



Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați  
Școala Doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



**TEZĂ DE DOCTORAT**  
**STUDIUL COMPUȘILOR CHIMICI**  
**DIN SPECII DE PLANTE DE INTERES TERAPEUTIC**  
**(Rezumatul tezei de doctorat)**

Doctorand,  
Anna Cazanevscaia (Busuioc)

Conducător științific,  
Prof. univ. dr. chim. habil. Rodica Mihaela Dinică

Teza de doctorat a fost realizată cu sprijinul proiectului ”Exceleța academică și valori antreprenoriale - sistem de burse pentru asigurarea oportunităților de formare și dezvoltare a competențelor antreprenoriale ale doctoranzilor și postdoctoranzilor” ANTREPENORDOC, cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Capital Uman, 2014-2020, Contract nr. 36355/23.05.2019 POCU/380/6/13 - Cod SMIS: 123847.”

Seria C: Chimie Nr. 7

Galați, 2023



Universitatea  
Ștefan cel Mare  
Suceava



ICGEON S.A.  
CENTRUL DE DEZVOLTARE COMERCIALĂ ȘI INOVARE ÎN SERVICIU  
REGISTRAT ÎN FIȘA COMERȚULUI ȘI BĂNII ROMÂNIEI



CAMERA DE COMERȚ, INDUSTRIE,  
NAVIGATIE ȘI AGRICULTURĂ CONSTANȚA  
Împreună creștem afacerea ta



Anna CAZANEVSCAIA (BUSUIOC)

STUDIUL COMPUȘILOR CHIMICI DIN  
SPECII DE PLANTE DE INTERES  
TERAPEUTIC

**Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați**

**Școala Doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești**



**TEZĂ DE DOCTORAT**  
**STUDIUL COMPUȘILOR CHIMICI**  
**DIN SPECII DE PLANTE DE INTERES TERAPEUTIC**  
**(Rezumatul tezei de doctorat)**

**Doctorand,**

**Anna Cazanevscaia (Busuioc)**

**Președinte**

**Acad. prof. dr. ing. Eugen Victor Cristian Rusu**  
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați

**Conducător științific**

**Prof. univ. dr. chim. habil. Rodica Mihaela Dinică**  
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați

**Referenți științifici**

**CS. grad I dr. chim. Mariana Pinteală**  
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași

**Conf. dr. chim. habil. Gheorghită Zbancioc**  
Universitatea "Alexandru Ioan Cuza" din Iași

**Prof. dr. chim. habil. Constantin APETREI**  
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați

**Seria C: Chimie Nr. 7**

**Galați, 2023**

Seriile tezelor de doctorat susținute public în UDJG începând cu 1 octombrie 2013 sunt:

Domeniul fundamental ȘTIINȚE INGINEREȘTI

- Seria I 1: **Biotehnologii**
- Seria I 2: **Calculatoare și tehnologia informației**
- Seria I 3: **Inginerie electrică**
- Seria I 4: **Inginerie industrială**
- Seria I 5: **Ingineria materialelor**
- Seria I 6: **Inginerie mecanică**
- Seria I 7: **Ingineria produselor alimentare**
- Seria I 8: **Ingineria sistemelor**
- Seria I 9: **Inginerie și management în agricultură și dezvoltare rurală**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE ECONOMICE

- Seria E 1: **Economie**
- Seria E 2: **Management**
- Seria SSEF: **Știința sportului și educației fizice**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE UMANISTE

- Seria U 1: **Filologie - Engleză**
- Seria U 2: **Filologie - Română**
- Seria U 3: **Istorie**
- Seria U 4: **Filologie - Franceză**

Domeniul fundamental MATEMATICĂ ȘI ȘTIINȚE ALE NATURII

- Seria C: **Chimie**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE BIOLOGICE ȘI BIOMEDICALE

- Seria M: **Medicină**

## Mulțumiri

Visul meu nu ar fi putut fi realitate niciodată fără acești minunați oameni, spațiul dedicat recunoștinței în urma unui imens puzzle care s-a construit cu lacrimi și cu zâmbete, este mult prea mic.

Fundamentarea științifică, realizarea experimentelor, elaborarea conținutului tezei și a tuturor experiențelor ce stau în spatele acestei teze de doctorat nu ar fi fost posibile fără participarea tuturor acestor persoane, cu imense recunoștințe și un deosebit respect, vă mulțumesc.

Îmi aduc deplina mea recunoștință unei doamne deosebite, doamnei **Prof. univ. dr. habil Rodica Mihaela Dinică**, conducător științific, profesionist dedicat, care face totul cu pasiune și dragoste. Ajutorul continuu, sfaturile și îndemnul domniei sale, au fost motorul care a făcut posibilă realizarea fiecărei etape din această lucrare. Vă mulțumesc că a-ți acceptat „nebulia” mea și a-ți scos din mine ce este mai bun!

De asemenea, doresc să mulțumesc membrilor comisiei de îndrumare *Prof. dr. chim. habil. Geta Cârâc, Conf. dr. Vasilica Barbu și Conf. dr. Bianca Furdui* pentru sfaturile, învățămintele și susținerea pe care mi le-au acordat atât pe parcursul pregătirii pentru doctorat, cât și la elaborarea tezei.

Aduc mulțumiri domnului președinte *Acad. prof. dr. ing. Eugen Victor Cristian Rusu* și distinșilor referenți *CS gr. I dr. chim. Mariana Pinteală Conf. dr. chim. habil. Gheorghită Zbancioc, și Prof. dr. chim. habil. Constantin Apetrei* pentru onoarea de a face parte din comisia de susținere publică și de a recenza această teză.

Cercetările prezentate în această teză au fost realizate prin mai multe colaborări cu alte instituții și persoane dedicate: domnul dr. ing. Cercetător științific grad I Costel Vânătoru din cadrul S.C.D.L. și BRGVEG Buzău, care ne-a furnizat materialul vegetal pe tot parcursul studiilor, Prof. chim. Luciano Barboni, Prof. Filippo Maggi, Prof. chim. Riccardo Petrelli și echipa de la Universitatea de Studii din Camerino, Italia cărora le mulțumesc pentru experiența științifică remarcabilă, domnul Ș.L. dr. Sorin Marius Avramescu din cadrul Universității din București, căruia îi mulțumesc pentru experiența valoroasă câștigată, domnul Cercetător științific gr III dr. Olivian Ciprian Mărincaș din cadrul Institutului Național de Cercetare Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare I.N.C.D.T.I.M. Cluj Napoca căruia îi mulțumesc pentru că a permis realizarea unor analize importante. Tuturor le mulțumesc pentru sprijinul acordat.

Adresez cuvinte de mulțumire cadrelor didactice cu care am colaborat din cadrul Universității "Dunărea de Jos" din Galați, *Prof. dr. Ștefan Dima, Ș.L. dr. Alina Viorica Iancu, Ș.L. dr. drd. Ing. Corina Neagu, Ș.L. dr. Ioana Otilia Ghinea* pentru sfaturile și ajutorul acordat.

De asemenea, doresc să adresez cuvinte de mulțumire colegelor de la Școala Doctorală de Chimie, în mod special *drd. asist. Andreea Veronica Botezatu* cu care am împărțit aceeași masă de lucru și căreia îi mulțumesc pentru timpul prețios pe care mi l-a dăruit, *dr. Bălănescu Fănică* colegul de bancă și *dr. Mihaela Cudălbeanu*, le mulțumesc tuturor pentru cei mai frumoși ani și clipe petrecute în laborator.

Mulțumesc pentru colaborarea și schimbul de experiență pe care l-am avut alături de colgii bursieri ai Agenției Universitare a Francofoniei, în mod special *dr. Eliasse Zongo și dr. Sara El Moujahed*.

Mulțumiri doamnelor *ing. Atena Bârlădeanu și ing. Mihaela Cristea* pentru ajutorul acordat.

Mulțumiri tuturor colegilor din cadrul Centrului European de Excelență pentru Mediu (ECEE) din cadrul Facultății de Științe și Mediu, din Departamentul de Chimie, Fizică și Mediu din Galați, unde mi-am desfășurat cercetările, pentru sprijinul profesional și moral acordat.

Mulțumiri proiectelor de mobilitate pentru cercetători UEFISCDI, EXPERT și ANTREPRENORDOC pentru sprijin și stagiile, care au fost realizate prin intermediul acestora.

Anna CAZANEVSCAIA (BUSUIOC)

STUDIUL COMPUȘILOR CHIMICI DIN  
SPECII DE PLANTE DE INTERES  
TERAPEUTIC

Mulțumiri Universității "Dunărea de Jos" din Galați, pentru suportul financiar acordat pe tot parcursul stagiului de pregătire a tezei de doctorat.

Mulțumesc familiei care a crezut în mine și m-a suportat toți acești ani, că au acceptat provocarea și m-au lăsat să îmi urmez pasiunea ca în final să am doi copii Matei-Nicholas și Teza aceasta de doctorat.

*Galați, 27.07.2023,*

*Anna Cazanevscaia (Busuioc)*

## Cuprins

<b>Introducere</b> .....	12
<b>PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRII</b> .....	25
<b>Capitolul 1. Specii de plante studiate de interes terapeutic</b> .....	26
1.1. Caracterizarea și importanța speciilor din familia Cucurbitaceae.....	29
1.1.1. <i>Momordica charantia</i> .....	30
1.1.2. <i>Cucumis metuliferus</i> .....	32
1.1.3. <i>Benincasa hispida</i> .....	34
1.1.4. <i>Trichosanthes cucumerina</i> .....	35
1.1.5. <i>Luffa cylindrica</i> .....	36
1.2. Caracterizarea și importanța speciilor din familia Fabaceae. Specia <i>Cassia sieberiana</i> .....	38
1.3. Concluzii parțiale.....	39
<b>Capitolul 2. Compoziția chimică a speciilor studiate</b> .....	40
2.1. Compoziția de macro-și micronutrienți.....	40
2.2. Clase de compuși organici identificate în plantele studiate.....	41
2.2.1. Metaboliți primari.....	42
2.2.2. Metaboliți secundari.....	50
2.3. Concluzii parțiale.....	63
<b>PARTEA a II-a CONTRIBUȚII PERSONALE</b> .....	64
<b>Capitolul 3. Caracterizarea materialului vegetal și obținerea extractelor din familiile de plante Cucurbitaceae și Fabaceae</b> .....	65
3.1. Introducere.....	65
3.2. Obiective specifice.....	66
3.3. Cultivarea, prelevarea și caracterizarea materialului vegetal.....	66
3.4. Extracția compușilor biologic activi din speciile studiate.....	68
3.5. Rezultate și discuții.....	72
3.6. Concluzii parțiale.....	78
<b>Capitolul 4. Analiza compoziției chimice a speciilor studiate prin diverse metode</b> .....	79
4.1. Introducere.....	79
4.2. Obiective specifice.....	79

4.3. Materiale și metode.....	80
4.3.1. Identificarea calitativă a claselor de compuși prezente în speciile de plante analizate.....	80
4.3.2. Cuantificarea conținutului total de saponine din speciile studiate.....	81
4.3.3. Cuantificarea compușilor organici din speciile de plante studiate prin metode spectrofotometrice.....	82
4.3.3.1. Dozarea conținutului total de polifenoli.....	82
4.3.3.2. Dozarea conținutului total de flavonoide.....	84
4.3.3.3. Dozarea conținutului total de $\beta$ -caroten.....	85
4.3.3.4. Dozarea conținutului total de zaharide.....	85
4.3.3.5. Dozarea conținutului de Vitamina C.....	86
4.4. Rezultate și discuții.....	87
4.4.1. Identificarea calitativă a claselor de compuși prezenți în speciile de plante analizate.....	87
4.4.2. Cuantificarea conținutului total de saponine din speciile studiate.....	88
4.4.3. Cuantificarea compușilor organici prin metode spectrofotometrice din speciile de plante studiate.....	89
4.4.3.1. Dozarea conținutului total de polifenoli.....	89
4.4.3.2. Dozarea conținutului total de flavonoide.....	92
4.4.3.3. Dozarea conținutului de $\beta$ -caroten.....	93
4.4.3.4. Dozarea conținutului total de zaharide.....	94
4.4.3.5. Dozarea conținutului de Vitamina C.....	94
4.5. Concluzii parțiale.....	96
<b>Capitolul 5 Separarea compușilor de interes terapeutic prin metode spectrometrice și cromatografice.....</b>	<b>97</b>
5.1. Introducere.....	97
5.2. Obiective specifice.....	97
5.1. Analiza compoziției chimice a materialelor vegetale studiate prin tehnica ICP-MS.....	97
5.6.1. Materiale și metode.....	98
5.6.2. Rezultate și discuții.....	99
5.2. Analiza compoziției chimice a extractelor din materialele vegetale studiate prin tehnica TLC/HPTLC.....	101

5.3.1. Materiale și metode.....	102
5.3.2. Rezultate și discuții.....	102
5.4. Analiza compoziției chimice a extractelor din materialele vegetale studiate prin tehnica HPLC-DAD și UHPLC-MS.....	105
5.5.1. Materiale și metode.....	105
5.4.2. Rezultate și discuții.....	105
5.5. Analiza compoziției chimice a materialelor vegetale studiate prin tehnica GC-MS.....	122
5.5.1. Materiale și metode.....	122
5.5.2. Rezultate și discuții.....	122
5.7. Separarea și izolarea unor compuși organici naturali de interes terapeutic.....	127
5.7.1. Separarea și izolarea acidului ursolic din fructele de <i>Cucumis metuliferus</i> .....	129
5.7.2. Separarea și izolarea a acidului ursolic din fructele de <i>Benincasa hispida</i> .....	134
5.8. Concluzii parțiale.....	136
<b>Capitolul 6. Evaluarea proprietăților biologice active ale extractelor vegetale studiate....</b>	<b>138</b>
6.1. Introducere.....	138
6.2. Obiective specifice.....	139
6.3. Studiul citotoxicității extractelor studiate.....	139
6.3.1. Materiale și metode.....	139
6.3.2. Rezultate și discuții.....	141
6.4. Activitatea antioxidantă a extractelor vegetale cu posibil potențial terapeutic.....	143
6.4.1. Analiza activității antioxidante prin metoda de reducere a ionilor de molibden..	145
6.4.1.1. Materiale și metode.....	145
6.4.1.2. Rezultate și discuții.....	146
6.4.2. Analiza activității antioxidante prin metoda de inhibare a radicalului liber DPPH147	
6.4.2.1. Materiale și metode.....	147
6.4.2.2. Rezultate și discuții.....	148
6.4.3. Analiza activității antioxidante prin metoda ABTS.....	150
6.4.3.1. Materiale și metode.....	151
6.4.3.2. Rezultate și discuții.....	151
6.4.4. Analiza activității antioxidante prin metoda FRAP.....	155



6. 4.4.1. Materiale și metode.....	156
6.4.4.2. Rezultate și discuții.....	156
6.4.6. Determinarea activității antioxidante prin studierea capacității de chelatizare a ionilor metalici.....	158
6.4.6.1. Materiale și metode.....	158
6.4.6.2. Rezultate și discuții.....	158
6.5. Evaluarea potențialului antiinflamator al extractelor obținute din speciile studiate.....	160
6.5.1. Evaluarea potențialului antiinflamator prin acțiunea anti-proteinazică.....	161
6.5.1.1. Materiale și metode.....	162
6.5.1.2. Rezultate și discuții.....	162
6.5.2. Evaluarea potențialului antiinflamator prin inhibarea denaturării albuminei.....	164
6.5.2.1. Materiale și metode.....	164
6.5.2.2. Rezultate și discuții.....	164
6.5.3. Evaluarea potențialului antiinflamator prin inhibarea lipoxigenazei.....	165
6.5.4. Evaluarea potențialului antiinflamator prin testul de stabilizare al membranei celulare a hematiilor.....	167
6.6. Evaluarea activității extractelor vegetale studiate asupra xantinoxidazei.....	168
6.6.1. Materiale și metode.....	168
6.6.2. Rezultate și discuții.....	169
6.7. Evaluarea potențialului antidiabetic al unor compuși din speciile studiate.....	170
6.7.1. Materiale și metode.....	170
6.7.2. Rezultate și discuții.....	171
6.8. Evaluarea potențialului antibacterian al unor compuși din speciile studiate.....	172
6.8.1. Materiale și metode.....	172
6.8.2. Rezultate și discuții.....	173
6.9. Evaluarea efectului antioxidant și antiinflamator sinergic dintre speciile familiei Cucurbitaceae și <i>C.sieberiana</i> .....	174
6.10. Concluzii parțiale.....	176
<b>Capitolul 7. Încapsularea unor extracte hidroetanolice obținute din speciile de plante studiate.....</b>	<b>178</b>
7.1. Introducere.....	178

7.2. Obiective specifice.....	179
7.3. Obținerea microcapsulelor cu extracte vegetale.....	180
7.3.1. Materiale și metode.....	180
7.3.2. Rezultate și discuții.....	181
7.4. Caracterizarea microcapsulelor pe bază de extracte vegetale.....	182
7.4.1. Materiale și metode.....	182
7.4.2. Rezultate și discuții.....	183
7.5. Concluzii parțiale.....	193
<b>Capitolul 8. Concluzii generale și originalitatea activității de cercetare.....</b>	<b>194</b>
8.1. Concluzii generale și originalitatea cercetărilor.....	194
8.2. Direcții viitoare de cercetare.....	197
<b>Capitolul 9. Diseminarea rezultatelor.....</b>	<b>198</b>
9.1. Lista publicațiilor originale.....	198
9.2. Participarea la proiecte, școli de vară și conferințe.....	199
<b>ANEXE.....</b>	<b>202</b>
<b>Referințe bibliografice.....</b>	<b>220</b>

## Introducere

Încă din cele mai vechi timpuri, în întreaga lume, oamenii au utilizat plantele ca surse valoroase de produse alimentare și medicinale. În Europa, chimia plantelor și izolarea compușilor biologic activi s-a dezvoltat rapid după influența lui Paracelsus (sec. XVI) care susținea că „*Toate pajiștile și pășunile, toți munții și dealurile sunt farmacii*” [1], adică natura este un furnizor de produse naturale și sănătoase. După ani și ani de căutări și evoluție, cercetarea științifică se reorientează către origini și încercă să descifreze puterea și beneficiile pe care le oferă natura.

