accesat în 5 Decembrie 2021
14. Luță EA, Ghica M, Gîrd CE, The Initiation of a Phytosociological Study on Certain Types of Medicinal Plants. *Agriculture*, 2022; 12(2): 283. <https://doi.org/10.3390/agriculture 12020283>
15. Links S, Van Zyl K, Cassiem A, Flett BC, Viljoen A, Rose LJ, The association of maize characteristics with resistance to *Fusarium verticillioides* and fumonisin accumulation in commercial maize cultivars. *World Mycotoxin Journal*, 2020; 13(3): 367-379. <https://doi.org/10.3920/WMJ2019.2537>
16. Raimondi L, Tomesani L, Donati L, Zucchelli A, Lattice material infiltration for hybrid metal-composite joints: Manufacturing and static strength. *Composite Structures*, 2021; 269: 114069. <https://doi.org/10.1016/j.compstruct.2021.114069>
17. Luță EA, Ghica M, Costea T, Gîrd CE, Phytosociological study and its influence on the biosynthesis of active compounds of two medicinal plants *Mentha piperita* L. and *Melissa officinalis* L. *Farmacia*, 2020; 68: 919–924
18. Dudonne S, Vitrac X, Coutier P, Woillez M, Merillon JM, Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. *J. Agric. Food. Chem.*, 2009; 57(5): 1764-1778
19. Cao D, Wang M, Qiu X, Liu D, Jiang H, Yang N, Xu R, M. Structural Basis for Allosteric, Substrate-Dependent Stimulation of SIRT1 Activity by Resveratrol. *Genes Dev.* 2015; 29: 1316–1325, doi:10.1101/gad.265462.115
20. Gertz M, Nguyen GTT, Fischer F, Suenkel B, Schlicker C, Fränzel B, Tomaschewski J, Aladini F, Becker C, Wolters D, Stegborn C, A Molecular Mechanism for Direct Sirtuin Activation by Resveratrol. *PLoS One* 2012; 7: e49761, doi:10.1371/journal.pone.0049761
21. You W, Zheng W, Weiss S, Chua KF, Stegborn C, Structural Basis for the Activation and Inhibition of Sirtuin 6 by Quercetin and Its Derivatives. *Sci. Rep.* 2019, 9, 19176. doi:10.1038/s41598-019-55654-1