

Universitatea POLITEHNICA din București
Facultatea de Chimie Aplicată și Știința Materialelor
Departamentul de Bioresurse și Știința Polimerilor



TEZĂ DE DOCTORAT

Compuși din plante cu activitate antitumorală

Conducător științific:
Prof. dr. ing. Ioan Călinescu

Doctorand:
Rodica Tatia

BUCUREȘTI
2021

Cuvinte cheie:

Hedera helix L.; constituenți fitochimici; α -hederin; hederagenin; hederacozid C; flash-chromatografie; optimizarea unui amestec de saponine; citotoxicitate *in vitro*; activitate antiproliferativă.

CUPRINS

INTRODUCERE.....	8
I. CERCETARE BIBLIOGRAFICĂ.....	12
CAPITOLUL 1. FITOCOMPUȘI CU ACTIVITATE ANTITUMORALĂ.....	12
1.1. Stadiul actual al cunoașterii compușilor din plante cu acțiune antitumorală și al efectelor lor în patologia bolilor de cancer.....	12
1.2. Mecanismele de acțiune al agenților antitumoralilor.....	13
1.3. Modul de acțiune al compușilor vegetali în terapii ale cancerului.....	15
1.4. Tendințele actuale în cercetarea compușilor naturali cu acțiune antitumorală.....	34
CAPITOLUL 2. <i>HEDERA HELIX</i> L. - COMPOZIȚIE ȘI ACTIVITĂȚI FARMACOLOGICE.....	38
2.1. Caracteristici generale ale plantei.....	38
2.2. Fitocompuși identificați în planta <i>Hedera helix</i> L.....	41
2.3. Saponinele prezente în <i>Hedera helix</i> L. și activitatea lor antitumorală.....	47
2.4. Alte activități farmacologice ale plantei <i>Hedera helix</i> L.....	48
CAPITOLUL 3. OBȚINEREA EXTRACTELOR VEGETALE	50
3.1. Metodele de extracție convenționale ale compușilor din plante.....	50
3.2. Metodele de extracție neconvenționale ale compușilor din plante.....	53
II. CERCETAREA EXPERIMENTALĂ.....	66
CAPITOLUL 4. ANALIZA CALITATIVĂ A UNOR EXTRACTE DIN FRUNZE DE <i>HEDERA HELIX</i> L.....	68
4.1. Obiectivul studiului.....	68
4.2. Pregătirea materialului vegetal frunze de <i>Hedera helix</i> L.....	68
4.3. Analiza calitativă a extractului apos.....	69
4.3.1. Obținerea extractului apos din frunze de iederă A1. și identificarea claselor de compuși	69
4.3.2. Obținerea extractului apos hidrolizat A2. și identificarea claselor de compuși.....	73
4.4. Analiza calitativă a extractului alcoolic.....	78
4.4.1. Obținerea extractului alcoolic B1. din frunze de iederă.....	78
4.4.2. Obținerea extractului acoolic hidrolizat B2.....	78
4.4.3. Identificarea claselor de compuși din extractul alcoolic B1., extractul hidrolizat eteric B2.1. și extractul hidrolizat apos B2.2.	79
4.5. Analiza calitativă a extractului eteric.....	85
4.5.1. Obținerea extractului eteric C1. din frunze de iederă.....	85

4.5.2. Obținerea extractului eteric hidrolizat C2. și identificarea claselor de compuși.....	86
4.6. Concluzii.....	91
CAPITOLUL 5. OBȚINEREA EXTRACTELOR DIN FRUNZE DE IEDERĂ ȘI EVALUAREA CONȚINUTULUI TOTAL DE SAPONINE.....	94
5.1. Obiectivul studiului.....	94
5.2. Materiale și metode.....	95
5.2.1. Pregătirea materialului vegetal frunze de <i>Hedera helix</i> L.....	95
5.2.2. Obținerea prin refluxare a extractului etanolic din frunze de <i>Hedera helix</i> L.....	95
5.2.3. Obținerea prin ultrasonicare a extractului etanolic din frunze de iederă.....	95
5.2.4. Obținerea prin macerare a extractului etanolic din frunze de <i>Hedera helix</i> L.....	96
5.2.5. Obținerea prin extracție continuă Soxhlet a extractului etanolic din frunze de iederă.....	96
5.2.6. Determinarea conținutului total de saponine a extractelor etanolice frunze de <i>Hedera helix</i> L. obținute prin cele patru metode de extracție (CTS).....	97
5.3. Rezultate și discuții.....	99
5.3.1. Rezultatele obținute la extracția principiilor active din frunze de iederă prin cele patru metode de extracție.....	99
5.3.2. Evaluarea conținutului total de saponine în extractele vegetale obținute.....	100
5.3.3. Corelații între condițiile specifice ale celor patru metode de extracție și conținutul de saponine prezent în extractele obținute.....	102
5.4. Concluzii.....	105
CAPITOPLUL 6. IZOLAREA SAPONINELOR DIN EXTRACTE DIN FRUNZE DE <i>HEDERA HELIX</i> L.....	106
6.1. Obiectivul studiului.....	107
6.2. Materiale și metode.....	107
6.2.1. Izolarea saponinelor din extractul etanolic obținut din frunze proaspete de <i>Hedera helix</i> L. (Metoda I-a).....	108
6.2. 2. Izolarea hederageninului din extractu letanolic obținut prin macerare repetată din frunze uscate de iederă (Metoda a II-a)	112
6.2.3. Izolarea hederageninului din extractul etanolic obținut prin refluxare din frunze uscate de iederă (Metoda a III-a).....	115
6.3. Rezultate și discuții.....	118
6.4. Concluzii.....	123
CAPITOLUL 7. CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ ȘI BIOLOGICĂ A PROBELOR REZULTATE LA METODELE DE IZOLARE A SAPONINELOR.....	126
7.1. Obiective.....	126
7.2. Materiale și metode	126
7.2.1. Metode de analiză fizico-chimice.....	127

7.2.1.1. Separarea prin fracționare pe coloană cromatografică (CC).....	127
7.2.1.2. Determinarea conținutului total de saponine (CTS).....	128
7.2.1.3. Cromatografia în strat subțire (CSS).....	129
7.2.1.4. Cromatografia de lichide cuplată cu spectrometrie de masă (LC-MS).....	131
7.2.2. Metode de testare biologică <i>in vitro</i>	134
7.3. Rezultate și discuții.....	136
7.3.1. Fracționarea și caracterizarea fizico-chimică a saponinelor isolate.....	136
7.3.2. Evaluarea <i>in vitro</i> a activității biologice a hederageninului izolat (RTI.8.1.).....	154
7.3.2.1. Testarea <i>in vitro</i> a biocompatibilității.....	154
7.3.2.2. Determinarea activității antiproliferative.....	156
7.3.2.3. Evaluarea morfologiei celulare.....	158
7.4. Concluzii.....	162
CAPITOLUL 8. EVALUAREA POTENȚIALULUI FITOCHIMIC ȘI ANTIPROLIFERATIV AL FRACȚIILOR SEPARATE PRIN FLASH CROMATOGRAFIE.....	166
8.1. Obiectivul studiului.....	166
8.2. Materiale și metode.....	166
8.2.1. Obținerea extractului hidroetanolic din frunze de iederă.....	166
8.2.2. Fracționarea prin flash cromatografie a extractului hidroetanolic.....	167
8.2.3. Evaluarea <i>in vitro</i> a extractului de iederă și a fracțiilor sale pentru determinarea citotoxicității și a activității antiproliferative.....	169
8.2.4. Caracterizarea fitochimică a probelor selectate.....	169
8.2.4.1. Determinarea conținutului total de flavonoide.....	169
8.2.4.2. Determinarea conținutului total de polifenoli.....	170
8.2.4.3. Determinarea activității antioxidante ABTS.....	170
8.2.4.4. Determinarea conținutului total de saponine.....	170
8.3. Rezultate și discuții.....	171
8.3.1. Evaluarea biocompatibilității și activității antiproliferative a extractului de iederă și a fracțiilor 8.3.1.1. Evaluarea cantitativă a viabilității și proliferării celulelor normale și tumorale în prezența probelor.....	171
8.3.2. Caracterizarea fizico-chimică a extractului de iederă și a fracțiilor 7 și 8.....	174
8.4. Concluzii.....	176
CAPITOLUL 9. OPTIMIZAREA PRIN MODELARE MATEMATICĂ A UNEI COMPOZIȚII DE SAPONINE TRITERPENICE CU ACIVITATE ANTIPROLIFERATIVĂ.....	178
9.1. Obiectivul studiului.....	178
9.2. Materiale și metode.....	178
9.2.1. Evaluarea <i>in vitro</i> a activității citotoxice și antiproliferative.....	178
9.2.2. Modelarea matematică a amestecurilor folosind RSM cu ajutorul software-ului Design	

Expert111.....	179
9.2.3. Analiza statistică.....	179
9.3. Rezultate și discuții.....	179
9.3.1. Influența saponinelor standard asupra viabilității celulare.....	179
9.3.1.1. Citotoxicitatea saponinelor asupra celulelor NCTC.....	179
9.3.1.2. Activitatea antiproliferativă a saponinelor asupra celulelor Hep-2.....	181
9.3.2. Optimizarea amestecurilor de saponine cu efect antiproliferativ.....	183
9.3.2. 1. Modelarea matematică a amestecurilor de saponine folosind RSM cu ajutorul software-ului Design Expert 11.....	183
9.3.2.2. Influența asupra viabilității celulare a amestecurilor celor trei saponine în variantele generate prin modelare matematică.....	185
9.3.2.3. Analize statistice.....	186
9.4. Concluzii.....	190
CAPITOLUL 10. CONCLUZII GENERALE.....	192
BIBLIOGRAFIE.....	200
DISEMINARE REZULTATE.....	215

INTRODUCERE

Istoria folosirii plantelor de către oameni începe din cele mai vechi timpurii, inițial fiind utilizate ca hrană, însă după descoperirea proprietăților lor tămăduitoare plantele au devenit și o sursă de tratare a rănilor și suferințelor și totodată de îmbunătățire a sănătății în diferite comunități umane. Dovezi ale utilizării terapeutice a plantelor sunt menționate încă din vremea civilizațiilor Sumeriene și Akkadiene în mileniul III înainte de erea noastră. Produsele din plante în perioada antică au făcut parte integrantă din sistemele de medicină tradițională specifice Chinei, Indiei (medicina ayurvedică) și a Egiptului. Papirusurile egiptene conțineau mii de rețete pe bază de plante cu aplicații terapeutice, pentru uz cosmetic sau cu rol de conservare și îmbălsămare. În perioada Greciei Antice învățați precum Hippocrate descriau în tratate medicale teorii deja, ale formării tumorilor și potențiale metode terapeutice ale acestora. Pe teritoriul țării noastre s-au transmis din vechime metode populare de vindecare pe bază de plante, astfel Herodot (secolul V î.e.n.) menționa în scrierile sale că *Leonurus cardiaca* (Talpa găștii) era folosită în tratarea tulburărilor cardiace de oamenii care trăiau la nord de Dunăre.

Mult timp extractele din plante și compușii lor naturali utilizați în medicina tradițională au fost folosite în diverse tratamente pe baze empirice, însă recent în urma cercetărilor științifice efectuate s-a dovedit că acestea conțin principii active capabile să trateze multe boli inclusiv cancerul. În studiile realizate asupra unor compuși naturali specifici din medicina indiană ayurvedică, rezultatele obținute au indicat faptul că mulți dintre respectivi compuși au puternice proprietăți antiinflamatoare și antitumorale.

Turmericul (*Curcuma longa*) a fost în trecut foarte utilizat în medicina ayurvedică pentru beneficiile sale terapeutice, atribuite astăzi prezenței curcuminei, ingredientul activ din turmeric, care are abilitatea de a supresa dezvoltarea tumorilor într-o mare varietate de cancere, fapt confirmat în urma studiilor intense ale acestui compus.

Extractul din Mayapple, *Podophyllum peltatum*, folosit în mod tradițional de nativii americani în combaterea cancerului de piele, a neoplasmelor maligne dar și a altor afecțiuni, are la bază componentul major podofilotoxina care a devenit primul dintr-o serie de agenți antitumoralii eficienți denumiți podofiline.

