UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREŞTI
ŞCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE

TEZĂ DE DOCTORAT

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

Student-doctorand:
RUSTEM (CĂS. IONUS) R. ELIS

2024

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREŞTI
ŞCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE

CERCETĂRI PRELIMINARE ASUPRA PROFILULUI FITOCHIMIC ŞI BIOLOGIC AL SPECIEI *AJUGA CHAMAEPITYS,* SPONTANĂ ÎN ROMÂNIA

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

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

Student-doctorand:
RUSTEM (CĂS. IONUS) R. ELIS

2024

Cuprins

Lista cu lucrările științifice publicate III
Lista cu abrevieri IV
INTRODUCERE 1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII 3
1. Date farmacobotanice despre specia *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. 3
1.1. Scurt istoric. Date generale despre genul *Ajuga* 3
1.2. Specii ale genului *Ajuga* naturalizate în România 4
1.2.1 *Ajuga reptans* (L.) (Vineţică) 4
1.2.2. *Ajuga genevensis* (L.) (Suliman) 4
1.2.3. *Ajuga laxmanni* (L.) Benth. (Barba boierului) 4
1.2.4. *Ajuga salicifolia* (L.) Schreb. 5
1.2.5. *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. (tămâiță de câmp) 5
1.2.5.1. Utilizări tradiţionale 5
2. Cercetări anterioare asupra speciei *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. 6
2.1. Cercetări fitochimice 6
2.2. Cercetări farmacologice 8
2.3. Cercetări fitochimice şi farmacologice pe alte specii ale genului *Ajuga* 10
2.3.1. Cercetări fitochimice 10
2.3.2. Cercetări biologice şi farmacologice 16
CERCETĂRI PERSONALE 22
3. Determinarea particularităţilor morfo-anatomice pe produse vegetale recoltate de la specia *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. care habitează în regiunea Dobrogei 22
3.1. Analiza macroscopică a speciei *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. 22
3.2. Structura microscopică a organelor vegetale aeriene şi subterane 23
4. Stabilirea normei de calitate a materiilor prime vegetale 32
4.1. Obţinerea materiilor prime vegetale 32
4.2. Analize fitochimice - reacţii de identificare a principalilor compuşi chimici. 32
4.3. Determinarea umidităţii 35
4.4. Determinarea substanţelor solubile 36
4.5. Determinarea cantitativă a constituenţilor bioactivi 38
4.5.1. Determinarea conţinutului de flavone 39
4.5.2. Determinarea conţinutului de acizi fenolcarboxilici (AFC-uri) 41
4.5.3. Determinarea conţinutului de polifenoli totali 44

4.5.4. Concluziile celor trei determinări spectrofotometrice 46
4.5.5. Analiza statisticã a datelor obţinute 46
4.6. Determinarea cantitativă a constituenţilor lipofili – dozarea uleiului volatil.. 55
5. Stabilirea procedeului tehnologic de obţinere a extractului uscat (*Ajugae chamaepitysis herba extractum* – faza de laborator) 56
5.1. Determinarea stabilităţii extractului uscat – *Ajugae chamaepitysis herba extractum* (ACHE) 57
5.2. Identificarea și cuantificarea compușilor polifenolici din ACHE prin cromatografie de lichide ultra-performantă cuplată cu spectrometrie de masă de înaltă rezoluție (UHPLC-HRMS/MS) 58
6. Determinarea citotoxicităţii extractului 64
6.1. Testarea activităţii citotoxice *in vivo* pe modelul *Artemia salina* L. 64
6.2. Testarea activităţii citotoxice *in vivo* pe speciile de *Daphnia* 67
6.3. Testul de dezvoltare a embrionului *Daphnia magna* (*Daphnia magna* Embryo test) 69
7. Cercetări *in vitro* asupra activităţii antioxidante 71
7.1. Capacitatea de scavanger asupra radicalului DPPH (Metoda DPPH) 71
7.2. Capacitatea de scavanger asupra radicalului $ABTS^{\bullet+}$ (Metoda ABTS) 73
7.3. Determinarea capacităţii de reducere a ferului (Metoda FRAP) 74
7.4. Rezultate şi discuţii asupra activităţii antioxidante realizate prin cele 3 metode 76
7.5. Concluzii 78
8. Determinarea activităţii antimicrobiene 79
9. Simulări de docking molecular pentru predicția *in silico* a interacțiunilor cu ținte biologice 84
9.1. Predicția țintelor moleculare şi docking molecular 84
9.2. Simulări de dinamică moleculară 91
Concluzii finale și contribuții personale 105
BIBLIOGRAFIE 107
ANEXE 119

Lista cu lucrările științifice publicate

Articole publicate în reviste cotate ISI:

1. **Elis Ionus**, Laura Adriana Bucur, Carmen Elena Lupu, Cerasela Elena Gîrd. Evaluation of the chemical composition of *Ajuga chamaepitys* (L.) Screb. from the spontaneous flora of Romania (2021). *Farmacia*, 69(3), 461-466, revistă indexată ISI, cu factor de impact **1.433**, ISSN: 2065-0019 (*for the Online Edition*) and 0014-8237 (*for the Printed Edition*), link: https://doi.org/10.31925/farmacia.2021.3.8
2. **Elis Ionus**, Verginica Schröder, Carmen Lidia Chiţescu, Laura Adriana Bucur, Carmen Elena Lupu, Denisa-Elena Dumitrescu, Liliana Popescu, Dragos Paul Mihai, Octavian Tudorel Olaru, George Mihai Nițulescu, Boscencu Rica, Gîrd Cerasela Elena. Phytochemical, *In Vitro*, *In Vivo*, and *In Silico* Research on the Extract of *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. (2024). *Plants*, 13, 1192, revistă indexată ISI, cu factor de impact **4.0**, ISSN: 2223-7747 (*for the Online Edition*), link: https://doi.org/10.3390/plants13091192

Participări la sesiuni de postere din cadrul simpozioanelor sau congreselor naționale sau internaționale cu publicarea rezumatelor:

1. **Elis Ionus**, Cerasela Elena Gîrd, Laura Bucur, *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb., potential resource of active principles (2021). Congresul Național de Farmacie Ediția a XVIIIa, Oradea, 15-17 septembrie, rezumat publicat în *Broșura Congresului: Farmacia. De la inovare la buna practică farmaceutică*, ISBN: 978-606-10-2144-4
2. **Elis Ionus**, Verginica Schröder, Sorin Grigore, Cerasela Elena Gîrd, Biological effects of the selective dry extract *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. (2023). Symposium with international participation : Alternative and complementary therapies (Homeopathy/Phytotherapy), 7th edition, Constanța, 27-28 octombrie, rezumat publicat în *Book of abstracts*, ISSN: 2601-1476 (premiul I)

Lucrări științifice comunicate la manifestări naționale:

- **Elis Ionus**, Cerasela Elena Gîrd, Laura Bucur, Evaluation of antioxidant capacity and phytochemical screening of dry extract of *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. (2021). Symposium with international participation : Alternative and complementary therapies (Homeopathy/Phytotherapy), 4th edition, Constanța, 26-27 martie, rezumat publicat în *Book of abstracts*, ISSN: 2601-1476

LISTA CU ABREVIERI

- Schreb. - Schreber
- UHPLC-HRMS/MS - cromatografie de lichide ultra-performantă cuplată cu spectrometrie de masă de înaltă rezoluție
- ssp. - subspecia
- var. - varianta
- AFC - acizi fenol-carboxilici
- GC-MS - gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă
- GLC-MS - cromatografie gaz-lichid cuplată cu spectrometrie de masă
- GLC-FID - cromatografie gaz-lichid cu detecţie de ionizare în flacără
- LC-MS - cromatografie de lichide cuplată cu spectrometrie de masă
- HPLC - cromatografie de lichide performantă
- GAE - echivalenţi acid galic
- LC-MS/MS - cromatografie de lichide cuplată cu spectrometrie de masă în tandem
- RP-HPLC-DAD - cromatografie de lichide performantă în faza inversă cu DAD
- QE - echivalenţi quercitrin
- RP-HPLC - cromatografie de lichide performantă în fază inversă
- FTIR - spectroscopie infraroşu cu transformată Fourier
- EDX - spectroscopie de raze X cu dispersie de energie
- HPLC/UV/MS - cromatografie de lichide ultraperformantă cu detecţie UV cuplată cu spectrometrie de masă
- AFC-uri - acizi fenolcarboxilici
- CDK5 - kinaza 5 dependentă de ciclină
- GSK-3β - glicogen sintaza kinaza-3β

INTRODUCERE

Plantele medicinale au fost utilizate încă din cele mai vechi timpuri și au fost recunoscute ca un interes important în industria farmaceutică, folosindu-se pentru ameliorarea și tratarea diferitelor patologii. Plantele utilizate în mod tradițional au avut un impact important în cercetare, multe dintre acestea sunt utilizate actual pe scară largă, deoarece s-au dovedit prin studii experimentale *in vivo* și *in vitro* utilitatea farmacoterapeutică, optimizându-se metodele de prelucrare și de înglobare a principiilor active a acestor fitopreparate.

