

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

**STUDII FIZICO-CHIMICE COMPARTIVE PE COMPUȘI
CU STRUCTURI INDOLICE DIN EXTRACTE
NATURALE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. RODICA SÎRBU**

**Student-doctorand:
FARM. ANA-MARIA DUMITRESCU (NECULAI)**

**BUCUREȘTI
2020**

CUPRINSUL TEZEI

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

LISTA CU ABREVIERI ȘI SIMBOLURI

INTRODUCERE

PARTEA A I-A STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL 1. STRUCTURI CU INELE INDOLICE PREZENTE ÎN PRODUSE NATURALE

1.1. NOȚIUNI GENERALE DESPRE COMPUȘII INDOLICI

1.2. COMPUȘI INDOLICI NATURALI

1.3. ROLUL COMPUȘILOR INDOLICI ÎN DESCOPERIREA MEDICAMENTELOR

CAPITOLUL 2. METODE DE ANALIZĂ A COMPUȘILOR INDOLICI

2.1. METODE DE EXTRAȚIE ȘI DETERMINARE CALITATIVĂ A COMPUȘILOR CU INEL INDOLIC

2.2. ANALIZA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A COMPUȘILOR INDOLICI

2.2.1. METODA HERTER ȘI FOSTER (HERTER C.A., 1905)

2.2.2. DETERMINĂRI PRIN TESTĂRI DE CULOARE

2.2.3. SEPARAREA INDOLULUI DE TRIPTOFAN CU BACTERII INDOL-POZITIVE

2.3. METODE MODERNE DE DETERMINARE A COMPUȘILOR INDOLICI

2.3.1. METODA COLORIMETRICĂ

2.3.2. METODA FLUORIMETRICĂ

2.3.3. METODA SPECTROFOTOMETRICĂ

2.3.4. METODA SPECTROFLUORIMETRICĂ

2.4. METODE CROMATOGRAFICE

2.4.1 METODA HPLC (CROMATOGRAFIE LICHIDĂ DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ) CU CHEMILUMINISCENȚĂ

2.4.2. METODA CROMATOGRAFIEI ÎN FAZĂ LICHIDĂ CU DETECȚIE ELECTROCHIMICĂ

2.4.3. METODA CROMATOGRAFIEI DE FLUIDE SUPERCRITICE

2.4.4. DETERMINAREA COMPUȘILOR INDOLICI DIN EXTRACTE VEGETALE PRIN EXTRACȚIA ÎN FAZĂ SOLIDĂ ȘI CROMATOGRAFIE LICHIDĂ DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ CU DETECȚIE UV ȘI FLUORESCENȚĂ

CAPITOLUL 3. STRUCTURA TRANSDERMICĂ, CARACTERISTICILE PIELII, APLICAȚIA TOPICĂ, SISTEME DE LIVRARE TRANSDERMICE ȘI MODELE REOLOGICE ALE FORMULĂRILOR FARMACEUTICE APLICATE TOPIC

3.1. STRUCTURA TRANSDERMICĂ ȘI CARACTERISTICILE PIELII

3.2. FORME FARMACEUTICE CU ADMINISTRARE TOPICĂ

3.3. PERMEABILITATEA TRANSDERMICĂ A SUBSTANȚELOR MEDICAMENTOASE

3.4. ABSORBȚIA TRANSEPIDERMICĂ A MOLECULELOR BIOACTIVE

3.5. PERMEABILITATEA MOLECULELOR BIOACTIVE PRIN STRATUL CORNOS

3.6. PERMEABILITATEA MOLECULELOR BIOACTIVE PRIN DERM

3.7. COMPORTAMENTUL REOLOGIC AL FORMELOR FARMACEUTICE SEMISOLIDE ADMINISTRATE TOPIC

3.8. MODELE REOLOGICE CARE EVIDENȚIAZĂ COMPORTAREA FORMELOR FARMACEUTICE SEMISOLIDE TOPICE

PARTEA A II – A CONTRIBUȚII PERSONALE

MOTIVAȚIA CERCETĂRII

CAPITOLUL 4. STUDII FIZICO-CHIMICE COMPARATIVE PRIVIND COMPUȘII INDOLICI EXTRAȘI DIN PLANTA *VINCA MINOR* L.

4.1. INTRODUCERE

4.2. STUDIUL FITOCHIMIC PENTRU *VINCA MINOR* L.

4.2.1. CLASIFICARE TAXONOMICĂ

4.2.2. ALCALOIZII *VINCA*

4.3. PREGĂTIREA MATERIALULUI VEGETAL

4.4. ANALIZA FIZICO-CHIMICĂ A COMPUȘILOR INDOLICI EXTRAȘI DIN PLANTA *VINCA MINOR* L.

4.4.1. VALIDAREA METODEI HPLC DE DETERMINARE A VINCAMINEI DIN PLANTA *VINCA MINOR* L.

4.4.2. APLICAREA METODEI HPLC ÎN SEPARAREA CANTITATIVĂ A ALCALOIZILOR CU INEL INDOLIC DIN PLANTA *VINCA MINOR* L.

4.4.3. STUDIUL SPECTROFOTOMETRIC AL EXTRACTELOR VEGETALE OBȚINUTE DIN FRUNZA ȘI TULPINA PLANTEI *VINCA MINOR* L.

4.4.4. STUDIUL PRIN SPECTROSCOPIE ÎN IR AL EXTRACTELOR ALCOOLICE 70% OBȚINUTE DIN FRUNZA PLANTEI *VINCA MINOR* L.

4.5. STUDII PRIVIND COMPOZIȚIA CHIMICĂ A EXTRACTELOR OBTINUTE DIN PLANTA *VINCA MINOR* L.

4.5.1. DETERMINAREA COMPOZIȚIEI MINERALE A PLANTEI *VINCA MINOR* L.

4.5.2. DETERMINAREA CONȚINUTULUI TOTAL DE POLIFENOLI

4.6. CONCLUZIILE CAPITOLULUI

CAPITOLUL 5. REALIZAREA UNOR FORME FARMACEUTICE SEMISOLIDE FOLOSIND EXTRACTE NATURALE DIN PLANTA *VINCA MINOR* L.

5.1. INTRODUCRE

5.2. MATERIALE ȘI METODE DE LUCRU

5.3. PREPARAREA FORMULĂRILOR FARMACEUTICE SEMISOLIDE FOLOSIND SOLUȚIILE ALCOOLICE EXTRACTIVE 96%, 70% ȘI 40% OBTINUTE DIN FRUNZA ȘI TULPINA PLANTEI *VINCA MINOR* L.

5.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

5.4.1. REZULTATE PRIVIND CARACTERISTICILE ORGANOLEPTICE

5.4.2. DETERMINAREA VARIAȚIEI pH-ULUI

5.4.3. REZULTATE PRIVIND DETERMINAREA CAPACITĂȚII DE ÎNTINDERE²⁰

5.5. CONCLUZIILE STUDIULUI

CAPITOLUL 6. STUDII COMPARATIVE PRIVIND CARACTERUL REOLOGIC AL FORMULĂRILOR FARMACEUTICE CU APLICAȚIE TOPICĂ OBTINUTE

6.1. INTRODUCERE

6.2. MATERIALE ȘI METODA DE LUCRU

6.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

6.4. CONCLUZIILE STUDIULUI

CAPITOLUL 7. STUDII COMPARATIVE PRIVIND PROPRIETĂȚILE ANTIOXIDANTE ALE EXTRACTELOR ALCOOLICE VEGETALE DIN FRUNZA ȘI TULPINA PLANTEI *VINCA MINOR* L. ȘI A UNOR FORMULĂRI FARMACEUTICE OBTINUTE

7.1. CERCETĂRI PRIVIND ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ A EXTRACTELOR VEGETALE ALCOOLICE OBTINUTE DIN PLANTA *VINCA MINOR* L.

7.1.1. STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A EXTRACTELOR VEGETALE ALCOOLICE OBTINUTE DIN PLANTA *VINCA MINOR* L. UTILIZÂND METODA DE CAPTARE A RADICALILOR 2,2-DIPHENYL-1PICRYLHYDRAZYL-DDPH

7.1.2. STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE AL EXTRACTELOR VEGETALE ALCOOLICE OBTINUTE DIN PLANTA *VINCA MINOR* L. ȘI A UNOR FORMULĂRI FARMACEUTICE UTILIZÂND METODA PRIN FOTOCHEMILUMINESCENȚĂ

7.2. CONCLUZIILE CAPITOLULUI

CAPITOLUL 8. STUDII COMPARATIVE PRIVIND ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A EXTRACTELOR ALCOOLICE VEGETALE DIN SPECIA VINCA MINOR L. ȘI A PREPARATELOR FARMACEUTICE OBȚINUTE PE BAZA ACESTOR EXTRACTE

8.1. STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A EXTRACTELOR ALCOOLICE VEGETALE OBȚINUTE DIN PLANTA *VINCA MINOR L.*

8.1.1. MATERIALE ȘI METODE DE LUCRU

8.1.2. PRELUCRAREA STATISTICĂ

8.1.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

8.2. STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A FORMULĂRILOR REALIZATE CU EXTRACTE ALCOOLICE VEGETALE OBȚINUTE DIN PLANTA *VINCA MINOR L.*

8.2.1. MATERIALE ȘI METODA DE LUCRU

8.2.2. PRELUCRAREA STATISTICĂ

8.2.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

8.2.4. STUDIUL COMPARATIV AL EFECTULUI ANTIMICROBIAN AL PREPARATELOR P3, P4, P9 ȘI P10 VERSUS EXTRACTUL VEGETAL BRUT ÎN ETANOL 70%

8.3. CONCLUZIILE STUDIULUI MICROBIOLOGIC

CAPITOLUL 9. CONCLUZII GENERALE

9.1. STUDII FIZICO-CHIMICE COMPARATIVE PRIVIND COMPUȘII INDOLICI EXTRAȘI DIN PLANTA *VINCA MINOR L.*

9.2. REALIZAREA UNOR FORME FARMACEUTICE SEMISOLIDE FOLOSIND EXTRACTE NATURALE DIN PLANTA *VINCA MINOR L.*

9.3. STUDII COMPARATIVE PRIVIND CARACTERUL REOLOGIC AL FORMULĂRILOR FARMACEUTICE CU APLICAȚIE TOPICĂ OBȚINUTE

9.4. STUDII COMPARATIVE PRIVIND PROPRIETĂȚILE ANTIOXIDANTE ALE EXTRACTELOR ALCOOLICE VEGETALE DIN FRUNZA ȘI TULPINA PLANTEI *VINCA MINOR L.* ȘI A UNOR FORMULĂRI FARMACEUTICE OBȚINUTE

9.5. STUDII COMPARATIVE PRIVIND ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A EXTRACTELOR ALCOOLICE VEGETALE DIN SPECIA *VINCA MINOR L.* ȘI A PREPARAT

BIBLIOGRAFIE GENERALĂ

ANEXE

INTRODUCERE

În ultimele decenii, terapiile alternative noi care utilizează medicamente ce conțin principii active de proveniență naturală, au constituit un domeniu de actualitate al cercetării farmaceutice. Unul din obiectivele acestor linii de cercetare a fost obținerea unor compuși bioactivi proveniți din resurse naturale.

Plantele reprezintă materia primă din care se pot extrage diverse principii active, care pot fi valorificate în tratarea diverselor afecțiuni. Prin conținutul ei, **Teza de doctorat se încadrează** în cercetarea resurselor vegetale și valorificarea compușilor bioactivi în dezvoltarea și realizarea unor noi formulări farmaceutice.

În lucrarea de față, **ipoteza de cercetare** a pornit de la obținerea compușilor indolici din planta *Vinca minor* L. regăsită din abundență în țara noastră. Pornind de la extracția acestor compuși de interes farmaceutic, am analizat și comparat proprietățile fizico-chimice ale compușilor indolici din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* L., pentru a obține noi formulări farmaceutice cu aplicație topică cu posibilitatea de a genera un potențial efect cicatrizant și antimicrobian.

Deși există numeroase studii care confirmă importanța compușilor indolici în domeniul medical și farmaceutic, datorită numeroaselor proprietăți terapeutice ale acestor alcaloizi, dintre care amintim: acțiunea anticancer, antivirală, antioxidantă, antimicrobiană și cicatrizantă, până în prezent, în literatura de specialitate nu există date cu privire la înglobarea acestor compuși în forme farmaceutice cu administrare topică, fapt care a generat **motivația acestei teme de cercetare**. De aceea, efectuarea unui studiu original și complex privind proprietățile fizico-chimice ale compușilor indolici din resurse naturale și valorificarea acestora în dezvoltarea unor noi formulări farmaceutice semisolide cu aplicație topică, pune în evidență **importanța, noutatea și actualitatea temei alese**.

Conținutul tezei de doctorat este structurat în două părți principale. Partea I (partea generală) a tezei, care este alcătuită din 3 capitole și partea a II-a (contribuțiile originale), care este sistematizată în 5 capitole. Teza cuprinde capitolul de Introducere, un capitol final de Concluzii generale și Bibliografie.

Partea I – Partea generală

Capitolul 1 – Structuri cu inele indolice prezente în produse naturale, cuprinde o primă direcție de cercetare care a avut ca obiectiv studierea compușilor indolici pentru a scoate în evidență proprietățile fizico-chimice ale acestora și diferitele surse naturale de proveniență ale compușilor

indolici, pe care cercetătorii din domeniu le-au folosit pentru a extrage acești alcaloizi, precum și importanța lor în descoperirea medicamentelor.