Camptothecinul identificat în extractele de *Camptotheca acuminata* utilizate în medicina tradițională chineză, s-a descoperit că are activitate antitumorală, iar derivații săi topotecan și irinotecan sunt utilizați frecvent în tratarea cancerelor de ovar și de colon.

Studii premergătoare ale Medicinii Alternative și Complementare au permis tot mai multor compuși naturali cu acțiune terapeutică folosiți în medicina tradițională, să devină o sursă pentru noi medicamente aflate în prim planul medicinei moderne.

Utilizarea plantelor în medicină ca agenți antitumoralii a început cu descoperirea și dezvoltarea alcaloizilor vinca (vinblastine și vincristine, în 1950) și cu izolarea podofilotoxinelor. Alcaloizii vinca au fost responsabili de vindecarea unor forme de leucemie, iar vincristinul inhibă asamblarea de microtubuli, inducând asocierea lor în agregate spiralete.

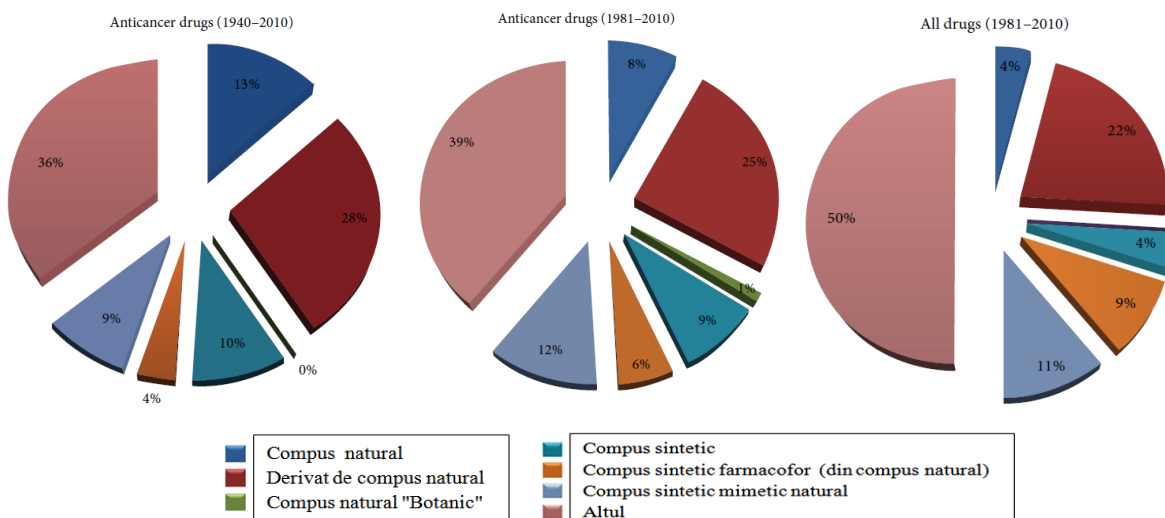


Figura 1. Sursa medicamentelor antitumorale în perioada 1940 – 2010.

Din 1955 la nivel internațional s-a recurs la înregistrarea și verificarea pe scară largă a agenților antitumorali în urma unor protocoale de testare standardizate. Începând din anii 1980, cercetarea asupra efectelor chemoterapeutice ale compușilor naturali a generat multe rezultate promițătoare. Descoperirea activității antitumorale a multora dintre remediile medicale tradiționale de proveniență vegetală a fost susținută și validată prin rezultate ale numeroase studii științifice.

În perioada 1940 - 2010 un număr total de 27 medicamente antitumorale (**Figura 1.**) [1] au fost obținute din surse naturale. Exemple sunt: actinomicin D, paclitaxel și vincristin care sunt în prezent unii dintre cei mai folosiți agenți chemoterapeutici în tratamentul cancerului, în timp ce topotecan, dexametazona, etoposid și chiar tamoxifenul sunt compuși cu acțiune antitumorală similară produșilor naturali. Un alt exemplu cert este resveratrolul, polifenol prezent în struguri, care s-a demonstrat ca are potențial atât ca agent preventiv cât și ca agent antitumoral. În mod similar, piperlongumina, un extract provenit din *Piper longum*, induce selectiv specii reactive de oxigen în celulele canceroase, producând moartea celulară prin apoptoză.

În anii 1980, Bagshawe și alții au dezvoltat o nouă utilizare a compușilor naturali, Terapia cu Enzime Precursorate Direcționate de Anticorpi (ADEPT). Aceasta tehnică folosește anticorpi specifici tumorali legați de o enzimă care determină conversia unui medicament inactiv (pro-medicament) în forma lui toxică activă atunci când ajunge în contact cu tumora. Mulți compuși naturali au fost utilizați cu succes ca pro-medicamente, incluzându-se printre acestea doxorubicin și taxol. Validarea științifică a acestor compuși naturali cu acțiune terapeutică în ceea ce privește eficacitatea, siguranța în utilizarea lor și a mecanismului lor de acțiune le va asigura o poziție importantă în medicina modernă, în mod special în domeniul cercetării și terapiei anticancer.

I. CERCETARE BIBLIOGRAFICĂ

CAPITOLUL 1. FITOCOMPUȘI CU ACTIVITATE ANTITUMORALĂ

Cercetarea în domeniul biologiei celulare a condus în ultimele două decade la o creștere enormă a informațiilor cu privire la evenimentele moleculare care conduc la dezvoltarea cancerului. Interferarea unor căi specifice moleculare prin care celulele canceroase supraviețuiesc oferă avantajul atractiv al unor terapii anticancer specifice fără toxicitatea chimioterapiei asupra țesuturilor normale. Terapiile moleculare țintite ale cancerului sunt medicații sau substanțe care blochează creșterea și diseminarea cancerului interferând molecule specifice implicate în creșterea și progresia cancerului. Deoarece aceste molecule sunt denumite și molecule-țintite, terapiile anticanceroase de acest tip sunt denumite "terapii moleculare țintite" (targeted therapies) deoarece vizează mecanisme celulare mai specifice și mai puțin nocive pentru celula normală.

1.3. Modul de acțiune al compușilor vegetali în terapii ale cancerului

Modul de acțiune al compușilor terapeutici din plante cunoscuți ca având efect antitumoral poate fi determinat prin studii de laborator *in vitro* pe culturi celulare tumorale și respectiv *in vivo* asupra unor modele animale purtătoare de grefe de țesut tumoral, în scopul identificării compușilor naturali care pot ținti căi specifice moleculare ale supraviețuirii celulele tumorale pentru a le distruge în mod selectiv și efectiv. Multe din rezultatele obținute au confirmat faptul ca diferitele manifestări distincte ale compușilor naturali cu acțiune antitumorală asupra celulelor canceroase includ în principal: diviziunea celulară, sistemul imunitar, replicarea necontrolată, invazia și metastaza, angiogeneza, mecanismele de moarte celulară, metabolismul aberant, tumorile relaționate inflamației și stresul oxidativ.

Tabelul 1.1. Activitatea antitumorală a unor fitocompuși din plante folosite inițial în medicina tradițională, utilizați în prezent în terapii antitumorale.

Clasa de compuși	Principiul activ	Planta	Calea de semnalizare afectată	Doza	Tipul de tumoră
Flavonoide	Apigenin (1.2.1.)	Mușețel (<i>Matricaria chamomilla</i>)	HER (<i>proteina ErbB2</i>) - receptorul factorului de creștere epidermal	50 μ M, 48 h	Faringe (FaDU)
			Invazie și metastază	40 μ M, 16 h	Ovar (A2780)
			Moarte celulară	60 μ M, 24 h	Mielom multiplu (U266, RPMI 8226)
	Licochalcone -A (1.2.8.)	Gălbenele (<i>Calendula officinalis</i>)	Invazie și metastază	250 mg/Kg corp	Melanom (BF16/F10)
		Lemn dulce (<i>Glycyrrhiza glabra</i>)	Ciclu celular	25 μ M, 48 h	Prostată (PC3)
			Moarte celulară	20 μ M, 12 h	Sân (MCF-7)

	Resveratrol (1.2.4.)	Viță de vie (<i>Vitis vinifera</i>)	HER (<i>proteina ErbB2</i>) - receptorul factorului de creștere epidermal	50 μM, 4 h sau 10 mM, 24 h	Sân (SKBr, MCF-7)	
			Ciclu celular	300 μM, 24 h	Esofag (HCE7), sân (MCF-7), colon (SW480)	
			HDAC(<i>histondeacetilaza</i>) – enzima implicată în exprimarea genică	10 μM, 96 h	San (MCF-7, MDA-MB231)	
			Invasie si metastază	100 μM, 24 h	Melanom (KM3)	
			Moarte celulară	50 μM, 18 h	Mielom (RPMI 8226), melanom (KM3)	
			Metabolism celular	10 μM, 24 h	Ficat (HepG2)	
	Silimarin (1.2.18.)	Armirariu (<i>Silybum marianum</i>)	Replicare hTERT (<i>Human Telomerase Reverse Transcriptase</i>)	100 μg/ mL, 48 h	Leucemie (K562)	
			Invasie și metastază	27 μM, 48 h	Prostată (LNCaP, DU145)	
			Silibinin (1.2.14.)	Angiogeneză	100 μM, 1 h	Sân (MCF-7)
				Metabolism celular	40 μM, 30 min.	Fibroblaste (3T3-L1), Ovar (CHO)
Lignanoliide	Arctigenin (1.17.)	Brusture (<i>Arctium lappa</i>)	Metabolism celular	10 mM, 30 min. pana la 12 h	Plămân (A549)	
Organo- sulfuri	Alicin (1.2.19.)	Usturoi (<i>Allium sativum</i>)	Ciclu celular	5–10 μM, 8–24 h	Leucemie (U937)	
				50 μM, 6–12 h	Sân(MCF-7)	
	Dialil sulfid (1.2.12.)		Modulator HDAC (<i>histondeacetilaza</i>) – enzima implicată în exprimarea genică	20 μM - 2 mM, 24 h	Colon (HT29)	
			Invasie și metastază	10– 25 μM sau 2–10 mM	Colon (colo205), prostată (PC-3,DU145), ovar (Skov-3)	
			Angiogeneză	10 μg/kg corp	Melanom (BF16/F10)	

			Moarte celulară	10 μM, 24 h	Leucemie (U937)
Qinone Policiclice	Hipericin (1.2.2.)	Sunătoare (<i>Hypericum perforatum</i>)	HER (<i>proteina ErbB2</i>) - receptorul factorului de creștere epidermal	25 nM, 24 h + hv	Sân (SKBR-3, MCF-7)
	Hiperforin (1.2.3.)		Inflamație	50 μg/m L, 1 h	Plămân (A549/8), colon (DLD-1)
			Invazie și metastază	0.5 μM, 6 h	Fibrosarcom (HT-1080)
			Angiogeneză	27 μM, 48 h	Endoteliu (HUVCE)
			Moarte celulară	20 μM, 12 h	Sân (MCF-7), leucemie (Jurkat)
Polifenoli	Carnosol (1.2.5.), acid carnosic (1.6.)	Rosmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Ciclu celular	50 mM, 24–48 h	Colon (Caco-2)
			Invazie și metastază	5–10 μM, 9–12 h	Melanom (B16/F10)
			Angiogeneză	25 μM, 7 h	Endoteliu (HUVCE)
			Moarte celulară	25 μM, 14 h	Leucemie (SEM, RS4/11, MV4/11, HT1080,HL60)
			Inflamație	10 μM, 1 h	Melanom B16/F10
Lactone Sescvi- terpene	Helenalin (1.2.9.)	Arnica (<i>Arnica montana</i>)	Ciclu celular	1 μM, 24 h	Leucemie (Jurkat)
			Replicare hTERT (<i>Human Telomerase Reverse Transcriptase</i>)	1–4 μM, 48 h sau 100 μM, 1 h	Leucemie (HL-60, Jurkat)
			Metabolismul celular	0.125 mg /zi	șoareci purători de tumoră de ascită Ehrlich
			Inflamație	1–2 μM, 24 h sau 10 μM, 1 h	Leucemie (Jurkat), ovar (A2780), colon (RKO), sân(MCF-7)
	Partenolid (1.2.10.)	Spilcuță (<i>Tanacetum parthenium</i>)	Moarte celulară	2 μM, 24 h	Ovar (A2780), colon (RKO), sân(MCF-7)
			Ciclu celular	5– 10 mM, 24 h	Vezică(5637), cervix (HeLa)
			Modulator al HDAC (<i>histondeacetilază</i>)	15 μM, pana la 3 h	Sân(ZR-75–1), colon HCT-116
			Inflamație	30 μM, 1 h	Cervix (HeLa)
Terpenoide	Crocin (1.2.11.)	Șofran (<i>Crocus sativus</i>)	Replicare hTERT (<i>Human Telomerase Reverse Transcriptase</i>)	3 mg/mL	Ficat (HepG2)
			Moarte celulară	3 mg/mL	Stomac (AGS)

În **Tabelul 1.1.** sunt indicate activitățile antitumorale ale unor fitocompuși din plante folosite inițial în medicina tradițională, utilizați în prezent în terapii antitumorale. În **Figura 1.1.** sunt prezentate structurile chimice ale compușilor cu efect antitumoral menționate.