Pe măsura modernizării tehnologiilor de cercetare, fitoterapia a luat amploare, fiind o alternativă la tratamentele alopate, care prezintă frecvent efecte farmacotoxicologice. Recunoașterea plantelor în domeniul medicinal nu este deloc surprinzătoare, deoarece ele și-au demonstrat eficacitatea și beneficiile asupra organismului uman.

Constituenții chimici din plante numiți fitonutrienţi nu sunt indispensabile vieții, dar prin adăugarea lor în dietă (sau prin administrarea de suplimente alimentare), acestea pot avea proprietăți importante în protecția sau prevenția anumitor boli. Spre exemplu, pot avea rol antioxidant, pentru protejarea celulelor organismului împotriva radicalilor liberi nocivi, rol cardio-protector, pentru reglarea tensiunii arteriale și pentru a susține funcțiile cardiace în mod optim, rol imunoprotector, pentru a preveni răcelile comune și pentru a combate infecțiile și multe altele.

În epoca modernă omul tinde să acorde o importanţă semnificativă asupra stilului de viaţă, prevenţia anumitor boli, şi de aceea se acordă o atenţie sporită fitopreparatelor tradiţionale în area medicinală şi se recunosc beneficiile plantelor medicinale ca resurse terapeutice. Mai mult decât atât, în ultimele decenii cercetările ştiinţifice în ceea ce priveşte medicina herbală au înregistrat o pantă ascendentă, fapt ce denotă un interes crescut al populaţiei pentru acest domeniu. Totuși, ca-n orice domeniu, rămân multe elemente încă nestudiate și neînțelese, ceea ce ne îndeamnă să continuăm cercetările, să explorăm şi să valorificăm aceste plante medicinale.

În prezenta teză de cercetare ne-am propus să realizăm cercetări preliminare în ceea ce privește profilul farmacobotanic, fitochimic și farmacologic al speciei *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb, spontană în zona Dobrogei Centrale.

Justificarea alegerii temei s-a bazat pe faptul că *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. este una din plantele utilizate în mod tradițional şi pentru a oferi dovezi că reprezintă potenţială resursă de compuşi activi, ne-am propus să stabilim o corelație între fitoconstituenții identificați și cuantificați

prin metode specifice domeniului fitochimiei și potențialele efecte terapeutice prin cercetări *in vitro*, *in vivo* și *in silico*.

Originalitatea cercetării constă în evaluarea fitochimică și fitoterapică a speciei care habitează în această zonă din țară, zona Dobrogei Centrale.

Obiectivele cercetării: Evaluarea fitochimică a diverselor tipuri de produse vegetale (radix, herba, flores) recoltate de la specia *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. cu scopul stabilirii tipului de organ vegetal cel mai înnobilat în principii active; Stabilirea intervalului optim de recoltare a produsului/produselor vegetale (recoltarea materiilor prime vegetale în perioada mai-august); Stabilirea tipului de solvent (apă, etanol de diferite concentrații) care solubilizează cea mai mare cantitate de principii active, cu scopul obținerii unui extract uscat bogat în principii active; Stabilirea metodologiei de obținere a extractului uscat; Stabilirea calității extractului uscat prin determinarea cantitativă (metode spectrofotometrice și HPLC) a constituenților chimici activi; Evaluarea acțiunii antioxidante *in vitro* prin trei metode (DPPH, ABTS, metoda FRAP); Evaluarea citotoxicității *in vivo* pe specii de *Artemia* și *Daphnia*; Studii *in silico* în scopul stabilirii potențialelor interacțiuni enzimatice a derivaților polifenolici (cu posibilă utilitate în tratamentul patologiilor neurodegenerative şi a durerii neuropate); Diseminarea rezultatelor obţinute în reviste de specialitate şi în cadrul manifestărilor ştiinţifice.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. DATE FARMACOBOTANICE DESPRE SPECIA *AJUGA CHAMAEPITYS* (L.) SCHREB.

Capitolul 1 sistematizează informațiile din literatura de specialitate despre speciile genului Ajuga și despre cele mai răspândite specii din zona Dobrogei, *Ajuga reptans* (L.) (vinețică repentă), *Ajuga genevensis* (L.) (suliman), *Ajuga laxmanni* (L.) Benth. (barba boierului), *Ajuga salicifolia* (L.) Schreb., *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. (tămâiță de câmp).

2. CERCETĂRI ANTERIOARE ASUPRA SPECIEI *AJUGA CHAMAEPITYS* (L.) SCHREB.

Capitolul 2 sistematizează informațiile asupra cercetărilor fitochimice și fitofarmacologice pe specia *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. și alți intermediari ale acestei specii (subspecii).

CERCETĂRI PERSONALE

3. DETERMINAREA PARTICULARITĂȚILOR MORFO-ANATOMICE PE PRODUSE VEGETALE RECOLTATE DE LA SPECIA *AJUGA CHAMAEPITYS* (L.) SCHREB. CARE HABITEAZĂ ÎN REGIUNEA DOBROGEI

În capitolul 3 sunt prezentate cercetările efectuate în scopul evidențierii particularităților anatomo-morfologice, pe baza analizelor macroscopice și microscopice (secțiuni transversale) efectuate pe diferite tipuri de organe vegetale recoltate de la specia *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. *Ajuga chamaepitys* (L.), fiind o specie care înflorește vara, din mai până în august, produsele vegetale (*radix*, *folium*, *flores*, *caulis, herba*) au fost colectate în fiecare lună de înflorire, rezultând patru loturi de analizã. În acest mod vom putea stabili principalele grupe de principii active şi vom putea determina care din aceste loturi cuprinde compoziţia cea mai abundentă de principii active, realizând o comparaţie. Specia *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. a fost localizatã si ulterior colectatã din zona Cheile Dobrogei, din Dobrogea Centralã, 44°29'16.5"N - 28°27'09.5" E.

Datele obținute în urma evaluării a diferitelot tipuri de produse vegetale și a specie, sunt în concordanţă cu datele din literatura de specialitate. Întreaga plantă prezintă un miros puternic, asemănător cu cel de pin.

Observațiile anatomo-morfologice identificate indică faptul că specia se încadrează morfologic în caracteristicile de gen. Studiul privind anatomia organelor de *Ajuga* a cuprins mai multe obiective printre care și îmbunătățirea metodelor de observare microscopică a structurilor. În acest scop, ca noutate, reprezintă aplicarea tehnicilor de microscopie cu fluorescență, care asigură completarea informațiilor prin vizualizarea unor detalii suplimentare legate de topochimia pereților celulari, sinteza de compuși specifici. Folosirea acestor metode de vizualizare în UV și realizarea de colorații vitale, asigură o nouă perspectivă privind înțelegerea și interpretarea detaliilor morfologice prin faptul că, se pot observa și fenomenele fiziologice ale structurilor celulare analizate, corelate cu sinteza de compuși specifici (lignina, celuloză, cutină, pigmenți clorofilieni, etc) sau modificări de pH (autoliză, produse secretorii).

4. STABILIREA NORMEI DE CALITATE A MATERIILOR PRIME VEGETALE

4.1. Obţinerea materiilor prime vegetale

Colectarea loturilor de analizã a fost efectuatã în anul 2019, după data de 15 a fiecărei luni de înflorire (mai, iunie, iulie, august), dimineaţa, pe timp uscat şi însorit, urmată de procesul de sortare şi uscare a materialului vegetal în condiţiile din laboratorul de Farmacognozie, rezultând

patru loturi de analizã (mai - LOT 1, iunie – LOT 2, iulie - LOT 3, august - LOT 4). De asemenea, șase organe vegetale au fost sortate din fiecare lot, care au fost ulterior supuse studiului fitochimic (flori, frunze, tulpini, rădăcini, fructe și părți aeriene). Colectarea a fost efectuată după cum urmează: pentru părţile aeriene (H - *herba*), rezultând proba H1 (colectată în mai), proba H2 (colectată în iunie), proba H3 (colectată în iulie) și proba H4 (colectată în august); pentru frunze (F - *folium*), rezultând proba F1 (mai), proba F2 (iunie), proba F3 (iulie) și proba F4 (august); pentru flori (FL - *flores*), rezultând proba FL1 (mai), proba FL2 (iunie), proba FL3 (iulie) și proba FL4 (august); pentru tulpini (C - *caulis*), rezultând proba C1 (mai), proba C2 (iunie), proba C3 (iulie) și proba C4 (august); pentru rădăcini (R – *radix*), rezultând proba R1 (mai), proba R2 (iunie), proba R3 (iulie) și proba R4 (august). Am decis să excludem fructele, deoarece acestea erau într-o cantitate foarte mică, nepermiţându-ne să realizăm studiile necesare. Produsele vegetale au fost uscate la umbră, la temperatura camerei, în condiţiile din laboratorul de Farmacognozie al Facultății de Farmacie, Universitatea „Ovidius” din Constanța, material vegetal fiind depozitat în colecţia *exicata* a laboratorului de Farmacognozie.