Cele mai mari provocări ale lumii din ultimii ani sunt creșterea populației umane și epuizarea resurselor naturale care duc la foamete, subnutriție și sănătatea precară a oamenilor [2]. Alte aspecte importante ale vieții actuale sunt creșterea numărului de afecțiuni ale organismului uman, dezvoltarea rezistenței unor boli la tratamentele clasice dar și efectele secundare toxice ale medicamentelor de sinteză [3,4]. Organizația Națiunilor Unite pentru Alimentație și Agricultură (FAO) a estimat că ~11% din cele 7,6 miliarde de oameni din lume, sufereau de subnutriție cronică în 2016 [5]. Majoritatea oamenilor subnutriți trăiesc în regiunile cu venituri mici și submedii [5]. Africa prezintă cea mai mare prevalență a subnutriției, dar Asia fiind cea mai populată regiune a lumii, are cel mai mare procent de oameni subnutriți [6]. În era schimbărilor climatice și a vulnerabilității agriculturii și horticulturii, plantele subutilizate sunt alternative valoroase pentru cultivarea și utilizarea lor în diverse scopuri.

În prezent, oamenii cultivă cereale, legume și fructe, folosind soiuri îmbunătățite și practici agricole moderne și se încearcă adaptarea diverselor specii la noi medii de creștere. Cu toate acestea, există multe specii de plante încă subutilizate sau subexploatate, dintre acestea făcând parte specii de plante care se dezvoltă în condiții de mediu extreme și habitate amenințate, având toleranță genetică pentru a supraviețui în condiții dure și calități nutriționale, fitochimice și terapeutice importante. Adaptarea la cultivare a acestor specii în alte zone geografice poate contribui la securitatea alimentară, nutriția și sănătatea oamenilor. Aceste plante pot reprezenta o valoare comercială considerabilă și, prin urmare, pot aduce o contribuție semnificativă la dezvoltarea agriculturii durabile [7].

Cercetătorii din diferite părți ale lumii au ca teme de cercetare caracterizarea compușilor nutritivi și bioactivi din diverse plante. Nutriția este unul dintre factorii primordiali ai sănătății, multe studii sugerând că dietele bogate în legume și leguminoase pot preveni sau atenua o gamă largă de afecțiuni [8].

Plantele sunt componentele majore ale unei diete umane echilibrate și oferă nutrienți esențiali, cum ar fi carbohidrați, proteine, grăsimi, vitamine și minerale. Cercetările sunt în continuare în explorarea diferitelor plante, altele decât legumele și leguminoasele tradiționale, pentru a satisface cerințele alimentare și medicinale globale. Multe dintre aceste plante, s-au dovedit, bogate în metaboliți primari și secundari valoroși [9,10].

Studiile efectuate în ultimele decenii au arătat că mulți compuși izolați din plante au proprietăți biologic active, având importanță în prevenirea afecțiunilor cronice precum cancerul, diabetul și bolile coronariene. Compușii fitochimici au demonstrat numeroase activități care includ proprietăți antioxidante, antitumorale, antimicrobiene, antihipertensive, antiinflamatorii și hepatoprotectoare [6,11].

Ținând cont de aceste aspecte, prezentul studiu evidențiază posibilitățile de explorare a unor specii de plante exotice, adaptate la cultivare în România, ca surse de nutrienți și produse farmaceutice.

Teza de doctorat cu titlul „*Studiul compușilor chimici din specii de plante de interes terapeutic*” este alcătuită din nouă capitole.

**Primele două capitole** reprezintă partea teoretică a tezei, care conține datele actuale din literatura de specialitate despre studiile privind speciile de plante studiate, compoziția chimică a acestor specii și proprietățile lor biologice. **Capitolele 3-7** reprezintă partea originală a tezei în care sunt prezentate screening-ul fitochimic și proprietățile biologice ale unor noi soiuri din specii de Cucurbitaceae exotice, aclimatizate în România, obținute de la o stațiune de cercetare-dezvoltare din Buzău precum și o specie propusă pentru aclimatizare din familia Fabaceae. Concluziile, direcțiile viitoare de cercetare și diseminarea rezultatelor sunt menționate în **capitolele 8 și 9**.

**Scopul** principal acestei teze de doctorat a fost de a caracteriza pentru prima dată, din punct de vedere al compoziției chimice, noi soiuri de specii de plante adaptate la cultivare în România din familia Cucurbitaceae: *Momordica charantia* Rodeo, *Cucumis metuliferus* Tempus, *Benincasa hispida* Zefir, *Trichosanthes cucumerina* Felix, *Luffa cylindrica* Elida dar și a unei specii de preoveniență africană, *Casia sieberiana*, și de a evalua proprietățile terapeutice ale acestora prin analiza unor activități biologice.

**Obiectivele principale** ale tezei de doctorat cu titlul: „*Studiul compușilor chimici din specii de plante de interes terapeutic*” au fost:

- ✓ studierea profilului fitochimic prin metode optice (UV-Vis), cromatografice (HPTLC, GC, HPLC) și spectrale (ICP-MS, IR și RMN) al speciilor din familia Cucurbitaceae adaptate la creștere și cultivare în România, soiurile: *M. charantia* Rodeo, *C. metuliferus* Tempus, *B. hispida* Zefir, *T. cucumerina* Felix, *L. cylindrica* Elida și a unei specii din familia Fabaceae, *C. sieberiana*, procurată din Burkina Faso Africa;
- ✓ obținerea unor compuși puri din fructele de *C. metuliferus* și *B. hispida* și caracterizarea acestora prin spectrometrie MS, IR și RMN;
- ✓ analiza potențialului terapeutic al extractelor și sucurilor obținute din speciile mai sus menționate, analizate individual și în combinație prin diverse metode *in vitro* bazate pe metode optice.

**Obiectivele specifice** ale acestei teze de doctorat au fost:

- ✓ Recoltarea și pregătirea probelor vegetale de la Stațiunea de Cercetare - Dezvoltare pentru Legumicultură Buzău, România și Banca de Resurse Genetice Vegetale pentru Legumicultură, Floricultură, Plante Aromatice și Medicinale Buzău;
- ✓ Cu ajutorul microscopiei de scanare confocală, caracterizarea unor părți anatomice ale plantelor din soiuri noi de plante adaptate la cultivare în România;
- ✓ Obținerea unor extracte prin metode convenționale și neconvenționale, din fructele și frunzele speciilor care provin din România, respectiv din scoarța și frunzele speciei *C. sieberiana*;
- ✓ Studiul micro- și macronutrienților din fructele și frunzele speciilor studiate prin tehnica ICP-MS;
- ✓ Evaluarea calitativă și cantitativă prin metode spectrofotometrice, a unor clase de compuși organici care fac parte dintre metaboliții primari și secundari ai plantelor;
- ✓ Extracția, separarea și identificarea unor compuși organici naturali din probele vegetale studiate prin metode cromatografice și spectrale (HPLC/DAD și UHPLC/MS, GC/MS);
- ✓ Separarea, izolarea și caracterizarea acidului ursolic din fructele de *C. metuliferus* și *B. hispida* utilizând metode spectrale (FT-IR, MS și RMN);
- ✓ Evaluarea citotoxicității extractelor obținute din speciile studiate prin metoda MTT și prin metoda germinării semințelor de plante;
- ✓ Evaluarea activității antioxidante a extractelor prin diverse metode microspectrofotometrice de inhibare de radicali liberi (DPPH, ABTS), de reducere a ionilor metalici și de chelare a ionilor metalici;

- ✓ Evaluarea activităților antiinflamatorii (studiul inhibării proteinazei, albuminei și lipoxigenazei) și prin testul de stabilizare a membranei celulare;
- ✓ Evaluarea efectului inhibitor asupra unor enzime implicate în diferite afecțiuni, precum xantinoxidaza implicată în gută și  $\alpha$ -amilaza și  $\beta$ -glucozidaza în diabet;
- ✓ Evaluarea activității antimicrobiene asupra unor microorganisme patogene;
- ✓ Realizarea și caracterizarea microcapsulelor obținute cu extracte din probele vegetale studiate în această teză.

**Cuvinte cheie:** compuși organici naturali, compuși fitochimici din familia Cucurbitaceae, extracte din plante, , separare de compuși naturali prin cromatografie, compuși cu proprietăți biologice active, încapsulare compuși naturali.

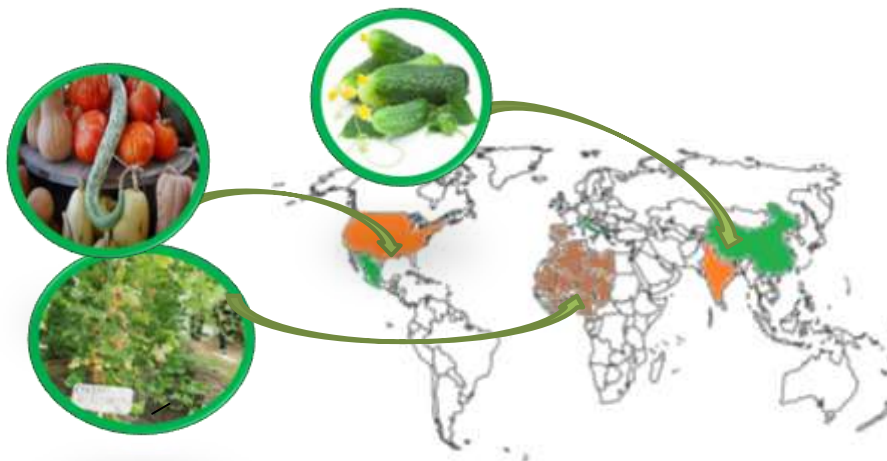
## PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRII

### Capitolul 1. Specii de plante studiate de interes terapeutic

#### 1.1. Caracterizarea și importanța speciilor din familia Cucurbitaceae

Plantele din familia Cucurbitaceae provin dintr-un grup mare de legume, iar cele mai comune sunt dovleacul, pepenele și castravetele [50]. Multe dintre acestea sunt consumate în întreaga lume, iar majoritatea plantelor sunt valoroase și din punct de vedere medicinal. Un rol important îl dețin speciile acestei familii în ecosistemele din care fac parte.

Cucurbitaceele sunt cea mai diversă familie de plante și sunt cultivate în întreaga lume într-o varietate de condiții de mediu, chiar dacă condițiile optime sunt cele tropicale și subtropicale acestea au fost adaptate cu ușurință la cultivare pe toate continentele. Peste 300 de specii de plante sunt folosite de oameni, dar numai 150 de specii sunt cultivate în mod expansiv, iar 30 dintre acestea sunt cruciale pentru producția globală de alimente. Principalii producători de Cucurbitaceae sunt țări precum India, Turcia, China și Statele Unite. Familia Cucurbitaceelor are un rol economic important deoarece legumele și fructele din această familie sunt folosite în diverse produse alimentare. Plantele comestibile, derivate din familia Cucurbitaceae, sunt un grup ce fac parte din cinci genuri: *Cucurbita*, *Cucumis*, *Citrullus*, *Legenaria* și *Sechium* [61].



**Figura 1.1.** Originile speciilor din familia Cucurbitaceae

Dintre speciile de *Cucurbitaceae*, în teza de doctorat au fost analizate *Momordica charantia*, *Cucumis metuliferus*, *Benincasa hispida*, *Trichosanthes cucumerina* și *Luffa cylindrica*, specii toate adaptate și cultivate în România și o plantă din Africa din familia *Fabaceae* și anume *Cassia sieberiana*

### 1.1.1. *Momordica charantia*

Specia *Momordica charantia* L., este cunoscută uzual și sub numele de castravete amar, tărtăcuță amară, castravete african [29]. Această plantă aparține genului *Momordica*, având originea în zona tropicală a Africii, în prezent fiind cultivată aproape în întreaga lume în zone tropicale, inclusiv în diferite părți ale Amazonului, în Africa de Est, Asia, Caraibe și chiar în Europa [30]. Fructele sunt penduloase, cu formă de discoid, ovoid sau elipsoid alungit, adesea îngustate la capete, care pot fi albe sau verzi și care se transformă la maturitate în portocaliu. Semințele, ce pot fi în număr de la 5 până la 30, dreptunghiulare, cu capete subtridentate, cu marginile canelate, au culoare maro sau negru [31].

*Momordica charantia* este una dintre cele mai cunoscute plante pentru proprietățile sale antidiabetice și este comercializată și consumată ca supliment alimentar pentru reglarea glicemiilor în cazul pacienților cu diabet zaharat tip II. De asemenea mai este folosită și în alte afecțiuni cum ar fi hipertensiunea arterială, osteoartrita, cancerul, obezitatea, infecții virale și bacteriene [63–65].

### 1.1.2. *Cucumis metuliferus*

Răspândirea speciei *Cucumis metuliferus* la nivel internațional a început încă din anul 1982 din Noua Zeelandă când a fost cultivată în scopuri comerciale și s-a extins cu ușurință pe piață. Fructele sunt elipsoide, de aproximativ 12 cm lungime, 8 cm în diametru, de culoare verde, iar în timpul maturării culoarea migrează în portocaliu. Acestea se întâlnesc în două forme, amare care conțin cucurbitacine (triterpenoide), ce pot fi toxice, și forma non-amară care este cultivată pe scară largă [101].

*Cucumis metuliferus* este numit *Kanda* în medicina tradițională a statului Plateua din Nigeria, ce poate fi tradus ca „opriți-l înainte să vină” sau „un vaccin local”, fiind folosit ca remediu pentru multe afecțiuni, cum ar fi ulcerul peptic, diabetul zaharat, hipertensiunea și infecțiile virale cu HIV [102]. Fermierii acestui stat folosesc pulpa fructului pentru a trata păsările bolnave de coccidioză [48]. Unele studii au arătat că semințele pot fi măcinate sub formă de făină fină care se emulsionează în apă și prin introducerea acestui amestec în dietă produce efecte antiparazitare [103].

### 1.1.3. *Benincasa hispida*

Specia *Benincasa hispida* (*Benincasa cerifera*), numită și pepene de iarnă, tărtăcuță de frasin, apărătoare de frasin, tărtăcuță de iarnă, dovleac alb sau tărtăcuță de ceară aparține genului *Benincasa* [119]. Se presupune că este originară din Japonia și Java, cultivată mai mult sau mai puțin în India și în țările calde. Este o specie de legume populară mai ales în rândul comunității asiaticilor fiind des utilizată atât în scop nutrițional, cât și terapeutic regăsindu-se în medicina aiurvedică [120].

*Benincasa hispida* poate fi folosit în stare proaspătă, dar și într-o varietate mare de produse alimentare. În plus, planta a fost folosită în scop medicinal în diverse afecțiuni precum probleme gastrointestinale, respiratorii, boli de inimă, diabet zaharat și boli urinare [136]. Aceste proprietăți se bazează pe compoziția chimică bogată și variată în vitamine, proteine și alți compuși chimici bioactivi

### 1.1.4. *Trichosanthes cucumerina*

Tătărcuța șarpe, tărtăcuță viperă, roșia șarpe sau roșia lungă sunt denumiri uzuale pentru planta cu denumirea științifică de *Trichosanthes cucumerina*. Este o plantă răspândită în India, Australia, Insulele Pacificului dar și în Vestul Africii. Fructele acestei specii de plante sunt de obicei consumate ca legume datorită valorii nutritive remarcabile, fiind o sursă bună de vitamina

A, vitamina B și vitamina C [137]. Pe lângă consumul în formă proaspătă sau prelucrată, această specie ocupă un loc important în sistemele alternative de medicină precum *Ayurveda* și *Siddha* [25].

### 1.1.5. *Luffa cylindrica*

*Luffa cylindrica*, cunoscută și sub numele de burete vegetal, este o plantă cu fructe valoroase în numeroase domenii de utilizare. Această specie reprezintă o materie primă naturală, ieftină, non-toxică, biodegradabilă și cu o producție agricolă mare de aproximativ 8000 de fructe pe hectar. Se cultivă îndeosebi în țări tropicale precum Brazilia, iar producția poate ajunge la 100 000 de zeci pe an [163].