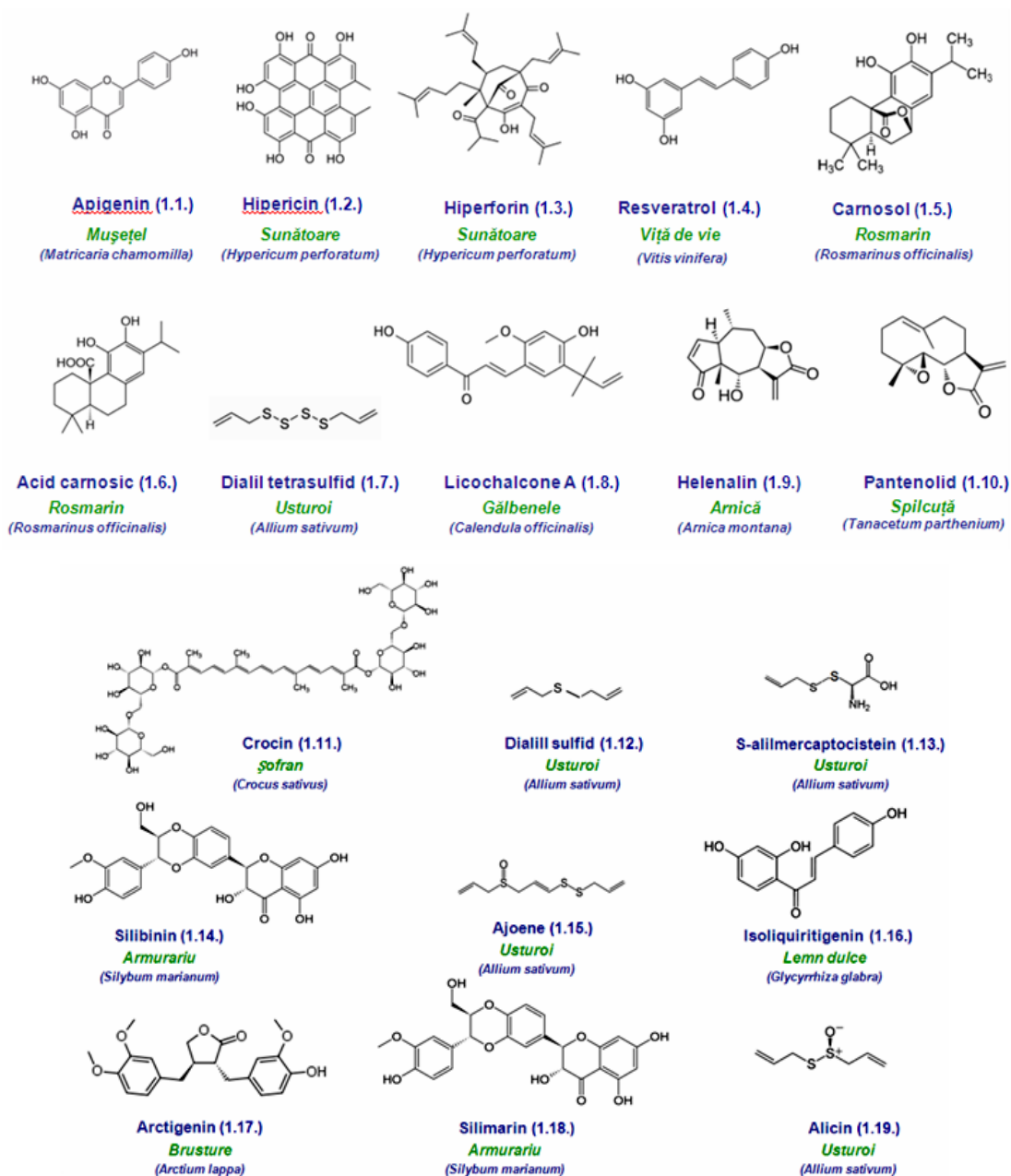


Figura 1.1. Compuși din plante cu acțiune antitumorală folosite inițial în medicina tradițională, utilizați în prezent în terapii antitumorale.

CAPITOLUL 2. *HEDERA HELIX* L. - COMPOZIȚIE ȘI ACTIVITĂȚI FARMACOLOGICE

2.1. Caracteristici generale ale plantei

Planta cu genul *Hedera* este una dintre cele 55 genuri aparținând familiei *Araliaceae* [2]. Până în prezent în cadrul genului *Hedera* au fost recunoscute 12 specii, 3 subspecii și o varietate *Hedera helix* L. [3], cu denumirea comună de iederă. (Figura 2.1.). Iedera este o specie indigenă, plantă de tipul liană agățătoare cu o lungime care poate ajunge până de 20 m, crește agățată cu ajutorul rădăcinilor scurte adventive pe trunchiuri de copaci, garduri sau ziduri de case, iar dacă nu are suport de cățărare planta devine târătoare pe sol. Cu frunzele ei persistente, iedera este sempervirescentă capabilă să vegeteze încontinuu, cu rezistență foarte bună peste iarna când se simte bine la 10-12°C, temperatură care îi asigură o oarecare stare de repaus. Forma frunzelor este de două tipuri, cele de pe ramurile florifere sunt întregi sau ovat rombice de dimensiune 3-8 cm, în timp ce frunzele de pe ramurile sterile au formă palmat lobară de dimensiune 4-10 cm, cu 3-5 lobi ascuțiți sau rotunjiți.

Încrengătura	Spermatophyta
Subîncrengătura	Angiospermae
Clasa	Dicotyledoneae
Subclasa	Asterids
Ordinul	Apiales
Familia	Araliaceae
Genul	<i>Hedera</i>
Specia	<i>Hedera helix</i> L.



Figura 2.1. Încadrarea taxonomică a plantei *Hedera helix* L.

Culoarea frunzelor la suprafață este verde închis cu nervurile radiale de culoare mai deschisă iar suprafața inferioară este de culoare verde spre gri. Florile sunt mici și grupate în inflorescențe dense de 3-5 cm în diametru, de culoare verde-gălbui, bogate în nectar, înfloresc de vara târziu până spre mijlocul toamnei [4]. Fructele au formă de bace globuloase, la maturitate devenind negre-violacee, toxice pentru oameni.

Utilizări ale plantei iederă (*Hedera helix* L.) în medicina tradițională

Primele menționări ale utilizării plantei de iederă în scop terapeutic provin din Grecia antică:

- *pentru uz intern:* frunzele erau macerate în vin și folosite la tratarea intoxicațiilor, în timp ce infuzia din frunze tinere (după uscare) era utilizată la tratarea tusei și pentru expectorație.
- *pentru uz extern:* în tratarea inflamațiilor având efect antibacterian, antimicotic, analgezic, sedativ, antiparazitar, antitumoral, emenagog.

Contraindicații: fructele ingerate produc vomă sau diaree; planta verde poate produce iritații ale pielii și mucoaselor, de aceea nu se administrează persoanelor alergice la constituenții conținuți.



Figura 2.2. Aspecte ale organelor vegetative ale plantei.

2.2. Fitocompuși identificați în planta *Hedera helix* L.

În medicina tradițională europeană planta era utilizată în afecțiuni ale tractului gastro-intestinal și în calculoză. Era de asemenea folosită pentru aplicații externe și ca antalgic pentru nevralgii și reumatism și ca revulsiv pentru ulceratii și arsuri. Are proprietăți expectorante și spasmolitice și este utilizat în boli însoțite de inflamații ale bronhiilor și în astmul bronhial [5, 6-8]. Saponinele sunt compuși bioactivi majoritari care generează aceste efecte terapeutice, dar polifenolii și flavonoidele participă de asemenea.

Planta are proprietăți vasoprotective, derivate din inhibarea elastazei și a hialuronidazei [9]. Aceste enzime degradează elastina și respectiv acidul hialuronic, și sunt implicate în formarea matricei extracelulare perivasculară, în care elastanul și acidul hialuronic împreună cu colagenul sunt principalele componente. S-a determinat că inhibarea elastazei și a hialuronidazei este datorată în principal fragmentărilor saponinelor triterpenice cum ar fi sapogeninele hederagenin și acidul oleanoic. Proprietățile vasoprotective fac planta utilă în tratarea insuficienței venoase.

α -Hederinul s-a dovedit că protejează ficatul de compuși hepatotoxici precum acetaminofenul și tetraclorură de carbon [10]. Mecanismul acestui efect protectiv poate depinde de inhibarea citocromului P450, o enzimă celulară care poate produce stres oxidativ prin metabolizarea compușilor xenobiotici și este parțial responsabil de efectele lor hepatotoxice [11]. Într-un studiu asupra hepatotoxicității cadmiului, s-a determinat că α -hederinul protejează ficatul prin inducerea sintezei de metalotioneine, care pot lega metalele grele, reducând toxicitatea acestora [12].

Alte studii au indicat acțiunea antibiotică împotriva bacteriilor și fungilor [13]. Activități antihelmintice au fost de asemenea detectate [5, 14, 15]. α -Hederin, hederacozid C, hederacolchisid E și hederacolchisid F au prezentat activitate puternic antiinflamatoare în edemul labei, indus la șobolan [8, 16].

Tabelul 2.1. Compuși chimici identificați în frunze de *Hedera helix* L.

Saponine triterpenice (2,5-6%)	Flavonoide	Cumarine	Poliacetilene	Acizi fenolici
- Hederagenin - Acid oleanolic - Baioenin -bidesmozide: - HederacozidC (preponderent) 1,7-4,8% - Hederasaponinele A, B, D, E, F, G, H, I 3-sulfați ai Ac. oleanolic și ai Ac. Echinocistic (<i>acid α-16-OH-oleanic</i>) 3-sulfat de 28-O-β-gentiobiosiloleanat (<i>helicozidă L-8a</i>) -monodesmozide: - α-hederin 0,1-0,3% - Hederagenin 3-O-β-glucozidă	- Quercetin - Campferol - Rutin (<i>quercetin 3-O-rutinozidă</i>) - Isoquercitrin (<i>quercetin 3-O-glucozidă</i>) - Astragalin (<i>campferol 3-O-glucozidă</i>) - Campferol 3-O-rutinozidă	- Scopolin (<i>scopoletin 7-O-glicozidă</i>)	- Falcarinon - Falcarinol 11,12-dehidrofalcarinol	- Ac. cafeic - Ac. clorogenic - Ac. neoclorogenic - Ac.3,5-O-dicafeoil-quinic - Ac. 4,5-O-dicafeoil-quinic - Ac. rosmarinic [(R)-(+)] enantiomer] - Ac. dihidroxibenzoic - Ac. protocatechic - Ac. p-cumaric

Tabelul 2.2. Compuși chimici identificați în fructe de iederă

Saponine triterpenice	Acizi grași	Poliacetilene
- Helixozidă A (3-O-β-glucozil-(1→2)-β-glucozil-28-O-β-glucozil -(1→6)-β-glucozil hederagenin) - Helixozidă B (acid oleanolic 3-O-β-glucozil-(1→2)-glucozil 28- O-β-glucozil-(1→6)-β-glucozil-3-O-β-glucozil hederagenin) - Ac. 3-O-β-glucozil-(1→2)-β-glucozil oleanolic (3-O-β-glucosyl-(1→2)-β-glucosil –hederagenin) - Staunozidă A (3-O-β-glucozil- 28-O-β-glucozil-(1→6)-β-glucozil hederagenin)	- Ac. petroselinic - Ac. oleic - Ac. cis-vaccenic - AC. palmitoleic	- Falcarinon - Falcarinol - Panaxidol ((Z)-9,10-epoxi-1-heptadecen-4,6-diin-3-onă)) - β-lectine

2.3. Saponinele prezente în *Hedera helix* L. și activitatea lor antitumorală

Hedera helix a fost tot mai mult studiată pentru potențialul său antitumoral [5] odată cu datele rezultate în urma unor studii care au indicat că principiile active prezente în iederă au activitate antitumorală împotriva unor tipuri de culturi tumorale. Într-un studiu [6] efectuat de Quetin-Leclercq J., Elias R. și Balansard G. asupra saponinelor triterpenice bidesmozide (hederacozid B, C și D) și monodesmozide (α-, β-, δ-hederin și hederagenin) au fost testate pe 4 tulpini: celule tumorale de sân de șoarece, fibroblaste normale de șoarece 3T3, celule umane normale Flow 2002 și celule tumorale epiteliale umane HeLa. Rezultatele studiului au indicat că saponinele sunt de circa 5 ori mai puțin active comparativ cu compusul de referință stricnospentamina. Cei mai activi compuși au fost α- și β-hederinele, care au fost citotoxice la concentrația mai mare sau egală cu 10 μg/mL. Bidesmozidele hederacoside C, B, D și hederageninul au fost inactiv la concentrații de până la 200 μg/mL.