4.2. Analize fitochimice - reacţii de identificare a principalilor compuşi chimici

Datoritã faptului cã *Ajuga chamepitys* (L.) Schreb. este o specie ce nu a fost studiatã din punct de vedere fitochimic, fiind o specie necunoscutã, de aceea noi am apelat la analiza calitativã fitochimicã pentru a identifica principalii compuşi activi. Analiza fitochimicã calitativã presupune cã produsele vegetale sã fie supuse extracţiei succesive cu diferiţi solvenţi şi ulterior efectuate reacţii de identificare specifice pentru fiecare grupã de principii active sau anumiţi constituenţi chimici. Reacţiile de identificare s-au realizat pentru fiecare tip de organ vegetal din fiecare lot, tocmai pentru a evidenţia diferenţele calitative între tipurile de produse vegetale.

Concluzii. Analizele efectuate pe extractul eteric admit prezenţa în principal a carotinoidelor, reziduul este untos şi cu miros plãcut, ceea ce indicã prezenţa uleiului volatil şi a acizilor graşi. Conform rezultatelor obţinute, pe extractul metanolic se constatã, în principal, prezenţa acizilor fenolcarboxilici, taninurilor catehice, compuşilor reducãtori, cumarinelor, respectiv heterozidelor triterpenice. În final pe extractul apos s-au evidenţiat urmãtoarele principii active: mucilagii şi saponozide cu proprietãţi detersive.

4.3. Determinarea umidităţii

Rezultatele obținute se încadrează în normele de calitate pentru produsele vegetale.

4.4. Determinarea substanţelor solubile

Prin această determinare punem în evidenţă cantitatea (exprimată în g%) substanţelor care se pot extrage în funcţie de solvent.

Tabelul IV.1. Determinarea substanţelor solubile în diferiţi solvenţi pentru fiecare tip de produs vegetal.

Tip de produs vegetal	Proba	Tip de solvent	Substanţe solubile g% ± abaterea standard (n=3)	Tip de produs vegetal	Proba	Tip de solvent	Substanţe solubile g% ± abaterea standard (n=3)
Herba (părţi aeriene)	H1	etanol 70%	30,4721 ± 0,2164	*Folium* (frunze)	F1	etanol 70%	30,9230 ± 0,0530
		etanol 50%	34,3678 ± 0,0030			etanol 50%	37,3263 ± 0,0533
		etanol 20%	36,4618 ± 0,2068			etanol 20%	39,9193 ± 0,0379
		Apã	34,3406 ± 0,0023			Apã	39,8207 ± 0,0006
	H2	etanol 70%	27,7466 ± 0,5178		F2	etanol 70%	30,8745 ± 0,2317
		etanol 50%	29,5662 ± 0,0371			etanol 50%	36,5696 ± 0,0284
		etanol 20%	34,1802 ± 0,0842			etanol 20%	39,4866 ± 0,0685
		Apã	31,9468 ± 0,0012			Apã	33,7807 ± 0,1063
	H3	etanol 70%	28,3446 ± 0,0224		F3	etanol 70%	38,6295 ± 0,1959
		etanol 50%	32,2954 ± 0,0377			etanol 50%	44,8601 ± 0,0901
		etanol 20%	34,1353 ± 0,0074			etanol 20%	47,3890 ± 0,1955
		Apã	30,0335 ± 0,2001			Apã	40,4680 ± 0,3408
	H4	etanol 70%	25,9839 ± 1,0013		F4	etanol 70%	29,5840 ± 0,1151
		etanol 50%	31,2247 ± 0,0825			etanol 50%	36,2109 ± 0,1165
		etanol 20%	35,5771 ± 0,1530			etanol 20%	42,1847 ± 0,1023
		Apã	25,6663 ± 0,1086			Apã	37,5457 ± 0,1438
Flores (flori)	FL 1	etanol 70%	36,4342 ± 0,3314	*Caulis* (tulpina)	C1	etanol 70%	26,1248 ± 0,6893
		etanol 50%	36,7727 ± 0,2728			etanol 50%	33,4137 ± 0,0530
		etanol 20%	37,3017 ± 0,3611			etanol 20%	35,6965 ± 0,0991
		Apã	36,8094 ± 0,0005			Apã	36,9994 ± 0,0011
	FL 2	etanol 70%	30,4120 ± 0,8151		C2	etanol 70%	19,1318 ± 0,1293
		etanol 50%	32,0383 ± 0,3561			etanol 50%	24,0898 ± 0,2056
		etanol 20%	33,0591 ± 0,2718			etanol 20%	25,2178 ± 0,1202
		Apã	28,1583 ± 0,5214			Apã	23,8367 ± 0,0226
	FL 3	etanol 70%	31,9521 ± 0,4447		C3	etanol 70%	24,6953 ± 0,0528
		etanol 50%	33,9347 ± 0,0693			etanol 50%	29,4511 ± 0,1333
		etanol 20%	34,8945 ± 0,0076			etanol 20%	29,7833 ± 0,0489
		Apã	30,2317 ± 0,0722			Apã	29,0932 ± 0,5202
	FL 4	etanol 70%	35,3686 ± 0,3942		C4	etanol 70%	22,3889 ± 0,5361
		etanol 50%	38,3826 ± 0,2928			etanol 50%	28,4214 ± 0,1513
		etanol 20%	41,0420 ± 0,0922			etanol 20%	29,8708 ± 0,1901
		Apã	38,9171 ± 0,0801			Apã	28,2125 ± 0,1271
Radix (rădăcina)	R1	etanol 70%	16,5349 ± 0,2114				
		etanol 50%	19,1022 ± 0,1783				
		etanol 20%	21, 3447 ± 0,2716				
		Apã	17,1352 ± 0,0025				
	R2	etanol 70%	20,2281 ± 0,6557				
		etanol 50%	25,4451 ± 0,1281				
		etanol 20%	24,7377 ± 0,0444				
		Apã	22,4734 ± 0,0015				

	R3	etanol 70%	27,8101 ± 0,0073
		etanol 50%	32,5118 ± 0,1795
		etanol 20%	34,4623 ± 0,0962
		Apã	28,8712 ± 0,0454
	R4	etanol 70%	23,8863 ± 0,1588
		etanol 50%	33,2257 ± 0,0507
		etanol 20%	29,7707 ± 0,0513
		Apã	24,5510 ± 0,1187

Legendã: H1, H2, H3, H4 (probele din pãrţile aeriene colectate în lunile mai, iunie, iulie, august), F1, F2, F3, F4 (probele din frunze colectate în lunile mai, iunie, iulie, august), FL1, FL2, FL3, FL4 (probele din flori colectate în lunile mai, iunie, iulie, august), C1, C2, C3, C4 (probele din tulpini colectate în lunile mai, iunie, iulie, august), R1, R2, R3, R4 (probele din rãdãcini colectate în lunile mai, iunie, iulie, august).
Notă: În tabel sunt evidenţiate (cu verde) valorile cele mai mari pentru produsul vegetal respectiv.

Concluzii. Conform rezultatelor obţinute, observãm cã principiile active au tendinţa de a se extrage într-un procent mai mare cu etanol 20% (v/v), acest lucru poate fi favorizat şi de faptul cã materialul vegetal conţine o cantitate mare de mucilagii.

4.5. Determinarea cantitativă a constituenţilor bioactivi

4.5.1. Determinarea conţinutului de flavone

Principiul metodei constã în determinarea intensitãţii coloraţiei galbene, printr-o metodă ce se bazează pe reacţia de complexare cu clorura de aluminiu ($AlCl_3$), flavonele extrase cu solvenţi hidrofili formând combinaţii complexe. Citirea absorbanţelor se realizează la λ = 427 nm faţă de martor, iar ca substanţă de referinţă se utilizează rutin.

Concluzii. Menţionãm cã rezultatele determinãrilor spectrofotometrice, în ceea ce priveşte conţinutul în flavone, în cazul produsului vegetal de tip *radix*, nu a fost detectatã în nicio probã, iar conţinutul cel mai ridicat în flavone a fost înregistrat în proba FL1-70, 7,1501 ± 2,4560 g echivalenţi rutin/100 g produs vegetal uscat (figura 4.1).