Capitolul 2 – Metode de analiză a compușilor indolici cuprinde informații din literatura de specialitate cu privire la metodele de analiză cantitativă și calitativă a compușilor cu structură indolică. Scopul acestor metode de analiză a fost extracția, identificarea și cuantificarea acestor compuși cu origine diferită: vegetală sau chimică. Cele mai importante și utilizate tehnici sunt reprezentate de metodele cromatografice și metodele cuplate deoarece acestea sunt mai rapide și totodată mai ecologice în comparație cu celelalte metode analitice convenționale.

Capitolul 3- Structura transdermică, caracteristicile pielii, aplicația topică, sistemele de livrare transdermice și modele reologice ale formulărilor farmaceutice aplicate topic tratează aspecte cu privire la structura transdermică, cinetica difuziunii prin piele, cu evidențierea strategiilor de eliberare topică a substanțelor medicamentoase. Au fost studiate diferite abordări de formulare care au fost folosite până în prezent pentru a îmbunătăți penetrarea prin piele a formelor farmaceutice semidolide cu aplicație topică.

Partea a II – a – Contribuțiile personale cuprind:

Capitolul 4 – Studii fizico-chimice comparative privind compușii indolici extrași din planta *Vinca minor* L., prezintă studiul fitochimic realizat pentru încadrarea plantei *Vinca minor* L. ca plantă de interes farmaceutic, prin scoaterea în evidență a răspândirii teritoriale a tipurilor de specii și a claselor de alcaloizi indolici prezenți în această plantă. Tot în cadrul acestui capitol au fost realizate extracte alcoolice din frunza și tulpina plantei *Vinca minor*. Am validat metoda cromatografică HPLC cu fază inversă și apoi am identificat și determinat conținutul compusului indolic, vincamină, din materialul vegetal studiat al plantei *Vinca minor* L. Metoda HPLC a fost aplicată și pentru determinarea cantitativă a 3 tipuri de alcaloizi cu structură indolică. Confirmarea structurii compușilor cu nucleu indolic a fost realizată prin analize spectrofotometrice în domeniul ultraviolet-vizibil (UV-VIS). Totodată a fost analizată și determinată compoziția minerală a plantei *Vinca minor* L. și conținutul total de polifenoli.

Capitolul 5 – Realizarea unor forme farmaceutice semisolide folosind extracte naturale din planta *Vinca minor* L. În acest capitol este descris modul de preparare pentru 12 noi formulări farmaceutice semisolide cu destinația aplicării topice, utilizând soluții alcoolice extractive obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* L. Pentru fiecare preparat au fost stabilite proprietățile organoleptice, a fost determinat pH-ul și capacitatea de întindere. Compușii indolici existenți în

planta *Vinca minor* L. prezintă un mare potențial în aplicațiile biomedicale de tratare a leziunilor cutanate și de grăbire a procesului de cicatrizare datorită biocompatibilității, biodegradabilității și non-toxicității sale.

Capitolul 6 – Studii comparative privind caracterul reologic al formulărilor farmaceutice cu aplicație topică obținute, cuprinde studiul influenței variabilelor de formulare asupra caracteristicilor reologice (vâscozitate, comportament de curgere, consistență) ale celor 12 formulări farmaceutice topice concepute și dezvoltate în capitolul anterior. Studiul reologic a fost efectuat pentru fiecare preparat farmaceutic cu scopul de a determina influența componentelor asociate în formulare asupra vâscozității formelor farmaceutice obținute. Măsurătorile reologice au fost efectuate cu ajutorul echipamentului de lucru Reovâscostar R. Au fost obținuți parametrii reologici: vâscozitate, gradient de viteză, viteza de rotație și tensiunea de forfecare din care au rezultat reograme și curbe de vâscozitate, care au fost studiate și comparate. Toate cele 12 formulări farmaceutice analizate au prezentat un comportament de fluid newtonian, pseudoplastic, tixotrop.

Capitolul 7 – Studii comparative privind proprietățile antioxidante ale extractelor alcoolice vegetale din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* L. și a unor formulări farmaceutice obținute cuprinde metodele de analiză ale capacității antioxidante pentru extractele alcoolice de diferite concentrații obținute din planta *Vinca minor* L. Au fost luate în studiu trei soluții extractive alcoolice de concentrații diferite (40%, 70% și 96%) obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* L., care au fost analizate pentru proprietățile lor antioxidante prin testarea mecanismului de acțiune al capacității de captare a radicalilor DPPH și utilizând metoda prin fotochemiluminescență. Tot prin metoda fotochemiluminescenței s-a determinat capacitatea antioxidantă totală a unor compozite semisolide cu aplicație topică preparate pe baza soluțiilor alcoolice extractive obținute din planta *Vinca minor* L. în asociere cu alte substanțe de origine vegetală sau de sinteză. A fost pusă în evidență influența componentelor asociate în fiecare preparat asupra capacității antioxidante totale.

Capitolul 8 – Studii comparative privind activitatea antimicrobiană a extractelor alcoolice vegetale din specia *Vinca minor* L. și a preparatelor farmaceutice obținute pe baza acestor extracte. În acest capitol a fost analizată prin metoda difuzimetrică, activitatea antimicrobiană împotriva tulpinilor bacteriene patogene *S. aureus*, *E. coli* și *C. albicans*, a extractelor alcoolice vegetale în concentrație de 40% și 70% obținute din frunza și tulpina plantei

Vinca minor L. și a unor formulări farmaceutice cu aplicație topică, preparate pe baza acestor extracte. Studiul comparativ prezentat în acest capitol se referă la activitatea antimicrobiană a extractelor vegetale alcoolice brute și comportamentul și activitatea antimicrobiană a acestor extracte incorporate în diferite compozite farmaceutice semisolide de uz topic. Pentru procesarea datelor și compararea rezultatelor, statistica descriptivă a folosit testul ANOVA din programul IBM SPSS.

Capitolul **Concluzii generale** reprezintă un capitol distinct care marchează finalul tezei de doctorat. În acest capitol sunt centralizate aspectele cele mai importante legate de extracția compușilor indolici din resurse naturale, cu evidențierea caracteristicilor fizico-chimice și valorificarea acestor compuși în obținerea unor noi formulări farmaceutice cu aplicație topică.

În capitolul **Anexe** sunt prezentate articolele publicate în volumele conferințelor la care am participat.

În viitor, rezultatele obținute în cadrul acestei teze de doctorat vor fi sistematizate pentru realizarea unor publicații în reviste de specialitate și vor constitui suportul unui brevet de invenție.

IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI

Luând în considerare importanța și actualitatea temei alese, **obiectivul general** al Tezei este acela de a obține prin extracție compușii indolici din planta *Vinca minor* L. prin realizarea unor studii fizico-chimice comparative pe acești compuși. Concomitent ne-am propus dezvoltarea unor noi formulări farmaceutice cu aplicație topică pe baza compușilor indolici extrași din planta *Vinca minor* L. Teza de doctorat propune o abordare originală orientată în vederea realizării următoarelor **obiective științifice**:

- ✓ Caracterizarea materialului vegetal studiat: *Vinca minor* L., cu evidențierea răspândirii teritoriale a tipurilor de specii, a claselor de alcaloizi indolici care se regăsesc în planta *Vinca minor* L. și a compoziției minerale a acestei plante;
- ✓ Obținerea și realizarea unui proces biotehnic de extracție a compușilor indolici din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* L.
- ✓ Caracterizarea produselor de extracție ale plantei *Vinca minor* L. prin studii fizico-chimice comparative, utilizand diferite metode de analiză: metode gravimetrice, volumetrice, metode

spectrofotometrice (absorbție atomică, absorbție în UV-VIS, absorbție în IR), cromatografice (HPLC), microbiologice și metoda fotochemiluminescenței.

- ✓ Analiza posibilităților de utilizare în dezvoltarea unor noi formulări farmaceutice cu aplicație topică, pe baza extractelor alcoolice obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* L.;
- ✓ Realizarea formulărilor semisolide de tip emulsie L/H sau H/L cu aplicație topică, în care am utilizat ca principii active soluțiile extractive ale compușilor indolici asociate cu alte substanțe de origine naturală sau de sinteză;
- ✓ Caracterizarea formulărilor realizate prin analiza acestor sisteme farmaceutice din punct de vedere al proprietăților lor fizico-chimice: determinarea pH-ului, capacitatea de etalare, punerea în evidență a comportării reologice, a activității antioxidante și antimicrobine, în vederea obținerii unor noi preparate care pot reprezenta pe viitor o alternativă la produsele farmaceutice existente pe piață.
- ✓

MOTIVAȚIA CERCETĂRII

În lucrarea de față, ipoteza de lucru a pornit de la obținerea și cercetarea compușilor indolici din planta *Vinca minor* L. regăsită din abundență în țara noastră. Pornind de la extracția acestor compuși a fost realizat un studiu comparativ în ceea ce privește proprietățile fizico-chimice ale compușilor indolici din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* L., cu scopul de a obține noi formulări farmaceutice cu aplicație topică.

Deși există numeroase studii care confirmă importanța acestor compuși în domeniul medical și farmaceutic, datorită numeroaselor proprietăți ale acestor alcaloizi, dintre care: acțiunea anticancer (Neculai Ana-Maria, 2015a), antivirală, antioxidantă, antimicorbiană și cicatrizantă (Fernandez M.A., 1996; Khanavi M., 2010), până în prezent, pe piață autohtonă nu este disponibil niciun preparat de uz topic care să conțină acești compuși, fapt care a generat motivația acestei teme de cercetare.

Contribuțiile personale au fost sistematizate în 5 capitole care au urmărit obiectivul general pentru evidențierea caracteristicilor benefice ale alcaloizilor indolici cuprinși în planta *Vinca minor*, precum și realizarea unor noi formulări farmaceutice cu aplicație topică cu posibilitatea de a genera un potențial efect cicatrizant și antimicrobian.

CONTRIBUȚII PERSONALE

CAPITOLUL 4

STUDII FIZICO-CHIMICE COMPARATIVE PRIVIND COMPUȘII INDOLICI EXTRAȘI DIN PLANTA *VINCA MINOR* L.

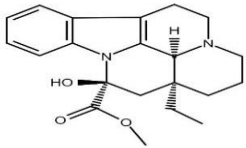
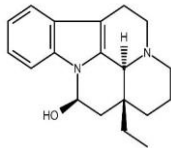
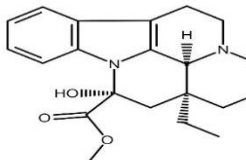
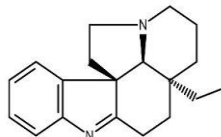
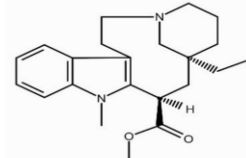
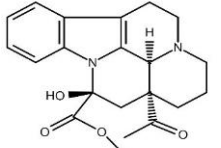
Obiectivele studiului. Principalul obiectiv al acestui prim capitol din partea experimentală a tezei de doctorat constă în studii fitochimice și analize fizico-chimice pentru a identifica și determina compușii indolici din surse naturale și anume planta *Vinca minor*.

4.2. STUDIUL FITOCHIMIC PENTRU *VINCA MINOR* L.

VINCA MINOR L.

Vinca Minor L. (Fig. 4.1.a., 4.1.b.) aparține familiei Apocynaceae. Această plantă, originară în principal din nordul Spaniei și vestul Franței, este cultivată ca plantă ornamentală, dar și ca plantă utilă din punct de vedere farmacologic. *Vinca minor* este o plantă perenă la sol, cunoscută în medicina populară pentru efectul său sedativ, hipotensiv, antidiabetic și, de asemenea, pentru tratarea afecțiunilor circulatorii la nivelul encefalului sau pentru promovarea metabolismului creierului (Farahanikia B., 2011; Spilková J., 2016).

Tabelul IV.2. Alcaloizi de tip eburnamonină.

vincamina (Cheng G.G., 2014)		(+)-isoeburnamina (Mokrý J., 1967)	
14-epivincamina (Mokrý J., 1963)		1,2-dehidroaspidospermidina (Prokša B., 1991)	
vincaminoreina (Manske R.H.F., 1965)		vincareina (Manske R.H.F., 1965)	



În urma analizelor efectuate din literatura de specialitate, în părțile aeriene ale plantei *Vinca minor* au fost indentificați aproximativ 50 de alcaloizi cu structuri indolice: desacetilacuamilină, eburnamină, epivincamină, dimetoxieburnamonină, eburnamenină, picrinina, perivncina, vincadiformina (Adizov S.M., 2017), N-metilaspidospermidina, vincaminoreina, vincanorina 11-metoxieburnamonina, metoximinovincina, minovincinina, minovincina, vinactina, vincasina, reserpină, etc. Vincamina reprezintă cel mai răspândit alcaloid indolic de tip eburnan.

4.3. PREGĂTIREA MATERIALULUI VEGETAL

Pregătirea extractelor vegetale

Materialul vegetal uscat și mărunțit a fost extras cu alcool etilic: soluțiile alcoolice extractive 40%, 70%, 96% obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* au fost preparate conform Farmacopeei Romane ediția a X-a (F.R. X.). Acest proces a implicat mărunțirea a 10 g produs vegetal din frunza și tulplina plantei *Vinca minor* L., peste care s-a adăugat alcool etilic de concentrație 40%, 70% și respectiv, 96% până la 100 mL (Raport 1:10). Extractele au fost lasate timp de 10 zile în condiții optime, ferite de lumină și umiditate, la loc răcoros. În perioada celor 10 zile, extractele au fost atent supravegheate și agitate de 2-3 ori pe zi. La final, acestea au fost filtrate cu ajutorul unor filtre din țesătură de bumbac pentru a putea fi separate de materialul vegetal. Lichidul colectat la filtrare a fost depozitat în recipiente sterile, închise la culoare.