Un alt studiu [17] menționează rezultatele experimentale obținute *in vitro* cu testarea α-hederin în mediu fără ser, constatându-se efectul toxic al acestuia prin producerea inhibiției proliferării celulelor de melanom de șoarece B16 și a celulelor fibroblaste normale de șoarece 3T3 la concentrații mai mici de 5 μg/mL după doar 8h de tratament. De asemenea α-hederin a indus alterarea membranelor celulare și vacuolizarea citoplasmei cauzând moartea celulară. Citotoxicitatea fitocompusului s-a redus la prezența în mediul de cultură a FCS (Ser Fetal de

Vișel) sau BSA (Albumină Serică Bovină), ceea ce indică faptul că α -hederin ca și alte saponine poate forma legături chimice cu proteinele.

Cercetătorul chinez Lin Cheng și colaboratorii au efectuat un studiu [18] în care a purificat și identificat α -hederin din *Clematis ganpiniana*, plantă cu activitate antitumorală utilizată în medicina tradițională chineză. Ei au determinat caracterul puternic inhibitor al α -hederin asupra creșterii celulelor tumorale de sân prin inducerea apoptozei acestora. Majoritatea terapiei antitumorale abordează inhibarea tumorală prin declanșarea apoptozei celulelor tumorale. Mitocondria joacă un rol important în supraviețuirea celulelor tumorale, de aceea ea este una dintre țintele principale asupra careia acționează medicamentele antitumorale [19].

Pentru evidențierea potențialului de membrană a mitocondriei, s-a utilizat colorația cu JC-1 (colorant carbocianină cationică) care se acumulează în mitocondrie. S-a determinat că α -hederin induce depolarizarea potențialului membranei mitocondriale și determină eliberarea Apaf-1 (factorul-1 de activare al proteazei apoptotice) și a citocromului c (metaloproteina cu rol în transportul oxigenului) din spațiul intermembranar în citoplasmă, favorizând activarea enzimelor caspază-3 și caspază-9 (proteaze ale acidului cistein-aspartic) care induc apoptoza.

Tabelul 2.3. Activitatea antitumorală a saponinelor prezente în *Hedera helix* L. demonstrată în studii anterioare.

Fitocompus	Culturi celulare	Rezultate	Ref.
• Hederacozid B, C și D, α -, β -, δ -hederin și Hederagenin	• 4 tulpini tumorale de sân • celule tumorale de șoarece B16 • fibroblaste de șoarece 3T3, • celule umane normale • celule tumorale umane HeLa	• α - și β -hederinele - citotoxice la conc. $\geq 10 \mu\text{g/mL}$ • bidesmozidele: hederacozid B, C, D și hederageninul sunt inactive la conc. $> 200 \mu\text{g/mL}$ • comparativ cu compusul de referință stricnopenamina saponinele sunt de 5 ori mai puțin citotoxice	[21]
• α -hederin, testare <i>in vitro</i> în mediu fără ser	• celule de melanom de șoarece B16 • celulelor fibroblaste normale de șoarece 3T3	• inhibă proliferarea ambelor tipuri de culturi la conc. $\leq 5 \mu\text{g/mL}$ după 8h prin alterarea membranelor și vacuolizarea citoplasmei • serul fetal în mediul de cultură poate forma legături cu proteinele celulare	[22]
• α -hederin din <i>Clematis ganpiniana</i>	• celule tumorale de sân	• inhibă creșterea celulelor tumorale și produce apoptoza • mecanism propus: α -hederin induce depolarizarea potențialului membranei mitocondriale și determină eliberarea genei Apaf-1 și a proteinei citocrom C cu rol în inițierea apoptozei	[23]
• α -hederin din <i>Clematis ganpiniana</i>	• celule tumorale de sân MCF-7 și MDA-MB-231	• Inducere apoptoza la ambele tipuri celulare	[24]
• Saponine triterpenice	• celule tumorale umane de ficat, gastrice, de esofag și colorectal	• induce apoptoza	[21-26]
• α -hederin din <i>Nigella sativa</i>	• celulele leucemice P388 de șoarece	• induce apoptoza prin perturbații mitocondriale	[27]

Testarea fitocompusului α -hederin (din *Clematis ganpiniana*) pe două culturi celulare umane de cancer de sân, de tipul: MCF-7 și MDA-MB-231 a avut ca rezultat inducerea apoptozei la ambele tipuri de culturi [20]. Acesta este primul raport despre efectele induse de către α -

hederin asupra inhibiției proliferării celulare și a efectelor pro-apoptotice asupra celulelor tumorale de sân și a căilor aferente fenomenului de apoptoză, ceea ce sugerează că α -hederin (din *Clematis ganpiniana*) este un candidat promițător pentru chemoterapia cancerului de sân.

Căile apoptotice mitocondriale au fost raportate ca fiind deseori abordate pentru evidențierea activității saponinelor triterpenice în alte tipuri de cancer uman, incluzând cancerul de ficat [21-23], gastric [24], de esofag [25] și colorectal [26]. S-a raportat că α -hederinul din *Nigella sativa* induce apoptoza prin perturbării mitocondriale în celulele leucemice P388 de șoarece [27].

II. CERCETARE EXPERIMENTALĂ

OBIECTIVE

- ❖ Analiza calitativă a unor extracte apoase, etanolicе și eterice din frunze de *Hedera helix* L. în scopul evidențierii claselor de fitocompuși caracteristici.
- ❖ Obținerea prin diferite metode a extractelor etanolicе din frunze de iederă și evaluarea conținutului total de saponine.
- ❖ Izolarea de saponine din extracte etanolicе din frunze de *Hedera helix*.
- ❖ Fraționarea și caracterizarea fizico-chimică și biologică a saponinelor izolate.
- ❖ Evaluarea potențialului fitochimic și antiproliferativ al fracțiilor de extract din frunze de *Hedera helix* L. separate prin flash cromatografie.
- ❖ Optimizarea prin modelare matematică a unei compoziții de saponine triterpenice cu activitate antiproliferativă.

CAPITOLUL 4. ANALIZA CALITATIVĂ A UNOR EXTRACTE DIN FRUNZE DE *HEDERA HELIX* L.

Materialul vegetal utilizat a fost frunze de *Hedera helix* L. comercializat sub formă de "Ceai de iederă" produs de S.C. HYPERICUM IMPEX S.R.L.. Frunzele uscate și zdrobite au fost supuse extracției în solvenți de tip apă, alcool și dietil-eter. Identificarea claselor de compuși prezenți în extractele de iederă au fost efectuată folosind metode corespunzătoare proprietăților fizico-chimice ale fiecărui grup de principii active [133, 134]. Rezultatele obținute în urma analizei calitative a claselor de compuși din extractele din frunze de *Hedera helix* au fost centralizate în **Tabelul 4.11**.

Tabel 4.11. Centralizator al rezultatelor obținute la analiza calitativă a claselor de compuși în extractele din frunze de *Hedera helix*.

Clase de compuși	Extract apos			Extract alcoolic			Extract eteric	
	Extract apos nehidrolizat A1.	Extract apos hidrolizat A2.		Extract alcoolic nehidrolizat B1.	Extract alcoolic hidrolizat B2.		Extract eteric hidrolizat C2.	
		Extract hidrolizat eteric A2.1.	Soluția apoasă A2.2.		Extract hidrolizat eteric B2.1.	Extract hidrolizat apos B2.2.	Extract hidrolizat eteric C2.1.	Extract hidrolizat apos C2.2.
glucide reducătoare	pozitiv	-	-	-	-	-	-	-
polioze (<i>reacția Molish</i>)	pozitiv	-	-	pozitiv	pozitiv	pozitiv	-	-
saponine	pozitiv	-	-	-	-	-	-	-
taninuri catechice	pozitiv	-	-	-	-	-	-	-
proantocianidine	pozitiv	-	-	-	-	-	-	-
alcaloizi (<i>reacția Hager</i>)	pozitiv	-	-	-	-	pozitiv	-	negativ
alcaloizi (<i>reacția Wagner</i>)	pozitiv	-	-	-	-	pozitiv	-	negativ
antracenozide (<i>reacția Borntrage</i>)	-	negativ	-	negativ	negativ	negativ	negativ	-
cumarine	-	pozitiv	-	pozitiv	pozitiv	pozitiv	negativ	-
flavonoide (<i>reacția Shibata</i>)	-	pozitiv	-	-	-	-	negativ	-
lactonă hexaatomică a cumarinelor	-	negativ	-	-	-	-	-	-
aminoacizi	-	-	negativ	-	-	-	-	-
antocianozide	-	-	negativ	-	-	-	-	-
poliuronide	pozitiv	negativ	-	pozitiv	-	negativ	-	-
compuși reducători (<i>reacții Fehling I și II</i>)	-	-	-	pozitiv	pozitiv	pozitiv	-	-
glicozide sterolice	-	-	-	pozitiv	pozitiv	pozitiv	-	-
Proantocianidoli	-	-	-	pozitiv	-	-	-	-
steroli și triterpene (<i>reacția Lieberman Burchard</i>)	-	-	-	-	-	-	-	pozitiv
flavonoli	-	-	-	pozitiv	pozitiv	-	-	-
flavone	-	-	-	-	-	pozitiv	-	-
carotenoide	-	-	-	-	-	-	-	pozitiv

CAPITOLUL 5. OBȚINEREA EXTRACTELOR DIN FRUNZE DE IEDERĂ ȘI EVALUAREA CONȚINUTULUI TOTAL DE SAPONINE

5.1. Obiectivul studiului

În studiul nostru, în scopul evaluării conținutului total de saponine prezent în extracte de iederă, am obținut extracte etanolice din frunze de *Hedera* utilizând patru metode de extracție: refluxare, ultrasonicare, macerare și extracție continuă Soxhlet. Evaluarea conținutului total de saponine (CTS) sa fost efectuată conform metodei Hiai [28] adaptată (Sigma, de puritate $\geq 98\%$).

Tabelul 5.1. Date analitice ale metodelor de extracție aplicate frunzelor proaspete de iederă

Metoda	Masă vegetală (g)	Vol. solvent (mL)	Temp. °C	Agitare	Timp
Refluxare	10	50	60	da	3h
UAE	10	50	23	da	1h
Macerare	10	50	23	da	11 zile
Soxhlet	10	100	60	-	6h

5.1. Obținerea extractelor etanolice din frunze de iederă

În **Figura 5.1.** sunt prezentate instalațiile de obținere a extractelor din frunze de iederă: a) refluxare, b) ultrasonicare, c) macerare și d) extracție Soxhlet.