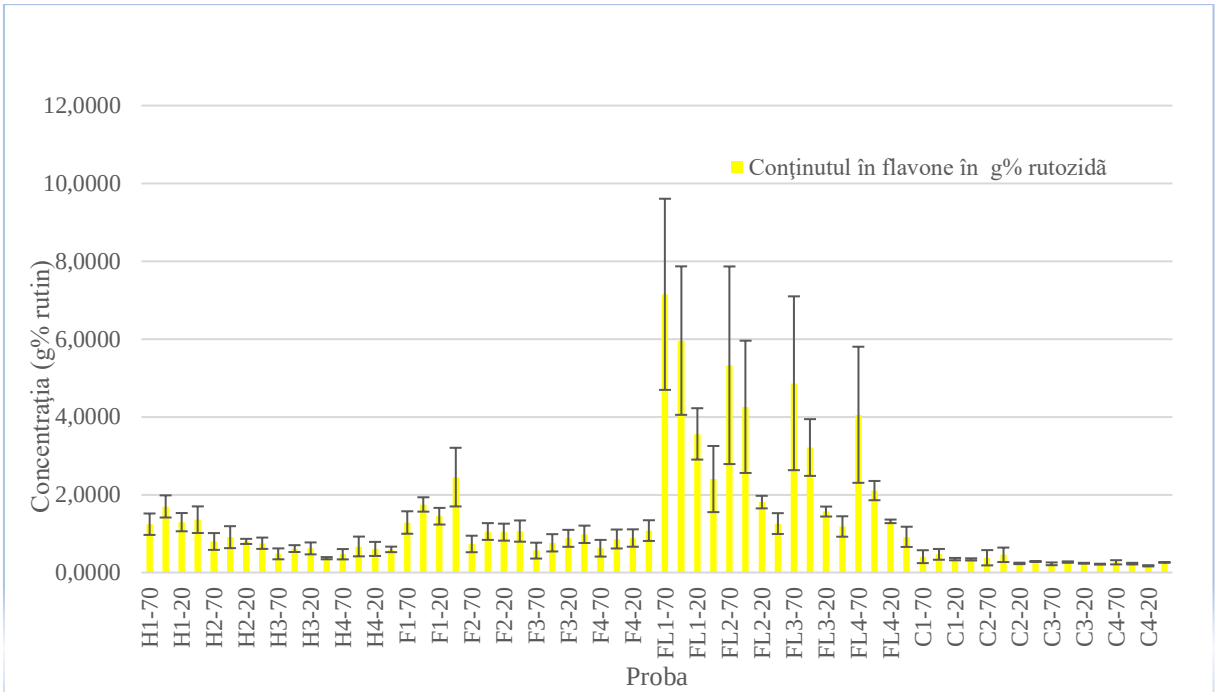

Figura 4.1. Rezultatele determinărilor spectrofotometrice, privind conţinutul în flavone – exprimaţi în g flavone (echivalenţi rutin)/100 g produs vegetal uscat.

4.5.2. Determinarea conţinutului de acizi fenolcarboxilici (AFC-uri)

Principiul metodei se bazează pe proprietatea AFC-urilor de a forma cu acidul azotos (HNO_2) nitrozoderivaţi, care prin tautomerizare spontană trec în izonitroderivaţi (oxime), care datorită caracterului lor slab acid, se dizolvă în soluţii alcaline, rezultând coloraţii roşii [63]. Citirea absorbanţelor se realizează la λ = 525 nm faţă de martor, iar ca substanţă de referinţă se utilizează acidul clorogenic.

Concluzii. Conform rezultatelor determinărilor spectrofotometrice, conţinutul cel mai ridicat în AFC-uri a fost înregistrat în proba FL1-50, 2,1480 ± 0,4541 g echivalenţi acid clorogenic/100 g produs vegetal uscat, în timp ce în produsul vegetal de tip *radix* s-a înregistrat cea mai mică cantitate (figura 4.2.).

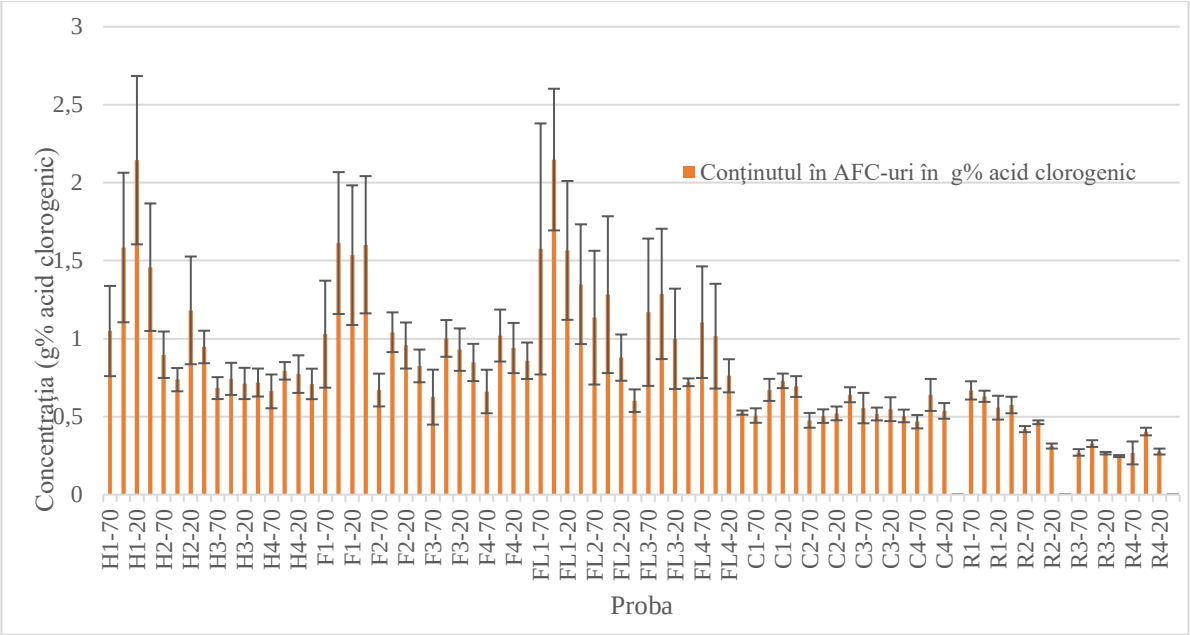

Figura 4.2. Rezultatele determinărilor spectrofotometrice, privind conţinutul în AFC-uri – exprimaţi în g AFC-uri (echivalenţi acid clorogenic)/100 g produs vegetal uscat.

4.5.3. Determinarea conţinutului de polifenoli totali

Principiul metodei se bazează pe proprietatea polifenolilor de a forma o coloraţie albastră, în prezenţa reactivului Folin-Ciocâlteu, la întuneric [63, 64]. Citirea absorbanţelor se realizează la λ = 763 nm faţă de martor, iar ca substanţă de referinţă se utilizează acidul tanic.

Conform rezultatelor, pentru conţinutul de polifenoli totali, valoarea cea mai mare s-a înregistrat pe proba FL1-50, obţinându-se 5,9601 ± 1,1547 g echivalenţi acid tanic/100 g produs vegetal uscat, în timp ce în produsul vegetal de tip *radix*, proba R4-A, s-a înregistrat cea mai micã cantitate, 0,3785 ± 0,0141 g echivalenţi acid tanic/100 g produs vegetal uscat (figura 4.3.).

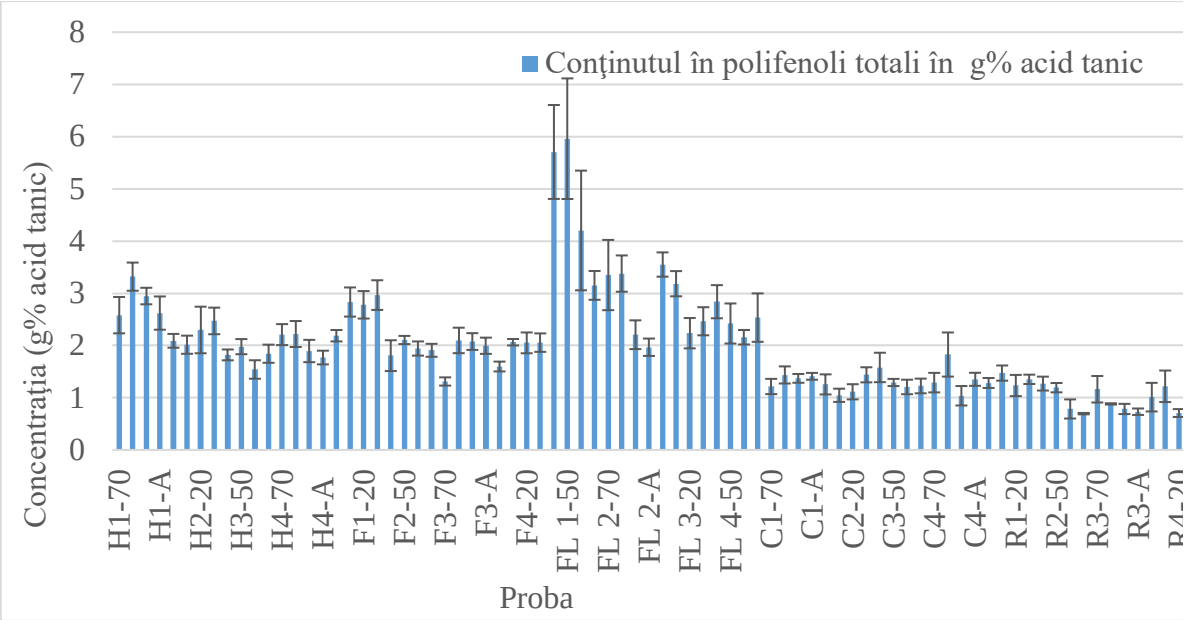

Figura 4.3. Rezultatele determinărilor spectrofotometrice, privind conţinutul în polifenoli totali – exprimaţi în g polifenoli totali (echivalenţi acid tanic)/100 g produs vegetal uscat.