4.4.1. VALIDAREA METODEI HPLC DE DETERMINARE A VINCAMINEI DIN PLANTA *VINCA MINOR* L.

Această cercetare reprezintă un studiu original și complex, în literatura de specialitate neexistând date pentru analiza plantelor *Vinca minor* din Dobrogea. În acest sens s-a considerat importantă validarea metodei HPLC de determinare a alcaloizilor indolici din produse vegetale utilizând parametrii statistici pentru atestarea parametrilor de performanță comparativ cu legislația în vigoare (SR ISO 8466-1 2016), (ICH Q2A, 2003) și (ICH Q2B, 2005).

Rezultate

În Tabelul IV.9. sunt prezentate rezultatele pentru 10 probe supuse condițiilor cromatografice care au realizat picuri cromatografice specifice fiecărei concentrații. Fiecare determinare a fost realizată în triplicat. În Tabelul IV.10. sunt prezentate ecuația dreptei de regresie și coeficientul de corelație obținut. În Tabelul IV.11. sunt reprezentate formule de calcul și rezultatele obținute pentru determinarea parametrilor de validare a metodei HPLC pentru vincamină.

Pentru calcul parametrilor statistici a fost folosit programul Microsoft Excel 2016 cu următoarele specificații. Parametrii statistici utilizați pentru validarea metodei de determinare a vincaminei din produse naturale (planta *Vinca minor*) sunt:

- ✓ Specificitatea și Selectivitatea,
- ✓ Liniaritatea și domeniul de liniaritate,
- ✓ Precizia,
- ✓ Acuratețea (exactitatea),
- ✓ Limita de detecție (LOD) și limita de cuantificare (LOQ),
- ✓ Precizia intermediară și reproductibilitatea,
- ✓ Robustețea.

Tabelul IV.11. Formule de calcul și rezultatele obținute pentru determinarea parametrilor de validare a metodei HPLC pentru vincamină

Parametrul de validare	Formula de calcul	Rezultate obținute
Interceptul A Ordonata la origine (sau interceptul), se referă la valoarea marimii de iesire atunci când marimea de intrare este 0 și caracterizează maritorul calculat al reactivilor	$y=A+Bx$	A= - 317,29
Panta B, panta de regresie a dreptei, se referă la schimbarea semnificativă a răspunsului analitic la o modificare mică a concentrației de analit și caracterizează sensibilitatea		B = 516,1123
Media valorilor pentru x și pentru y N=10 probe citite	$\bar{A}_p = \frac{\sum^n A_p}{n}$	Media _x = 273,5 Media _y = 140838.2
Abaterea standard	$s = \sqrt{\frac{\sum^n (A_p' - \bar{A}_p)^2}{n - 1}}$	S = 781,7572
Abaterea standard relativă	$RSD\% = \frac{s * 100}{\bar{A}_p}$	RSD % = 0,55075
Repetabilitatea R	$R\% = 2\sqrt{2}RSD\%$	R% = 1,5699 %
Covarianța	$S_{xy} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x - \sum y}{n}}{n - 1}$	S _{xy} = 2,24209
Abaterea standard pentru populația valorilor lui x reprezintă măsura absolută a preciziei metodei. Aceasta permite evaluarea calității manoperei analitice la prepararea soluțiilor etalon; este eroarea introdusă la trasarea curbei de etalonare și face parte din bugetul de incertitudini al metodei.	$S_x = \frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}$	S _{x0} = 2,970973
Abaterea standard pentru populația valorilor lui y reprezintă dispersia valorilor masurate în jurul drepte de regresie liniară; este un indicator de performanță care descrie acuratețea etalonării.	$S_y = \frac{\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}}{n - 1}$	S _y = 1533,342
Coefficientul de corelație	$r_{xy} = \frac{S_{xy}}{S_x S_y}$	r _{xy} = 0,9998
Abaterea standard pentru întreaga populație a valorilor	$S_0 = \sqrt{\frac{y^2 - A \sum y - B \sum xy}{n - 2}}$	S ₀ = 3,131373

Tabelul IV.9. Valorile concentrațiilor și ariile picurilor realizate pentru N=10 probe

Nr. proba	Concentrația vincaminei (xi)		Aria medie (yi)
	L	μg/m	
1	10	4310	
2	25	12450	
3	50	25108	
4	100	51120	
5	200	103143	
6	300	155110	
7	400	207120	
8	500	259110	
9	550	285111	
10	600	305800	
Me die	273.5	140833.8	
n =	10		

Tabelul IV.10. Domeniul de liniaritate și coeficientul de corelație realizat în ecuația drepte de regresie.

Coeficientul de corelație r	Domeniul de liniaritate	Ecuația drepte de regresie
0.9998	10-600 μg/mL	y=516.11x -322.92

4.4.2. APLICAREA METODEI HPLC ÎN SEPARAREA CANTITATIVĂ A ALCALOIZILOR CU INEL INDOLIC DIN PLANTA *VINCA MINOR* L.

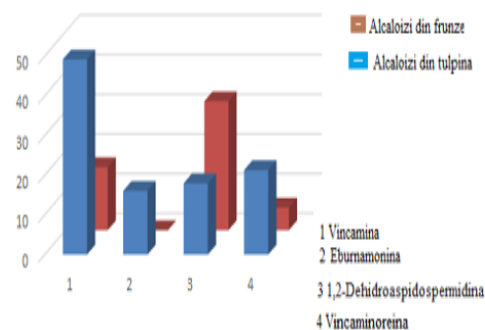
Până în prezent, cel mai valoros alcaloid din punct de vedere farmacologic existent în planta *Vinca minor* este vincamina, care prezintă o activitate vasodilatatoare cerebrală pronunțată. În literatura de specialitate există puține studii privind analiza celorlalți alcaloizi indolici prezenți în această plantă. În acest sens s-a considerat importantă identificarea conținutului de alcaloizi cu nucleu indolic pentru probele din frunza și tulpina plantei *Vinca minor*.

Rezultate

În Tabelul IV.18. sunt prezentate rezultatele obținute în urma analizei cromatografice pentru probele din frunza și tulpina plantei *Vinca minor*.

Tabelul IV.18. Rezultatele obținute în analiza cromatografică pe probele din frunza și tulpina plantei *Vinca minor*

Nr.crt.	Alcaloizi	Tr Min.	k'	Conținutul de alcaloizi	
				Frunza ng/mL	Tulpina ng/mL
1	Vincamina	5,74	2,67	49,18 ± 0,027	15,88 ± 0,003
2	Eburnamonina	11,7	5,71	16,07 ± 0,001	-
3	1,2-Dehidrospidospermidina	18,8	10,06	17,97 ± 0,009	32,5 ± 0,034
4	Vincaminoreina	25,6	19,94	21,28 ± 0,004	5,7 ± 0,001
5	paclitaxel	5	2,2	83000	83000



În Fig. 4.13. și 4.14. sunt prezentate cromatogramele obținute pentru probele din frunza și tulpina plantei *Vinca minor*.

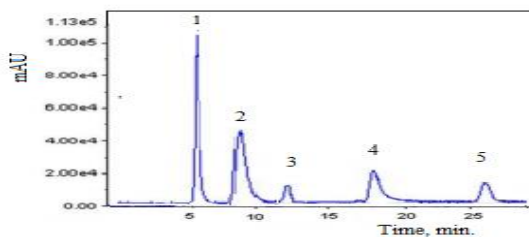


Fig. 4.13. Cromatograma obținută pentru frunza plantei *Vinca minor*

- 1-paclitaxel
- 2-Vincamina
- 3-Eburnamonina
- 4-1,2-Dehidrospidospermidina
- 5-Vincaminoreina

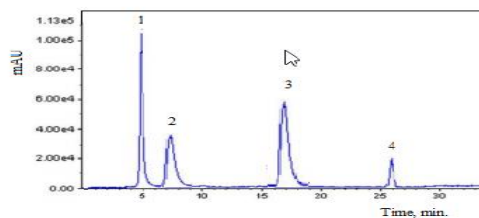


Fig. 4.14. Cromatograma obținută pentru tulpina plantei *Vinca minor*

- 1-paclitaxel
- 2-Vincamina
- 3-1,2-Dehidrospidospermidina
- 4-Vincaminorein

4.4.3. STUDIUL SPECTROFOTOMETRIC AL EXTRACTELOR VEGETALE OBTINUTE DIN FRUNZA ȘI TULPINA PLANTEI *VINCA MINOR* L.

Studiul spectrofotometric al extractelor vegetale alcoolice obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* a fost efectuat utilizând metoda spectrofotometrică UV-VIS. Pentru această analiză s-a utilizat un spectrofotometrul cu fascicul dublu de tip VWR UV-630PC.

Rezultate

În Fig. 4.17. și 4.18. sunt redată spectrele suprapuse de absorbție în UV-VIS obținute pentru probele de extracte alcoolice realizate din frunza și tulpina plantei *Vinca minor*.

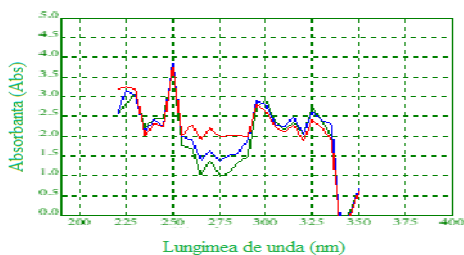


Fig. 4.17. Spectrele suprapuse de absorbție ale extractelor alcoolice de concentrație 40%, 70% și 96% obținute din frunza plantei *Vinca minor*

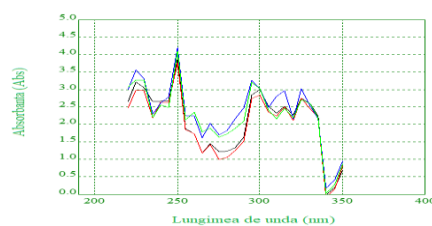


Fig. 4.18. Spectrele suprapuse de absorbție ale extractelor alcoolice de concentrație 40%, 70% și 96% obținute din tulpina plantei *Vinca minor*

În Fig. 4.19., 4.20. și 4.21. sunt redată spectrele unice pentru probele de extracte alcoolice de concentrație 40% (Fig. 4.19.), 70% (Fig. 4.20.) și 96% (Fig. 4.21.) obținute din frunza plantei *Vinca minor*.



Fig. 4.19. Spectrul de absorbție al extractului alcoolic de concentrație 40% din frunza plantei *Vinca minor*

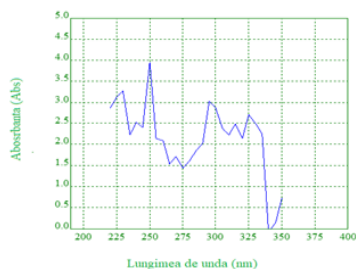


Fig. 4.20. Spectrul de absorbție al extractului alcoolic de concentrație 70% din frunza plantei *Vinca minor*

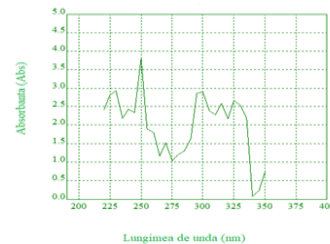


Fig. 4.21. Spectrul de absorbție al extractului alcoolic de concentrație 96% din frunza plantei *Vinca minor*

4.5.1. DETERMINAREA COMPOZIȚIEI MINERALE A PLANTEI *VINCA MINOR*

L.

Compoziția minerală a materialului vegetal (frunza și tulpina) al plantei *Vinca minor* poate constitui un punct de plecare în dezvoltarea cercetărilor noastre. Plantele pot absorbi metalele toxice, care se pot îndrepta către corpul uman prin prepararea medicamentelor și pot provoca pericole grave pentru sănătatea vieții umane. În consecință, controlul concentrațiilor de metale din plante este o problemă importantă pentru a asigura calitatea vieții.

Măsurătorile spectrometrice au fost realizate folosind un spectrometru de absorbție atomică echipat cu un sistem de corecție de fond continuu, cu lămpi cu catod cavitărilor corespunzătoare metalelor determinate, un dispozitiv/lămpi și un ansamblu nebulizator-arzător pentru flacără aer-acetilenă (ContrAA 700 Analytic Jenna).

Pentru exprimarea concentrațiilor metalelor în mg metal/kg probă, a fost aplicată ecuația (4.2):

$$\text{Concentrație metal (mg/Kg proba)} = \frac{V_b \times c}{m_{\text{proba}}} \quad (4.2)$$

unde:

- V_b = volumul balonului cotelat în care s-a preparat soluția probei (50 mL);
- c = concentrația metalului citită (mg/L);
- $m_{\text{probă}} = 0,5$ g.

Rezultate

Rezultatele obținute pentru analiza compoziției minerale a materialului vegetal studiat din planta *Vinca minor*, sunt prezentate în Tabelul IV.20.