Fructele acesteia sunt cilindrice, fuziforme cu o lungime de 20-50 cm, diametrul de 6-10 cm, de culoare verde în stare proaspătă, cu o consistență lemnoasă, o textură fibroasă (asemănătoare cu buretele) și sunt bogate în lignină, celuloză și hemiceluloză [165]. Acestea pot fi consumate atunci când sunt proaspete, moi și cu semințe negre mate și eliptice [166].

*Luffa cylindrica* este folosită în diverse domenii precum obținerea de medicamente, în cosmetică, pentru încălțăminte, pălării, tapet, în construcții și în ingineria materialelor. În medicina tradițională se folosește ca remediu pentru durerile de cap, constipație și alte afecțiuni gastro-intestinale.

## 1.2. Caracterizarea și importanța speciilor din familia Fabaceae. Specia *Cassia sieberiana*

*Cassia sieberiana* este o specie de plante răspândită mai mult în Africa, ce aparține familiei Fabaceae, și este un arbust lemnos și denumit în mod uzual „laburnum african”, „arborii flacării” sau „arborii de ceară” [188]. Aceste denumiri populare se datorează florilor sale mari, galbene sau roșii, care apar înaintea frunzelor și îi conferă un aspect de flăcără [189]. Aceasta se întâlnește în savana Sudanului, în Nigeria, în Bukina Fasou din Africa de Vest și Centrală, în India și America de Sud [188,190,191]. Aceste plante se cultivă în zonele calde și umede, precum pădurile tropicale și subtropicale, dar poate crește și în zonele mai uscate [190].

Studiul compoziției chimice al extractelor brute apoase din frunze, tulpini, rădăcini și păstăi a scos în evidență prezența compușilor din diferite clase de compuși precum alcaloizi, taninuri, flavonoide, antrachinone, terpenoide, saponine, glicozide și fenoli în diverse concentrații. *C. sieberiana* este utilizată în mod tradițional pentru tratarea simptomelor de menopauză, malarie, hemoroizi, impotență sexuală, dureri de stomac, lepră, icter, dureri de cap, diabet, infertilitate, boli de piele, dureri de dinți și HIV [188].

### 1.3. Concluzii parțiale

În conformitate cu datele din literatura de specialitate, speciile de plante selectate din familiile *Cucurbitaceae* și *Fabaceae*, au potențial terapeutic dovedit atât prin utilizările din medicina tradițională, cât și prin studiile de cercetare realizate în laborator.

*Momordica charantia*, cea mai studiată dintre speciile selectate, este cunoscută în mod special pentru proprietățile sale antidiabetice.

*Trichosanthes cucumerina* se evidențiază prin beneficiile sale la nivelul tractului gastro-intestinal, *Benincasa hispida* pentru acțiunea antinociceptivă, *Luffa cylindrica* pentru proprietățile bronhodilatatoare și hepatoprotective, iar *Cucumis metuliferus* prin acțiunea antimalarică.

Toate speciile au proprietăți antioxidante, antiinflamatorii, antibacteriene și antidiabetice fiecare având bajul specific de compuși

Specia *Cassia sieberiana* se remarcă prin proprietăți terapeutice valoroase, fiind utilizată în medicina tradițională africană.



## Capitolul 2. Compoziția chimică a speciilor studiate

### 2.2. Clase de compuși organici identificate în plantele studiate

Plantele reprezintă o sursă importantă de compuși chimici valorificați în diverse produse comerciale (alimentare, farmaceutice, chimice, cosmetice) [210]. Plantele se pot compara cu „fabrici” care sub acțiunea energiei solare, consumă CO<sub>2</sub> și apă, și apoi produc oxigen, energie și compuși de bază necesari supraviețuirii organismelor vii, cum ar fi proteinele, hidrații de carbon, vitaminele și lipidele [211].

Metabolismul plantelor constă în numeroase reacții chimice catalizate de enzime, care se desfășoară în diverse structuri celulare vegetale și producerea unei varietăți de molecule chimice din categoria metaboliților primari [212]. Acestea joacă un rol major în menținerea viabilității plantei (proteine, zaharide, vitamine și lipide). Pe lângă metaboliții primari, în plante sunt sintetizați și o serie de compuși cum ar fi terpenele, compușii fenolici, compușii cu azot (alcaloizi, glicozide cianogene, aminoacizi neproteici) și compușii cu sulf, compuși care se sintetizează în procesele chimice din metabolismul secundar [213]. Aceștia sunt biosintetizați de plante și specifici fiecărei specii în parte, adesea manifestând funcții caracteristice unor organe sau țesuturi vegetale, pot fi identificați numai într-o anumită perioadă de creștere și dezvoltare în cadrul unei specii, sau se pot activa doar la anumiți factori de stres cum ar fi atacul unor microorganisme, insecte sau lipsa nutrienților [214]. Metaboliții secundari sunt considerați compuși de interes din diverse motive, precum diversitatea lor structurală și potențialul lor de candidați pentru obținerea de medicamente [213].

În general, metaboliții secundari sunt produși prin modificări de biosinteză ale metaboliților primari, inclusiv metilare, glicozilare și hidroxilare. Plantele conțin metaboliți secundari foarte specifici, uneori extrem de toxici la o concentrație mare și reprezintă o bibliotecă valoroasă de compuși bioactivi cu o activitate largă în contextul celulelor umane, bacteriilor, ciupercilor și paraziților [215]. Din motive economice, studiul metaboliților secundari a reprezentat subiectul unor cercetări din ultimii ani, contribuind la dezvoltarea mai multor domenii ale fitochimiei. Datele statistice scot în evidență faptul că anual sunt identificați peste o mie de noi compuși chimici din diferite specii de plante. Conform datelor din literatură, aproximativ 25% dintre medicamentele utilizate pentru prevenirea și tratarea diverselor afecțiuni conțin compuși de origine vegetală [211,216].

### 2.3. Concluzii parțiale

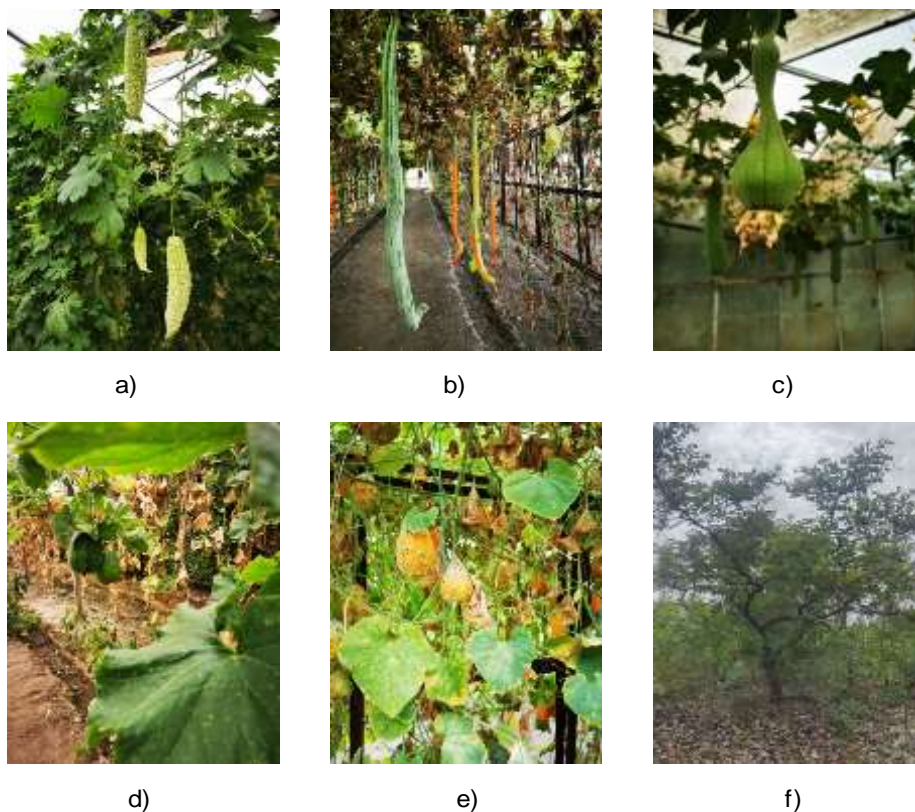
Descifrarea compoziției chimice a speciilor de plante studiate este de actualitate, chiar dacă mulți dintre compuși au fost identificați și sunt deja cunoscuți.

În acest capitol s-au pus în evidență metaboliții primari și secundari ai plantelor și în mod special al speciilor din familia *Cucurbitaceae* și *Fabaceae* studiate în această lucrare, precum și importanța acestora în viața regnului vegetal.

Conform datelor din literatură speciile analizate au o compoziție chimică specifică, cu compuși valoroși din clasela saponinelor, terpenoidelor și alcaloizilor. Datorită acestor compuși biologic activi aceste specii dețin un potențial terapeutic valoros.

**PARTEA a II-a CONTRIBUȚII PERSONALE****Capitolul 3. Caracterizarea materialului vegetal și obținerea extractelor din familiile de plante Cucurbitaceae și Fabaceae****3.3. Cultivarea, prelevarea și caracterizarea materialului vegetal***Cultivarea și prelevarea materialului vegetal*

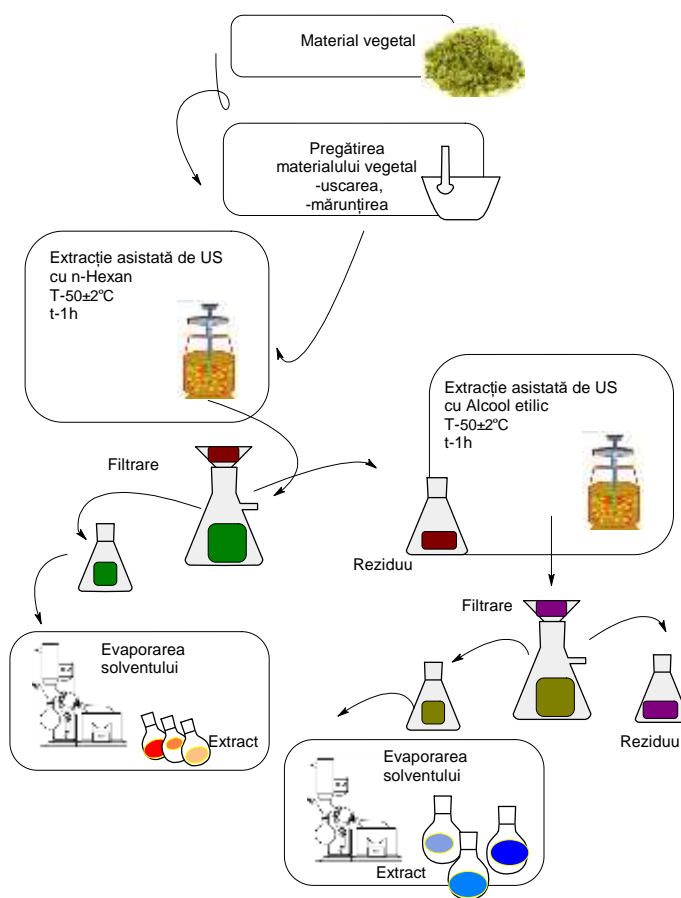
Materialul vegetal analizat în acest studiu este reprezentat de fructele și frunzele speciilor: *Momordica charantia* soiul Rodeo, *Cucumis metuliferus* soiul Tempus, *Benincasa hispida* soiul Zefir, *Luffa cylindrica* Elida și *Trichosanthes cucumerina* soiul Felix (Figura 3.1), aclimatizate în Buzău, regiunea Muntenia, România (Europa de Sud-Est). Pentru realizarea studiilor propuse în această lucrare au fost culese fructe verzi și ajunse la maturitate, precum și frunze din perioada 2019- 2021 de la SCDL și BRGV, Buzău, România. Speciile selectate au fost aclimatizate folosind, ca material inițial, semințele de plante endemice din Tibet, Deșertul Kalahari, Nepal și China (Universitatea Hubei) din perioada 1996-2019.



**Figura 3.1.** Culturi ale soiurilor din România: a) *M. charantia* Rodeo; b) *T. cucumerina* Felix; c) *L. cylindrica* Elida; d) *B. hispida* Zefir e) *C. metuliferus* Tempus și f) arbust de *C. sieberiana* din pădurea Dienderesso, Burkina Faso

### 3.4. Extracția compușilor biologic activi din speciile studiate

Sistemul biologic al plantelor este alcătuit dintr-o gamă largă de metaboliții primari și secundari, din care rezultă proprietățile și activitățile biologice. Pentru a valorifica compoziția chimică a plantelor și a obține compuși de interes, în ultimii 50 de ani, tehnologiile de extracție au cunoscut o continuă evoluție. Astfel au fost dezvoltate metode ecologice care utilizează cantități reduse de substanțe chimice sintetice și organice, timp de lucru mai scurt, randament și calitate ale extractului îmbunătățite. În acest context, au fost concepute noi strategii de extracție pentru a elimina unele dezavantajele ale metodelor tradiționale de extracție [368]. Astfel au apărut termenii de „tehnologie verde” sau „metode ale chimiei verzi” care abordează noi metode de extracție datorită faptului că folosesc mai puțină energie și volume reduse de solvenți organici astfel încât să nu fie toxice pentru mediu [369]. În acest studiu s-a folosit una dintre metodele chimiei verzi și anume extracția asistată cu ultrasunete, dar și metode tradiționale precum decoctul și extracția cu solvenți la reflux.



**Figura 3.4.** Schema de extracție asistată de ultrasunete. T=temperatură, t=timp.

Extracția a fost realizată în două etape cu solvenți de polarități diferite pentru a separa compușii lipofili de cei hidrofili (Figura 3.4.).

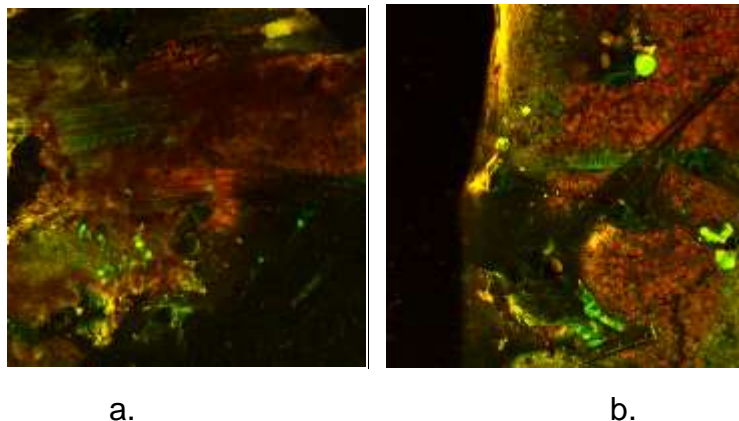
Toate extractele obținute au fost cântărite și depozitate în flacoane bine sigilate la o temperatură de  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fiind utilizate pentru analizele ulterioare. De asemenea, pentru extractele studiate a fost determinată valoarea componentelor total extractibile (**TEC%**).

### 3.5. Rezultate și discuții

#### **Cultivarea și prelevarea materialului vegetal**

##### *Caracterizarea materialului vegetal prin microscopia CLSM*

Un material vegetal poate fi caracterizat prin mai multe metode, una din ele fiind și vizualizarea structurii interne a țesutului cu ajutorul unor metode și aparate moderne precum microscopia CLSM. Astfel a fost posibilă vizualizarea în secțiune a câtorva probe din frunze, fructe verzi și coapte din unele specii analizate.



**Figura 3.10.** Imagini CLSM ale țesutului din secțiunile a.-longitudinală, b.- transversală ale frunzelor de *C. metuliferus* (poze originale)

În Figura 3.10. se pot observa imaginile realizate cu ajutorul CLSM, care au evidențiat în secțiunile prin frunză parenchimul asimilator compact ce este bogat în cloroplaste, dar și canale secretoare pline cu compuși bioactivi. Vasele conducătoare au pereții secundari ușor îngroșați cu ornamentații spiralate. De asemenea, se pot observa peri epidermali tectori lungi, pluricelulari sau glandulari, mai scurți, cu picior monocelular și glanda bazală.

### 3.6. Concluzii parțiale

Materialele vegetale formate din frunzele și fructele din soiuri noi precum *M. charantia* Rodeo, *C. metuliferus* Tempus, *T. cucumerina* Felix, *B. hispida* Zefir și *L. cylindrica* Elida adaptate la cultivare și cultivate în România au fost preluate pentru realizarea studiului de la Stațiunea de Cercetare - Dezvoltare pentru Legumicultură (SCDL) Buzău. Specia *C. sieberiana* a fost adusă din Africa din regiunea Hauts-Bassins, din pădurea Dienderesso, Burkina Faso.

O parte din plantele analizate au fost caracterizate cu ajutorul microscopiei CLSM, unde s-au pus în evidență țesuturile și celulele vegetale sănătoase ale fructelor și frunzelor prin secționări transversale și longitudinale.

Au fost selectate mai multe metode de extracție ale compușilor biologic activi, unele dintre acestea fiind studiate și pentru diverse proprietăți biologice precum cele antimicrobiene, antiinflamatorii sau antioxidante. S-au realizat extracții prin metode convenționale și neconvenționale din fructele și frunzele speciilor studiate în această cercetare. Dintre metodele convenționale s-au realizat extracții prin decoct, macerare și Soxhlet cu solvenți diferiți. Extracția secvențială asistată de ultrasunete în care se folosesc mai mulți solvenți cu polarități diferite s-a dovedit a fi una din cele mai bune metode de extracție neconvenționale. S-au observat cele mai mari valori ale componentelor total extractibile (TEC) în cazul probelor obținute prin extracție asistată de ultrasunete, valorile fiind cuprinse într-un interval de 44,3 - 61,5%.