Figura 5.1. Instalațiile de obținere a extractelor din frunze de iederă: a) refluxare, b) ultrasonicare, c) macerare și d) extracție Soxhlet.

5.3.1. Rezultatele obținute la extracția principiilor active din frunze de iederă prin cele patru metode de extracție sunt indicate în **Tabelul 5.3.**

Tabelul 5.3. Rezultatele obținute la extracția principiilor active din frunze de iederă prin cele patru metode de extracție.

Proba	Reziduu vegetal (g)	V _f extract (mL)	Culoare extract	Cod probă extract
Extract etanolic de la refluxare	6,98	36	verde închis	RTI.4.
Extract etanolic de la US	6,64	38	verde	RTI.5.
Extract etanolic de la macerare	4,63	36,5	verde	RTI.6.
Extract etanolic de la extracția Soxhlet	4,64	80,5	verde închis	RTI.7.

Determinarea conținutului total de saponine (CTS)

Metoda utilizează un sistem cromogenic de reactivi format din vanilină și acid percloric. Saponinele sunt supuse procesului de oxidare în mediu puternic acid, urmat de dehidrogenare și apoi de adăugarea vanilinei, rezultând un compus de culoare violet, a cărui absorbanță este măsurată spectrofotometric.

Saponina standard a fost ginsenosid Rb1(Sigma, de puritate $\geq 98\%$), cu un maxim de absorbție în domeniul vizibil la lungimea de undă $\lambda_{\max} = 550 \text{ nm}$.

Ecuția curbei de calibrare a fost: $y = 0,0102 x - 0,0191$, cu coeficientul de corelare: 0,999.

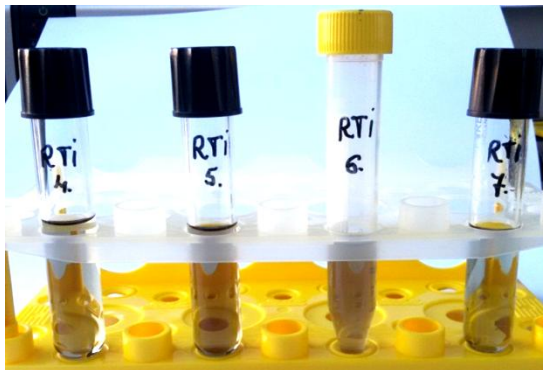


Figura 5.2. Aspectul probelor de extract obținute prin cele patru metode de extracție, în urma reacției cu reactivul cromogenic la determinarea TSC.

Tabelul 5.5. Rezultatele obținute la determinarea conținutului total de saponine în probele testate.

Proba	Cod proba	CTS ($\mu\text{g sapon.}/\text{mg s.u.}$)	CTS (%)
Extract etanolic uscat refluxare	RTI.4.	30,07	3,01
Extract etanolic uscat. de la U.S.	RTI.5.	41,86	4,19
Extract etanolic uscat de la macerare	RTI.6.	33,18	3,32
Extract etanolic uscat de la extracția Soxhlet	RTI.7.	38,26	3,83

În **Figura 5.2.** este redat aspectul probelor de extract obținute prin cele patru metode de extracție, în urma reacției cu reactivul cromogenic la determinarea TSC, iar în **Tabelul 5.5.** sunt centralizate rezultatele obținute la determinarea conținutului total de saponine din probele testate.

5.3.3. Corelații între condițiile specifice ale celor patru metode de extracție și conținutul de saponine prezent în extractele obținute

Rezultatele determinării conținutului total de saponine (**Tabelul 5.5.**) prin metoda UAE au indicat conform așteptărilor o valoare maximă de 4,19 % la proba de extract obținut. Deși masa de extract uscat rezultată la UAE a fost de doar 0,344 g din 10 g materie vegetală inițială, eficiența UAE a fost maximă. Rezultatele determinării conținutului total de saponine ale probelor de extract rezultate la celelalte trei metode de obținere, convenționale: refluxare, macerare și extracție continuă Soxhlet au înregistrat următoarele valori: 3,01 %, 3,32 % și respectiv 3,83 %. Conținutul total de saponie al extractului obținut prin metoda Soxhlet, a fost 3,83 %,

reprezentând valoarea maximă înregistrată la metodele convenționale testate. Valoarea aceasta a fost apropiată de cea 4,19 % și confirmă faptul că metoda de extracție Soxhlet este reprezentativă pentru categoria metodelor convenționale și apropiată ca eficiență de metodele de extracție neconvenționale, în acest caz metoda UAE. Pe de altă parte, deși durata de extracție a fost cea mai îndelungată, de 11 zile, extractul obținut prin macerare a avut un conținut mediu de saponine (3,32%) acest lucru putându-se explica prin faptul că operațiunea a decurs la temperatura camerei, iar eficiența metodei este mult redusă față de UAE sau chiar cea realizată prin refluxare Soxhlet.

CAPITOLUL 6. IZOLAREA SAPONINELOR DIN EXTRACTE DIN FRUNZE DE *HEDERA HELIX* L.

6.1. Obiectivul studiului

Scopul studiului a fost izolarea saponinelor din extracte etanolice din frunze de *Hedera helix*., pentru aceasta, au fost aplicate trei metode de izolare:

- Izolarea saponinelor din extract etanolic obținut din frunze proaspete de *Hedera helix* L. (Metoda I-a);
- Obținerea hederageninului din extract etanolic rezultat prin macerare repetată din frunze uscate de iederă (Metoda a II-a);
- Izolarea hederageninului din extract etanolic obținut prin refluxare din frunze uscate de iederă (Metoda a III-a).

Materialul vegetal: frunze proaspete de *H. helix* L. obținute de la " Hofigal S.A. ". Planta a fost autenticată și un specimen voucher (nr. 407754) a fost depus la Grădina Botanică din București, România.

6.2.1. Izolarea saponinelor din extract etanolic obținut din frunze proaspete de *Hedera helix* L. (Metoda I-a)

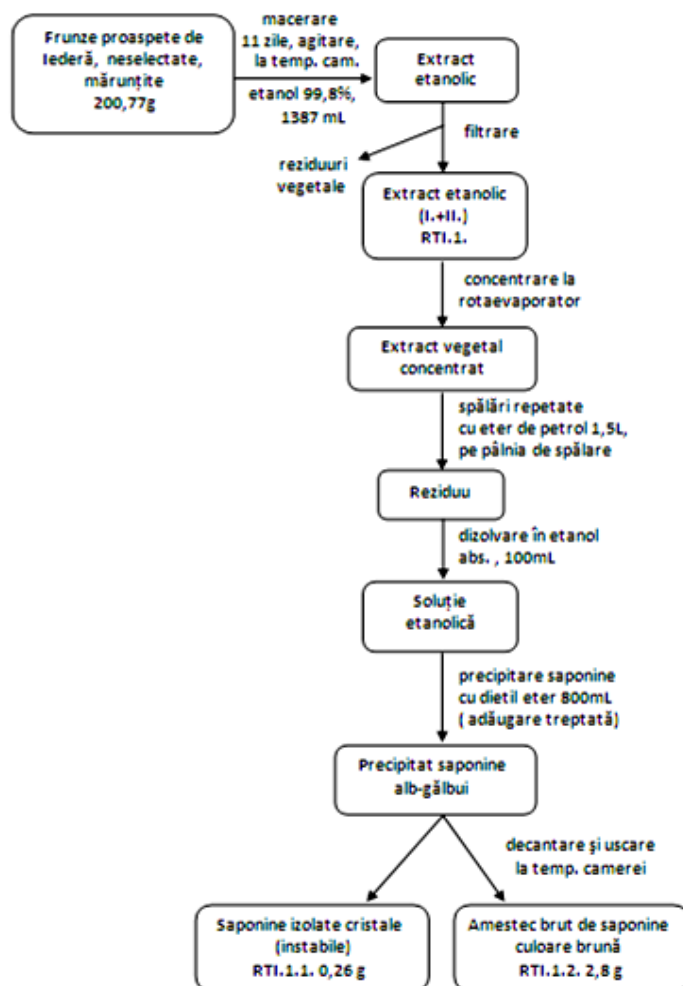
În vederea izolării saponinelor triterpenice din extractele de frunze de *Hedera helix* L. am ales metoda de extracție prin macerare, folosind două tipuri de material vegetal: frunze proaspete de iederă cu forme variate; frunze proaspete de iederă selectată de formă palmară.

În **Tabelul 6.1.** sunt centralizate datele experimentale și rezultatele caracteristice extractelor obținute prin macerarea în etanol absolut a frunzelor de *Hedera helix* L.

Tabelul 6.1. Condiții experimentale de la macerarea frunzelor de *Hedera helix* L. în etanol, în scopul izolării saponinelor (Metoda I-a).

Extracția	Masă vegetală proaspătă	Cantitate (g)	Vol. solvent (mL)	Temp. °C	Agitare	Timp (zile)
Macerare 1.	Frunze iederă I.	100,22	692	23	da	11
	Frunze iederă II.	100,55	695	23	da	11
Macerare 2.	Frunze iederă selectată	100,63	690	23	da	8

Pentru izolarea hederageninului s-au utilizat volumele de extracte obținute, conform etapelor menționate în **Schema 6.1.**:



Schema 6.1. Procedul de extracție și izolare a saponinelor brute din frunzele de iedera (Metoda I-a), [29].

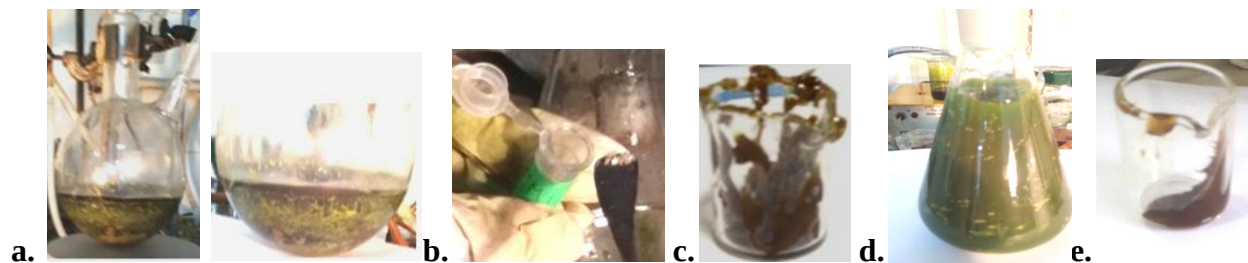


Figura 6.1. a) Precipitarea saponinelor din extractul din frunze neselectate de iedera RTI.1.; b) saponine izolate cristale RTI.1.1; c) amestecul brut de saponine izolate RTI.1.2.; d) precipitarea saponinelor din extract din frunze de iedera selectate RTI.2.; e) amestecul brut de saponine izolate RTI.2.1.

Datele rezultate în urma izolării saponinelor, sunt centralizate în **Tabelul 6.2.**

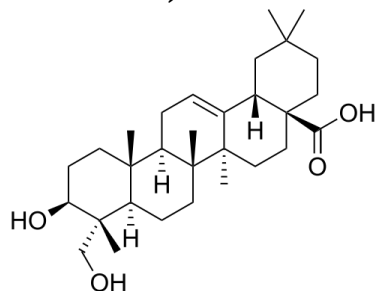
Tabelul 6.2. Rezultatele obținute la metoda de izolare a saponinelor din frunze de formă variată și selectată, de iederă proaspătă (Metoda I-a)

Extracție	a) Extracte frunze iederă formă variată I. și II.				b) Extract frunze iederă selectată (formă palmară)	
	Macerare I.		Macerare II.		Macerare	
	V _{solv.} 692 mL	M _{frunze} 100,22 g	V _{solv.} 695 mL	M _{frunze} 100,55 g	V _{solv.} 100,63 mL	M _{frunze} 100,63 g
	V _{extr.I} 595 mL		V _{extr.II} 579,5 mL		V _{extr.} 570 mL RTI.2.	
	V _{extr.I+II} = 1174,5 mL RTI.1.					
	(s.u.= 0,12g/mL) M _{extract uscat. I+II} RTI.1. 140,94 g				(s.u.= 0,126g/mL) M _{extr. us.} RTI.2. 71,9 g	
Izolare saponine	M _{crist. sapon. izol.} RTI.1.1. 0,26 g		M _{sapon. brute izol.} RTI.1.2. 6,475 g		M _{sapon. izol.} RTI.2.1. 2,8 g	
Masă totala saponine brute izolate	6,735 g				2,8 g	
% saponine brute izolate	4,78 %				3,89 %	

Proba RTI.1.2. reprezentând amestecul brut de saponine izolate din extract de iederă (I+II), a fost fracționat prin cromatografie pe coloană (CC). Frațiile selectate împreună cu probele RTI.1., RTI.1.1., RTI.1.2., RTI.2.1. au fost testate prin cromatografie în strat subțire (CSS) și analizate prin cromatografia de lichide cuplată cu spectrometrie de masă (LC-MS) și a fost determinat conținutul lor total de saponine (CTS).