Tabelul IV.20. Concentrația metalelor (mg/kg) în probele din planta studiată

Nr. crt.	Metal	Concentrația metalelor în tulpina plantei <i>Vinca minor</i> L. (mg/kg)	Concentrația metalelor în frunza plantei <i>Vinca minor</i> L. (mg/kg)
1.	K	<DL	<DL
2.	Ca	4896±0,02	25640±3
3.	Mg	871,4±0,03	1436,2±1
4.	Na	1293,2±0,01	874,20±1
5.	Fe	192,34±0,02	620,80±3
6.	Mn	92,34±0,01	296,00±1
7.	Cd	<DL	<DL
8.	Cu	8,65±0,01	1,40±0,01
9.	Pb	<DL	<DL
10.	Ni	<DL	<DL
11.	Zn	40,8±0,02	64,85±0,01

* Fiecare valoare arătată este valoarea medie ± abatere standard

4.5.2. DETERMINAREA CONȚINUTULUI TOTAL DE POLIFENOLI

În acest studiu a fost identificat și determinat conținutul total de fenoli prin metoda Folin-Ciocalteu a extractelor alcoolice de concentrații diferite: 40%, 70%, 96% (T40, T70, T96, F40, F70, F96) obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor*. Mecanismul de bază al acestei metode este reprezentat printr-o reacție de oxidare/reducere, în care ionul metalic este redus, iar gruparea fenolică este oxidată. Pentru a calcula concentrația fenolilor totali, exprimată în mg de acid galic (GAE) pe 100 g de material vegetal uscat, a fost aplicată ecuația (4.4):

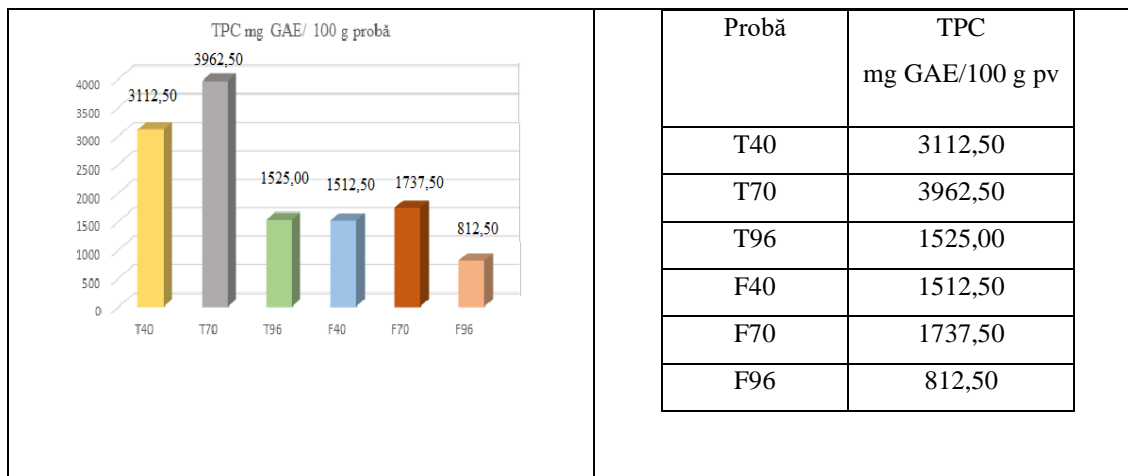
$$TPC \text{ (mg GAE/100g)} = \frac{V_f \times c \times 5}{V_i \times m_{\text{probă}}} \quad (4.4)$$

Unde, c reprezintă concentrația (mg/L) citită pe curba de etalonare, V_f este volumul de extract alcoolic filtrat al fiecărei probe, V_i este volumul de probă adăugat în balonul cotat de 50 mL pentru efectuarea determinării iar $m_{\text{probă}}$ este masa de material vegetal uscat (frunza și tulpina) supus macerării.

Rezultate și discuții

În urma analizei, au fost obținute următoarele valori pentru conținutul total de polifenoli, pentru fiecare extract analizat, prin aplicarea formulei de la ecuația 4.4. Aceste valori sunt reprezentate în Tabelul IV.21.

Tabelul IV.21. Concentrația fenolilor totali (TPC) în extractele etanolice obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* L.



Conținutul total de polifenoli al extractelor alcoolice obținute din tulpina și frunza plantei *Vinca Minor* L., cuprins între 812,50 mg/100g pv și 3962,50 mg/100g pv este în concordanță cu literatura de specialitate (Nishibe S., 1996; Grujic M.S., 2014). În cazul extractelor alcoolice obținute din tulpina plantei *Vinca minor* L., cea mai mare concentrație de polifenoli totali a fost găsită în extractul alcoolic 70%, urmat de extractul alcoolic 40% și extractul alcoolic 96%. În ceea ce privește extractele alcoolice obținute din frunza plantei *Vinca minor* L., concentrațiile de polifenoli au fost cuprinse între 812,50 mg/100g pv și 1737,50 mg/100g pv.

CAPITOLUL 5

REALIZAREA UNOR FORME FARMACEUTICE SEMISOLIDE FOLOSIND EXTRACTE NATURALE DIN PLANTA *VINCA MINOR* L.

Capitolul 5 al acestei teze a avut ca obiectiv dezvoltarea și caracterizarea farmacotehnică a unor formulări farmaceutice cu aplicație topică, conținând alcaloizi indolici extrași din planta *Vinca minor* L., în asociere cu alte substanțe de origine vegetală ce prezintă acțiune antiseptică, antimicrobiană și regenerantă. Pentru a extrage compușii indolici din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* s-au realizat extracte alcoolice, care au fost încorporate în preparatele semisolide.

Astfel, am conceput și preparat 12 noi formulări farmaceutice utilizând soluții alcoolice extractive din frunza și tulpina plantei *Vinca minor*. Controlul calității acestor preparate a vizat analiza proprietăților fizico-chimice, determinarea pH-ului, determinarea caracterelor reologice și determinarea capacității de etalare a acestor formulări.

5.4.1. REZULTATE PRIVIND CARACTERISTICILE ORGANOLEPTICE

După finalizarea procesului de preparare a formelor farmaceutice studiate, probele din cele 12 formulări farmaceutice obținute au fost supuse analizei organoleptice pentru a se determina aspectul, consistența, culoarea și mirosul. Cele 12 formulări farmaceutice obținute: P1-P12 au prezentat un aspect omogen, translucid, culoarea alb sau alb-verzui și mirosul caracteristic componentelor, rezultate ce se încadrează în limitele impuse de F.R. X. referitoare la consistență și omogenitate. În Fig. 5.10 și 5.17 sunt prezentate 2 dintre cele 12 preparate semisolide dezvoltate în acest capitol.

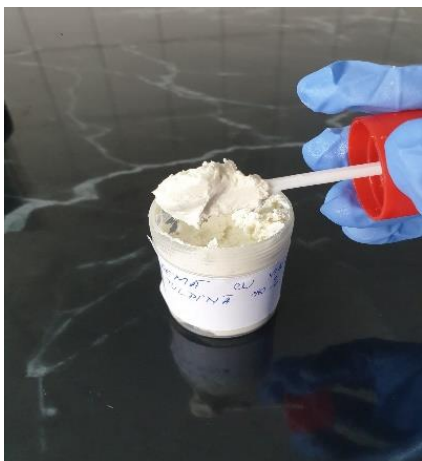


Fig. 5.10. Aspectul, culoarea și consistența preparatului P3



Fig. 5.17. Aspectul, culoarea și consistența preparatului P10

5.4.2. DETERMINAREA VARIAȚIEI pH-ULUI

Pentru toate cele 12 formulări farmaceutice preparate anterior s-au efectuat măsurători de pH. pH-ul reprezintă un parametru fizico-chimic prin care se exprimă conținutul de acizi sau baze. Valoarea pH-ului preparatelor farmaceutice destinate administrării topice este importantă deoarece aceasta este corelată cu pH-ul pielii. Determinarea pH-ului s-a realizat cu ajutorul unui pH-metru multiparametric. Echipamentul de lucru a fost *Hanna instruments* care a permis înregistrarea valorilor de pH pentru fiecare formulare farmaceutică.

Fig. 5.20. prezintă variația valorilor pH-ului a celor 12 formulări farmaceutice. În urma măsurătorilor, aceste preparate au avut un pH cuprins în intervalul 5,4-6,75, apropiat de pH-ul fiziologic al pielii, încadrându-se totodată în limitele prevăzute de farmacopee conform monografiei *Unguenta*: 4,5-8,5. Fiecare determinare a fost realizată în triplicat.

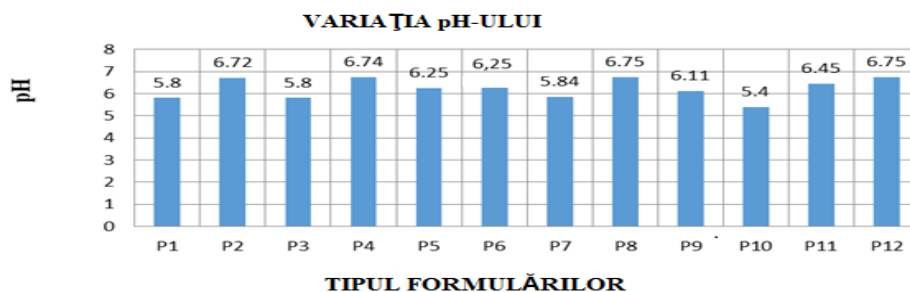
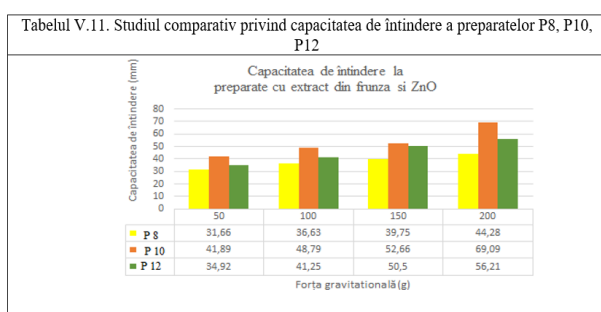
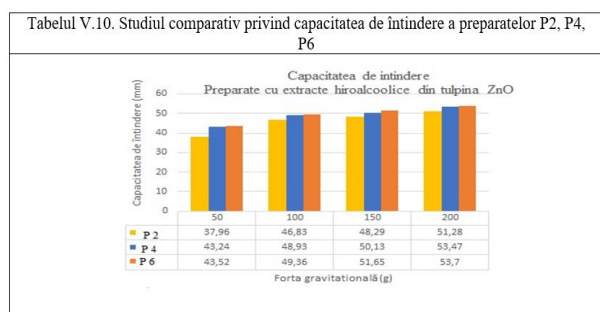
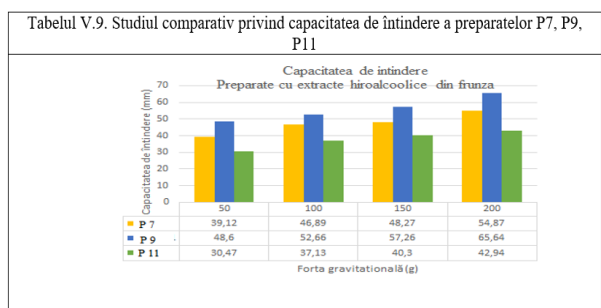
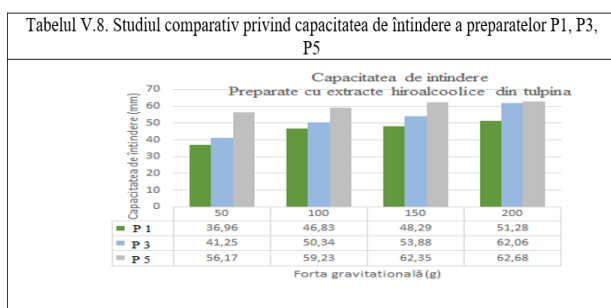


Fig. 5.20. Variația valorii pH pentru formulările semisolide P1-P12

5.4.3. REZULTATE PRIVIND DETERMINAREA CAPACITĂȚII DE ÎNTINDERE

Pentru efectuarea controlului capacității de întindere a celor 12 formulări farmaceutice preparate anterior, s-a utilizat metoda P. Ojeda-S. Arbussa. Rezultatele obținute conform acestei metode au fost prelucrate grafic. Diferențele existente între cele 12 formulări farmaceutice preparate, sunt evidențiate în Tabele V.8., V.9., V.10., V.11.

Rezultatele obținute în cadrul determinării capacității de întindere atestă consistența corespunzătoare a fiecărui preparat, valori ce diferă între ele datorită influenței extractelor alcoolice vegetale obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* și a celorlalte substanțe din compoziția preparatelor.



CAPITOLUL 6

STUDII COMPARATIVE PRIVIND CARACTERUL REOLOGIC AL FORMULĂRILOR FARMACEUTICE CU APLICAȚIE TOPICĂ OBȚINUTE

Preparatele farmaceutice realizate de noi au fost studiate pentru evidențierea încărcăturii ionice, a pH-ului și temperaturii, parametrii ce intervin în procesul de realizare a emulsiilor finale.

În cadrul acestui capitol vor fi prezentate studiile efectuate pentru formulările finale pentru a evidenția comportarea reologică în vederea caracterizării stabilității acestora.

6.3. REZULTATE ȘI DISCUTII

În urma măsurătorilor reologice (citirilor de vâscozitate la diferite viteze de rotație, în creștere și descreștere), au fost calculate gradientul de viteză și tensiunea de forfecare. Construirea reogramelor și a curbelor de curgere s-a efectuat pentru valorile medii obținute ale parametrilor reologici. Citirile de vâscozitate aparentă η (cP) au fost efectuate în triplicat la creșterea și descreșterea vitezelor de rotație ω (rpm). Calculele celorlalți parametri au fost efectuate în programul Microsoft Excel 2016.