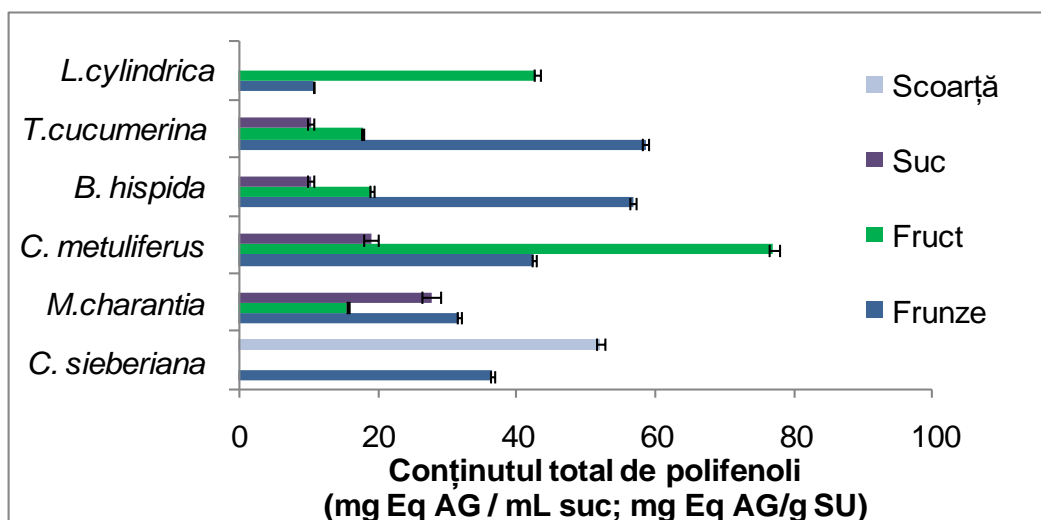
## Capitolul 4. Analiza compoziției chimice a speciilor studiate prin diverse metode

### 4.4.3. Cuantificarea compușilor organici prin metode spectrofotometrice din speciile de plante studiate

#### 4.4.3.1. Dozarea conținutului total de polifenoli

În ultimii ani a crescut foarte mult numărul de studii privind activitățile fiziologice ale compușilor din plante. Multe dintre aceste studii au subliniat efectele benefice ale polifenolilor în ceea ce privește proprietățile lor antioxidante, antiproliferative și antiinflamatorii [397] (Figura 4.9).

În figura 4.10 sunt prezentate rezultatele obținute pentru determinarea conținutului total de compuși fenolici (TPC) al probelor testate. În sucul de *C. metuliferus* a fost identificată o concentrație semnificativă de compuși polifenolici ( $18,97 \pm 1,25$  mg Eq AG / mL suc), iar o concentrație mai mare a prezentat sucul de *M. charantia* ( $27,64 \pm 1,89$  mg Eq AG / mL suc). Întrunul dintre studiile pe sucul obținut din diferite varietăți ale speciei *M. charantia* au fost identificate valori ale conținutului total de polifenoli cuprinse între  $8,15 \pm 0,51$  și  $11,47 \pm 0,49$  mg EqAG/g SU [28], valori mai mici comparativ cu datele obținute în acest studiu. Cele două soiuri de *B. hispida* și *T. cucumerina* au prezentat un conținut mai mic de polifenoli, de  $10,32 \pm 1,06$  mg EqAG /mL suc și respectiv  $10,253 \pm 0,56$  mg EqAG / mL suc. Aceste rezultate se pot datora compușilor fenolici, cum ar fi acidul galic, acidul cafeic, acidul tanic, acidul p-cumaric și acidul trans-ferulic [398].

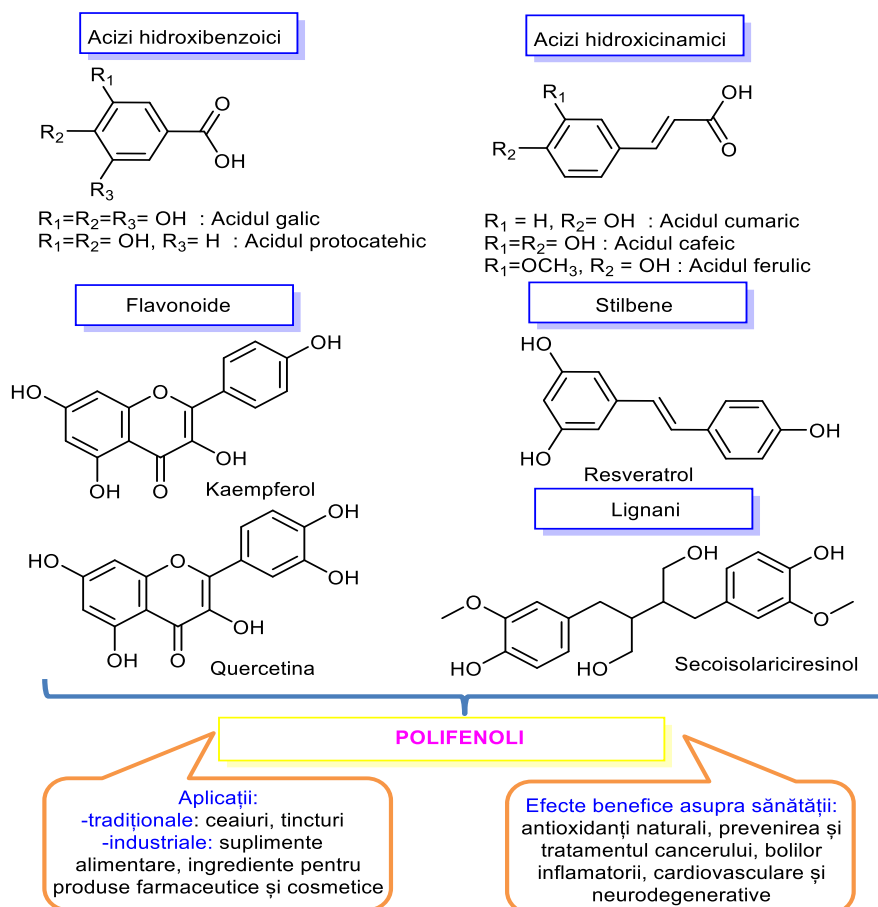


**Figura 4.10.** Conținutul total de polifenoli din sucurile, frunzele și fructele soiurilor analizate valorile reprezintă media a trei experimente separate și barele de eroare cu deviația standard.

Soiul analizat în acest studiu a prezentat un conținut total de polifenoli de  $15,63 \pm 0,333$  mg EqAG / g SU (Figura 4.10). Comparativ cu sucul, extractul de *M. charantia* (castravete amar) este mai sărac în compuși din clasa polifenolilor, valabil doar în cazul acestei specii. Frunzele au prezentat o compoziție chimică mai bogată în polifenoli, cum s-a observat și în cazul probelor de

*B. hispida* și *T. cucumerina*. mai mici de polifenoli din frunzele și fructele de *L. cylindrica* comparativ cu alte specii [402].

Numeroasele studii aferente în acest domeniu, de identificare și dozare a compușilor fenolici din plante, indică interesul actual la nivel mondial pentru acest subiect. Pentru a determina care polifenoli sunt cei mai potriviți pentru aplicarea în diverse produse alimentare, cosmetice sau farmaceutice care nu au fost încă exploatate sunt necesare studii suplimentare prin tehnici de analiză moderne.



**Figura 4.9.** Principalele subclase de polifenoli prezente în speciile studiate de Cucurbitaceae și Fabaceae, posibile beneficii pentru sănătate și aplicațiile acestora [24–30]

#### 4.5. Concluzii parțiale

În urma screeningului fitochimic calitativ s-a demonstrat că toate speciile de plante analizate conțin diverse clase de compuși de interes terapeutic, unele rezultate obținute fiind corelate cu datele prezentate în literatura de specialitate.

Ca urmare a cuantificării diverselor clase de compuși, s-au evidențiat diferențele între speciile de plante analizate precum și între diversele părți anatomice ale aceleiași specii.

Pentru prima dată, s-au studiat comparativ sucurile dar și extractele din diverse părți ale plantei pentru mai multe specii din familia Cucurbitaceae și pentru specia *C. sieberiana*.

Conținutul total de compuși fenolici din speciile studiate a fost mai ridicat pentru fructele de *C. metuliferus* ( $77,04 \pm 0,45$  mg EqAG/g SU) și în frunzele de *T. cucumerina* ( $58,55 \pm 0,55$  mg EqAG/g SU).

Conform datelor din literatură și analizelor efectuate în acest studiu, conținutul cel mai mare de  $\beta$ -caroten l-au prezentat fructele castravetelui amar ( $103,65 \pm 0,70 \mu\text{g Eq}\beta\text{C/g SU}$ ), urmate de *C. metuliferus*, iar pentru *T. cucumerina* s-a observat cea mai mică concentrație ( $3,75 \pm 0,21 \text{ mg Eq}\beta\text{C/g SU}$ ).

S-a dovedit faptul că fructele au un conținut scăzut de vitamina C, comparativ cu frunzele fiecărei specii. Cu un conținut ridicat de vitamina C s-au evidențiat extractele din frunzele de *T. cucumerina* și *C. metuliferus* ( $19,65 \pm 0,01 \text{ mgAA/10 g SU}$ , și respectiv  $16,86 \pm 0,06 \text{ mgAA/10 g SU}$ ).

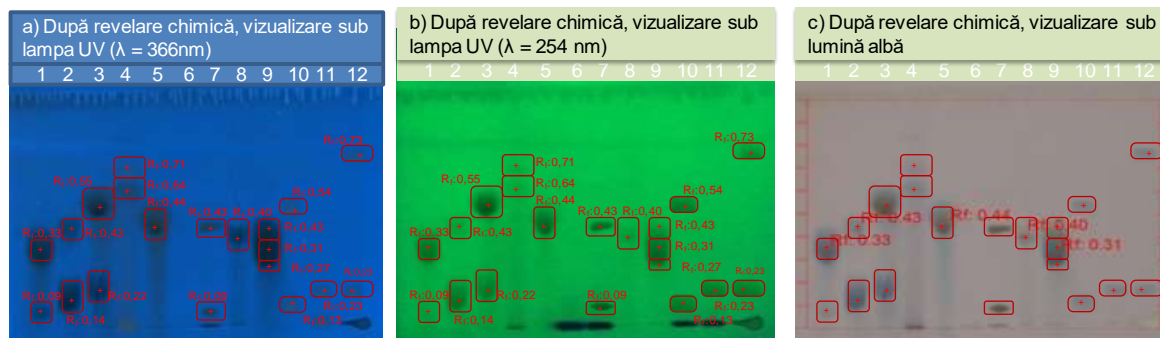
## Capitolul 5 Separarea compușilor de interes terapeutic prin metode spectrometrice și cromatografice

### 5.2. Analiza compoziției chimice a extractelor din materialele vegetale studiate prin tehnica TLC/HPTLC

HPTLC (High-Performance Thin-Layer Chromatography) adică "Cromatografie pe Strat Subțire de Înaltă Performanță" reprezintă o tehnică în care faza staționară este una solidă și poate fi reprezentată de o plăcuță cromatografică pe care s-a depus silicagel, celuloză aminoetilată, alumină sau diverse poliamide etc. iar faza mobilă este lichidă și poate fi un solvent sau un amestec de solvenți în diferite proporții, fază mobilă care depinde de compusul/compușii chimici care urmează să fie izolați din amestec.

#### 5.3.2. Rezultate și discuții

În extractele din *C. metuliferus* - pulpă, *C. metuliferus* - învelișul extern al fructelor, *B. hispida* - învelișul extern al fructelor, *B. hispida* - pulpă, *L. cylindrica*, *T. cucumerina* și *M. charantia* s-au identificat compuși din clasa zaharidelor după separarea acestora prin cromatografie HPTLC (Figura 5.2). În extractele din coaja fructelor de *C. metuliferus* s-au identificat manoza ( $R_f=0,43$ ) și rafinoza (0,09), în extractele din fructele de *B. hispida* galactoza ( $R_f=0,33$ ), manoza, și un compus neidentificat ( $R_f=0,27$ ), în extractele din fructele de *L. cylindrica* xiloza ( $R_f=0,55$ ) și un compus neidentificat ( $R_f=0,13$ ), în extractele de *T. cucumerina* maltoza ( $R_f=0,22$ ) și în extractele din *M. charantia* maltoza și un compus neidentificat ( $R_f=0,73$ ) (Figura 5.2).



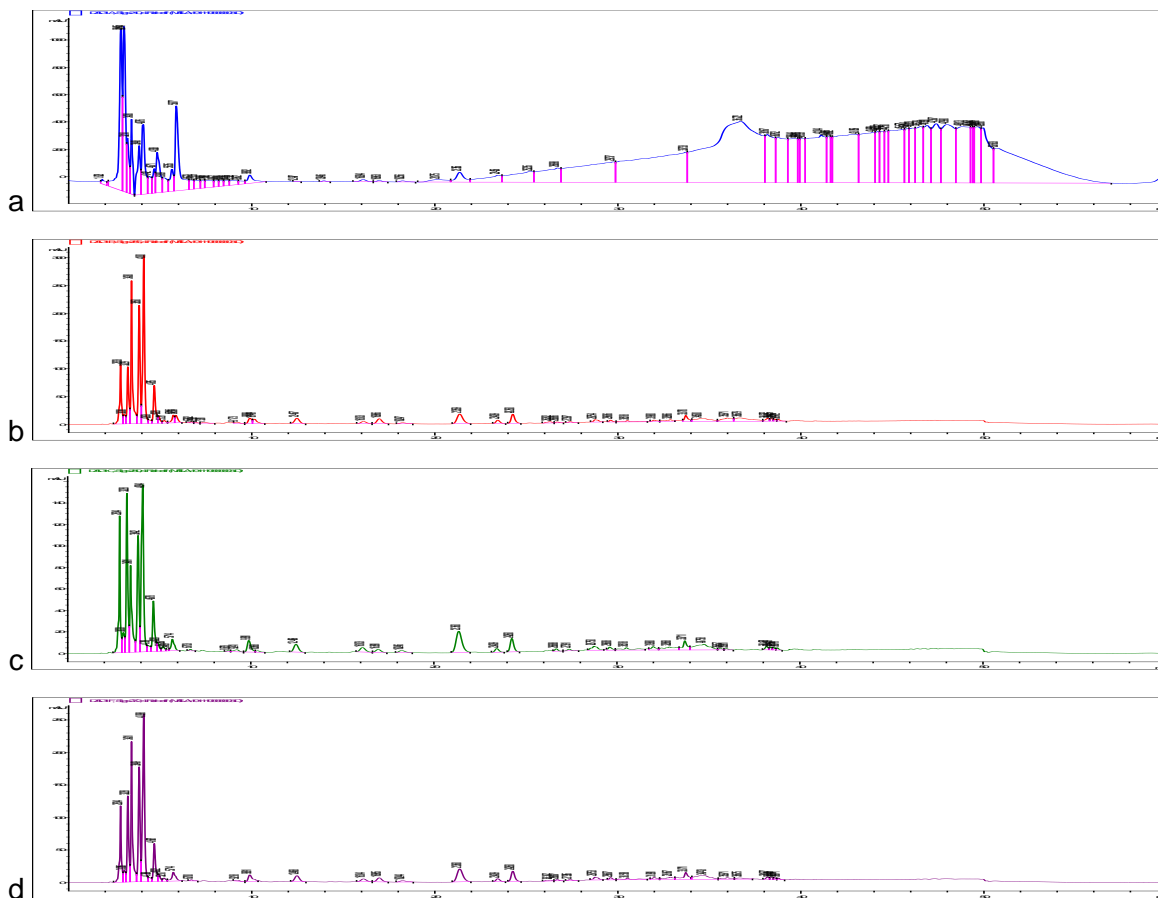
**Figura 5.2.** Separarea HPTLC a: compușilor puri (1) galactoză+rafinoză, (2) manoză+lactoză, (3) maltoză+xiloză, (4) dezoxiriboza+riboza, (5) arabinoza, și a extractelor din speciile de plante: (6) *C. metuliferus* - învelișul extern al fructelor, (7) *C. metuliferus* - pulpă, (8) *B. hispida* - învelișul extern al fructelor, (9) *B. hispida* - pulpă, (10) *L. cylindrica*, (11) *T. cucumerina*, (12) *M. charantia*

### 5.4. Analiza compoziției chimice a extractelor din materialele vegetale studiate prin tehnica HPLC-DAD și UHPLC-MS

În acest studiu dat au fost identificați, prin analiza HPLC-DAD, 22 de compuși de interes în probe de suc obținute din fructele speciilor de plante analizate și anume acid galic, acid neoclorogenic, acid cafeic, acid p-cumaric, acid trans-ferulic, hidrat de (+)-catechină, (-)-epicatechină, procianidina A2, procianidina B2, rutina, quercetin-3-D-galactozida, kaempferol-3-glucozida, hiperozida, naringenina, kaempferol, quercetina, acid cinamic, carnosol, acid carnosic, acizi ursolic și oleanolic. Analiza cantitativă (exprimată în  $\mu\text{g/g}$  suc), a compușilor identificați în



cele patru specii aparținând familiei Cucurbitaceae și cultivate în România (*M. charantia*, *C. metuliferus*, *B. hispida* și *T. cucumerina*).