4.5.4. Concluziile celor trei determinări spectrofotometrice

Conform rezultatelor obţinute, cantitatea cea mai abundentã de principii active se regãseşte cu precãdere în lotul de colectare din luna mai, proba FL1-70 cuprinde conţinutul cel mai ridicat în flavone, 7,1501 ± 2,4560 g echivalenţi rutin/100 g produs vegetal uscat, proba FL1-50 cel mai ridicat conţinut în AFC-uri, înregistrându-se 2,1480 ± 0,4541 g echivalenţi acid clorogenic/100 g produs vegetal uscat, şi totodată proba FL1-50 cel mai mare conţinut în polifenoli totali, 5,9601 ± 1,1547 g echivalenţi acid tanic/100 g produs vegetal uscat.

4.5.5. Analiza statistică a datelor obţinute

Analiza varianței (ANOVA) a fost efectuată pentru a evalua timpul optim de colectare. Comparațiile post hoc ale cantităților medii au fost făcute folosind testul post-hoc cu diferența cea mai mică (LSD - least significant difference). Diferențele au fost considerate semnificative atunci când valorile p au fost mai mici de 0,05 ($p < 0,05$). Momentul colectării (luna) a fost considerat un factor fix.

Compoziția chimică depinde de condițiile meteorologice (pedo-climatice) pentru fiecare lună în care s-a realizat colectarea. Cu toate acestea, această observație se suprapune cu dinamica de acumulare a compușilor, care variază în funcție de luna în care a fost colectată

planta. Rezultatele obținute cu ANOVA au indicat diferențe semnificative ($p < 0,05$) între produsele vegetale din plante analizate și timpul colectare pentru flavone în ceea ce privește părțile aeriene ($F = 16,539$, $p < 0,001$) și frunze ($F = 8,451$, $p = 0,002$), pentru acizi fenolici pentru rădăcini ($F = 62,545$, $p < 0,000$) și pentru polifenoli totali pentru frunze ($F = 14,308$, $p = 0,001$) și flori ($F = 10,943$, $p = 0,003$). Aceste observaţii se referă la rezultatele obţinute în etanol 70% (v/v).

Pentru etanol 50% (v/v), rezultatele obținute cu ANOVA au indicat diferențe semnificative ($p < 0,05$) între produsele vegetale din plante analizate și timpul de colectare pentru flavone în ceea ce privește părțile aeriene ($F = 11,230$, $p < 0,001$) și frunze ($F = 10,590$, $p = 0,001$), acizi fenolici pentru tulpini ($F = 8,230$, $p = 0,003$), polifenoli totali pentru flori ($F = 13,540$, $p = 0,001$) și rădăcini ($F = 9,470$, $p = 0,002$). Analiza post-hoc cu testul LSD a arătat că există diferențe semnificative statistic între conținutul în flavone din părțile aeriene și frunze ($p < 0,05$), între acizi fenolici din tulpini și celelalte părți ($p < 0.05$), și între polifenoli totali din flori și rădăcini ($p < 0,05$).

Pentru etanol 20% (v/v), rezultatele obținute din ANOVA au indicat diferențe semnificative ($p < 0,05$) între produsele vegetale din plante analizate și timpul de colectare pentru flavone în ceea ce privește părțile aeriene ($F = 16,539$, $p < 0,001$) și frunze ($F = 8,451$, $p = 0,002$), acizi fenolici pentru rădăcini ($F = 62,545$, $p < 0,001$), polifenoli totali pentru frunze ($F = 14,308$, $p = 0,001$) și flori ($F = 10,943$, $p = 0,003$). Analiza post-hoc cu testul LSD a arătat că există diferențe semnificative statistic între conținutul de flavone din părțile aeriene și frunze ($p < 0,05$), între acizi fenolici din rădăcini și celelalte părți ($p < 0,05$), și între polifenoli totali din frunze și flori ($p < 0,05$).

Pentru apa distilată (v/v) folosită ca solvent de extracţie rezultatele obținute din ANOVA au indicat diferențe semnificative ($p < 0,05$) între produsele vegetale din plante analizate și timpul de colectare pentru flavone în ceea ce privește părțile aeriene ($F = 9,345$, $p < 0,001$) și frunze ($F = 7,543$, $p = 0,003$), acizi fenolici pentru tulpini ($F = 12,234$, $p < 0,001$), polifenoli totali pentru flori ($F = 10,789$, $p = 0,002$) și rădăcini ($F = 8,456$, $p = 0,004$). Analiza post-hoc cu testul LSD a arătat că există diferențe semnificative statistic între conținutul de flavone din părțile aeriene și frunze ($p < 0,05$), între acizi fenolici din tulpini și celelalte părți ($p < 0,05$), și între polifenoli totali din flori și rădăcini ($p < 0,05$).

4.6. Determinarea cantitativă a constituenţilor lipofili – dozarea uleiului volatil

Conform literaturii de specialitate s-a evidenţiat prezenţa componentelor volatile [20, 22, 24] în compoziţia speciei studiate. Ne-am propus obţinerea uleiului volatil din fiecare tip de organ vegetal proaspăt, din fiecare lot, şi ulterior identificarea constituenţilor din compoziţia acestora.

Concluzii. Uleiul volatil se prezintă sub forma unui lichid vâscos, de culoare gălbuie, aderent de pereţii aparatului, caracterele organoleptice neputând fi determinate datoritã adãugării xilenului. Cantitatea uleiului volatil fiind foarte micã, din aceste considerente ne-am decis sã renunţãm la aceastã analizã.

5. STABILIREA PROCEDEULUI TEHNOLOGIC DE OBŢINERE A EXTRACTULUI USCAT (*AJUGAE CHAMAEPITYSIS HERBA EXTRACTUM* - FAZA DE LABORATOR)

Pentru continuarea cercetãrile, am decis sã obţinem un extract liofilizat din proba H1-50 (*herba* lotul de colectare din luna mai, folosind ca solvent de extracţie etanol 50% (v/v)), deoarece florile, după uscare, se prezintă într-o cantitate foarte micã pentru a ne continua analizele, iar extractul etanolic 50% (v/v) reprezintă solventul optim pentru extragerea principiilor active. Solvenții și condițiile experimentale utilizate sunt prezentate la fiecare pas. De asemenea, menționăm că această specie răspândită în zona Dobrogei nu indică probleme de periclitare a materiei prime vegetale, specia este adaptată la condițiile pedoclimatice din această regiune a țării, creşte spontan și este foarte abundentă. Aditional, speciile *Ajuga* au fost documentate ca repelenţi pentru insecte, este protejată de dăunători, este rezistentă și bine adaptată mediului.

Rezultate. După procesul de liofilizare s-a obţinut în total o cantitate de 52 g de extract liofilizat ce s-a păstrat în exsicator. Extractul obţinut se prezintă sub forma unei pulberi higroscopice, de culoare verde cu miros caracteristic persistent. Extractul liofilizat prezintă un randament de 28,4463% raportat la produsul vegetal uscat.

5.1. Determinarea stabilităţii extractului uscat – *Ajugae chamaepitysis herba extractum* (ACHE)

Pentru a aprecia dacă extractul liofilizat este stabil din punct de vedere calitativ şi cantitativ, se va determina conţinutul de principii active, şi anume conţinutul în flavone, AFC-uri, polifenoli totali, conform metodologiei descrise anterior. Aceste determinări se vor realiza la aproximativ o lunã de la obţinerea extractului, respectiv la 3, 6, 9 şi 12 luni.

Rezultate. Rezultatele obţinute sunt evidenţiate în Figura 5.1.

Concluzii. Conform rezultatelor obţinute, extractul liofilizat s-a stabilizat în timp, caracteristicile organoleptice neprezentând modificări, deoarece preparatul s-a păstrat în condiţii optime.