În continuare vor fi prezentate rezultatele obținute pentru două dintre formulările farmaceutice preparate de noi în capitolul anterior: P3 (preparat pe baza extractului 70% obținut din tulpina plantei *Vinca minor*) și P10 (preparat pe baza extractului 70% obținut din frunza plantei *Vinca minor* și oxid de zinc).

Pentru preparatul P3 care conține în compoziție extract alcoolic 70% din tulpina plantei *Vinca minor*, valorile medii obținute din măsurătorile reologice sunt prezentate în Tabelul VI.6.

În Fig. 6.9. este prezentată curba de curgere a preparatului P3. În Fig. 6.10. este redată grafic reograma preparatului P3, iar în Fig. 6.11. este regăsită liniarizarea parametrilor curbei de curgere.

Se constată că preparatul P3 prezintă caracter de fluid nenenewtonian, având comportare pseudoplastică, iar liniarizarea curbei de curgere este foarte bună. Din analiza statistică efectuată a parametrilor reologici pentru modelul Ostwald de Waele (Tabelul VI.8.), preparatul P3 prezintă indicele mediu de curgere n cu valoarea $0.706 < 1$ și coeficientul de corelație mediu cu valoarea de 0.9979.

Tabelul VI.8. Parametrii reologici ai modelului Ostwald de Waele pentru preparatul P3

Parametru	K Indice de consistență	n Indice de curgere	R Coeficient de corelație
Testul 1	11.315	0.7016	0.9978
Testul 2	11.307	0.6997	0.9979
Testul 3	11.412	0.7185	0.9981
Medie	11.34466667	0.7066	0.997933333
DS	0.058449408	0.010349396	
CV(%)	0.515214859	1.464675363	

Tabel VI.6. Valorile medii obținute în urma măsurătorilor reologice pentru preparatul cu extract alcoolic 70% din tulpina plantei *Vinca minor* (P3)

D (s ⁻¹)	η (cP)	τ (mPa)	lnη	lnD
1.02	105100	107984	11.5868	0.0198
1.36	79400	111984	11.2823	0.3075
1.7	72800	119760	11.1955	0.5306
2.04	68000	123760	11.1273	0.7129
3.4	55400	138720	10.9223	1.2238
4.08	52000	188360	10.8590	1.4061
6.8	40175	212160	10.6010	1.9169
10.2	35852	301920	10.4871	2.3224
17	35164	351900	10.4678	2.8332
17	35000	351870	9.6158	2.8332
10.2	30800	314160	10.3353	2.3224
6.8	36800	250240	10.5133	1.9169
4.08	42900	175032	11.0666	1.4061
3.4	46700	158780	10.9515	1.2238
2.04	57200	116688	11.0543	0.7129
1.7	65500	111350	11.2098	0.5306
1.36	79500	108120	11.2835	0.3075
1.02	105100	107202	11.5627	0.0198

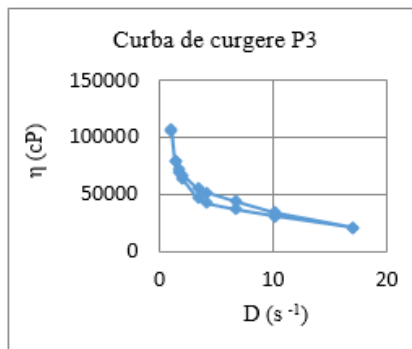


Fig. 6.9. Curba de curgere pentru preparatul P3

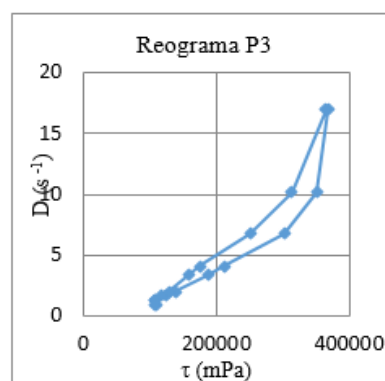


Fig. 6.10. Reograma pentru preparatul P3

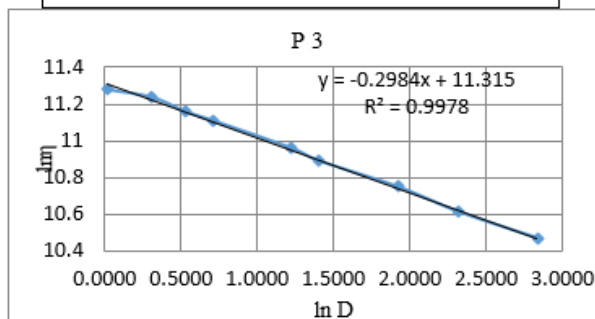
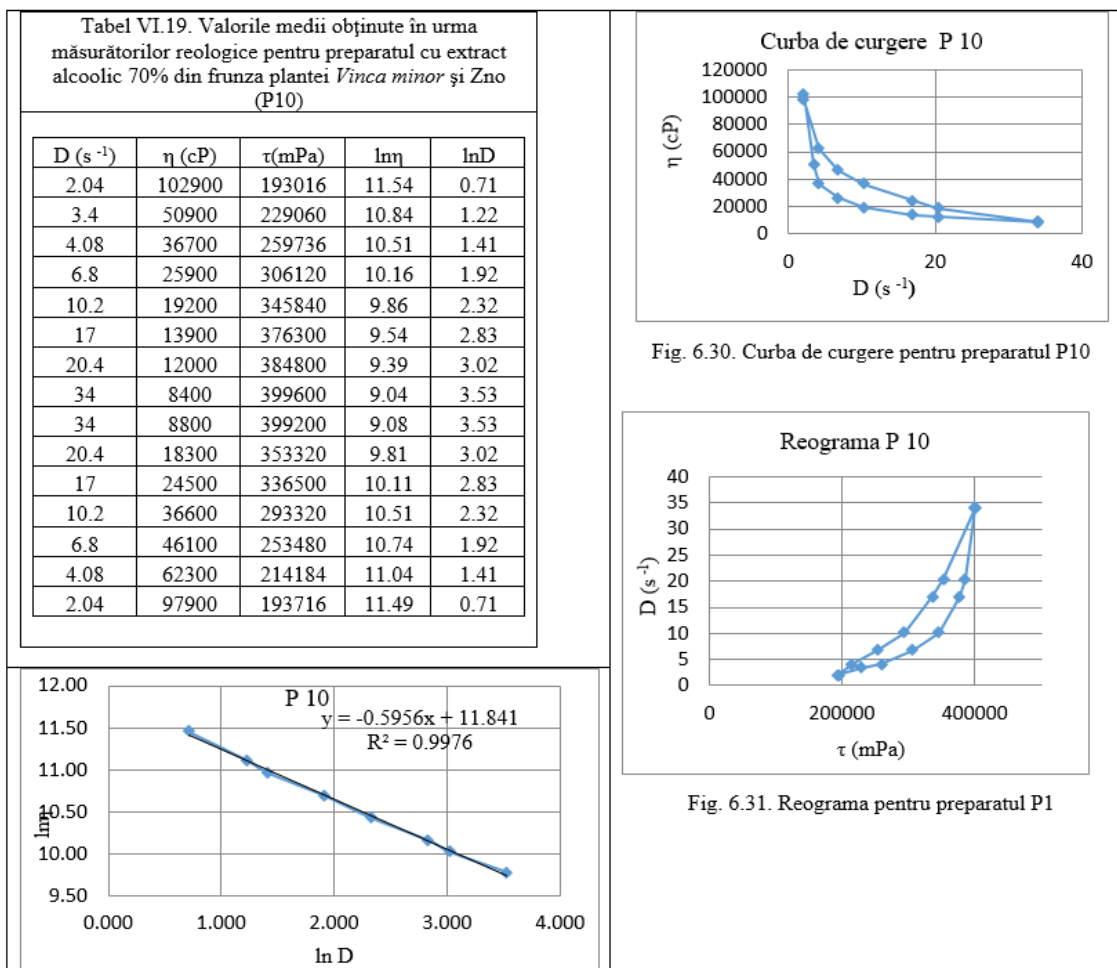


Fig. 6.11. Liniarizarea parametrilor reologici pentru preparatul P3

Pentru preparatul P10 care conține extractul alcoolic 70% obținut din frunza plantei *Vinca minor* și ZnO, rezultatele medii obținute pentru parametrii reologici sunt prezentate în Tabelul VI.19. Vâscozitatea a înregistrat valori cuprinse între 8400 cP și 102900 cP. Mărirea intervalului se datorează adăugării ZnO în compoziția preparatului P10. În mod analog, în ceea ce privește tensiunile de forfecare, pentru preparatul P10 s-au înregistrat valori cuprinse între 193016 mPa și 399600 mPa.

Curba de curgere și reograma preparatului P10 sunt reprezentate în Fig. 6.30. și respectiv, 6.31., iar liniarizarea parametrilor de curgere redată în Fig. 6.32.

Din analiza statistică a parametrilor reologici ai modelului Ostwald de Waele (Tabelul VI.21.), pentru preparatul P10 s-au obținut următoarele valori: indicele mediu de curgere $n = 0.4038 < 1$, iar coeficientul de corelație mediu $= 0.9972$.



Tabelul VI.21. Parametrii reologici ai modelului Ostwald de Waele pentru preparatul P10

Parametru	K Indice de consistență	n Indice de curgere	R Coeficient de corelație
Testul 1	11.841	0.4044	0.9976
Testul 2	11.654	0.495	0.998
Testul 3	11.995	0.312	0.996
Medie	11.83	0.4038	0.9972
DS	0.170765922	0.091501475	
CV(%)	1.443498915	22.66009792	

Referitor la încadrarea rezultatelor într-un model reologic se constată că toate preparatele P3 și P10 sub formă de emulsii de tip L/H respectă modelul Ostwald de Waele (cu respectarea legii puterii), cu indice de curgere $n < 1$, în cazul ambelor formulări. Astfel se confirmă faptul că preparatele prezintă comportament de fluide pseudoplastice iar vâscozitatea aparentă scade cu creșterea vitezelor de forfecare.

CAPITOLUL 7

STUDII COMPARATIVE PRIVIND PROPRIETĂȚILE ANTIOXIDANTE ALE EXTRACTELOR ALCOOLICE VEGETALE DIN FRUNZA ȘI TULPINA PLANTEI *VINCA MINOR* L. ȘI A UNOR FORMULĂRI FARMACEUTICE OBȚINUTE

Obiectivul studiului. Obiectivul principal al prezentului studiu îl reprezintă analiza capacității antioxidante totale realizată pe extractele vegetale din frunza și tulpina plantei *Vinca Minor*, obținute în alcool de diferite concentrații și determinarea proprietăților antioxidante a formulărilor farmaceutice semisolide cu aplicație topică realizate de noi în Capitolul 5 al tezei de doctorat. Activitatea antioxidantă a extractelor vegetale din frunza și tulpina plantei *Vinca Minor*, obținute în alcool de diferite concentrații: 40%, 70% și 96%, a fost testată prin două metode:

- *Metoda de captare a radicalilor 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-DDPH* (Takao T., 1994)
- *Metoda prin fotochemiluminescență*

7.1.1. STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A EXTRACTELOR VEGETALE ALCOOLICE OBȚINUTE DIN PLANTA *VINCA MINOR* L. UTILIZÂND METODA DE CAPTARE A RADICALILOR 2,2-DIPHENYL-1PICRYLHYDRAZYL-DDPH

Determinarea activității antioxidante prin metoda DPPH reprezintă o metodă simplă ce utilizează un spectrofotometru UV de rezonanță paramagnetică. Metoda de lucru implică neutralizarea radicalului DPPH cu virajul de culoare al acestuia măsurat la 517 nm, prin donarea de electroni a antioxidantilor. Activitatea antioxidantă este pusă în evidență prin decolorarea soluției.

În ecuația (7.1) este prezentată formula de calcul pentru determinarea capacității de captare a radicalilor DPPH.

$$\% \text{ Capacitatea de captare} = \frac{(\Delta A_{517} \text{ din control} - \Delta A_{517} \text{ din proba})}{\Delta A_{517} \text{ din control}} \times 100 \quad (7.1.)$$

Rezultate și discutii

Comparând rezultatele obținute prin testarea capacității de captare a radicalilor DPPH pentru extractele obținute din frunza și din tulpina plantei *Vinca minor* s-a constatat o capacitate de captare mai ridicată în cazul extractelor obținute din frunza acestei plante, ceea ce indică prezența unui conținut mai ridicat de compuși cu acțiune antioxidantă.

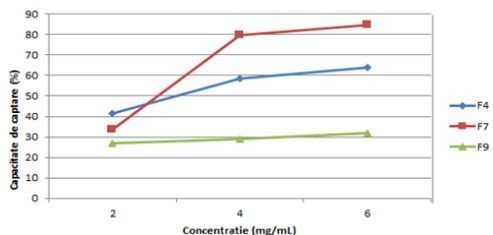


Fig.7.2. Variația capacității de captare a extractelor alcoolice de concentrație 40%, 70%, 96% obținute din frunza plantei *Vinca minor* L.

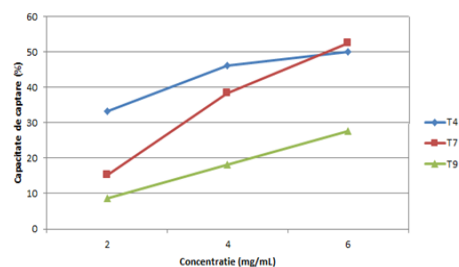


Fig.7.3 Variația capacității de captare a extractelor alcoolice de concentrație 40%, 70%, 96% obținute din tulpina plantei *Vinca minor* L.