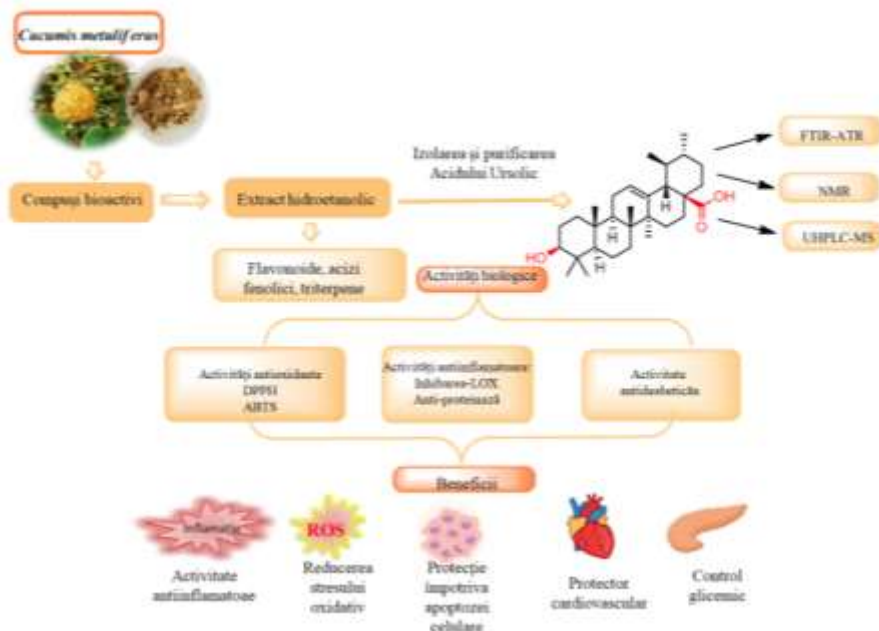


**Figura 5.8.** Cromatogramele HPLC-DAD pentru probele de suc de *M. charantia* înregistrate la diferite lungimi de undă  $\lambda$ : a-210nm , b-265 nm, c-280 nm,d- 272 nm

În urma actualizării datelor din literatura de specialitate nu au fost găsite date pentru a realiza o comparație a rezultatelor obținute în acest studiu pentru sucul obținut din cele patru specii analizate. Cea mai bogată compoziție chimică a fost identificată în sucul de *M. charantia* (Figura 5.8.) și *C. metuliferus*, iar absența unor compuși cum ar fi kampferol și kampferol-3-glucozide a fost constatată în sucul de *B. hispida*. Conținutul majoritar sunt epicatechina (555,22 mg/kg), catechina (201,78 mg/kg), acidul oleanolic (238,10 mg/kg) și acidul ursolic (195,44 mg/kg), care au fost identificați în sucul de *M. charantia* și respectiv în *C. metuliferus* (347,67 și 191,44 mg/kg).

### 5.7. Separarea și izolarea unor compuși organici naturali de interes terapeutic

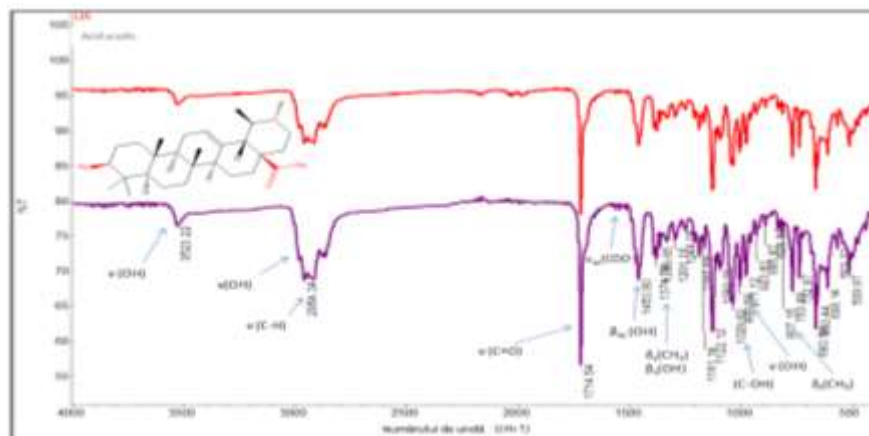
Separarea compușilor dintr-un amestec pentru obținerea moleculelor pure are multiple aplicații și se poate regăsi în diverse domenii, conexe chimiei organice, cum ar fi biologia, industria farmaceutică, alimentară etc. Prin separare este posibilă obținerea și purificarea compușilor individuali dintr-un amestec complex, permițând astfel analiza, caracterizarea și utilizarea ulterioară a acestora [479].



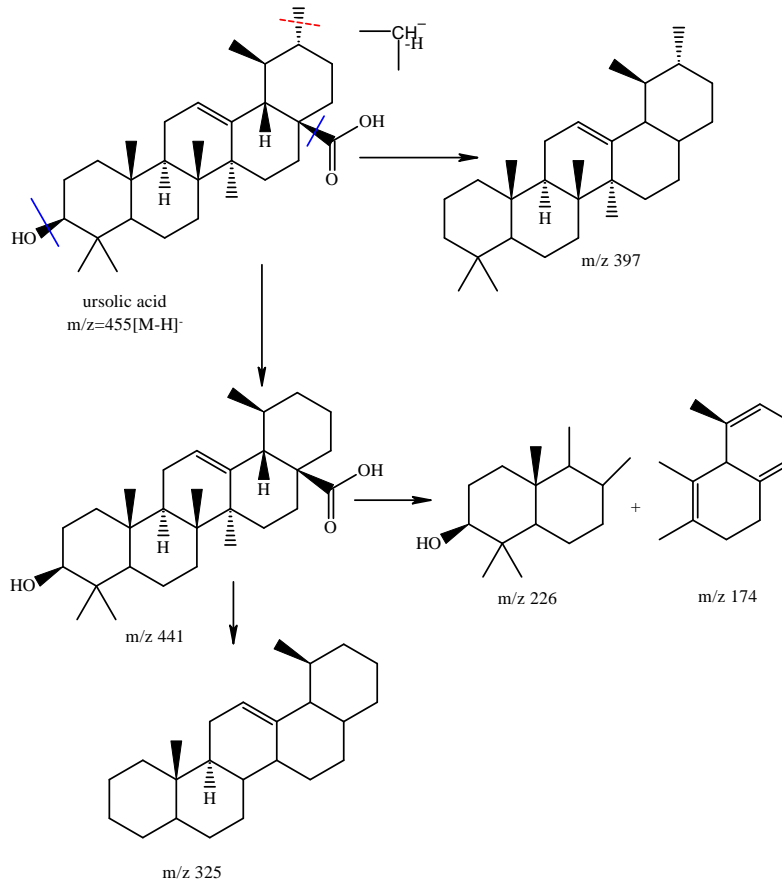
**Figura 5.19.** Reprezentarea schematică a separării acidului ursolic din extractul hidroalcoolic de *C. metuliferus* și principalele caracteristici bioactive

Structura compusului ursolic, compusul izolat din extractul de *C. metuliferus* a fost demonstrată prin analize spectrale înregistrându-se spectrele FT-IR ale acidului ursolic (AU) comercial și al celui izolat și purificat (Figura 5.22).

S-a urmărit demonstrarea prezenței compusului izolat, astfel interpretarea și atribuirea benzilor caracteristice IR, fiind evidente benzile de vibrație ale acidului ursolic și grupele funcționale caracteristice, confirmate și de datele din literatură ale acidului identificat [489,491,494]

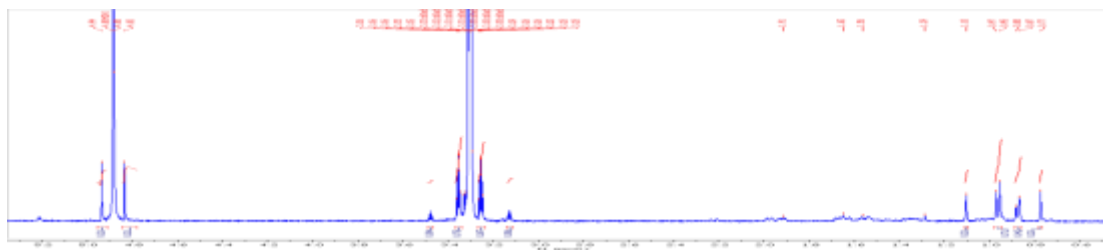


**Figura 5.22.** Spectrele FTIR-ATR ale acidului ursolic comercial (violet) și al acid ursolic izolat (roșu)



**Figura 5.24.** Schema de fragmentare propusă pentru acidul ursolic

Compusul izolat a fost analizat ulterior și prin spectroscopie  $^1\text{H}$ -RMN pentru a caracteriza cu și mai mare exactitate structura compusului presupus a fi acidul ursolic. Rezultatele obținute au fost analizate prin compararea deplasărilor chimice ale compusului izolat cu datele din literatură, spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al acidului ursolic comercial. Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN, prezentat în Figura 5.25. al AU izolat a evidențiat prezența în regiunea de câmp înalt a cinci grupări metil prin singletele corespunzătoare (0,77, 0,88, 0,95, 0,97 și 1,10 ppm) și două grupări metil dublet (0,87 și 0,99 ppm), semnale caracteristice pentru scheletul triterpenelor de tip ursan [249].



**Figura 5.25.** Spectrul  $^1\text{H}$  RMN al acidului ursolic obținut din extractul de *C. metuliferus*

Au fost de asemenea identificate în AU izolat două semnale singlet la  $\delta$  1,10 ppm, caracteristice pentru grupa protonii metil ai scheletului triterpenic de oleanan și la  $\delta$  1,29 ppm, pentru protonii metilen  $-\text{CH}_2-$ . Semnalul de la 3,3 ppm din regiunea de câmp joasă reprezintă H,

posibil datorat grupării hidroxil, iar la  $\delta = 4,94$  ppm, un semnal protonic atribuit protonului olefinic al triterpenei.

Acid ursolic (acid 3 $\beta$ -hidroxi-urs-12-en-28-oic): pulbere, albă, <sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD):  $\delta = 1,63$  - 1,69 (H-1,2H, m), 1,65 (H-2, 2H, m), 3,13 (H-3, 2H), 0,74 (H-5, 1H, d), 1,43 și 1,29 (H-6, 2H, m), 1,29 (H-7, 2H, m), 1,56 (H-9, 1H, m), 1,91 (H-11, 2H, q), 5,21 (H-12, 1H, t), 1,62 (H-15, 2H, m), 1,58 și 1,63 (H-16, 2H, m), 2,20 (H-18, 1H), 1,38 (H-19, 1H, m), 1,36 (H-20, 1 H, m), 1,32 (H-21, 2H, m), 1,53 (H-22, 2H, m), 0,95 (H-23, 3H, s), 0,77 (H-24, 3H, s), 0,97 (H-25, 3H, s), 0,84 (H-26, 3H, s), 1,10 (H-27, 3H, s), 0,87 (H-29, 3H, d), 0,95 (H-30, 3H, d).

## 5.8. Concluzii parțiale

Au fost selectate probe din cele patru specii *M. charantia*, *C. metuliferus*, *B.hispida* și *T. cucumerina* și analize privind compoziția lor chimică, utilizând metode diverse de analiză.

Din studiul realizat prin metoda spectrometrică de analiză, ICP/MS, pentru micro și macroelemente, au fost puse în evidență prezența unor elemente chimice cu valori mai mari în toate speciile analizate precum potasiu, calciu, magneziu și fier. Studiul comparativ dintre probele uscate și cele liofilizate a demonstrat faptul că materialul vegetal uscat păstrează mai bine prezența de micro- și macroelemente în probe.

Prin metoda cromatografică HPTLC, au fost puse în evidență componentele principale din clasa de metaboliți primari și anume carbohidrați prezenți în speciile familiei Cucurbitaceae cum sunt maltoza, arabinoza, dezoxiriboza și altele, date comparabile cu literatura, care face referire la această specie

Prin analiza HPLC/DAD s-a confirmat că marea majoritate a speciilor din familia Cucurbitaceae conțin un număr mare de triterpene și concentrații semnificative de polifenoli și flavonoide. Au fost cuantificați compușii chimici precum acidul shikimic, acidul galic, quercitina, acidul cinamic, acidul ursolic și oleanoic prezenți atât în extractele hidroetanolice, cât și în probele de suc ale speciilor de castraveți.

Prin utilizarea metodei UHPLC/ la analiza extractelor din fructele și frunzele speciilor din familia Cucurbitaceae au fost puși în evidență compuși specifici acestor plante precum cucurbitacinele A, E, C, D, luteolina, kuguacinul etc.

Cu ajutorul tehnicii GC/MS a fost posibilă analiza părții lipofile a fructelor de *M. charantia*, *T. cucumerina* și *C. metuliferus*, fiind propuse unele modele de fragmentare a compușilor identificați cum ar fi : linalol, n- heneicosan

Prin experimentări succesive a fost posibilă izolarea prin două metode diferite a acidului ursolic, ca fiind un compus primordial în fructele speciilor de *C. metuliferus* și *B.hispida*. Compusul pur obținut a fost caracterizat prin mai multe metode FT-IR, UHPLC/MS și RMN.

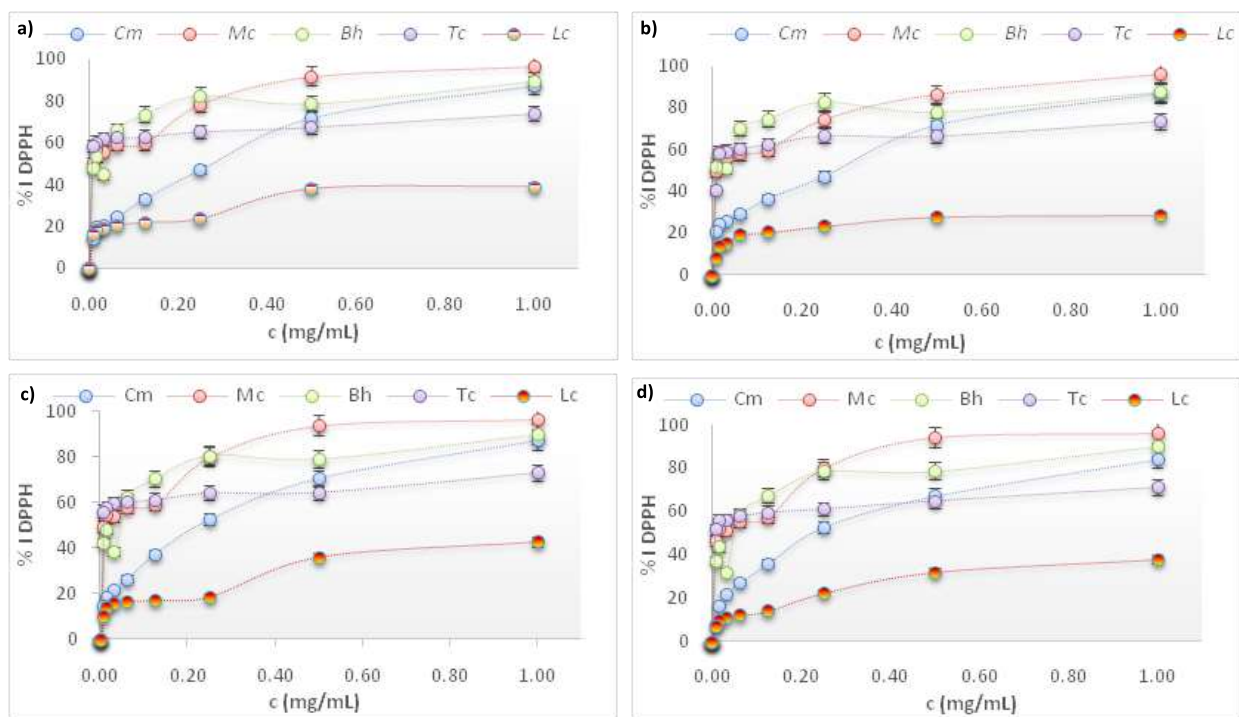
## Capitolul 6. Evaluarea proprietăților biologice active ale extractelor vegetale studiate

### 6.1. Introducere

Produsele naturale și derivații obținuți din acestea au fost utilizate de-a lungul istoriei omenirii pe scară largă, iar în prezent acestea se găsesc tot mai des pe piața farmaceutică [1]. Multe dintre acestea au rămas neglijate, ne reprezentând interes terapeutic sau economic [2]. O dată cu trecerea timpului și dovedirea proprietăților benefice pentru sănătate ale produselor naturale, plantele și extractele vegetale au reintrat cu succes în viața consumatorilor.