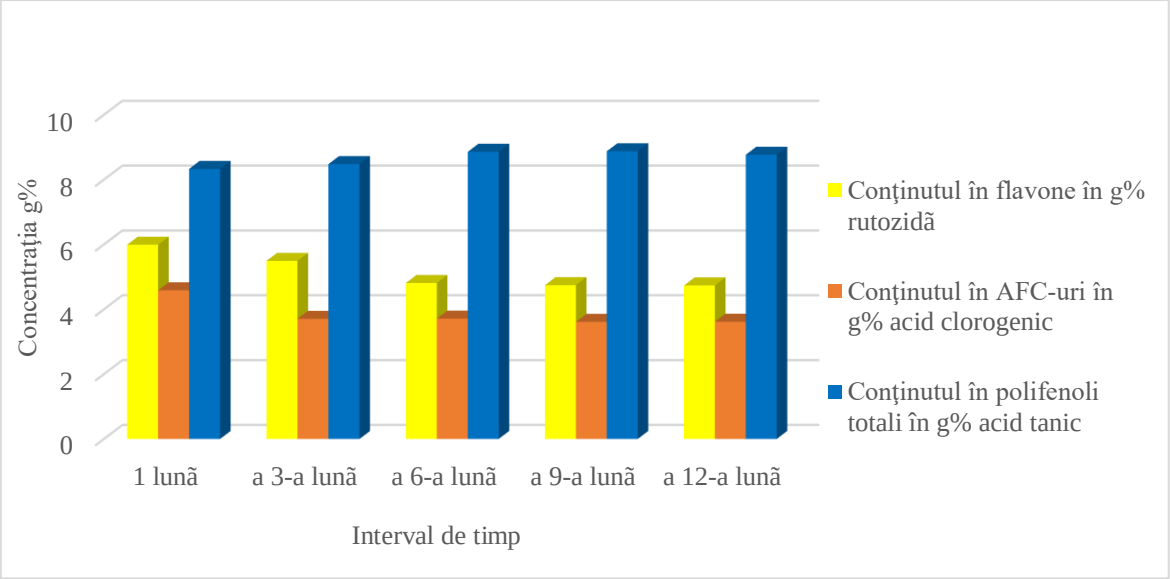

Figura 5.1. Determinarea conţinutului de principii active pe extractul uscat ACHE la diferite intervale de timp.

5.2. Identificarea și cuantificarea compușilor polifenolici din ACHE prin cromatografie de lichide ultra-performantă cuplată cu spectrometrie de masă de înaltă rezoluție (UHPLC-HRMS/MS)

Rezultate. Au fost identificați în total 19 compuși polifenolici: apigenin, kaempferol, naringenin, crisin, genistin, 2′,6-dihidroxiflavona, acid cafeic, biochanin A, pratensein, kaempferol-3-O-rutinozida, kaempferol (sau luteolin)- O-glucozida/izomeri, vitexin (apigenin 8-C-glucozida)/izovitexin, apigetrin (apigenin-7-glucozida), cinarozida (luteolin-7-O-glucozida), apigenin 7-O-glucozilglucozida, hispidulin, luteolin, apigenin-7-O-glucuronida și acid clorogenic. Acești compuși fac parte din grupul flavonoidelor, izoflavonelor și acizilor fenolici. Au fost cuantificați cantitativ 13 compuși fitochimici.

6. DETERMINAREA CITOTOXICITĂŢII EXTRACTULUI

Artemia și *Daphnia* sunt două crustacee utilizate pe scară largă pentru evaluarea farmacotoxicologică și a toxicității de mediu a compușilor chimici și a extractelor de plante. Ambele modele oferă date preliminare cu privire la intervalele de concentrație biologic active și pot prezice mai precis decât testul *in silico* concentrațiile letale pentru teste ulterioare. Testul embrionar pe *Daphnia embrio* poate oferi informații suplimentare privind influența extractului asupra dezvoltării embrionilor și riscurile potențiale de teratogenitate. Aceste date preliminare sunt foarte utile în teste non-clinice pe specii mai evoluate (ex. șoareci și șobolani).

6.1. Testarea activităţii citotoxice *in vivo* pe modelul *Artemia salina* L.

Evaluarea citotoxicităţii pe larvele de *Artemia salina* L. este un test dezvoltat şi adaptat ca unul din cele mai rapide şi eficiente datoritã sensibilităţii larvelor la o varietate de substanţe chimice [81, 82, 83]. Testul este considerat un instrument util pentru evaluarea toxicității preliminare a extractelor de naturã vegetalã sau animalã. Testul este o modalitate eficientă, ieftinã și relativ rapidă de a detecta compuși toxici, necesitând doar cantități mici de probă, şi anume mai puţin de 20 mg. Analiza probitului este o metodă de analiză a relației dintre un stimul (doza) și răspunsul binomial.

Concluzii. Valoarea LC_{50} ce exprimã mortalitatea a 50% dintre subiecţi este mai mare de 1000 μg/mL ceea ce ne aratã o acţiune citotoxicã scãzutã.

6.2. Testarea activităţii citotoxice *in vivo* pe speciile de *Daphnia*

Concluzii. Cercetarea noastră a constatat că utilizarea ambelor specii este avantajoasă, deoarece fiecare a dat răspunsuri unice de sensibilitate, servind astfel ca un instrument valoros pentru identificarea potențialelor efecte toxice induse de extractele din plante. Cu toate acestea, toxicitatea a fost evidentă numai la concentrații semnificativ mai mari decât cele utilizate în mod obișnuit în fitoterapie.

6.3. Testul de dezvoltare a embrionului *Daphnia magna* (*Daphnia magna* Embryo test)

Testele de toxicitate asupra speciilor *Daphnia* au arătat că extractul a prezentat toxicitate scăzută până la moderată, efectele fiind dependente de concentrație. În timp ce concentrațiile mai mari au afectat *Daphnia pulex* în mod semnificativ și au întârziat dezvoltarea embrionului de *Daphnia magna*, nu au fost observate efecte teratogene, indicând o siguranță relativă la concentrații mai mici. Testul embrionar pe embrionii *D. magna* poate fi utilizat pentru a identifica potențialele efecte teratogene. În cercetarea noastră, testul de dezvoltare embrionară

pe *D. magna* a elucidat în continuare impactul extractului. Astfel, între 50 și 500 µg/mL, stadiile de dezvoltare și viabilitatea au fost ușor mai scăzute sau comparabile cu controlul netratat, în timp ce la 1000 µg/mL, o concentrație foarte ridicată, viabilitatea a fost redusă, dezvoltarea larvelor a fost întârziată și s-au observat modificări anormale.

7. CERCETĂRI *IN VITRO* ASUPRA ACTIVITĂŢII ANTIOXIDANTE

Activitatea antioxidantă a extractelor a fost determinată pe baza capacităţii de scavenger a radicalilor liberi DPPH (2,2-difenil-2-picril-hidrazil), $ABTS^{\bullet+}$ (acid 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) şi pe baza capacităţii de reducere a ferului.

Rezultatele noastre au arătat că ACHE are o activitate antioxidantă semnificativă, confirmând rezultatele altor cercetători. Mai mult, chiar dacă efectul de captare a radicalilor liberi al ACHE este de câteva ori mai mic decât activitatea antioxidantă de referință (extract IC_{50}DPPH = 529,4 µg/mL mai mare decât IC_{50}acid ascorbic = 16,5 µg/mL), putem observa că coeficienții Pearson privind valorile DPPH și concentrațiile compușilor chimici (valorile din prima lună de după extracţie: 59,932 ± 21,167 mg echivalenţi rutin/g extract uscat, 45,864 ± 4,434 mg echivalenţi acid clorogenic/g extract uscat şi, respectiv, 83,307 ± 3,989 mg echivalenţi acid tanic acid/g extract uscat) de care generează efectul au atins cel mai înalt nivel semnificativ (DPPH vs FC (FC = conţinutul în flavone): $r = 0,9959$, $p < 0,05$; DPPH vs PAC (PAC= conţinutul în acizi fenolici) $r = 0,9991$, $p < 0,001$; DPPH vs TPC (TPC = conţinutul în polifenoli totali): $r = 0,9704$, $p < 0,05$). Drept urmare, s-a observat o corelație pozitivă, puternică între DPPH și FC ($r = 0,9959$, $p = 0,009$), PAC ($r = 0,9991$, $p < 0,001$) și TPC ($r = 0,9704$, $p = 0,0367$). O corelație negativă semnificativă a fost găsită între $ABTS^{\bullet+}$ și FC ($r = -0,9639$, $p < 0,0386$) și PAC ($r = -0,9719$, $p = 0,0249$). Nu a fost găsită o corelație semnificativă între FRAP și conținutul în compuși polifenolici. Aceste rezultate au evidențiat precizia corelației dintre variabile precum și gradul ridicat de acuratețe al metodei DPPH în contrast cu celelalte tehnici antioxidante.

7.5. Concluzii

Rezultatele obținute au fost concludente, conținutul de compuși fitochimici jucând un rol principal în îmbunătățirea procesului de oxidare prin captarea radicalilor liberi, chelatarea ionilor metalici și eliminarea oxigenului din sistemele biologice.