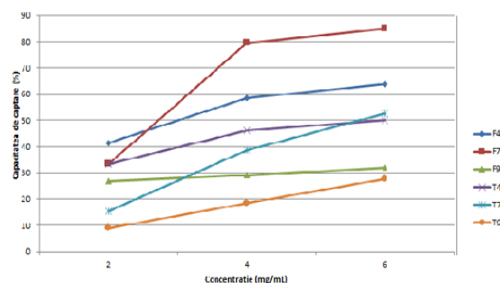


Fig.7.4. Variația capacității de captare pentru fiecare probă de extract alcoolic vegetal obținut din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* L. la diferite concentrații din proba de analizat

7.1.2. STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE AL EXTRACTELOR VEGETALE ALCOOLICE OBȚINUTE DIN PLANTA *VINCA MINOR* L. ȘI A UNOR FORMULĂRI FARMACEUTICE UTILIZÂND METODA PRIN FOTOCHEMILUMINESCENȚĂ

Metoda prin fotochemiluminescență utilizează tehnica prin fotochemiluminescență încorporată în sistemul Photochem. Utilizând această metodă, antioxidanții solubili atât în apă cât și în lipide pot fi măsurați rapid, în câteva minute, iar prepararea probelor nu este una laborioasă. (Negreanu-Pirjol T., 2012)

Capacitatea antioxidantă totală (TEAC) a fost studiată utilizând metoda prin fotochemiluminescență, pentru 6 extracte alcoolice vegetale de concentrații diferite obținute din planta *Vinca minor* (3 extracte din tulpina plantei *Vinca minor* obținute în alcool de concentrație 40%, 70%, 96%: T40, T70, T96 și 3 extracte din frunza plantei *Vinca minor* obținute în alcool de concentrație 40%, 70%, 96%: F40, F70, F96).

Rezultate

Tabelul VII.4. Rezultate obținute pentru Capacitatea Antioxidantă Totală (TEAC) realizată de preparatele farmaceutice semisolidе (P3, P4, P9, P10) obținute pe baza extractelor alcoolice

70% din frunza și tulpina plantei *Vinca minor*

Probă	Volum de probă utilizat (μL)	Timp de analiză (secunde)	Inhibiția	Echivalent unități Trolox (mmol/ volum probă)	Concluzii
P3 sol. stoc	5	120	0,945	-3,304	Prezintă inhibiție dar rezultatul TEAC nu se încadrează pe curba etalon
P3 diluție 1:100	5	120	0,443	1,959	Prezintă inhibiție și TEAC bună
P4 sol. stoc	5	120	0,189	0,388	Prezintă inhibiție și TEAC mai scăzută
P9 sol. stoc	5	120	0,894	-3,819	Prezintă inhibiție dar rezultatul TEAC nu se încadrează pe curba etalon
P9 diluție 1:100	5	120	0,275	0,692	Prezintă inhibiție și TEAC bună
P10 sol. stoc	5	120	0,228	0,512	Prezintă inhibiție și TEAC mai scăzută

Tabelul VII.3. Rezultate obținute pentru capacitatea antioxidantă pentru soluții diluate de extracte alcoolice de concentrație 40%, 70% și 96% obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor*

Probă Extract alcoolice vegetale	Volum de probă utilizat (μL)	Timp de analiză (secunde)	Inhibiția	Echivalent unități Trolox (mmol/ volum probă)	Concluzii
T40 sol. stoc	5	120	0.978	3.743	Prezintă inhibiție și TEAC prea ridicată, depășește curba etalon
T 40 diluție 1:10	5	120	0.719	3.606	Prezintă inhibiție și TEAC prea ridicată, depășește curba etalon
T40 diluție 1:100	5	120	0.363	3.174	Prezintă inhibiție și TEAC foarte bună
F40 sol. stoc	5	120	0.995	3.750	Prezintă inhibiție și TEAC prea ridicată, depășește curba etalon
F40 diluție 1:100	5	120	0.226	2.769	Prezintă inhibiție și TEAC foarte bună
T70 sol. stoc	5	120	0.972	3.741	Prezintă inhibiție și TEAC prea ridicată, depășește curba etalon
T70 diluție 1:100	5	120	0.183	2.567	Prezintă inhibiție și TEAC foarte bună
F70 sol. stoc	5	120	0.999	3.752	Prezintă inhibiție și TEAC prea ridicată, depășește curba etalon
F70 diluție 1:100	5	120	0.724	3.609	Prezintă inhibiție și TEAC prea ridicată, depășește curba etalon
F70 diluție 1:200	5	120	0.107	2.014	Prezintă inhibiție și TEAC foarte bună la diluția cea mai ridicată
T96 sol. stoc	5	120	0.960	-3.186	Prezintă inhibiție dar rezultatul TEAC nu se încadrează pe curba etalon
T96 diluție 1:100	5	120	0.407	1.547	Prezintă inhibiție și TEAC bună
F96 sol. stoc	5	120	0.992	-2.973	Prezintă inhibiție dar rezultatul TEAC nu se încadrează pe curba etalon
F96 diluție 1:100	5	120	0.515	3.380	Prezintă inhibiție și TEAC foarte bună

CAPITOLUL 8

STUDII COMPARATIVE PRIVIND ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A EXTRACTELOR ALCOOLICE VEGETALE DIN SPECIA *VINCA MINOR* L. ȘI A PREPARATELOR FARMACEUTICE OBȚINUTE PE BAZA ACESTOR EXTRACTE

Scopul acestui studiu a constat în identificarea și evaluarea potențialului antimicrobian natural al unor compuși bioactivi din extracte alcoolice vegetale, în variante diferite de concentrație în alcool etilic (40% și 70%), din frunza și tulpina plantei *Vinca minor*, precum și valorificarea eventualelor proprietăți antimicrobiene naturale ale extractelor obținute în diferite preparate cu aplicație topică.

8.1. STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A EXTRACTELOR ALCOOLICE VEGETALE OBȚINUTE DIN PLANTA *VINCA MINOR* L.

Evaluarea cantitativă a activității antimicrobiene s-a realizat printr-o variantă a metodei difuzimetrice Kirby-Bauer, o metodă simplă și rapidă ce permite determinarea spectrului de sensibilitate/rezistență la antibiotice a microorganismului, variantă în care microtabletele cu antibiotice clasice au fost înlocuite cu cantități de 5 μ L și respectiv 7 μ L din probele de testat, dispuse prin micropipetare pe suprafața mediului PCA inoculat cu microorganismul de testat. Această metodă a fost folosită atât pentru extractele obținute din tulpină, cât și pentru cele obținute din frunza plantei *Vinca minor*.

Rezultate

În Fig. 8.8., 8.9. și 8.10. este reprezentat studiul comparativ al activității antimicrobiene al extractelor alcoolice vegetale de concentrație 40% și 70% obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor*, testate pe tulpini de *S. aureus*, *E. coli* și *C. albicans*. Se observă că alcoolul etilic în concentrație de 70% utilizat în pregătirea extractelor reprezintă solventul cu cea mai mare putere de extracție a compușilor cu activitate antimicrobiană, evidențiată prin apariția halourilor de inhibiție a creșterii microbiene (plăcile din dreapta pe figuri).

În figurile 8.11. și 8.12. sunt prezentate halourile de inhibiție formate în urma activității antimicrobiene exercitată de extractele vegetale alcoolice de concentrație 70% obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor*, pe tulpinile bacteriilor *E. coli*, *S. aureus* și *C. albicans*.

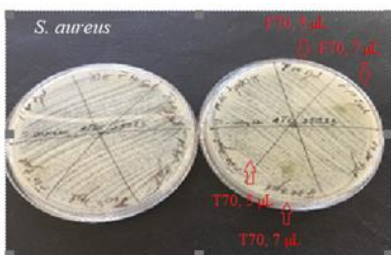


Fig. 8.8. Activitatea antimicrobiană a extractelor vegetale alcoolice de concentrație 40% și 70% obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* L. pe *S. aureus*

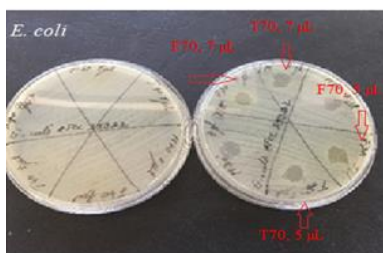


Fig. 8.9. Activitatea antimicrobiană a extractelor vegetale alcoolice de concentrație 40% și 70% obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* L. pe *E. coli*

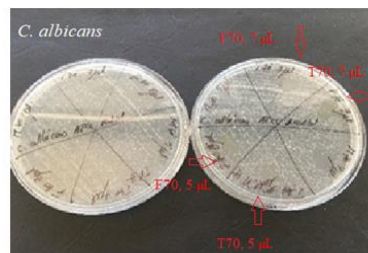


Fig. 8.10. Activitatea antimicrobiană a extractelor vegetale alcoolice de concentrație 40% și 70% obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* L. pe *C. albicans*

8.2. STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A FORMULĂRILOR REALIZATE CU EXTRACTE ALCOOLICE VEGETALE OBȚINUTE DIN PLANTA *VINCA MINOR L.*

În acest studiu a fost analizată activitatea antimicrobiană pentru 4 formulări farmaceutice destinate aplicației topice sub formă de emulsii de tip L/H, pe baza extractelor alcoolice vegetale obținute din planta *Vinca minor L.*, în asociere cu alte substanțe naturale sau de sinteză care prezintă activitate antimicrobiană proprie, pentru a spori efectul antibacterian.

Evaluarea cantitativă a activității antimicrobiene s-a realizat prin metoda difuzimetrică. Pentru prepararea inoculului s-a utilizat metoda omogenizării directe a coloniilor, constând în omogenizarea în ser fiziologic steril (AFS) a 3-5 colonii de pe placa cu cultură de 18 ore, pentru obținerea unei turbidități standardizate 0.5 McFarland. S-a însămânțat prin încorporare o placă de PCA cu 1 mL suspensie bacteriană de 0.5 McFarland (1.5×10^8 ufc/mL). După solidificare s-au realizat godeuri de diferite diametre, în care s-au introdus gramaje din preparatele farmaceutice analizate, respectându-se condițiile de asepsie ($\emptyset = 9\text{mm} - 0.15$ g preparat, $\emptyset = 11\text{mm} - 0.20$ g compozit, $\emptyset = 15\text{mm} - 0.40$ g preparat). S-au incubat pentru 22 ± 2 ore la 37°C . După terminarea perioadei de incubare, se observă și se măsoară în mm diametrul zonei de inhibiție a creșterii microbiene.

Rezultate

În acest studiu a fost analizată activitatea antimicrobiană pentru 4 formulări farmaceutice destinate aplicației topice sub formă de emulsii de tip L/H, pe baza extractelor alcoolice vegetale obținute din planta *Vinca minor L.*, în asociere cu alte substanțe naturale sau de sinteză care prezintă activitate antimicrobiană proprie, pentru a spori efectul antibacterian.

În Fig. 8.17., Fig. 8.18. și Fig. 8.19. se observă că cele 4 compozite semisolide preparate au prezentat o activitate antimicrobiană bună pe tulpinile bacteriene de referință *S. aureus* 25923 (Gram-pozitivă) și *E. Coli* ATCC 25922 (Gram-negativă) și că preparatele P4 și P10 care prezintă în plus în compoziția lor și oxidul de zinc, sunt singurele care au prezentat o acțiune evidentă asupra tulpinii de referință *C. albicans* ATCC 10231.

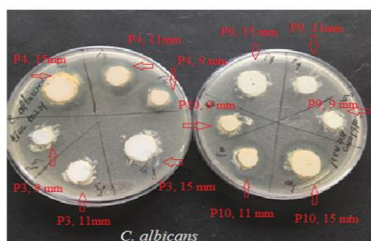


Fig. 8.17. Activitatea antimicrobiană a preparatelor P3, P4, P9 și P10 pentru *C. albicans*

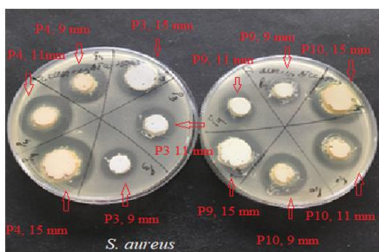


Fig. 8.18. Activitatea antimicrobiană a preparatelor P3, P4, P9 și P10 pentru *S. aureus*

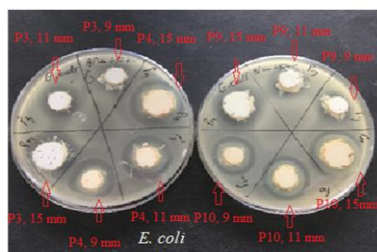


Fig. 8.19. Activitatea antimicrobiană a preparatelor P3, P4, P9 și P10 pentru *E. coli*

8.2.4. STUDIUL COMPARATIV AL EFECTULUI ANTIMICROBIAN AL PREPARATELOR P3, P4, P9 ȘI P10 VERSUS EXTRACTUL VEGETAL BRUT ÎN ETANOL 70%

Aprecierea comparativă a efectului antimicrobian al formulărilor farmaceutice P3, P4, P9 și P10, în care au fost încorporate extracte vegetale etanolice 70% din frunze și tulpini de Vinca, conform formulărilor descrise în Capitolul 5, s-a realizat cu testul ANOVA din procesorul statistic IBM SPSS.