#### 6.4.2. Analiza activității antioxidante prin metoda de inhibare a radicalului liber DPPH

Unul dintre cele mai populare teste spectrofotometrice pentru determinarea activității antioxidante a diferitor substanțe și în mod special a extractelor din plante este testul de inhibare a radicalului 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) care inițial este colorat în mov, iar în prezența agenților antioxidanți culoarea virează în galben. Avantajele acestei metode sunt precizia, costul scăzut și ușurința realizării, oferind un screening al activității antioxidante [29,30](Figura 6.9).



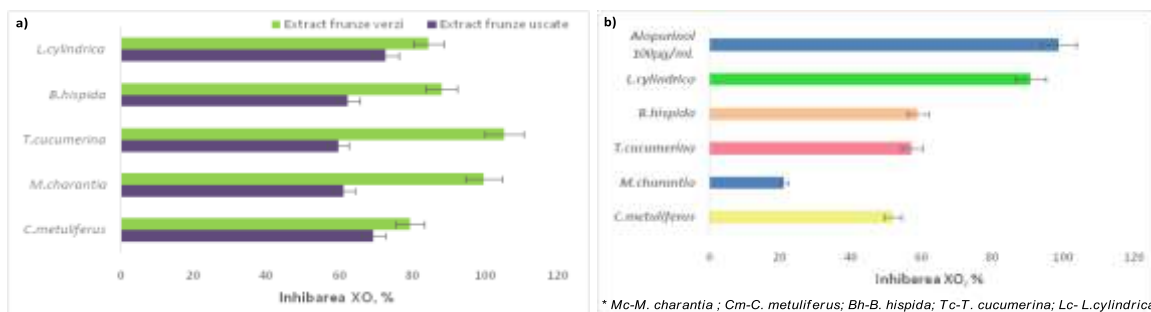
**Figura 6.9.** Variația activității antioxidante determinată prin metoda de inhibare a radicalilor DPPH în timp a) 15min, b) 30min, c) 45min, d) 1oră, pentru extractele hidroalcoolice din fructele speciilor din familia Cucurbitaceae; valorile reprezintă media a trei experimente separate, barele de eroare și deviația standard. Cm- *C. metuliferus*, Mc- *M. charantia*, Tc- *T. cucumerina*, Lc- *L. cylindrica* și Bh- *B. hispida*

## 6.6. Evaluarea activității extractelor vegetale studiate asupra xantinoxidazei

Xantinoxidaza (XO) este o enzimă implicată în metabolismul purinelor, care catalizează oxidarea hipoxantinei și xantinei la acidul uric, generând producerea speciilor reactive de oxigen (ROS).

### 6.6.2. Rezultate și discuții

Evaluarea activității xantinoxidazei a fost realizată comparativ pentru extractele hidroetanolice din frunzele proaspete și cele uscate ale speciilor de Cucurbitaceae studiate (Figura 6.18.a).



**Figura 6.18.** Activitatea de inhibare a xantinoxidazei (XO) de către extractele hidroetanolice obținute din a) frunze uscate și proaspete și b) fructe ale speciilor de Cucurbitaceae studiate; valorile reprezintă media a trei experimente separate, barele de eroare și deviația standard

## 6.10. Concluzii parțiale

În urma studiilor biologice efectuate în acest capitol, studii care au analizat extractele obținute din materialele vegetale studiate în această teză de doctorat, se poate afirma faptul că aceste plante au un potențial terapeutic ridicat, potențial argumentat din punct de vedere științific dar și de utilizarea acestora în medicina tradițională, rezultatele prezentând un interes crescut și pentru terapiile alternative moderne.

S-au utilizat două metode de determinare a toxicității: MTT și testul de toxicitate pe germeni de grâu și s-a demonstrat faptul că extractele obținute din speciile din familia Cucurbitaceae nu prezintă citotoxicitate. În studiile de determinare a viabilității fibroblaștilor în prezența extractelor studiate, s-a observat că după cele 24 de ore de analiză viabilitatea celulară crește, ceea ce înseamnă că în timp mor un număr mai mic de celule sănătoase, iar creșterea cariopselor de grâu nu a fost inhibată.

Activitatea antioxidantă a fost evaluată prin 6 metode diferite, iar rezultatele obținute prin toate metodele au fost satisfăcătoare și apropiate de cele din literatura de specialitate. O parte dintre rezultatele obținute în metodele de determinare a activității antioxidante sunt prezentate pentru prima dată pentru unele dintre speciile de plante analizate, prin urmare s-au comparat datele obținute cu alte studii din literatura de specialitate doar unde a fost posibil.

Activitatea antioxidantă determinată în cazul combinațiilor de sucuri de fructe a prezentat o valoare mai mare decât cele individuale. Se poate afirma în acest context că apare o sinergie în amestecurile obținute acestea având un efect antioxidant crescut, așadar, consumul acestora pot preveni sau reduce stresul oxidativ și pot fi valorificate mai departe în obținerea de produse alimentare funcționale.

Cea mai pronunțată activitate, evaluată prin metoda de reducere a molibdenului, au demonstrat extractele din fructele de *C. metuliferus* și *B. hispida*, acestea putând fi utile în obținerea de tratamente pe bază de plante împotriva stresului oxidativ și efectelor ulterioare ale acestuia generate în organism..

Prin metoda de inhibare a radicalului DPPH toate probele analizate au prezentat un efect antioxidant puternic efect care este direct proporțional cu concentrația extractelor, atât din frunzele, cât și din fructele speciilor de plante analizate (fam. Cucurbitaceae și Fabaceae).

Evaluarea potențialului antioxidant prin metoda de inhibare a radicalului ABTS realizată comparativ pentru două tipuri de extracte hidroetanolic și metanolice a prezentat valori variate. Astfel, probele hiroetanolic din fructele de *L.cylindrica* și *T. cucumerina* au prezentat un efect inhibitor crescut la concentrații mici, comparativ cu celelalte specii, în timp ce extractele metanolice au fost avantajoase pentru toții reprezentanții, ieșind în evidență castravetele amar și kiwano. În cazul extractelor a fost remarcat cel din frunzele speciei *M. charantia*, acesta fiind o potențială sursă bogată în antioxidanți pentru obținerea de ceaiuri și alte produse alimentare sau farmaceutice.

Rezultatele obținute prin metoda FRAP pentru probele din fructele și frunzele speciilor studiate în această teză nu au variat semnificativ fiind încadrate într-un interval  $IC_{50}$  cuprins între 34,63  $\mu\text{M}$  Eq Fe (II)/g și 45,37  $\mu\text{M}$  Eq Fe (II)/g.

Cea mai mare capacitate de chelare a ionilor metalici ( $\text{Fe}^{2+}$ ) au demonstrat extractele din fructele castravetelui de iarnă și castravetelui șarpe, iar în cazul extractelor din frunze cele ale speciilor de plante *L.cylindrica* și *C. metuliferus*. Prin urmare în cazul excesului de fier în organism, speciile de plante analizate sunt surse importante de compuși utili care pot împiedica efectele toxice asupra organelor, celulelor sau declanșarea peroxidării lipidelor care apar prin acumularea fierului.

Activitatea antiinflamatorie a probelor vegetale a fost realizată prin mai multe metode, iar rezultatele au variat pentru speciile de plante analizate. *M. charantia* și *C.sieberiana* au prezentat cel mai ridicat potențial în combaterea inflamației. În testele de inhibare a lipoxigenazei s-au dovedit a fi mai active extractele din frunzele de *L. cylindrica*, iar în cel de denaturare a albuminei extractele din fructele de *T. cucumerina*.

S-a dovedit experimental faptul că materialul vegetal proaspăt are un potențial mai mare de inhibiție a xantin-oxidazei comparativ cu cel uscat, comparându-se extractele obținute din frunzele proaspete și cele uscate ale speciilor din familia Cucurbitaceae în studiul asupra activității xantin-oxidazei.

Analiza proprietăților antidiabetice pentru materialele vegetale prin inhibarea activității a două enzime reprezentative, a scos în evidență speciile *M. charantia* și *C. metuliferus* care au avut capacitate mai mare de a inhiba  $\alpha$ -amilaza și  $\beta$ -glucosidaza.

Studiul preliminar asupra unor bacterii gram-pozitive și gram-negative, a scos în evidență potențialul antibacterian al materialelor vegetale care aparțin speciei *L. cylindrica*, celelalte extracte din speciile de plante analizate fiind mai puțin active împotriva tulpinilor de microorganisme testate.

## Capitolul 7. Încapsularea unor extracte hidroetanolic obținute din speciile de plante studiate

Microîncapsularea reprezintă un proces prin care un material sau principiu activ, care poate fi un ingredient, o substanță bioactivă sau un amestec, este încapsulat într-o matrice protectoare sub formă de microcapsule [558,559]. Studiile privind acest subiect sunt relativ noi, interesul a crescut abia în deceniile 7 și 8 din secolul al XX-lea. Prima aplicație a microcapsulelor a fost utilizată în cadrul fabricării hârtii autocopiatoare în industria papetăriei [560]. Astăzi, datorită faptului că se pot obține microcapsule cu proprietăți diferite, cu caracteristici specifice, cu aspect, culoare sau gust deosebit și cu o gamă variată de principii, acestea au aplicații în domenii variate precum industria farmaceutică, cosmetică, alimentară, textilă, agricolă sau a noilor materiale [561–563].

### 7.4. Caracterizarea microcapsulelor pe bază de extracte vegetale

După obținerea microcapsulelor acestea pot fi caracterizate cu ajutorul mai multor tehnici care pot oferi diverse informații despre produsul obținut cum ar fi forma, dimensiunea, structura, distribuția pe dimensiuni, compoziția chimică, proprietăți legate de eliberare etc. Astfel o metodă accesibilă o constituie microscopia optică (MO), aceasta permițând vizualizarea directă a microcapsulelor și oferă informații despre formă, dimensiune și aspectul suprafeței

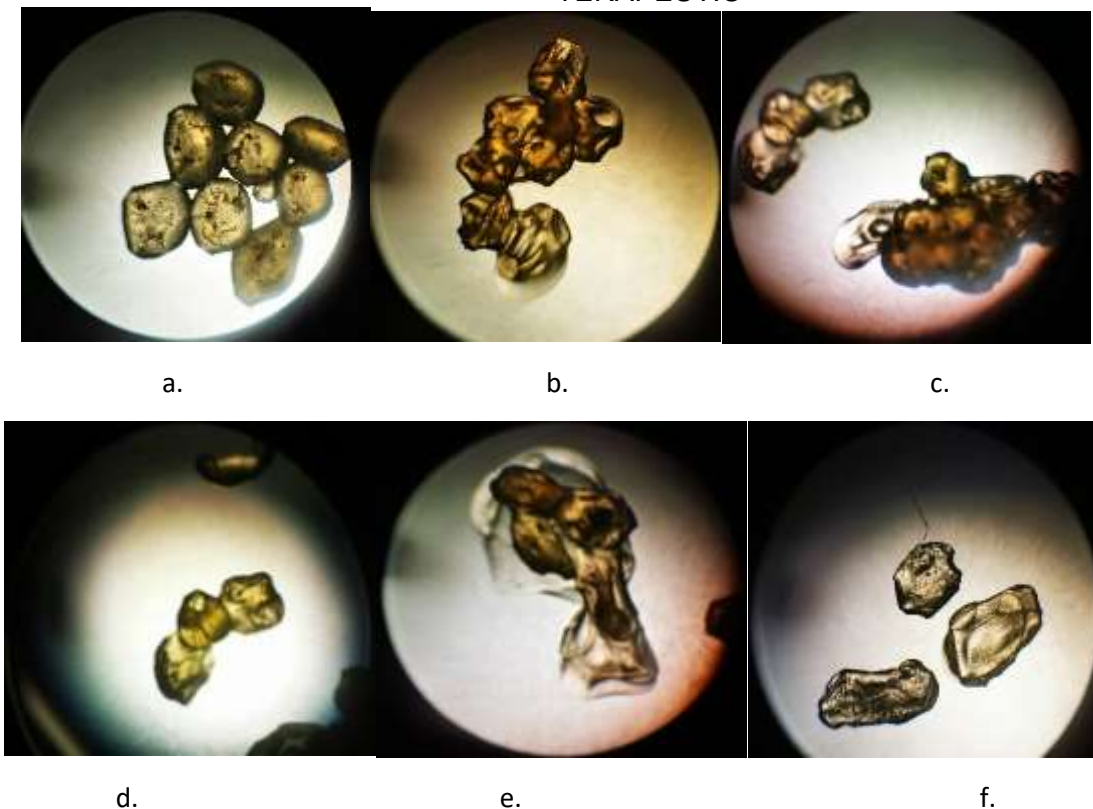
O tehnică mai avansată este reprezentată de microscopia electronică de scanare (SEM) care utilizează un fascicul de electroni pentru a obține imagini de înaltă rezoluție ale microcapsulelor. Așa se pot obține detalii despre forma, suprafața și structura capsulelor și se evaluează morfologia. Analiza SEM este în general cuplata cu Spectroscopia cu raze X cu dispersie de energie (SEDX) privind analiza compozițională a eșantioanelor.

Prin spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) se pot realiza spectre de absorbție care dau informații despre compoziția chimică a microcapsulelor. Analiza termică precum cea termogravimetrică (TGA) și cea de scanare diferențială (DSC) aduc informații cu privire la stabilitatea termică, conținutul de umiditate și comportamentul termic al microcapsulelor [573,574].

#### 7.4.2. Rezultate și discuții

Din imaginile înregistrate la microscopul optic se observă că au fost obținute microcapsule de forme și culori diferite care nu se aseamănă între ele, deși s-au folosit extracte cu același tip de solvent, etanol 70% (Figura 7.3). Microcapsulele de *B.hispida* și de *T. cucumerina* indica o culoare verde mai intensă, celelalte specii au microsferelor colorate în galben-portocaliu până la maroniu, în timp ce în proba de control, numai cu alginat sunt microsferelor de culoare alb ușor transparent. Forma acestor microsisteme variază mult fiind foarte neregulată în cazul probei care conține extract de *L.cylindrica*, iar cele care conțin extracte de *C. metuliferus* și *M. charantia* sunt asemănătoare, iar cele care conțin extract de *B.hispida* sunt mult mai rotunde și fără deformări.

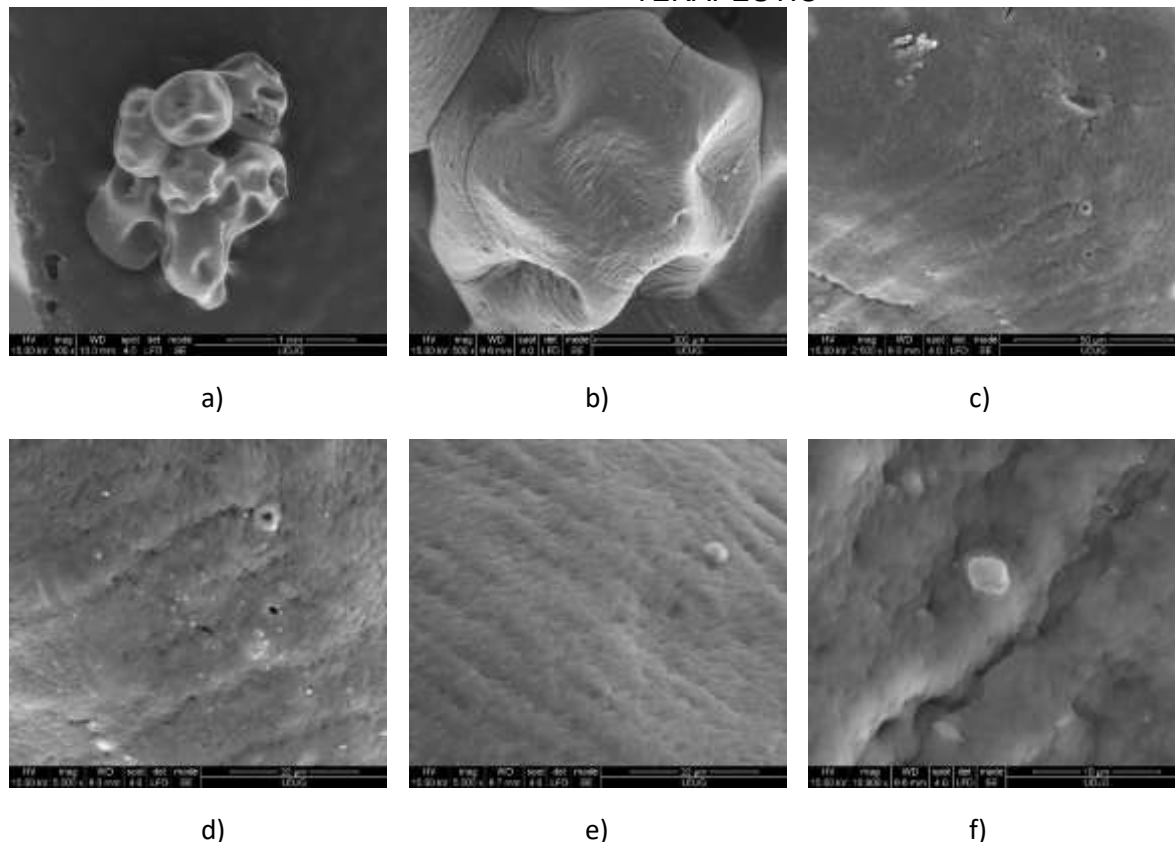




**Figura 7.3.** Imagini înregistrate cu microscopul optic (MO) pentru microcapsulele conținând extractele de a. *B.hispida*; b. *C. metuliferus*; c. *M. charantia*; d. *T. cucumerina*; e. *L.cylindrica*; f. control pozitiv

În imaginile SEM (Figura 7.4) sunt prezentate microcasulele obținute din extractele fiecărei specii analizate, imagini realizate la diferite marimi.. Astfel se observă diferite forme neregulate în cazul speciilor *C. metuliferus*, *T. cucumerina* și *L.cylindrica*; și sferice pentru probele de *B.hispida* și *M. charantia*, fasciculul emergent poate să conțină doar o informație locală (un 'pixel' ) din imagine.