8. DETERMINAREA ACTIVITĂŢII ANTIMICROBIENE

Determinarea acțiunii antimicrobiene a extractului s-a realizat prin metoda difuzimetrică și metoda diluțiilor, pe mediile de culturã cu tulpinile de referinţã, bacili gram (-) negativi: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 şi coci gram (+) pozitivi: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 23235. ACHE manifestă efect inhibitor asupra tulpinilor bacteriene, mai eficient fiind asupra *Escherichia coli* şi *Staphylococcus aureus*. Valorile bactericide sunt înregistrate la concentraţii mari de peste 18 mg/mL şi chiar 40 mg/mL, date care relevă potenţialul antimicrobian.

9. SIMULĂRI DE DOCKING MOLECULAR PENTRU PREDICŢIA *IN SILICO* A INTERACŢIUNILOR CU ŢINTE BIOLOGICE

9.1. Predicția țintelor moleculare si docking molecular

Potentialele ţinte moleculare au fost prezise pentru mai multe substanțe fitochimice (apigenin, galangin, genistein, kaempferol, naringenin, acid cafeic, acid ferulic și acid p-cumaric), care au fost găsite în cantități mai mari pe baza analizei UHPLC-HRMS/MS. În urma unei analize a rezultatelor predicției, am selectat CDK5 și GSK-3β ca potențiali candidați țintă pentru polifenolii investigați, ambele kinaze fiind implicate în fiziopatologia bolilor neurodegenerative și a durerii neuropatice. După cum se arată, apigenina a fost prezisă ca inhibitor CDK5 cu o probabilitate de 100% de către SwissTargetPrediction și cu o probabilitate de 7,8% conform PASS. Mai mult, apigenin a avut o valoare maximă a TC de 61,54% atunci când a fost asociată cu inhibitori cunoscuți ai CDK5. În plus, apigenin a avut o probabilitate estimată de 100% de a arăta activitate inhibitoare a GSK-3β conform algoritmului SwissTargetPrediction și o valoare maximă de 100% TC atunci când este asociată cu inhibitori GSK-3β cunoscuți. După căutarea în baza de date ChEMBL [114], am constatat că apigenin inhibă atât activitățile CDK5/p25, cât și GSK-3β, cu potențe similare (valori IC_{50} de 1,6 μM și, respectiv, 1,9 μM). Un alt compus interesant a fost kaempferol, pentru care algoritmul SwissTargetPrediction a prezis o probabilitate de 51,79% de a inhiba CDK5 și o probabilitate de 65,80% de a inhiba activitatea GSK-3β, în timp ce algoritmul PASS a dat o probabilitate de 6,9% de a acționa ca inhibitor GSK-3β. Un studiu anterior a arătat că kaempferolul inhibă CDK5/p25 cu o valoare IC_{50} de 51 μM, dar activitatea pe GSK-3β nu a fost investigată. În plus, galangin a fost prezis cu SwissTargetPrediction să aibă o probabilitate de 14,97% de a

inhiba CDK5 și 16,61% de a inhiba GSK-3β, în timp ce PASS a prezis o probabilitate de 9,80% de a fi activ pe CDK5. Interesant, SEA a calculat o similitudine de 45,65% între galangin și inhibitorii CDK5. Deși naringenin a fost prezis ca un potențial inhibitor CDK5 și GSK-3β numai de SwissTargetPrediction, studiile anterioare au arătat că glicozida sa, naringina, inhibă GSK-3β cu un IC_{50} de 100 μM.

Studiile de andocare moleculară au fost efectuate în continuare pentru a estima potențialul de legare dintre polifenolii evaluați și țintele de proteine care au fost selectate pe baza predicțiilor PASS, SwissTargetPrediction și SEA. Astfel, simulările de andocare au fost efectuate împotriva CDK5 și GSK-3β, ambele structuri cristaline fiind în conformații active (arhitectura αCin), deoarece resturile de glutamat αC-helix (Glu51 în CDK5 și Glu97 în GSK-3β) au format punți de sare cu β3 - resturi de catene lizină (Lys33 în CDK5 și Lys85 în GSK-3p). Protocolul de andocare a fost validat prin suprapunerea pozițiilor prezise ale liganzilor co-cristalizați pe conformațiile experimentale. Valorile RMSD calculate au fost 0,7023 Å pentru inhibitorul CDK5 și 1,2459 Å pentru inhibitorul GSK-3β, ambele valori fiind mai mici decât pragul de 2,0 Å.

Concluzii. Studiile *in silico* au evidențiat posibilitatea inhibării activității protein kinazelor CDK5 și GSK-3b pentru apigenin, galangin și kaempferol, cu posibilă utilitate pentru tratarea patologiilor neurodegenerative și a durerii neuropatice. În concluzie, conform analizei efectuate, s-a demonstrat că *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb., care este răspândită în flora spontană a Dobrogei, România, poate fi o sursă importantă de polifenoli cu potențială activitate inhibitorie asupra unor ținte specifice în boli neurodegenerative și dureri neuropatice.

9.2. Simulări de dinamică moleculară

Simulările de dinamică moleculară (MD) au fost realizate pentru a evalua suplimentar rezultatele studiului de docking molecular și pentru a analiza stabilitatea complexelor prezise proteină-ligand. Astfel, au fost supuse simulărilor următoarele structuri: CDK5/p25 fără ligand (apo) – structură martor negativ; GSK-3β fără ligand (apo) – structură martor negativ; CDK5/p25 în complex cu apigenin – structură martor pozitiv (complex cu inhibitor de referință); GSK-3β în complex cu apigenin – structură martor pozitiv (complex cu inhibitor de referință); CDK5/p25 în complex cu galangin – complex investigat cu inhibitor presupus; GSK-3β în complex cu kaempferol – complex investigat cu inhibitor presupus.

Concluzii. Simulările de dinamică moleculară efectuate pentru CDK5 și GSK-3β în stare liberă și legată oferă perspective cuprinzătoare asupra stabilității, modificărilor conformaționale și dinamicii interacțiunilor acestor protein kinaze cu fitocompușii studiați. Simulările au avut o durată de 100 ns și au inclus analize ale RMSD, RMSF, razei de girație și numărului de legături de hidrogen intramoleculare.Pentru ambele proteine apigenin a fost utilizat ca ligand de referință, acesta având o activitate inhibitorie demonstrată asupra celor 2 kinaze. În ceea ce privește complexul CDK5 cu proteine activatoare p25, se pare că apigenin și galangin induc modificări conformaționale ale acestuia, probabil alterând stabilitatea complexului activat pe lângă mecanismul competitiv presupus. Pe de altă parte, apigenin și kaempferol cresc stabilitatea conformațională a GSK-3β în timp.

În concluzie, rezultatele studiului computațional sugerează că interacțiunile dintre kaempferol și GSK-3β sunt mai stabile decât cele formate între galangin și CDK5/p25, o posibilă activitate inhibitorie a kaempferolului fiind susținută de simulări de dinamică moleculară într-o măsură mai mare.

CONCLUZII FINALE ŞI CONTRIBUŢII PERSONALE

Concluzii generale

Cercetarea efectuată în cadrul tezei a fost realizată în scopul de a colecta date preliminare în ceea ce priveşte compoziţia chimică a speciei *Ajuga chamaepitys* (L.), colectată din flora spontană a Cheilor Dobrogei, România. (44°29′16.5″ N–28°27′09.5″ E), ce presupune determinarea conţinutului în flavone, polifenoli și acizi fenolici în extracte hidroalcoolice (etanol 70%, 50%, 20%) şi apoase colectate în diferite luni de înflorire. Rezultatele obţinute din toate cele patru loturi de analiză au fost mai mari la probele de flori din luna mai. Astfel, s-a stabilit intervalul optim de colectare, solventul şi produsul vegetal cu cantitatea cea mai mare în principii active (s-a luat în lucru produsul vegetal de tip *herba*, deoarece florile se prezentau într-o cantitate mică pentru a efectua analizele). Conform rezultatelor obținute, s-a demonstrat că *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb., din flora spontană, posedă cantități notabile de constituenți chimici, ceea ce ne face să luăm în considerare importanța acestei plante din punct de vedere terapeutic. Ulterior, pe aceste considerente, s-a obţinut un extract uscat selectiv ce a fost evaluat din punct de vedere calitativ si cantitativ. Cercetarea pe *Ajugae chamaepitysis herba extractum* desfăşurându-se în mai multe etape: stabilirea calității materiei prime vegetale; obţinerea şi caracterizarea chimică a extractului

uscat prin metode spectrofotometrice (dozare flavone, AFC-uri şi polifenoli totali) şi cromatografice (UHPLC-HRMS/MS); evaluarea capacităţii antioxidante prin 3 metode (DPPH, ABTS•+, FRAP); determinarea citotoxicității *in vivo* asupra larvelor de *Artemia* sp. (BSLA) și *Daphnia*; determinarea potențialului teratogen prin testul embrionar pe embrioni de *Daphnia magna*; determinări *in silico* (studii de andocare moleculară pentru potențialul de inhibare a activității protein kinazelor CDK5 și GSK-3b pentru apigenin, galangin și kaempferol, cu posibilă utilitate pentru tratarea patologiilor neurodegenerative și neuropatice); determinarea activităţii antimicrobiene pe agenţi patogeni de interes din punct de vedere clinic. Toate rezultatele fiind prelucrate statistic. Conform rezultatelor obținute, s-a demonstrat că *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb., din flora spontană, posedă cantități notabile de constituenți chimici, ceea ce ne face să luăm în considerare importanța acestei plante din punct de vedere terapeutic. Conform studiilor prezentate, din literatura şi din analizele efectuate de noi, în ceea ce privește compoziția chimică, această plantă cuprinde mai multe grupe de principii active cum ar fi: ulei volatil, iridoide, triterpene, diterpene neoclerodani, heterozide steroidice (ecdisterone), flavonoide, antociani, derivați ai acizilor polifenoli-carboxilici, polifenoli totali si rezine, fapt ce explică utilizarea acestei specii în medicina tradiţională.