Deși, din Fig. 8.17, 8.18., 8.19. se observă că preparatele P4 și P10, care conțin în compoziție în plus și oxidul de zinc, prezintă o activitate antimicrobiană crescută comparativ cu P3 și P9, testul ANOVA aplicat în cazul datelor experimentale a evidențiat diferențe ne semnificative ($P < 0.001$) față de martor în cazul tuturor variantelor experimentale analizate P3, P4, P9, P10.

În Fig. 8.23., 8.24. și 8.25 este redată reprezentarea grafică a mediei valorilor diametrelor zonelor de inhibiție pentru cele 4 variante experimentale față de martor în cazul tulpinei de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

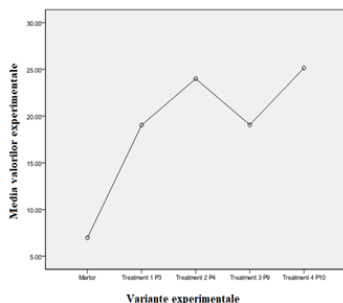


Fig. 8.23. Eficiența efectului antimicrobian al preparatelor P3, P4, P9, P10 împotriva tulpinilor de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

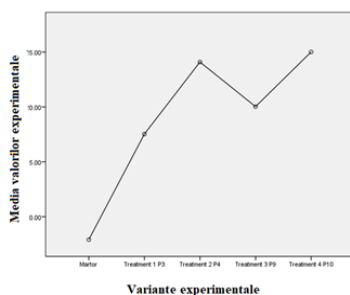


Fig. 8.24. Eficiența efectului antimicrobian al preparatelor P3, P4, P9, P10 împotriva tulpinilor de *Escherichia coli* ATCC 25922

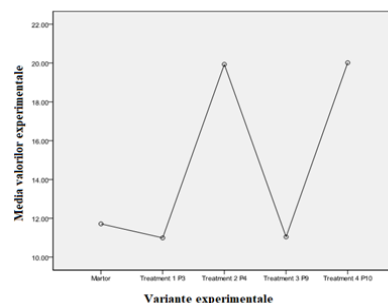


Fig. 8.25. Eficiența efectului antimicrobian al preparatelor P3, P4, P9, P10 împotriva tulpinilor de *Candida albicans* ATCC 10231

CAPITOLUL 9

CONCLUZII GENERALE

Pe baza rezultatelor obținute în urma cercetărilor realizate prin studii originale cu un grad avansat în cercetarea compușilor indolici din surse naturale, pe parcursul celor 5 capitole din partea de contribuții personale a tezei de doctorat, se pot evidenția următoarele concluzii generale derivate din fiecare capitol descris.

9.1. STUDII FIZICO-CHIMICE COMPARATIVE PRIVIND COMPUȘII INDOLICI EXTRAȘI DIN PLANTA *VINCA MINOR* L.

Natura reprezintă o sursă valoroasă de compuși biologic activi cu rol benefic pentru sănătatea organismului. Pornind de la potențialul terapeutic confirmat al plantei *Vinca minor*, considerată și în literatura de specialitate ca fiind de interes farmaceutic, acest capitol prezintă rezultatele unor studii specifice efectuate asupra unor extracte obținute din planta *Vinca minor*, utilizate în formularea unor noi preparate farmaceutice de uz topic:

- În cadrul acestui capitol a fost realizat un studiu fitochimic pentru încadrarea plantei *Vinca minor* ca plantă de interes farmaceutic, prin scoaterea în evidență a răspândirii teritoriale a tipurilor de specii și a claselor de alcalozi indolici prezenți în această plantă.
- Au fost preparate 6 extracte alcoolice de concentrație diferită 40%, 70% și respectiv, 96%, obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* (3 extracte alcoolice din frunză și 3 extracte alcoolice obținute din tulpina plantei *Vinca minor*).
- În urma analizei cromatografice HPLC a fost identificat și determinat conținutul de vincamină, în probele de extracte vegetale din frunza și tulpina plantei *Vinca minor*, din arealul românesc, zona Dobrogea. Pe baza studiului realizat prin evaluarea parametrilor statistici utilizați, metoda HPLC a fost validată. În cazul determinării preciziei și acurateței, metoda HPLC a obținut rezultate foarte bune prin îndeplinirea criteriilor atât pentru RSD%, repetabilitate R%, cât și pentru bias (regăsire), iar coeficient de corelație obținut $r=0,9998$, a prezentat o liniaritate foarte bună.
- Metoda HPLC validată a fost aplicată pentru determinarea alcaloizilor cu nucleu indolic: vincamina, eburnamonina, 1,2-dehidroaspidospermidină și vincaminoreina din extractele vegetale obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor*. În urma rezultatelor obținute s-a

constatat existența unei cantități mai mari de vincamină în extractele vegetale din frunză ($49,18 \pm 0,027$ ng/mL), față de tulpina plantei studiate ($15,88 \pm 0,003$ ng/mL). Alcaloidul eburnamonină a fost identificat cu un conținut de $16,07 \pm 0,001$ ng/mL doar în extractele vegetale din frunza plantei *Vinca minor*. În ceea ce privește alcaloidul indolic 1,2-dehidrospidospermidină, acesta a prezentat un conținut mai mare în tulpină ($32,5 \pm 0,034$ ng/mL), față de frunză ($17,97 \pm 0,009$ ng/mL), iar vincaminoreina a fost identificată în ambele extracte vegetale, cu un conținut de $21,28 \pm 0,004$ ng/mL în frunză și $5,7 \pm 0,001$ ng/mL, în tulpină. Rezultatele au fost în concordanță cu datele din literatura de specialitate.

- Rezultatele obținute în urma analizei spectrofotometrice UV-VIS efectuată în acest capitol, confirmă structura compușilor indolici extrași din planta *Vinca minor* L.
- A fost analizată compoziția minerală a plantei *Vinca minor* utilizând metoda spectrală de absorbție atomică. Pentru frunza și tulpina plantei *Vinca minor*, a fost studiată concentrația unor metale cum sunt plumbul, fierul și cuprul. În materialul vegetal studiat au fost identificate și alte elemente cum sunt: calciu, magneziu, mangan, sodiu și zinc. În urma rezultatelor obținute, s-a constatat încadrarea concentrațiilor unor metale toxice (Ni, Cd, Pb, Cu) în limitele impuse de literatura de specialitate pentru aplicații biomedicale, fapt ce confirmă că planta *Vinca minor* constituie o materie prima naturală, curată și necontaminată ce prezintă un potențial ridicat pentru a fi utilizată în industria farmaceutică pentru aplicații actuale și viitoare.
- Deoarece conținutul de polifenoli generează o activitate antioxidantă semnificativă, a fost determinat conținutul total de polifenoli al extractelor alcoolice vegetale obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* L. Concentrațiile totale de polifenoli au fost separate utilizând metoda Folin-Ciocalteu.
- În urma rezultatelor obținute, concentrațiile totale de polifenoli au fost mai mari pentru extractele alcoolice de concentrație 70% obținute atât din frunză cât și din tulpină. Putem afirma faptul că alcoolul etilic în concentrație de 70% reprezintă solventul cu cea mai mare putere de extracție a compușilor bioactivi.
- S-a constatat existența unui conținut mai mare de compuși fenolici în extractele etanolice obținute din tulpina plantei *Vinca minor* (T40, T70, T96) decât în cazul frunzei (F40, F70, F96), rezultat ce susține activitatea antioxidantă mai mare a extractelor alcoolice obținute din tulpina acestei plante.

- În urma analizei parametrilor fizico-chimici asociată cu siguranța obținută în cazul profilului de toxicitate, încadrează planta *Vinca minor* în aria produselor naturale cu potențial important în industria farmaceutică.

9.2. REALIZAREA UNOR FORME FARMACEUTICE SEMISOLIDE FOLOSIND EXTRACTE NATURALE DIN PLANTA *VINCA MINOR* L.

Din necesitatea de a avea la dispoziție preparate farmaceutice cu aplicație topică, care să regenereze și să cicatrizeze pielea, în cadrul acestui capitol au fost dezvoltate noi formulări farmaceutice cu aplicație topică care au în compoziție extractele alcoolice vegetale obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor*, în asociere cu alte substanțe de origine vegetală și de sinteză, în scopul obținerii unui efect terapeutic îmbunătățit.

- Dezvoltarea acestor preparate semisolide destinate administrării locale a avut la bază numeroasele beneficii pe care compușii indolici extrași din planta *Vinca minor* le evidențiază la nivel extern: contribuie la vindecarea ulcerărilor sângerânde, plăgilor deschise, echimozelor, contuziilor, prin grăbirea procesului de cicatrizare.
- Compoziția acestor formulări topice a fost selectată astfel încât să asigure biocompatibilitate, bioadeziune și un posibil efect terapeutic îmbunătățit. Preparatele farmaceutice au fost pregătite sub formă de emulsii de tip L/H sau H/L, având în compoziție soluțiile vegetale alcoolice ca substanțe principale utilizate pentru efectul lor cicatrizant, antimicrobian, asociate cu diferite substanțe care prezintă acțiune farmacologică proprie.
- Cele 12 noi formulări farmaceutice dezvoltate în cadrul acestui capitol au fost diferențiate prin procentul variat de extract alcoolic 40%, 70%, 96% conținut, dar și prin adaosul de oxid de zinc, compus cu proprietăți antiseptice și antimicrobiene în preparatele cu aplicație topică. Pentru fiecare preparat au fost stabilite proprietățile organoleptice, a fost determinat pH-ul și capacitatea de întindere. Din analiza rezultatelor celor 12 formulări farmaceutice concretizate în preparatele P1-P12, se pot trage următoarele concluzii importante:
 - În urma analizei proprietăților organoleptice, rezultatele au confirmat faptul că cele 12 preparate farmaceutice au fost omogene, translucide, cu miros caracteristic componentelor, proprietăți ce corespund controlului calității.
 - Conform prevederilor din F.R. X, pH-ul s-a determinat potențiomtric, folosind un pH-metru Hanna Instruments. Fiecare testare a valorii pH-ului a fost realizată în triplicat, iar valorile

rezultate în urma testărilor au fost în limitele admise prevăzute de F.R. X. (4,5-8,5) fiind totodată și apropiate de pH-ul fiziologic al pielii.

- În ceea ce privește analiza controlului capacității de întindere a celor 12 formulări farmaceutice preparate anterior, s-a utilizat metoda P. Ojeda-S. Arbussa. Din evaluarea rezultatelor s-a evidențiat faptul că toate cele 12 formulări farmaceutice preparate prezintă o bună capacitate de întindere, influențată de prezența extractelor alcoolice vegetale obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca Minor*.
- Pentru determinarea siguranței, stabilității și eficienței terapeutice, în viitor, sunt necesare studii suplimentare *in vivo* și *in vitro*, în vederea dezvoltării unor noi preparate topice comerciale utilizând soluții alcoolice extractive din planta *Vinca Minor*.

9.3. STUDII COMPARATIVE PRIVIND CARACTERUL REOLOGIC AL FORMULĂRILOR FARMACEUTICE CU APLICAȚIE TOPICĂ OBȚINUTE

Cunoașterea parametrilor reologici oferă informații importante despre unele proprietăți fizico-chimice finale ale formelor farmaceutice cum ar fi stabilitatea, dar și pentru stabilirea unor parametrii tehnologici utilizați în preformulare și formulare.

Studiul comportamentului reologic al celor 12 formulări farmaceutice obținute în capitolul anterior, a evidențiat următoarele concluzii importante:

- Cele 12 formulări farmaceutice semisolide studiate au prezentat un comportament de fluid newtonian, pseudoplastic, tixotrop.
- Comportamentul reologic al celor 12 preparate respectă legea puterii dată de modelul Ostwald de Waele.
- Toate preparatele P1-P12 sub formă de emulsii de tip L/H sau H/L, luate în studiu, având caracter reologic, pseudoplastic și indicele de curgere $n < 1$, au prezentat o scădere a vâscozităților aparente, odată cu creșterea vitezelor de forfecare.
- În urma studiilor reologice efectuate au rezultat reograme care au evidențiat faptul că toate aceste preparate realizate cu extractele vegetale alcoolice luate în studiu, au prezentat tensiuni de forfecare mai mari la scăderea tensiunii de forfecare, decât cele măsurate la creșterea vitezelor de forfecare, înregistrându-se astfel bucle de histerezis. Preparatele P6 și P11 au fost singurele care au făcut excepție de la această constatare deoarece acestea au prezentat creșteri ale tensiunilor de forfecare, odată cu creșterea vitezelor de forfecare, față de

descreșterea vitezelor. Acest fapt explică și alțiura diferită a reogramelor pentru aceste preparate cu conținut de extracte vegetale obținute în soluții alcoolice de concentrație mică (40%).