Pentru microcapsule cu extractul de *C. metuliferus* (Figura 7.4) se observă mai multe microsferă bine definite, cu iregularități pe suprafață (Figura 7.4.a), având dimensiuni în jur de 300 μm (Figura 7.4.b). La mărirea de 5000X se observă suprafața peretelui microcapsulelor cu aspect regulat (de ex. Figura 7.4.d), în lanțuri polimerice bine ordonate în șiruri, evidente la mărirea de 10000X (Figura 7.4.e). Prin analiza EDX s-au pus în evidență compoziția elementelor chimice, în ordine, carbon, oxigen, clor, calciu, sau azot, prezente în microcapsule, în procente diferite, la mărirea de 5000X și 10000X (Figura 7.5.e).



**Figura 7.4.** Imagini SEM ale microcapsulelor cu extract de *C. metuliferus*: a) 100X(1mm); b) 500X (300  $\mu\text{m}$ ); c) 2500X (50  $\mu\text{m}$ ); d)si e) 5000X (20  $\mu\text{m}$ ); f) 10000X (10  $\mu\text{m}$ )

### 7.5. Concluzii parțiale

S-au obținut microcapsule conținând extracte hidroetanolice din fructele speciilor de plante cu proprietăți terapeutice adaptate la creștere și cultivare în România: *M. charantia*, *C. metuliferus*, *B.hispida*, *T. cucumerina* și *L.cylindrica*.

Microcapsulele s-au obținut prin gelifiere ionotropă externă cu alginat în prezența soluției de clorură de calciu.

Cel mai bun randament de încapsulare l-au avut extractele obținute din specia *C. metuliferus*, de 92,24% și *T. Cucumerina*, de 94%, iar gradul de încapsulare a fost de 91,05%, respectiv de 91,22%.

Prin microscopia optică s-au obținut imagini privind aspectul fiecărui tip de microcapsulă realizată, acestea indicând aspectul de microsferă rotunde sau ușor alungite, cu unele neregulărități pe suprafață, acestea fiind în funcție de specia utilizată în procesul de obținere al microcapsulelor.

Cu ajutorul imaginilor de microscopie electronica de scanare (SEM) s-au obținut imagini care confirmă aspectul de microsferă, cu informații mai multe privind morfologia suprafețelor microcapsulelor obținute, dar și aspectul peretelui microcapsulelor.

Analiza compozițională EDX, cuplată cu tehnica SEM, a imaginilor analizate a furnizat informații valoroase despre prezența elementelor chimice în microcapsule, precum carbonul, oxigenul, clorul, borul, potasiul, calciul și azotul, elemente specifice compușilor din produsele vegetale și a alginatului de calciu utilizat la obținerea microcapsulelor.

## Capitolul 8. Concluzii generale și originalitatea activității de cercetare

### 8.1. Concluzii generale și originalitatea cercetărilor

La începutul cercetărilor acestei teze de doctorat au fost propuse mult mai multe activități și direcții de cercetare, dar așa cum se știe, în cercetare imprevizibilul este mereu prezent, astfel că a fost posibilă realizarea parțială a direcțiilor inițiale de cercetare și reorientarea către altele, până s-a ajuns la obținerea produsului "finit", adică a acest studiu de doctorat.

În lucrarea de doctorat intitulată "Studiul compușilor chimici din specii de plante de interes terapeutic" au fost realizate cercetări asupra cinci specii adaptate la creștere și cultivare în România prin colaborare cu SCDL Buzău și Banca de Resurse Genetice Buzău dar și a unei plante africane, toate de interes terapeutic. Studiul a fost orientat spre câteva direcții principale de analiză a materialelor vegetale precum: identificarea, separarea, izolarea și caracterizarea unor compuși biologic activi, evaluarea potențialului terapeutic și obținerea și caracterizarea unui compus cu importanță pentru domeniul medical/alimentar.

Interesul pentru studiul speciilor *M.charantia*, *L.cylindrica* și *B.hispida* se datorează popularității acestor specii la nivel mondial, fiind un subiect de cercetare actual și analizat din perspective interdisciplinare, în timp ce speciile *C.siberiana*, *C.metuliferus* și *T.cucumerina* sunt specii mai puțin studiate, dar care în ultimii ani s-au dovedit interesante, atât din punct de vedere al compoziției chimice, cât și al potențialului terapeutic pe care le posedă. Astfel, deși plantele analizate în această teză par diferite au multe aspecte în comun.

Aportul științific original realizat în urma studiilor și cercetărilor este expus sintetic în următoarele concluzii.

- ✱ Pentru prima dată au fost analizate soiurile *M.charantia* Rodeo, *L.cylindrica* Elida, *B.hispida* Zefir, *C.metuliferus* Tempus și *T.cucumerina* Felix obținute prin colaborare cu Banca de Resurse Genetice Vegetale pentru Legumicultură, Floricultură, Plante Aromatice și Medicinale, BRGVEG Buzău și Stațiunea de Cercetare -Dezvoltare pentru Legumicultură, SCDL Buzău, România.
- ✱ S-au realizat studii în colaborare cu colegii din Burkina Fasso, Africa pe diverse părți anatomice ale plantei *C. sieberiana* culeasă din regiunea Hauts-Bassins, din pădurea Dienderesso, Burkina Faso.
- ✱ Speciile de plante selectate în studiu din familiile *Cucurbitaceae* și *Fabaceae*, prezintă un potențial terapeutic valoros fiind demonstrat prin vasta utilizare în medicina holistică, cât și prin studii și analize de laborator, dovedindu-se a avea proprietăți antibacteriene, antioxidate, antiinflamatorii și antidiabetice. *Momordica charantia*, cea mai studiată dintre speciile selectate, este cunoscută în mod special pentru proprietățile sale antidiabetice. *Trichosanthes cucumerina* se evidențiază prin beneficiile sale la nivelul tractului gastro-intestinal, *Benincasa hispida* pentru acțiunea antinociceptivă, *Luffa cylindrica* pentru proprietățile bronhodilatatoare și hepatoprotective, iar *Cucumis metuliferus* prin acțiunea antimalarică. Specia *Cassia sieberiana* se remarcă prin proprietăți terapeutice valoroase, fiind utilizată în medicina tradițională africană.
- ✱ Caracterizarea celulelor și țesuturilor vegetale din frunzele și fructele speciilor studiate a fost realizată cu ajutorul microscopiei CLSM.
- ✱ S-au utilizat diverse metode de extracție convenționale, precum decoctul, macerarea și extracția Soxhlet utilizând solvenți diferiți, dar și neconvenționale cum ar fi extracția secvențială asistată de ultrasunete,.

- ✎ Extracția secvențială asistată de ultrasunete utilizând solvenți cu polarități diferite, s-a dovedit a fi cea mai bună metodă de separare și izolare a compușilor de interes pentru studiile *in vitro*, extracție care a permis obținerea unor valori TEC (componente total extractibile) cuprinse într-un interval de 44,3 - 61,5%.
- ✎ În speciile vegetale analizate au fost evidențiați metaboliții primari și secundari, din clasele saponinelor, terpenoidelor și alcaloizilor compuși care dețin un potențial terapeutic valoros
- ✎ S-au obținut și analizat pentru prima dată sucuri din speciile *M.charantia* Rodeo, *C.metuliferus* Tempus, *B.hispida* Zefir și *T.cucumerina* Felix acestea dovedindu-se de mare interes pentru lumea științifică având în vedere numărul de citări al rezultatelor obținute.
- ✎ Pentru prima dată, s-au studiat comparativ sucurile dar și extractele din diverse părți ale anatomice ale unor specii din familia Cucurbitaceae și Fabaceae prin cuantificarea diferiților metaboliți primari și secundari precum zaharide, polifenoli, flavonoide, carotenoide, triterpenoide, vitamina C.
- ✎ Cea mai mare concentrație de compuși fenolici totali a fost pus în evidență în fructele speciei *C. metuliferus* ( $77,04 \pm 0,45$  mg EqAG/g SU) și în frunzele de *T. cucumerina* ( $58,55 \pm 0,55$  mg EqAG/g SU).
- ✎ Cel mai mare conținut de  $\beta$ -caroten ( $103,65 \pm 0,70$   $\mu$ g Eq $\beta$ C/g SU) a fost găsit în *M. charantia*, urmat de *C. metuliferus*, specia *T. cucumerina* având cea mai mică concentrație de  $\beta$ -caroten ( $3,75 \pm 0,21$  mg Eq $\beta$ C/g SU).
- ✎ Vitamina C s-a dovedit a fi din abundență în frunzele speciilor studiate, evidențiindu-se pentru cele mai bune valori extractele de *T.cucumerina* ( $19,65 \pm 0,01$  mgAA/10 g SU) și *C. metuliferus* ( $16,86 \pm 0,06$  mgAA/10 g SU).
- ✎ Fructele speciilor studiate au o concentrație mai mare de zaharide cu valori cuprinse între 20 și 40  $\mu$ g EqG/mL comparativ cu frunzele aceluiași specii, dar cu un conținut mai redus decât alte specii din familia Cucurbitaceae prezentate în literatură.
- ✎ S-a realizat o analiză comparativă a micro- și macroelementelor din materialul vegetal uscat natural și liofilizat obținut din fructele speciilor studiate și s-a demonstrat faptul că toate speciile au un conținut crescut de potasiu, iar probele uscate natural sunt mai bogate în elemente, precum fosfor, potasiu, calciu, magneziu, sulf, sodiu, fier, mangan, bor, nichel, cupru, seleniu, molibden, cobalt, zinc, bariu, crom și aluminiu.
- ✎ Prin metoda ICP/MS, a fost pusă în evidență prezența unor elemente chimice cu valori mari, precum potasiu, calciu, magneziu și fier, în toate speciile analizate. Studiul comparativ dintre probele uscate și cele liofilizate a demonstrat faptul că materialul vegetal uscat păstrează mai bine prezența de micro- și macroelemente în probe.
- ✎ Prin metoda cromatografică HPTLC, au fost puse în evidență componentele principale din clasa zaharidelor, metaboliți primari, prezenți în speciile familiei Cucurbitaceae cum sunt maltoza, arabinoza, dezoxiriboza.
- ✎ Prin cromatografie HPLC/DAD s-a confirmat că marea majoritate a speciilor din familia Cucurbitaceae conțin un număr mare de triterpenoide și concentrații semnificative de polifenoli și flavonoide. Au fost cuantificați compușii chimici precum acidul shikimic, acidul galic, quercitina, acidul cinamic, acidul ursolic și oleanoic prezenți atât în extractele hidroetaolice, cât și în probele de suc ale speciilor de castraveți. Astfel în sucul de *M.charantia* și în cel de *B.hispida* a fost identificat în cea mai mare concentrație acidul galic ( $3386.78 \pm 1.60$  mg/kg și respectiv  $525.24 \pm 0.80$  mg/kg), în cel de *C.metuliferus* catechina  $928.74 \pm 0.97$  mg/kg, iar în *T.cucumerina* acidul oleanoic ( $352.79 \pm 7.97$  mg/kg).
- ✎ Prin utilizarea metodei UHPLC/MS a extractelor din fructele și frunzele speciilor din familia Cucurbitaceae au fost puși în evidență compuși specifici acestor plante precum cucurbitacinele A, E, C, D, luteolina, kuguacinul etc.

- ✎ Prin cromatografie GC/MS a fost analizată partea lipofilă a fructelor de *M. charantia*, *T. cucumerina* și *C. metuliferus*, structura fiind demonstrată prin mecanismele de fragmentare propuse pentru compuși identificați cum ar fi : linalol, n- heneicosan, ocimen, 2,6- tritertbutil-fenol.
- ✎ Separarea și izolarea prin două metode diferite a acidului ursolic, ca fiind un compus primordial în fructele speciilor de *C. metuliferus* și *B.hispida*. Compusul pur obținut a fost caracterizat prin FT-IR, UHPLC/MS și RMN.
- ✎ S-au studiat diferite proprietăți biologice active ale speciilor studiate prin evaluarea citotoxicității, activității antioxidante și antiinflamatoare.
- ✎ Studiile realizate pentru dovedirea proprietăților antioxidante ale extractelor obținute s-au realizat prin 6 metode diferite, metodele de inhibare a radicalilor liberi DPPH și ABTS, metoda FRAP și evaluarea capacității de chelatare a ionilor metalici, pentru unele dintre speciile de plante analizate fiind realizată pentru prima dată în această teză
- ✎ Activitatea antioxidantă determinată în cazul combinațiilor de sucuri de fructe a prezentat o valoare mai mare decât cele individuale. Activitatea antioxidantă prin inhibarea radicalului DPPH a combinațiilor de sucuri, a pus în evidență efectul sinergic al speciei *M.charantia* asupra celorlalte specii, precum și activitatea de chelare a ionilor metalici. Același efect sinergic a fost dovedit și în cazul combinației dintre kiwano și castravetele șarpe.
- ✎ .
- ✎ Se poate afirma în acest context că apare o sinergie în amestecurile obținute acestea având un efect antioxidant crescut, așadar, consumul acestora poate preveni sau reduce stresul oxidativ și pot fi valorificate mai departe în obținerea de produse alimentare funcționale.
- ✎ Cea mai pronunțată activitate, evaluată prin metoda de reducere a molibdenului, au demonstrat extractele din fructele de *C. metuliferus* și *B. hispida*, acestea putând fi utile în obținerea de tratamente pe bază de plante împotriva stresului oxidativ și efectelor ulterioare ale acestuia generate în organism..Prin metoda de inhibare a radicalului DPPH toate probele analizate au prezentat un efect antioxidant puternic efect care este direct proporțional cu concentrația extractelor, atât din frunzele, cât și din fructele speciilor de plante analizate (fam. Cucurbitaceae și Fabaceae).
- ✎ Evaluarea potențialului antioxidant prin metoda de inhibare a radicalului ABTS realizată comparativ pentru două tipuri de extracte hidroetanolic și metanolic a prezentat valori variate. Astfel, probele hiroetanolic din fructele de *L.cylindrica* și *T. cucumerina* au prezentat un efect inhibitor crescut la concentrații mici, comparativ cu celelalte specii, în timp ce extractele metanolic au fost avantajoase pentru toții reprezentanții, ieșind în evidență castravetele amar și kiwano. În cazul extractelor a fost remarcat cel din frunzele speciei *M. charantia*, acesta fiind o potențială sursă bogată în antioxidanți pentru obținerea de ceaiuri și alte produse alimentare sau farmaceutice.
- ✎ Rezultatele obținute prin metoda FRAP pentru probele din fructele și frunzele speciilor studiate în această teză nu au variat semnificativ fiind încadrate într-un interval IC<sub>50</sub> cuprins între 34,63 μM Eq Fe (II)/g și 45,37 μM Eq Fe (II)/g.
- ✎ Cea mai mare capacitate de chelatare a ionilor metalici (Fe<sup>2+</sup>) au demonstrat extractele din fructele castravetelui de iarnă și castravetelui șarpe, iar în cazul extractelor din frunzele cele ale speciilor de plante *L.cylindrica* și *C. metuliferus*. Prin urmare în cazul excesului de fier în organism, speciile de plante analizate sunt surse importante de compuși utili

care pot împiedica efectele toxice asupra organelor, celulelor sau declanșarea peroxidării lipidelor care apar prin acumularea fierului.