Flora spontană a României ne oferă o multitudine de posibilităţi de explorare și valorificare prin cercetare, această specie reprezentând o sursă de compuși bioactivi fundamentată științific.

Gradul de originalitate

În țara noastră această specie cu potențial medicinal important, conform literaturii de specialitate, uitată în medicină populară, nu a fost explorată și nu au fost realizate studii în ceea ce privește efectul terapeutic și compoziția chimică. Totodată, în alte țări au fost realizate studii pe modele *in vitro* și mai puțin *in vivo*, având prilejul de a continua cercetările și în acestă perspectivă. Menţionam ca aceasta este prima cercetare realizată pe această specie din ţara noastră.

Perspective în cercetare

Această specie poate permite înglobarea principiilor active sub forma unui supliment alimentar cu beneficii asupra organismului uman. Datorită conţinutului în iridoide se poate explora acţiunea antiinflamatoare şi analgezică pe modele *in vivo*, permiţând realizarea unei

forme farmaceutice cu aplicare topică (de tip gel sau plasture) pentru suprimarea durerii în artralgii (e.g. în artrita gutoasă).

Bibliografie selectivă

1. **Ionus, E.;** Gîrd C.E.; Bucur, L.A. *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb., potential resource of active principles, Congresul Național de Farmacie Ediția a XVIIIa, Oradea, 2021, rezumat publicat în Broșura Congresului: Farmacia. De la inovare la buna practică farmaceutică, ISBN: 978-606-10-2144-4.
2. Costea, L.; Ghica, M.; Costea, T.; Gîrd, C.E. Spectrophotometric evaluation of flavonoids, phenolcarboxylic acids and total phenolic contents of several indigenous herbal products with potential hepatoprotective effect. *Farmacia*, 2021, *69*, 1176–1181. 10.31925/farmacia.2021.6.23.
3. Camps, F.; Coll, J. Insect allelochemicals from *Ajuga* plants. *Phytochemistry*. 1993, *32*, 1361–1370. 10.1016/0031-9422(93)85139-I.
4. **Ionus, E.;** Gîrd C.E.; Bucur, L.A. *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb., potential resource of active principles, Congresul Național de Farmacie Ediția a XVIIIa, Oradea, 2021, rezumat publicat în Broșura Congresului: Farmacia. De la inovare la buna practică farmaceutică, ISBN: 978-606-10-2144-4.
5. Costea, L.; Ghica, M.; Costea, T.; Gîrd, C.E. Spectrophotometric evaluation of flavonoids, phenolcarboxylic acids and total phenolic contents of several indigenous herbal products with potential hepatoprotective effect. *Farmacia*, 2021, *69*, 1176–1181. 10.31925/farmacia.2021.6.23.
6. **Ionus, E.**; Schröder, V.; Chiţescu, C.L.; Bucur, L.A.; Lupu, C.E.; Dumitrescu, D.-E.; Popescu, L.; Mihai, D.P.; Olaru, O.T.; Nițulescu, G.M.; Boscencu, R.; Gîrd, C.E. Phytochemical, *In Vitro*, *In Vivo*, and *In Silico* Research on the Extract of *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. Plants 2024, 13, 1192. 10.3390/plants13091192.
7. **Ionus, E.;** Schröder, V.; Grigore, S.; Gîrd, C.E. Biological effects of the selective dry extract *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. (2023). Symposium with international participation: Alternative and complementary therapies (Homeopathy/Phytotherapy), 7th edition, Constanța, 27-28 octombrie, rezumat publicat în *Book of abstracts*, ISSN: 2601-1476.
8. Toğulga, M.; The Short-Term toxicity of two toxicants to *Artemia Nauplii*. *Tr. J. of Zoology*. 1998, *22*(3), 259-266.

9. Nunes, B.S.; Carvalho, F.D.; Guilhermino, L.M.; Van Stappen, G. Use of the genus Artemia in ecotoxicity testing. *Environ Pollut.* 2006, *144*(2), 453-62. 10.1016/j.envpol.2005.12.037.

10. Dvořák, P.; Zďárský, M.; Beňová, K. Possibilities of alternative generation II biotests at *Artemia*. *Interdiscip Toxicol.* 2009, *2*(2), 45-47. 10.2478/v10102-009-0008-0.

11. Rajeh, M,A.; Kwan, Y.P.; Zakaria, Z.; Latha, L.Y.; Jothy, S.L.; Sasidharan, S. Acute toxicity impacts of Euphorbia hirta L extract on behavior, organs body weight index and histopathology of organs of the mice and *Artemia salina*. *Pharmacognosy Res.* 2012, *4*(3), 170-177. 10.4103/0974-8490.99085.

12. Popovici, V.; Bucur, L.A.; Schröder, V.; Gherghel, D.; Mihai, C.T.; Caraiane, A.; Badea, F.C.; Vochița, G.; Badea, V. Evaluation of the Cytotoxic Activity of the *Usnea barbata* (L.) F. H. Wigg Dry Extract. *Molecules.* 2020, *25*(8), 1865. 10.3390/molecules25081865.

13. Iancu, I.M.; Bucur, L.A.; Schroder, V.; Mireşan, H.; Mihai, S.; Iancu, V.; Badea, V. Phytochemical evaluation and cytotoxicity assay of *Lythri herba* extracts. *Farmacia.* 2021, *69*(1), 52-58. 10.31925/farmacia.2021.1.7.

14. Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R,; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; McLaughlin, J.L.; Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 1982, *45*(5), 31-34. 10.1055/s-2007-971236.

15. Solis, P.N.; Wright, C.W.; Anderson, M.M.; Gupta, M.P.; Phillipson, J.D.; A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Med.* 1993, *59*(3), 250-252. 10.1055/s-2006-959661.

16. Schröder, V.; Bucur, A. L.; Iancu, I. M.; , Honcea, A.; Buşuricu, F. The crustacean species as in vivo testing model – advantages and possible applications in the nutrition or pharmaceutical field, *In Proceedings of the Nutrition, Diet Therapy & Food Safety in the Context of the COVID-19*, Bucharest, Romania, 28-29 May 2020, 205-211, ISBN 978-88-85813-91-5.

17. Popovici, V.; Bucur, L.A.; Schröder, V.; Gherghel, D.; Mihai, C.T.; Caraiane, A.; Badea, F.C.; Vochița, G.; Badea, V. Evaluation of the Cytotoxic Activity of the *Usnea barbata* (L.) F. H. Wigg Dry Extract. *Molecules.* 2020, *25*(8), 1865. 10.3390/molecules25081865.

18. **Ionus**, E.; Gîrd, C.E.; Bucur, L.A. Evaluation of antioxidant capacity and phytochemical screening of dry extract of *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. (2021). Symposium

with international participation: Alternative and complementary therapies (Homeopathy/Phytotherapy), 4th edition, Constanța, 26-27 martie, rezumat publicat în *Book of abstracts*, ISSN: 2601-1476.

19. Ao, C.; Li, C.; Chen, J.; Tan, J.; Zeng, L. The role of Cdk5 in neurological disorders. *Front Cell Neurosci.* 2022, *16*, 951202. 10.3389/fncel.2022.951202.

20. Maixner, D.W.; Weng, H.R. The Role of Glycogen Synthase Kinase 3 Beta in Neuroinflammation and Pain. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2013, *1*(1), 001. 10.13188/2327-204X.1000001.

21. Mendez, D.; Gaulton, A.; Bento, A. P.; Chambers, J.; De Veij, M.; Félix, E.; Magariños, M. P.; Mosquera, J. F.; Mutowo, P.; Nowotka, M.; Gordillo-Marañón, M.; Hunter, F.; Junco, L.; Mugumbate, G.;Ro driguez-Lopez, M.; Atkinson, F.; Bosc, N.; Radoux, C. J.; Segura-Cabrera, A.; Hersey, A.; Leach, A. R. ChEMBL: towards direct deposition of bioassay data. *Nucleic acids research*, 2019, *47*(D1), D930–D940. 10.1093/nar/gky1075.