Izolarea hederageninului din extracte din frunze de *Hedera helix* L.

6.2.2. Izolarea hederageninului din extract etanolic obținut prin macerare repetată din frunze uscate de iederă (Metoda a II-a)



Hederagenin

[acid(3β)-3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oic]

Pentru izolarea hederageninului s-au utilizat volumele de extracte obținute conform etapelor:

a. Concentrarea extractului etanolic RTI.8. la presiune redusă s-a efectuat cu ajutorul unui rotaevaporator la temperatura de 60° C până la obținerea unui extract vegetal concentrat în greutate de 19,30 g, de culoare verde închis (**Figura 6.6.a**).

b. Hidroliza acidă a extractului concentrat pentru îndepărtarea părții glucidice, prin adăugarea unei soluții etanolice de acid sulfuric 5% v/v (2,7 mL acid sulfuric în 114,8 mL etanol) și refluxare timp de 3h, rezultând Amestecul 1. de pH acid.

c. Neutralizarea la pH 6-7 a Amestecului 1. prin adăugarea de hidroxid de potasiu în etanol (5% v/v). rezultând Amestecul 2.

d. Tratarea cu cărbune activ (7g), a Amestecului 2. și refluxarea timp de 30 min., a condus la obținerea Amestecului 3.

e. Filtrarea prin strat filtrant Celite a Amestecului 3. A condus la obținerea Filtratului 1.

f. Concentrarea la presiune redusă a Filtratului 1., până la aproximativ 10% din volumul inițial, constituind un Reziduu. La reziduul obținut s-au adăugat 100 mL de apă distilată fierbinte. Soluțiereziduală obținută a fost evaporată la presiune redusă.

g. Tratarea cu acetonitril a Reziduului de culoare brun pentru îndepărtarea impurităților.

6.2.3. Izolare a hederageninului din extract etanolic obținut prin refluxare din frunze uscate de iederă (Metoda a III-a)

Pentru izolarea hederageninului s-au utilizat volumele de extract obținute conform etapelor:

a. Concentrarea extractului etanolic RTI.9. la presiune redusă s-a efectuat cu ajutorul unui rotaevaporator la temperatura de 60° C până la obținerea unui extract vegetal concentrat de culoare verde închis, cântărind 32,86 g notat RTI.9.

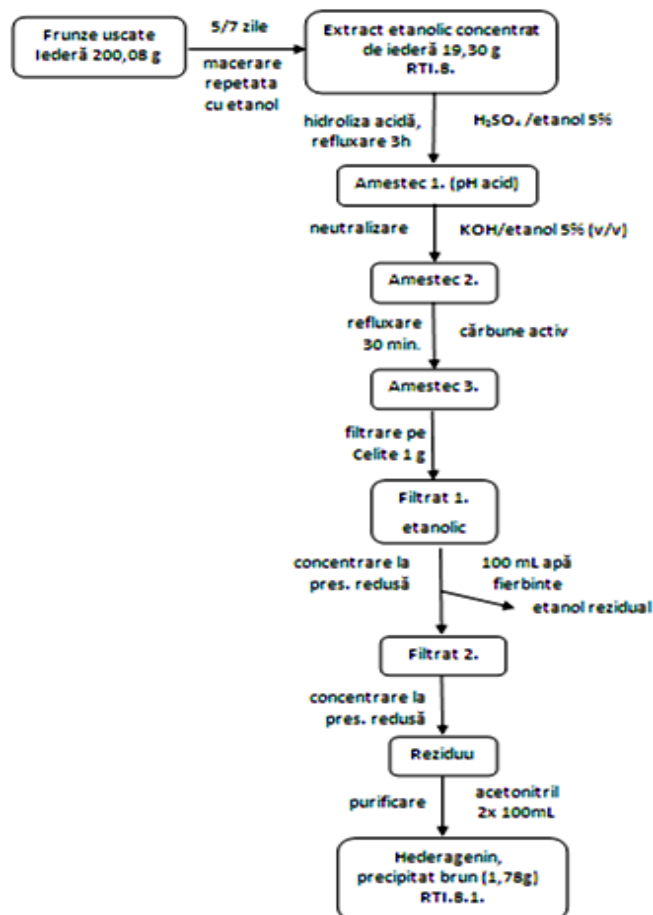
b. Hidroliza acidă a extractului concentrat RTI.9., pentru îndepărtarea părții glucidice, folosind o soluție de acid sulfuric/etanol 5% (5,4 mL acid sulfuric/230 mL etanol) și refluxare timp de 3h, rezultând o soluție verde închis cu un pp. alb, de pH acid.

c. Filtrarea soluției de la hidroliza acidă, cu obținerea unui precipitat RTI.9.1. de culoare brună, cântărind 4,11 g.

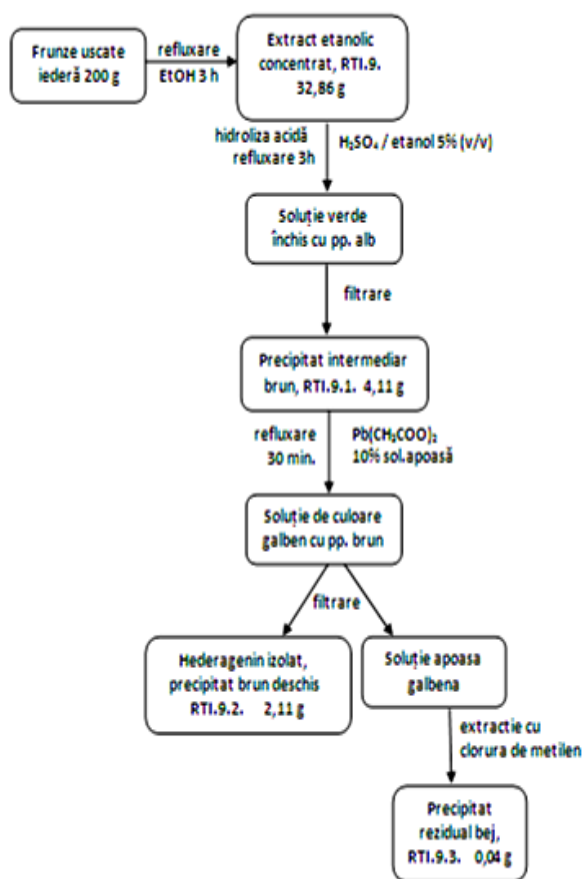
d. Tratarea precipitatului RTI.9.1. cu soluție apoasă de acetat de plumb 10% (3g acetat de plumb în 27 mL apă) și refluxare timp de 30 minute, cu formarea unei soluții galbene cu precipitat brun.

e. Filtrarea soluției pentru separarea precipitatului hederagenin brut izolat notat RTI.9.2., de culoare brun reprezentând cu masa de 2,11 g, și un filtrat de culoare galben.

Datele centralizate în urma izolării hederageninului prin cele doua metode sunt prezentate în **Tabelul 6.6..**



Schema 2. Izolarea hederageninului din extract etanolic obținut prin macerare repetată din frunze uscate de iedera (Metoda a II-a) [30].



Schema 3. Izolarea hederageninului din extractul alcoolic obținut prin refluxare din frunze uscate de iedera (Metoda a III-a).

Tabelul 6.6. Rezultatele obținute la izolarea hederageninului din frunze uscate de iedera (Metodele a II –a și a III-a).

Extracție	Izolare hederagenin (Metoda a II-a)		Izolare hederagenin (Metoda a III-a)	
	Macerare repetata		Refluxare	
	$V_{\text{solv.}}$ $V_{\text{I+II}} = 2911 \text{ mL}$	M_{frunze} 200,08 g	$V_{\text{solv.}}$ 2110 mL	M_{frunze} 200 g
Izolare	$M_{\text{extr. uscat}}$ RTI.8. 19,30 g		$M_{\text{extr. uscat}}$ RTI.9. 32,86 g	
% saponine brute izolate	9,22 %		6,42 %	

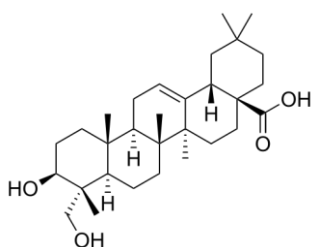
CAPITOLUL 7. CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ ȘI BIOLOGICĂ A PROBELOR REZULTATE LA METODELE DE IZOLARE A SAPONINELOR

7.1. Obiective

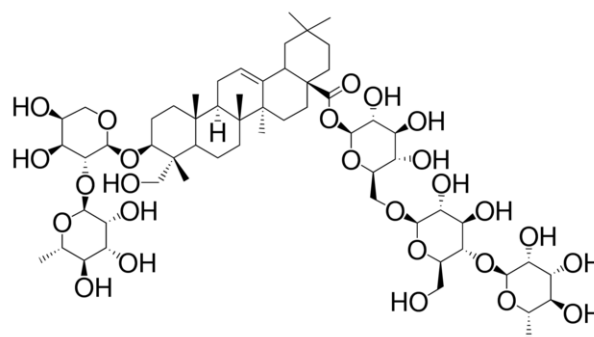
Scopul studiului a fost fracționarea și caracterizarea fizico-chimică a probelor rezultate la metodele de izolare a saponinelor, urmată de caracterizarea biologică *in vitro* a hederageninului izolat din extractul etanolic din frunze de iederă.

7.2. Materiale si metode

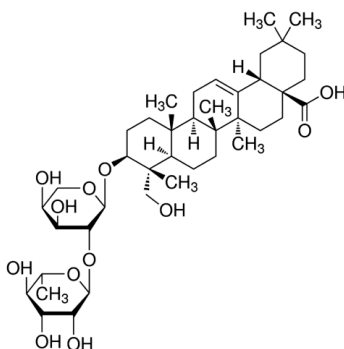
Saponinele standard utilizate la analizele CSS, LC-MS și pentru determinarea activității biologice au fost α -Hederin, Hederagenin, Hederacozid C și Dioscin de puritate $\geq 98\%$, producator Sigma-Aldrich.



Hederagenin (saponină)
acid(3 β)-3,23-dihidroxiolean-12-en-28-oic
 $C_{30}H_{48}O_4$, $M = 472,1\text{g/mol}$



Hederacozid C (saponină bidesmoidă)
[(2S,3R,4S,5S,6R)-6-[[[(3R,4R,5S,6R)-3,4-dihidroxi-6-(hidroximetil)-5-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il]oxioxan-2-il] oximetil]-3,4,5-trihidroxi-oxan-2-il]
 $C_{59}H_{96}O_{26}$, $M = 1221,38\text{ g/mol}$



α -Hederin (saponină monodesmoidă)
acid (3 β ,4 α)-3-[[2-O-(6-deoxi- α -L- 2,6a,6b,9,9,12a- -mannopiranosil)- α -L- arabinopiranosil]oxi]-23-hidroxi-olean-12-en-28-oic
 $C_{41}H_{67}O_{12}$, $M = 751,4\text{ g/mol}$

Culturile celulare utilizate la testarea citotoxicității *in vitro* au fost: cultura celulară normală fibroblaste dermale de șoarece de tip NCTC (clone 929), și cultura de celule tumorale epiteliale de cervix uman Hep-2 furnizate de ECACC, Sigma-Aldrich.