- ✎ S-au utilizat două metode de determinare a toxicității: MTT și testul de toxicitate pe germeni de grâu și s-a demonstrat faptul că extractele obținute din speciile din familia Cucurbitaceae nu prezintă citotoxicitate.
- ✎ În studiile de determinare a viabilității fibroblaștilor în prezența extractelor studiate, s-a observat că după cele 24 de ore de analiză viabilitatea celulară crește, ceea ce înseamnă că în timp mor un număr mai mic de celule sănătoase.
- ✎ Activitatea antiinflamatorie a probelor vegetale a fost realizată prin mai multe metode, iar rezultatele au variat pentru speciile de plante analizate. *M. charantia* și *C. sieberiana* au prezentat cel mai ridicat potențial în combaterea inflamației. În testele de inhibare a lipoxigenazei s-au dovedit a fi mai active extractele din frunzele de *L. cylindrica*, iar în cel de denaturare a albuminei extractele din fructele de *T. cucumerina*.
- ✎ S-a dovedit experimental faptul că materialul vegetal proaspăt are un potențial mai mare de inhibiție a xantinoxidazei comparativ cu cel uscat.
- ✎ Analiza proprietăților antidiabetice pentru materialele vegetale prin inhibarea activității a două enzime reprezentative, a scos în evidență speciile *M. charantia* și *C. metuliferus* care au avut capacitate mai mare de a inhiba  $\alpha$ -amilaza și  $\beta$ -glucosidaza.
- ✎ Studiul preliminar asupra unor bacterii gram-pozitive și gram-negative, a scos în evidență potențialul antibacterian al speciei *L. cylindrica*, celelalte extracte din speciile de plante analizate fiind mai puțin active împotriva tulpinilor de microorganisme testate.
- ✎ S-au obținut microcapsule conținând extracte hidroetanolice din fructele speciilor de plante cu proprietăți terapeutice adaptate la creștere și cultivare în România: *M. charantia*, *C. metuliferus*, *B. hispida*, *T. cucumerina* și *L. cylindrica*.
- ✎ Microcapsulele s-au obținut prin gelifiere ionotropă externă cu alginat în prezența soluției de clorură de calciu.
- ✎ Cel mai bun randament de încapsulare l-au avut extractele obținute din specia *C. metuliferus*, de 92,24% și *T. Cucumerina*, de 94%, iar gradul de încapsulare a fost de 91,05%, respectiv de 91,22%.
- ✎ Prin microscopia optică s-au obținut imagini privind aspectul fiecărui tip de microcapsulă realizată, acestea indicând aspectul de microsferă rotunde sau ușor alungite, cu unele neregulărități pe suprafață, acestea fiind în funcție de specia utilizată în procesul de obținere al microcapsulelor.
- ✎ Prin microscopie electronică de scanare (SEM) s-au obținut imagini care confirmă aspectul de microsferă, cu informații mai multe privind morfologia suprafațelor microcapsulelor obținute, dar și privind aspectul peretelui microcapsulelor.
- ✎ Analiza compozițională EDX, cuplată cu tehnica SEM, a imaginilor analizate a furnizat informații valoroase despre prezența elementelor chimice în microcapsule, precum carbonul, oxigenul, clorul, borul, potasiul, calciul și azotul, elemente specifice compușilor din produsele vegetale și a alginatului de calciu utilizat la obținerea microcapsulelor.

## 8.2. Direcții viitoare de cercetare

Rezultatele obținute în studiile din acest studiu de doctorat, care s-au centrat pe șase specii de plante: *M. charantia*, *C. metuliferus*, *B. hispida*, *T. cucumerina*, *L. cylindrica* și *C. siberiana* au generat noi perspective de cercetare care își propun exploatarea în detaliu a unor direcții care nu au fost valorificate la maxim.

➤Astfel, cercetările ulterioare vor avea ca direcții mari de cercetare izolarea și separarea de noi molecule, specifice speciilor de plante analizate și analiza acestora în detaliu, prin studii *in vitro*, *in vivo* și *in silico*.

➤Obținerea prin diverse tehnici de separare de noi compuși puri din speciile studiate, în mod special continuarea studiului asupra speciei *C. metuliferus*.

➤Realizarea studiilor *in silico* a compușilor izolați din speciile *C. metuliferus* și *B. hispida* cu scopul de a pune în evidență anumite proprietăți precum antiinflamatorii și antidiabetice și în ideea deslușirii mecanismului de acțiune al acestora.

➤Realizarea unor studii *in vitro* și *in vivo* pentru moleculele izolate dar și pentru extractele cele mai active biologic pentru a pune în evidență activitatea cicatrizantă, cu scopul obținerii unui produs cu această acțiune.

➤Caracterizarea mai în profunzime din punct de vedere fizico-chimic a microcapsulelor care înglobează compușii din aceste plante și evaluarea *in vitro* a potențialului antioxidant, antiinflamator și antimicrobian; dar și eliberarea compușilor de interes terapeutic prin metoda digestiei *in vitro*.

➤Obținerea de noi microcapsule prin tehnici diferite, utilizând alte materiale pentru încapsulare cu scopul selectării metodei optime de obținere a microcapsulelor, care să fie mai sigure și cu potențial terapeutic crescut și mai avantajoase economic.

➤Realizarea unor studii care să identifice proprietățile antivirale și antitumorale ale extractelor din fructe și din frunzele speciilor studiate în acest studiu.

➤Realizarea de colaborări și noi proiecte cu conexiune interdisciplinară care vor urmări promovarea speciilor studiate pe piața din România, acest lucru fiind posibil prin diseminarea rezultatelor cercetărilor din teză și aducerea în atenția comunității științifice dar și publicului larg, adică consumatorul, a compoziției fitochimice și a proprietăților biologice active ale acestor specii cu scopul promovării și valorificării acestor specii din punct de vedere terapeutic și alimentar.

➤Valorificarea rezultatelor și planului de afacere realizat pe perioada studiilor doctorale în cadrul proiectului „Excelența academică și valori antreprenoriale - sistem de burse pentru asigurarea oportunităților de formare și dezvoltare a competențelor antreprenoriale ale doctoranzilor și post doctoranzilor” – ANTREPRENORDOC, Contract nr. 36355/23.05.2019 POCU/380/6/13 - Cod SMIS: 123847 realizat pe baza studiilor din teza de doctorat.

## Capitolul 9. Diseminarea rezultatelor

### 9.1. Lista publicațiilor originale

**Lista publicațiilor originale și în colaborare (Factor de impact cumulat= 38,675)**

1. **Anna Cazanevscaia Busuioc**, Andreea-Veronica Dediu Botezatu , Bianca Furdui, Costel Vinatoru, Filippo Maggi, Giovanni Caprioli, Rodica-Mihaela Dinica; "Comparative Study of the Chemical Compositions and Antioxidant Activities of Fresh Juices from Romanian Cucurbitaceae Varieties" *Molecules* 2020, 25, doi:10.3390/molecules25225468, F.I.=4,927; (37 citări).

2. Eliasse Zongo, **Anna Busuioc\***, Roland Nâg-Tiero Meda, Andreea Veronica Botezatu, Maria Daniela Mihaila , Ana-Maria Mocanu, Sorin Marius Avramescu, Benjamin Kouliga Koama, Sami Eric Kam, Hadidiatou Belem, Franck Le Sage Somda, Clarisse Ouedraogo, Georges Anicet Ouedraogo, Rodica Mihaela Dinica "Exploration of the Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential of Cassia Sieberiana DC and Piliostigma Thonningii (Schumach.) Milne-Redh, Traditionally Used in the Treatment of Hepatitis in the Hauts-Bassins Region of Burkina Faso" *Pharmaceuticals* 2023, 16, 133, doi:10.3390/ph16010133, F.I.=5,215 (2 citări).

3. **Anna Cazanevscaia Busuioc**, Giorgiana Valentina Costea, Andreea Veronica Dediu Botezatu, Bianca Furdui,\* and Rodica Mihaela Dinica\*; "*Cucumis metuliferus* L. Fruits Extract with Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antidiabetic Properties as Source of Ursolic Acid" *Separations* 2023, 10, 274. <https://doi.org/10.3390/separations10050274>, F.I.=3,344.

4. Bălănescu Fănică, Andreea Veronica Botezatu, Fernanda Marques, **Anna Busuioc**, Olivian Marinceaș, Costel Vînătoru, Geta Cârâc, Bianca Furdui, and Rodica Mihaela Dinica. "Bridging the Chemical Profile and Biological Activities of a New Variety of Agastache Foeniculum (Pursh) Kuntze Extracts and Essential Oil", *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 828, doi:10.3390/ijms24010828, F.I.=6,208 (1 citare).

5. Balanescu Fanica, **Anna Cazanevscaia Busuioc**, Andreea Veronica Dediu Botezatu, Steluta Gosav, Sorin Marius Avramescu, Bianca Furdui, and Rodica Mihaela Dinica. "Comparative Study of Natural Antioxidants from Glycine Max, Anethum Graveolens and Pimpinella Anisum Seed and Sprout Extracts Obtained by Ultrasound-Assisted Extraction", *Separations* 2022, 9, 152, doi:10.3390/separations9060152, F.I.=3,344; (8 citări).

6. Dinica Rodica-Mihaela, Sandu Cristina, Botezatu Dediu Andreea Veronica, **Busuioc Anna Cazanevscaia**, Balanescu Fanica, Ionica Mihaila Maria Daniela, Dumitru Caterina Nela, Furdui Bianca, Iancu Alina Viorica-" Allantoin from Valuable Romanian Animal and Plant Sources with Promising Anti-inflammatory Activity as a Nutricosmetic Ingredient", *Sustainability*, 2021, Volume 13, Issue 18, Article Number 10170, DOI 10.3390/su131810170, F.I.= 3,889; (12 citări).

7. Kevine Kamga Silihe, Stephane Zingue, Marius Trésor Kemegne Sipping, **Anna Busuioc Cazanevscaia**, Andreea Veronica Dediu Botezatu, Dieudonne Njamen, Rodica Mihaela Dinica;" The Antioxidant Potential of *Ficus Umbellata* Vahl (Moraceae) That Accelerates In Vitro and the In Vivo Anti-Inflammatory Protective Effects" *Appl. Sci.* 2022, 12, 9070. <https://doi.org/10.3390/app12189070>, F.I. =2,838.

8. Sara El Moujahed, Rodica Mihaela Dinica, Hicham Abou Oualid, Mihaela Cudalbeanu, Andreea-Veronica Botezatu-Dediu, **Anna Cazanevscaia**



**Busuioc**, Fouad Ouazzani Chahdi, Youssef Kandri Rodi, Faouzi Errachidi "Sustainable biomass as green and efficient crosslinkers of collagen: Case of by-products from six pomegranate varieties with global commercial interest in Morocco" *Journal of Environmental Management*, Volume 335, 1 June 2023, 117613, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117613> , F.I. =8.91

## 9.2. Participarea la proiecte, școli de vară și conferințe

### Proiecte:

- Director: PN-III-P1-1.1-MC-2019-1767 – Proiecte de mobilitate pentru cercetători, UEFISCDI, 2019;
- Mobilitate în cadrul proiectului EXPERT la Universitatea din București, Facultatea de Chimie, Catedra de Chimie Organică , februarie 2020;
- Participant în proiectul "PROACTIVE HEALTH WITHOUT BORDERS, Joint Operational Programme Romania–Republic of Moldova 2014- 2020 – ENI -2<sup>nd</sup> Call for proposals", 2021 GALAȚI;
- Participant în cadrul proiectului Excelența academică și valori antreprenoriale - sistem de burse pentru asigurarea oportunităților de formare și dezvoltare a competențelor antreprenoriale ale doctoranzilor și post doctoranzilor – ANTREPRENORDOC, Contract nr. 36355/23.05.2019 POCU/380/6/13 - Cod SMIS: 123847- 2022, GALAȚI.

### Premii:

- Premiul III - în cadrul Conferinței Școlii Doctorale SCDS-UDJG 2018, Galați,
- Premiul III- prezentare orală în cadrul Conferinței Școlii Doctorale SCDS-UDJG 2019, Galați
- Premiul III- poster în cadrul Conferinței Școlii Doctorale SCDS-UDJG 2019, Galați
- Premiul III- în cadrul Conferinței Școlii Doctorale SCDS-UDJG 2020, Galați
- Premiul Award-The most Active Team of Students în cadrul International Summer School „Food Safety and Healthy Living” FSHL-2020;
- Premiul I- în cadrul Conferinței Școlii Doctorale SCDS-UDJG 2021;
- Premiul II- în cadrul Conferinței Școlii Doctorale SCDS-UDJG 2021;
- Premiul I- în cadrul Conferinței Școlii Doctorale SCDS-UDJG 2022;
- Premiul I- în cadrul Conferinței Școlii Doctorale SCDS-UDJG 2023;
- Mențiune- în cadrul Conferinței Școlii Doctorale SCDS-UDJG 2023;
- Premiul I- Premierea rezultatelor cetării UEFISCDI :
- PN-III-P1-1.1- PRECISI-2021- 56862

### Conferințe

- Conferința Internațională "10ème édition du Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée -**COFrRoCA** iunie, 2018";
- Conferința Științifică a Școlilor Doctorale **SCDS-UDJG**, Ediția a VI-a iunie 2018, GALAȚI;
- Congresul Național cu participare Internațională **GALMED**, Ediția VIII-a martie 2018, GALAȚI;
- Conferința **IasiCHEM** 2018, Zilele Facultății de Chimie "Universitatea Alexandru Ioan Cuza" Iași, 2018;

- Conferința Internațională "Conférence Internationale des Sciences de la VIE et des Technologies pour le **BIEN-ÊTRE, LIFE 2018**", Cluj – Napoca, Romania
- Conferința Științifică a Școlilor Doctorale **SCDS-UDJG**, Ediția a VII-a 2019, GALAȚI;
- Congresul Internațional de chimie **IUPAC**, Paris, 2019;
- Conferința „Utilizzo dei prodotti di scarto della canapa industriale come fonte di biopesticidi” , Universitatea din Camerino (UNICAM), Italia 2019;
- Conferința Științifică a Școlilor Doctorale **SCDS-UDJG**, Ediția a VIII-a 2020, GALAȚI;
- Conferința „Siguranța alimentelor-o responsabilitate comuna” iulie 2020;
- Advances in Food Chemistry Conference, **AdFoodChem**, aprilie 2021;
- International Conference "INTELLIGENT VALORISATION OF AGRO-INDUSTRIAL WASTES", octombrie 2021 Chișinău;
- "Young Researchers' International Conference on Chemistry and Chemical Engineering- **YRICCCE III**", Cluj-Napoca 2021;
- Conferința Științifică a Școlilor Doctorale **SCDS-UDJG**, Ediția a IX-a 2021, GALAȚI;
- Conferința **EuroAliment 2021**, GALAȚI;
- 17th International Conference "Students for Students", 2021;
- International Conference "European Integration – Realities and Perspectives" , 16th Edition, 2021, GALAȚI;
- "11th International Conference The Danube - Axis of European Identity "ediția a XI-a, iunie, 2021 Galați;
- "International Conference On Contemporary Scientific and Technological Aspects Towards An Entrepreneurial Approach " 1st EDITION, 2022, GALAȚI;
- **EUROINVENT**, 14th edition, 2022, Iași;
- Conferința Științifică a Școlilor Doctorale **SCDS-UDJG**, Ediția a X-a 2022, GALAȚI;
- Conferința Națională de Chimie ediția a XXXVI-a, Călimănești-Căciulata, 2022;
- Conferința Științifică a Școlilor Doctorale **SCDS-UDJG** , Ediția a XI-a 2023, GALAȚI.

### Școli de vară:

- Participare la International Summer School „Food Safety and Healthy Living” FSHL-2020 iulie 2020 ;
- Participarea la International Summer School „CHEMISTRY for Everyday Life” Camerino, Italy, septembrie 2020

### Cursuri:

- Engleză în scopuri științifice și inginerești, 2018
- Redactare academică(academic writing) pe domeniul tehnic și științe fundamentale.Etica în cercetarea științifică și managementul proiectelor de cercetare”2018
- Metode avansate de procesare și analiza datelor experimentale”2018
- Tehnici instrumentale de separare și identificare și analiza datelor (cromatografie, RMN, MS, IR,lectroanalize,analize multivariante)” 2019
- "Practici de lucru privind realizarea și publicarea lucrărilor științifice II – În domeniul tehnic", Galați, mai 2019
- „Redactarea și publicarea articolelor științifice” DFCTT, Galați, iunie 2019
- „From B cells to yeast-diverse approaches to rapid discovery of COVID -19 therapeutic antibodies ” august 2020
- „Disease and the Hippo Pathway: Cellular and Molecular Mechanisms ” iulie 2020
- „Sewage Screening as an Early Outbreak Alert Tool and SARS-Covid-2 Fate in waters „9 iulie 2020

- „Catalysts / Recent Advances in Biocatalysis for Biomanufacturing „iunie 2020
- „Nutrients/ Diet and CKD: Old and New Concepts „iulie 2020
- „Strategies to maximize LC-MS/MS uptime and efficiency”, septembrie 2020
- „Modernizing the analyses of naturally occurring toxins in food and water” septembrie 2020
- „Dioxin Session 1 | Moving away from magnetic sectors for legacy POP's analyses” septembrie 2020
- „Dioxin Session 2 | Advances in instrumentation for emerging POP's analyses” 22 septembrie 2020
- „Clarivate în ciclul de viață al inovației” decembrie 2020
- „Ingrediente funcționale, obținere și caracterizare” 2020;
- „Web of Science pentru incepatori „ianuarie 2021
- „Datele de finantare in Web of Science ” ianuarie 2021
- „Choosing a different Carrier Gas in GC „ martie 2021
- „Îmbunătățește-ți profilul de cercetător” martie 2021
- „Basic of LPGC/Vacuum GC for fastest methods using the MS detector ” aprilie 2021
- „Basics in liquid chromatography „ aprilie 2021
- „Faster method development and optimisation in (U)HPLC) by choosing a suitable column type” mai 2021
- „HILIC-Basic and new methods and applications for the analysis of polar compounds” mai 2021
- „Build a Rock-Solid Analytical Foundation with Restek CRMs,, iunie 2021
- „Our favorite productivity tools for staying ahead in LC-MS/MS food testing workflows” iunie 2021.

**Concursuri:**

- Finala națională FameLab România - Grand Final 2019, organizatori British Council;
- Premiul cel Mare - BluAct competition în Galați, România 2020, <https://www.bluact.eu/>.