În cadrul acestui capitol a fost efectuată o analiză comparativă pentru probe din preparatele P1-P6 obținute din tulpină și P7-P12, obținute din frunza plantei *Vinca minor*. În urma rezultatelor obținute, se pot trage următoarele concluzii:

- Toate preparatele realizate cu extracte alcoolice vegetale din frunza plantei *Vinca minor* au prezentat intervale de valori mai largi pentru toți parametrii reologici (vâscozitate, gradient de viteză și tensiune de forfecare), față de cele realizate din tulpina plantei *Vinca minor*. Acest fapt se datorează compozițiilor diferite în tipuri diferite de alcaloizi *Vinca*, obținuți în extracte alcoolice, la frunză față de tulpină, pentru toate concentrațiile de alcool comparative.
- Adăugarea ZnO atât în formularea preparatelor realizate cu extracte vegetale din frunză cât și la cele realizate din tulpina plantei *Vinca minor*, obținute în concentrații mici de alcool (40%), nu a influențat valorile obținute pentru vâscozitatea aparentă.
- Adăugarea ZnO în cazul preparatelor cu extracte vegetale din frunză și tulpină realizate în soluții alcoolice de concentrație 70% și 96%, a mărit tixotropia preparatelor față de cele care nu au avut ZnO în compoziția acestora.

9.4. STUDII COMPARATIVE PRIVIND PROPRIETĂȚILE ANTIOXIDANTE ALE EXTRACTELOR ALCOOLICE VEGETALE DIN FRUNZA ȘI TULPINA PLANTEI *VINCA MINOR* L. ȘI A UNOR FORMULĂRI FARMACEUTICE OBȚINUTE

Din studiile efectuate în cadrul acestui capitol se pot trage următoarele concluzii:

- Proprietatea antioxidantă a extractelor vegetale din frunza și tulpina plantei *Vinca Minor*, obținute în alcool de diferite concentrații: 40%, 70% și 96%, a fost testată prin două metode: metoda de captare a radicalilor 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-DDPH și metoda prin fotochemiluminescență.
- Rezultatele obținute la analiza capacității antioxidante testată prin metoda de captare a radicalilor DPPH au evidențiat atât în cazul extractelor alcoolice obținute din frunza plantei *Vinca Minor*, cât și la cele obținute din tulpină, faptul că soluțiile analizate prezintă o diminuare a culorii violet pe măsura creșterii concentrației.

- În cazul testării capacității de captare a DPPH, cea mai mare valoare a fost obținută pentru concentrația de 6 mg/mL a extractelor alcoolice vegetale obținute din frunza și din tulpina plantei *Vinca Minor*. Rezultatul sugerează o activitate mai pronunțată de captare a radicalilor DPPH odată cu creșterea concentrației de extracte alcoolice.
- Cea mai mare valoare a capacității de captare a DPPH a fost obținută în cazul soluțiilor extractive obținute în alcool etilic de concentrație 70%, de unde rezultă că alcoolul etilic 70% reprezintă solventul cu cea mai mare putere de extracție a compușilor bioactivi, fapt confirmat și în Capitolul 4 al tezei” Studii fizico-chimice comparative privind compușii indolici extrași din planta *Vinca minor* L.”, la determinarea compușilor polifenolici totali, subpunctul 4.5.2. “Determinarea conținutului total de polifenoli”.
- Prin compararea valorilor obținute la testarea capacității de captare a radicalilor liberi pentru extractele obținute din frunza și din tulpina plantei *Vinca minor*, s-a constatat o capacitate de captare mai ridicată în cazul extractelor obținute din frunza acestei plante, ceea ce indică prezența unui conținut mai ridicat de compuși cu acțiune antioxidantă.
- Făcând o corelație cu datele obținute la determinarea compușilor polifenolici totali prin metoda Folin-Ciocalteu, unde s-a obținut o cantitate mai mare de compuși polifenolici totali în tulpina plantei *Vinca Minor*, putem concluziona că valorile ridicate ale capacității de captare a radicalilor DPPH sunt determinate în special de compușii cu structuri diferite de alcaloizi *Vinca*, fapt ce concordă cu literatura de specialitate.

9.5. STUDII COMPARATIVE PRIVIND ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A EXTRACTELOR ALCOOLICE VEGETALE DIN SPECIA *VINCA MINOR* L. ȘI A PREPARATELOR FARMACEUTICE OBȚINUTE PE BAZA ACESTOR EXTRACTE

- În acest capitolul au fost analizate prin metoda difuzimetrică, proprietățile antimicrobiene ale extractelor alcoolice vegetale în concentrație de 40% și 70% obținute din frunza și tulpina plantei *Vinca minor* și ale celor 4 formulări farmaceutice cu aplicație topică, preparate pe baza acestor extracte. Testarea activității antimicrobiene a fost realizată pe două tipuri de bacterii de referință (o bacterie Gram-pozitivă: *S. aureus* și una Gram-negativă: *E. coli*) și o specie de levură (*C. albicans*).
- Studiile efectuate pentru extractele alcoolice de concentrație 70% au demonstrat eficacitatea și caracterul antibacterian al acestor extracte asupra diferitelor microorganisme testate,

precum: două tipuri de bacterii: *S. aureus* de tip Gram-pozitiv și *E. coli* de tip Gram-negativ și o specie de levură: *C. albicans*, utilizând metoda difuzimetrică.

- Rezultatele obținute au subliniat faptul că toate probele de extract alcoolic de concentrație 70%, în volume de 7 μ L, au exercitat o acțiune inhibitoare antibacteriană totală împotriva tulpinilor de referință *E. coli* și *C. albicans* și moderată împotriva tulpinei *S. aureus*, rezultate ce concordă cu literatura de specialitate. Pentru extractele vegetale obținute în alcool de concentrație 40%, rezultatele obținute în urma testării antimicrobiene au evidențiat faptul că acestea nu prezintă activitate antimicrobiană.
- Pentru extractele alcoolice vegetale de concentrație 70%, rezultatele obținute au evidențiat valori apropiate atât în cazul celor preparate din frunză, cât și pentru cele preparate din tulpina plantei *Vinca minor*, fapt ce pune în evidență prezența compușilor cu activitate antimicrobiană similară pentru extractele obținute din ambele materiale vegetale studiate.
- Formulările farmaceutice semisolide pe bază de extracte alcoolice obținute din planta *Vinca minor* L., au exercitat un efect antimicrobian bun asupra tulpinilor de referință *S. aureus*, *E. coli* și *C. albicans*. A fost observată o potențare a acțiunii de inhibiție la asocierea oxidului de zinc, substanță ce prezintă aceleași efecte: antifungic și antibacterian.
- Studiul comparativ al efectului antimicrobian al formulărilor farmaceutice P3, P4, P9 și P10, în care au fost incorporate extracte vegetale etanolice 70% din frunze și tulpini de *Vinca*, s-a realizat cu testul ANOVA din procesorul statistic IBM SPSS. Rezultatele obținute (fără semnificație statistică) au evidențiat că efectul antimicrobian este datorat în principal extractului brut în etanol 70.
- Din rezultatele studiului se confirmă faptul că atât frunzele cât și tulpinile plantei *Vinca minor* reprezintă o sursă valoroasă de substanțe antibacteriene, iar formulările farmaceutice analizate pot reprezenta o alternativă în realizarea unor noi preparate farmaceutice cu aplicație topică pe baza extractelor alcoolice obținute din planta *Vinca minor*.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Adizov S.M., Tashkhodzhaev B., Bruskov V.P., Talipov S.A., Yuldashev P.K., Malikov V.M. (2017). On nitrogen coordination in vincadifformine-type alkaloids. Chem. Nat. Compd. 53, p. 512.

- Ahmed A.B., Maha M. Abdelrahman, Nada S. Abdelwahab, Fathy M. Salama (2016). Stability-Indicating TLC-Densitometric and HPLC Methods for the Simultaneous Determination of Piracetam and Vincamine in the Presence of Their Degradation Products. *Journal of AOAC International* Vol. 99, No. 6.
- Alexander R.S., Butler A.R. (1976). Electrophilic substitution in pyrroles 1. Reaction with 4- dimethylaminobenzaldehyde in acid solution. *Chem. Soc. Perkin II*, p. 696.
- Alves P.M., Pohlmann A.R., Guterres S.S. (2005). Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nano emulsion: development and rheological characterization. *Pharmazie*, 60 (12): p. 900-904.
- Amato A., Cavazzutti G., Gagliardi L., Profili M., Zagarese V., Chimenti F., Tonelli D. & Gattavecchia E. (1983). Determination of vincamine by high-performance liquid chromatography with dual-wavelength ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A* 270, p. 387–391.
- Anca Dragomirescu, (2008). *Dermatofarmacie si cosmetologie*, Edition Mirton, Timisoara. p. 150-198.
- Anderton M.J., Jukes R., Lamb J.H., Manson M.M., Gescher A., Steward W.P., Williams M.L. (2003). Liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of indole-3-carbinol and its acid condensation products in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 787: p. 281–291
- Andrews J.M. (2005). *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 56, no. 12, p. 60–76.
- Antoun H. and Kloepper J.W. (2001). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) In: *Encyclopedia of Genetics*. Brenner S. and Miller J.H. (Eds.). Academic Press, NY., p. 1477-1480.
- Arshad M. and Frankenberger W.T. (1991). Jr. Microbialproduction of plant hormones. *Plant Soil*, 133: p. 1-8.
- Asghar H.N., Zahir Z.A., Arshad M. and Khaliq A. (2002). Relationship between *in vitro* production of auxins byrhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils*, 35: p. 231-237.
- Moldoveanu D., Lepădatu A. (sub redacția). (2004). *Bacteriologie și Genetică Moleculară*. Editura Pegasus Press, București, p. 24 – 35.

- Mollgaard B., Hoelgaard A. (1983). Vehicle effect on topical drug delivery. I. Influence of glycols and drug concentration on skin transport. *Acta Pharm. Suec.*, 20: p. 433–442.
- Montenegro C., Carbone G., Puglisi G., (2011). Vehicle effects on *in vitro* release and skin permeation of octylmethoxycinnamate from microemulsions. *Int. J. Pharm.*, 405, p. 162-168.
- Moudi M., Go R., Yien C.Y., Nazre M. (2013). Vinca alkaloids. *Int. J. Prev. Med.* 4, p. 1231.
- Muhammad A.A., Zahir A.Z., Muhammad Arshad and Muhammad Ashraf. (2011). Isolation and screening of rhizobia for auxin biosynthesis and growth promotion of mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings under axenic conditions. *Soil Environ.* 30 (1): p. 18-26.
- Muszyńska B., Kała K., Firlej A. & Sułkowska-Ziaja K. (2016). *Cantharellus cibarius*—culinary-medicinal mushroom content and biological activity. *Acta Poloniae Pharmaceutica –Drug Research*, 73, p. 589–598.
- Naik A., Kalia Y. N., Guy R. H. (2000). (2000)., Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function, *Pharm. Sci. Tech. Today*, 3, p. 318-326.
- Namjoshi O.A., Cook J.M. (2016). Sarpagine and Related Alkaloids. *Alkaloids Chem Biol*; 76: p. 63-169.
- Nathan C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420, p. 846–852.
- **Neculai Ana-Maria**, Cadar E., Paris S., Negreanu-Pîrjol B.-S., Sîrbu R. (2015a). Studies on natural compounds with glycozides with indole ring, 15th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2015, 18-24 June, Bulgaria, Vol. I, ISBN 978-619-7105-42-1, p. 561-566.
- Negreanu-Pîrjol T., Negreanu-Pîrjol B.Ş., Sîrbu R., Paraschiv G., Meghea A. (2012). Comparative studies regarding the antioxidative activity of some therapeutic marine algae species along Romanian Black Sea Coast, *JEPE*, 13, (3A), p. 1744-1750.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

❖ LUCRĂRI PUBLICATE ÎN REVISTE COTATE BDI

1. **Ana-Maria Dumitrescu (Neculai)**, Gabriela Stanciu, Rodica Sîrbu, Florica Busuricu. *Spectrophotometric studies of indolic compounds from Vinca Minor L.* (2020). European Journal of Medicine and Natural Sciences [S.I.], Vol. 4 (3). ISSN 2601-6400, p. 33-42.
2. **Ana-Maria Dumitrescu (Neculai)**, Rodica Sîrbu, Anca Cristina Lepădatu. *Study of antimicrobial activity of vegetable alcoholic extracts obtained from Vinca Minor L.* (2020). European Journal of Medicine and Natural Sciences [S.I.], Vol. 4 (3). ISSN 2601-6400, p. 66-73.

❖ LUCRĂRI PUBLICATE ÎN VOLUME ALE UNOR CONFERINȚE COTATE ISI

3. **Neculai Ana-Maria**, Sîrbu R., Tomescu A., Paris S., Eremia C.-L., (2015b). *Considerations on natural compounds with indole ring from environmental found in the human body*, 15th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2015, (Conferință cotată ISI) 18-24 June, Bulgaria, Conference Proceedings, Vol. I, ISBN 978-619-7105-42-1, p. 367-373.
4. **Neculai Ana-Maria**, Cadar E., Paris S., Negreanu-Pîrjol B.-S., Sîrbu R. (2015). *Studies on natural compounds with glycozides with indole ring*, 15th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2015, (Conferință cotată ISI) 18-24 June, Bulgaria, Conference Proceedings, Vol. I, ISBN 978-619-7105-42-1, p. 561-566.
 - Criteriu îndeplinit.

❖ LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE REALIZATE ÎN CADRUL PROIECTULUI DE CERCETARE POSDRU/187/1.5/S/155631/2015 ȘI PREZENTATE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE

5. **Dumitrescu Ana-Maria**, Luiza Caracostea, Cadâr Emin, Cristina-Luiza Erimia, Rodica Sîrbu, *Synthesis and characterization of some Indole compounds with physiological importance*, The first edition of the International Conference "From Science to Guidance and Practice" 19th - 21st October 2015, Bucharest, Romania, ISBN 978-973-708-854-3, poster presentation.