Etape:

- ❖ Fraționarea probelor rezultate la metodele de izolare a saponinelor
- ❖ Caracterizarea fizico-chimică a probelor
- ❖ Caracterizarea biologică *in vitro* a hederageninului izolat din extractul etanolic din frunze de iederă

Metodele de analiză aplicate au fost următoarele:

- Fraționarea prin cromatografie pe coloană (CC)
- Determinarea conținutului total de saponine (CTS)
- Analiza prin cromatografia în strat subțire (CSS)
- Analiza prin cromatografia de lichide cuplată cu spectrometrie de masă (LC-MS)
- Evaluarea *in vitro* a activității biologice a hederageninului izolat.

7.2.1. Metode de analiză fizico-chimice

7.2.1.1. Separarea prin fracționarea pe coloană cromatografică (CC)

Probele selectate pentru fracționarea pe coloană cromatografică au fost: **amestecul brut de saponine izolate (RTI.1.2.)** din extract de iederă (I+II) de la Metoda I-a și **hederageninul brut izolat (RTI.8.1)** de la Metoda a II –a.

Fracționarea s-a realizat utilizând o coloană de separare din sticlă (20 cm x 1,5 cm) umplută cu o suspensie de granule silicagel cu diametrul particulelor de 0,6-0,8 mm în etanol și un sistem de eluare constituit din n-butanol: acid acetic glacial: apă = 4:1:5 (v/v).

Proba solubilizată în etanol a fost trecută pe coloană, cu reținerea compușilor pe faza staționară, urmată de trecerea prin coloană a sistemului de eluare și colectarea fracțiilor cu volume de aproximativ 1 mL fiecare.

Fracții colectate au fost:

- din proba amestec brut de saponine izolate RTI.1.2. → 9 fracții notate A1 – A9.
- din proba hederagenin brut izolat RTI.8.1. → 13 fracții notate B1 - B13.

7.2.1.2. Determinarea conținutului total de saponine (CTS)

Saponina standard utilizată ca referință a fost ginsenosid Rb1 (Sigma Aldrich), cu maximum de absorbție în domeniul vizibil la lungimea de undă $\lambda_{\max} = 550$ nm. Ecuația curbei de calibrare a fost: $y = 0.0102 x - 0,0191$, cu coeficientul de corelare: 0,999.

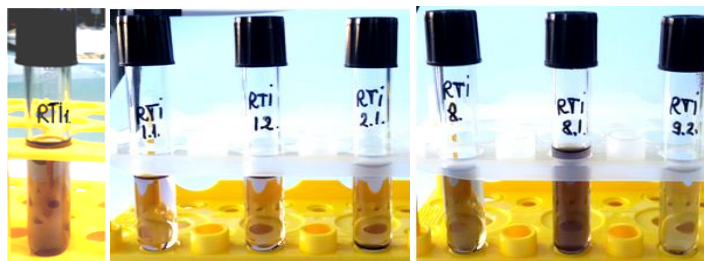


Figura 7.3. Aspectul probelor analizate, în urma reacției cu reactivul cromogenic la determinarea conținutului total de saponine.

Tabelul 7.3. Rezultatele obținute la determinarea CTS în probele testate.

Proba	Cod proba	Media CTS ($\mu\text{g sapon.}/\text{mg s.u.}$)	Media CTS (%)
Extract etanolic uscat de la macerare (Metoda I-a)	RTI.1.	33,25	3,32
Amestec saponine cristale izolate	RTI.1.1.	21,20	2,12
Amestec brut saponine izolate frunze formă variată	RTI.1.2.	25,64	2,56
Amestec brut saponine izolate din frunze formă palmară (selectate)	RTI.2.1.	27,77	2,78
Extract etanolic uscat de la macerare repetată (Metoda a II-a)	RTI.8.	32,67	3,27
Hederagenin izolat (Metoda a II-a)	RTI.8.1.	60,32	6,03
Extract etanolic uscat de la refluxare (Metoda a III-a)	RTI.9.	20,75	2,07
Hederagenin izolat (Metoda a III-a)	RTI.9.2.	23,10	2,31

În **Figura 7.3.** este redat aspectul soluțiilor probelor analizate, rezultat în urma reacției cu reactivul cromogenic pentru determinarea conținutului total de saponine.

În **Tabelul 7.3.** sunt centralizate rezultatele obținute la determinarea conținutului total de saponine în probele testate.

7.2.1.3. Cromatografia în strat subțire (CSS)

Probele analizate prin metoda cromatografiei în strat subțire au fost următoarele:

- amestecul brut de saponine izolate RTI.1.2. din extract de iederă (I+II), (Metoda I-a);
- fracțiile A2., A7., A8. și A9. ale amestecului brut de saponine izolate RTI.1.2. (Metoda I-a);
- fracțiile B2. și B6. din hederageninul brut izolat RTI.8.1. (de la Metoda a II-a);
- precipitatul intermediar RTI.9.1. format la hidroliza de la procedeul de izolare a hederageninului (Metoda a III-a);
- hederageninul hederageninul brut izolat RTI.8.1. (Metoda a II-a);
- brut izolat (RTI.9.2.) (de la Metoda a III-a).

Tabelul 7.2. Rezultatele obținute ale probelor analizate prin cromatografia în strat subțire (CSS)

Metoda	Probele testate	R_f Hederagenin	R_f α -Hederin	R_f Hederacozid C
		0,67	0,46	0,72
Izolare saponine Metoda I-a	RTI.1.2. amestec brut de saponine izolate	+	+	+
	A2 (RTI.1.2.)	+	-	-
	A7 (RTI.1.2.)	+	-	+
	A8 (RTI.1.2.)	+	+	+
	A9 (RTI.1.2.)	-	+	+
Izolare hederagenin Metoda a II-a	RTI.8.1. hederagenin brut izolat	+	+	-
	B2 (RTI.8.1.)	+	-	-
	B6 (RTI.8.1.)	+	-	-
Izolare hederagenin Metoda a III-a	RTI.9.1. precip. intermediar	+	-	+
	RTI.9.2. hederagenin brut izolat	+	-	+

În **Tabelul 7.2.** sunt centralizate rezultatele obținute la analiza prin cromatografia în strat subțire (CSS) a probelor testate.

Pe baza rezultatelor analizei CSS se poate observa, că cele trei saponine de interes au fost confirmate în probele testate, astfel:

- Hederageninul agliconul saponinelor de referință, a fost regăsit în toate probelor testate provenite de la cele trei metode de izolare a saponinelor, atât în izolatele brute cât și fracții ale acestora.
- α -Hederinul, care în frunzele de iederă se găsește în cantități reduse, a fost confirmat în amestecul brut de saponine izolat RTI.1.2., în fracțiile sale A7 și A9 și în hederageninul brut izolat RTI.8.1. (Metoda a II-a).
- Hederacozidul C, saponina cu cel mai mare conținut în frunzele plantei de iederă, este o bidesmozidă cu structură chimică ramificată și o masă moleculară mare, fapt care poate genera fragmentarea moleculei. Rezultatele analizei CSS au confirmat prezența hederacozidului C în amestecul brut de saponine izolate RTI.1.2. alături de hederagenin, și respectiv în fracțiile A7, A8 și A9. De asemenea hederacozidului C s-a regăsit în fracția B6 a hederageninului izolat RTI.8.1. (Metoda a II-a) și în precipitatul intermediar de la izolarea hederageninului RTI.9.1. (Metoda a III-a).

7. 2.1.4. Cromatografia de lichide cuplată cu spectrometrie de masă (LC-MS)

Analiza LC-MS s-a realizat cu ajutorul unui Sistem LC-MS/MS: Aparat HPLC Agilent de tip API 3200 (Sciex) cuplat cu o pompă binară Infiniti 1260 (Agilent) și un autosampler, software-ul de analiză versiunea 1.5.2, coloană: Phenomenex Luna pentafluoropropionil (PFP 2) (100 x 2 mm, 3 μ m, 100Å).

Faza mobilă a fost constituită din: A) apă cu acid formic 0,1% și B) acetonitril cu acid formic 0,1% cu debitul de 0,275 mL / min, iar volumul de injectare a fost de 15 μ L.

Soluții de referință: α -Hederin, Hederagenin și Hederacozid C (Sigma-Aldrich) de puritate $\geq 98\%$ și probele au fost dizolvate în MeOH la conc. 1mg / mL și ulterior diluate la 5 μ g/mL în metanol /apă (1:1, v/v) și analizate LC-MS.

Interfața ESI a spectrometrului de masă a fost operată în modul de ionizare negativă, iar achizițiile de date s-au efectuat în scanarea completă Q1 pe gama masă / sarcină cuprinsă între 250 și 1500 Da.

➤ **Rezultate obținute la cromatografia de lichide cuplată cu spectrometrie de masă (LC-MS)**

Probele selectate pentru a fi analizate prin metoda LC-MS au fost următoarele:

- extractul de iederă RTI.1. obținut prin macerare din frunze proaspete de iederă (din care a fost izolat amestecul brut de saponine la Metoda I-a);
- proba cristale de saponine izolate (instabile) RTI.1.1. (Metoda I-a);
- amestecul brut de saponine izolate RTI.1.2. (Metoda I-a);
- fracțiile A2., A7., A8. și A9. ale amestecului brut de saponine izolate RTI.1.2. (Metoda I-a);
- extractul de iederă RTI.8. obținut prin macerare repetată din frunze uscate de iederă din care a fost izolat hederagenin (Metoda II-a);
- hederageninul brut izolat RTI.8.1. (Metoda a II-a);
- fracțiile B2., B6. și B11. din hederageninul brut izolat RTI.8.1. (Metoda a II-a);
- extractul de iederă RTI.9. obținut prin hidrodistilare din frunze uscate de iederă din care a fost izolat hederagenin (Metoda III-a);
- precipitatul intermediar RTI.9.1. (Metoda a III-a);
- hederageninul brut izolat RTI.9.2. (Metoda a III-a).

7.3.1. Identificarea Hederacozidului C

Compusul Hederacozid C a fost cuantificat cu ajutorul analizei LC-MS, conform cromatogramelor rezultate, în probele: extractul etanolic de iederă RTI.1., în amestecul brut de saponine izolate RTI.1.2., în fracția A8. din RTI.1.2. și în fracția A9. din RTI.1.2.. (**Figura 7.4. , Tabelul 7.3.**).

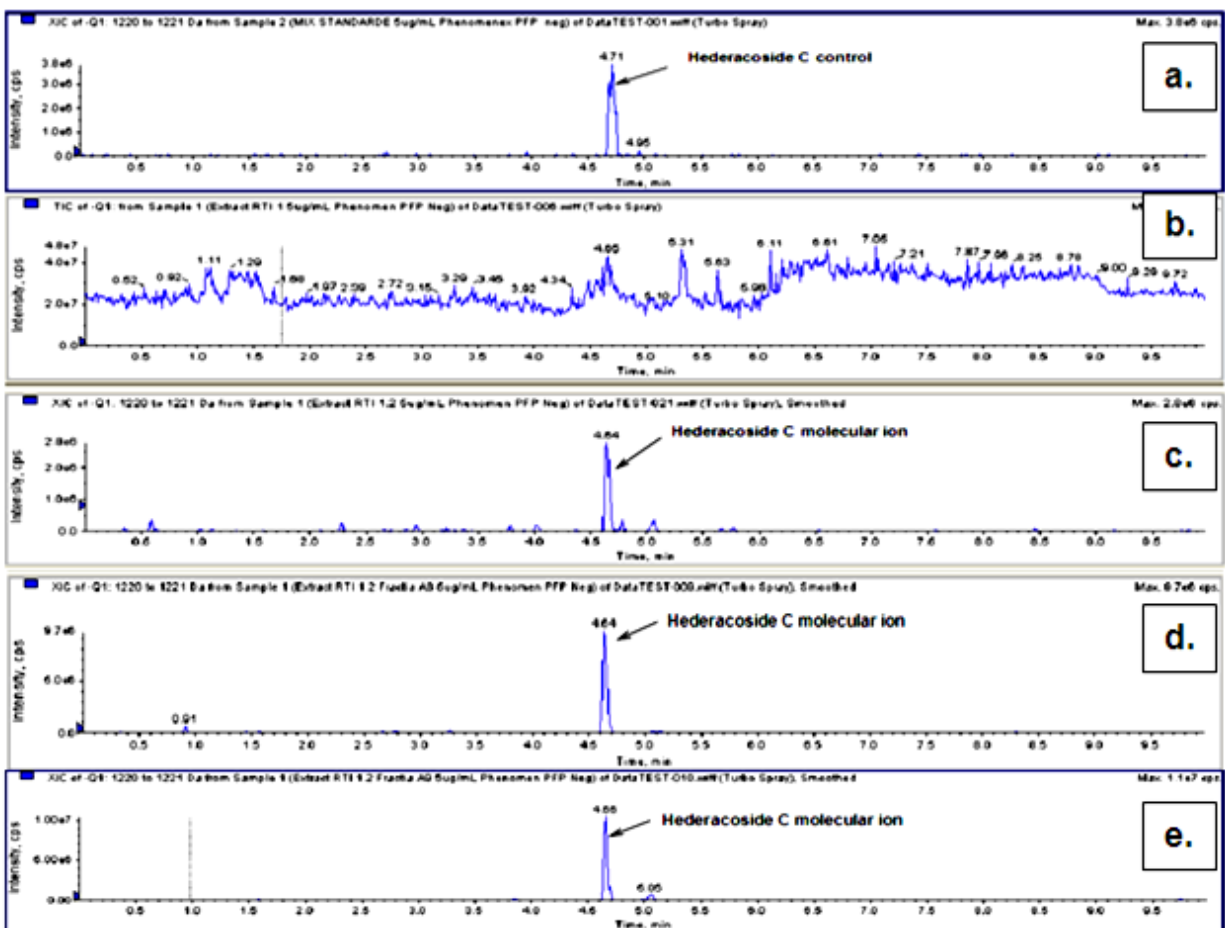


Figura 7.4. Cromatogramele LS-MS pentru: a) Hederacozid C standard, b) extractul etanolic de iederă RTI.1., c) Hederacozidul C identificat în amestecul brut de saponine izolate, RTI.1.2., d) Hederacozidul C identificat în fracția A 8 din RTI.1.2., e) Hederacozidul C identificat în fracția A9 din RTI.1.2..

Tabelul 7.3. Prezența Hederacozidului C în probele provenite de la metoda de izolare a saponinelor, analizate prin LC-MS (în ionizare negativă).

Saponina standard	M.W.	Timp de retenție (min)	Intensit. semnal (cps)	Proba (5 µg/mL)	Intensit. semnal Hederacozid C / Ion molecular în probă (cps)
Hederacozid C 2 mg (5µg/mL)	1221,4	4,71	$3,8 \cdot 10^6$	RTI.1.	$3,2 \cdot 10^6$
				RTI.1.1.	$6,0 \cdot 10^5$
				RTI.1.2.	$2,8 \cdot 10^6$
				A2 (RTI.1.2.)	$2,6 \cdot 10^5$
				A7 (RTI.1.2.)	$1,9 \cdot 10^6$
				A8 (RTI.1.2.)	$9,7 \cdot 10^6$
				A9 (RTI.1.2.)	$1,1 \cdot 10^7$

7.3.2. Identificarea Hederageninului

Hederageninul a fost cuantificat preponderant, conform cromatogramelor LC-MS, în probele: extractul etanolic de iederă RTI.1., în extractul de iederă supus izolării hederageninului, RTI.8., c) Hederagenin identificat în extractul de iederă, RTI.8., d) Hederagenin identificat în proba de hederagenin brut izolat, RTI.8.1. (**Figura 7.5.și Tabelul 7.4.**).

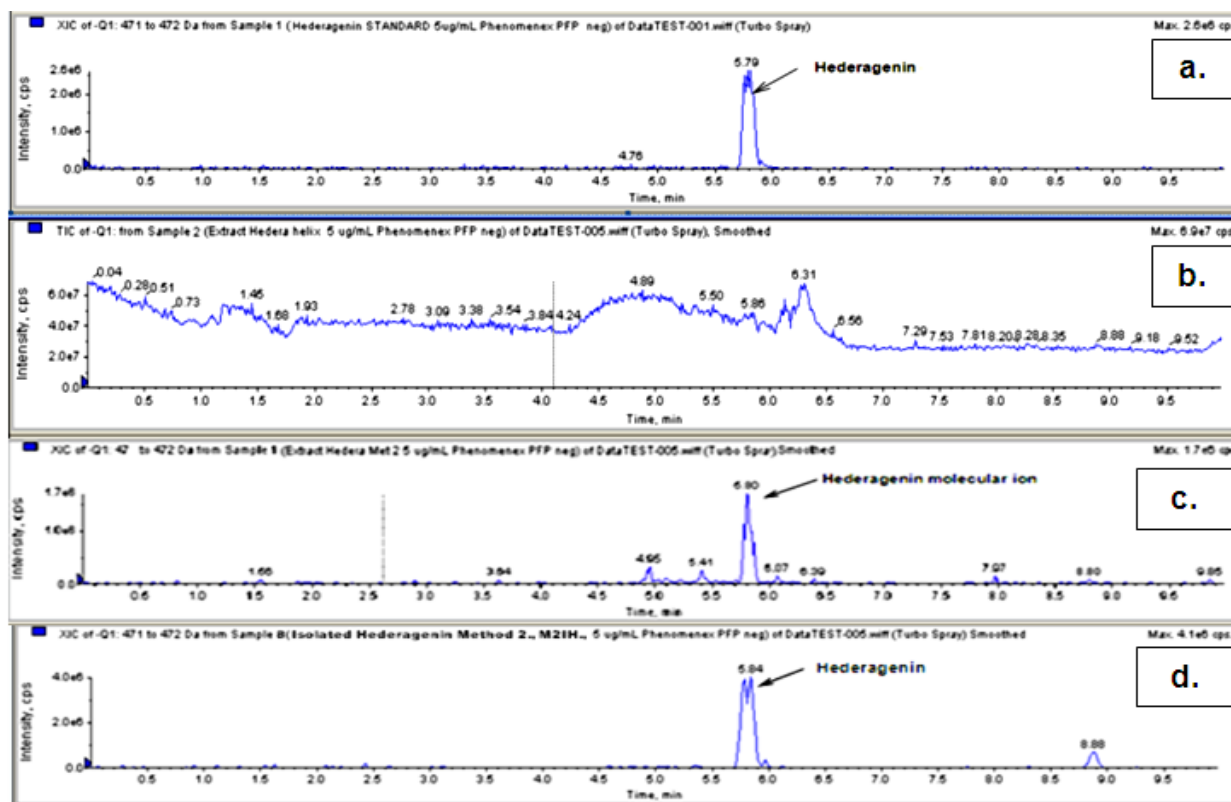


Figura 7.5. Cromatogramele LC-MS pentru: a) hederagenin standard, b) extractul de iederă supus izolării hederageninului RTI.8., c) hederagenin identificat în extractul de iederă RTI.8., d) hederagenin identificat în proba de hederagenin brut izolat RTI.8.1.

Tabelul 7.4. Prezența preponderentă a Hederageninului în probe provenite de la metoda a II-a de izolare a hederageninului, analizate prin LC-MS (în ionizare negativă).

Saponina standard	M.W.	Timp retenție(min)	Intensit. semnal (cps)	Proba (5 µg/mL)	Intensit. semnal Hederagenin / Ion molecular în probă (cps)
Hederagenin 3,09 mg (5µg/mL)	471,7	5,79	$2 \cdot 10^6$	RTI.8.	$1,7 \cdot 10^6$
				RTI.8.1.	$8,2 \cdot 10^6$
				B2 (RTI.8.1.)	$1,7 \cdot 10^6$ *
				B6 (RTI.8.1.)	$2,5 \cdot 10^6$ *
				B11 (RTI.8.1.)	$2,2 \cdot 10^6$ *

7.3.3. Identificarea α -Hederinului

Pe baza valorii intensității de semnal specifice α -Hederinului standard, compusul a putut fi cuantificat cu ajutorul cromatogramelor LC-MS (în ionizare negativă). în probele: extractul etanolic RTI.1., în fracțiile A8, A9 din RTI.1.2. (Metoda I a), respectiv în extractul RTI.8. și în hederageninul brut izolat RTI.8.1. (Metoda a –II a), (**Figura 7.6** și **Tabelul 7.5.**).

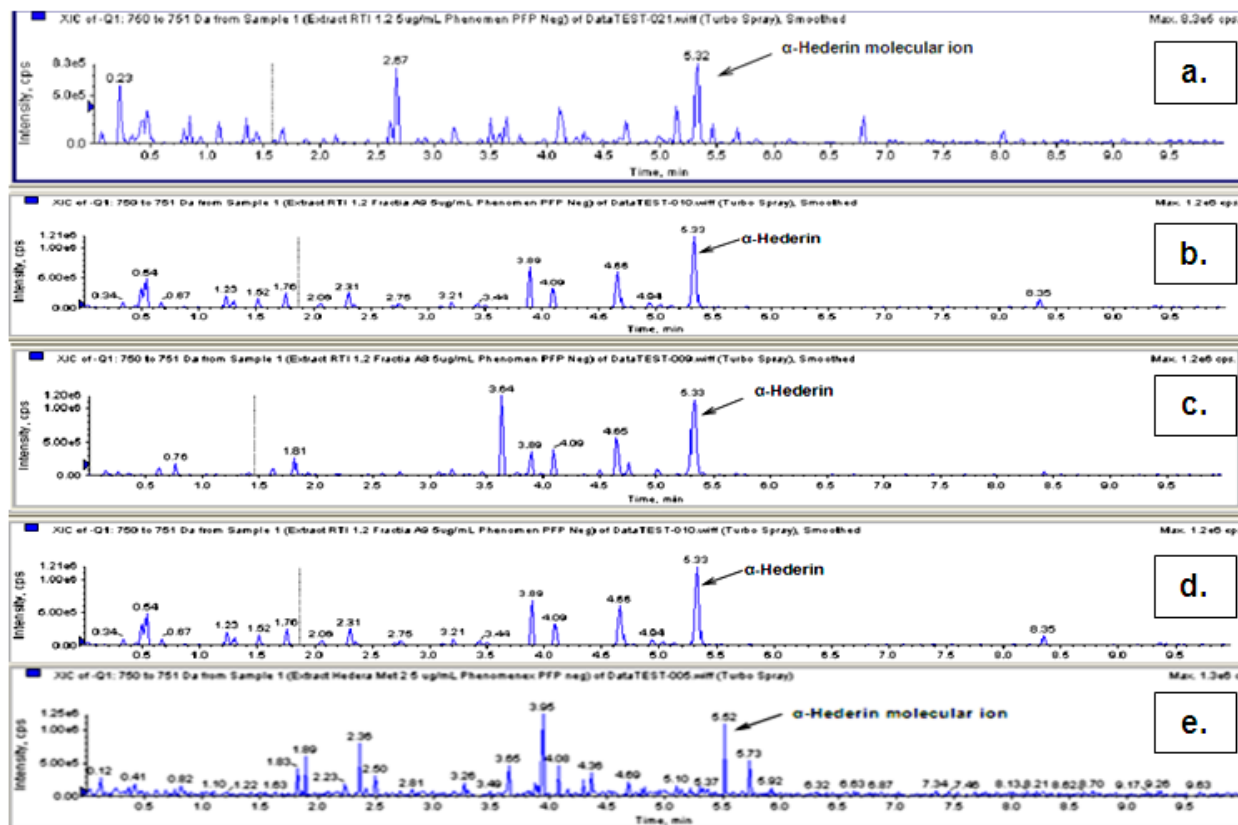


Figura 7.6. Cromatogramele LC-MS pentru: a) α -Hederinul standard, b) α -Hederinul identificat în extractul de iedera RTI.1., c) și d) α -hederinul identificat în fracțiile A8 și A9 din amestecul brut de saponine izolate RTI.1.2. e) α -hederinul identificat în extractul de iedera RTI.8.

Tabelul 7.5. Prezența α -Hederinului probele analizate prin LC-MS (în ionizare negativă).

Saponina standard	M.W.	Timp de retenție (min)	Intensit. semnal (cps)	Proba (5 μ g/mL)	Intensit. semnal α -Hederin / Ion molecular în probă (cps)
α -Hederin 2 mg (5 μ g/mL)	751,4	5,34	$5,5 \cdot 10^6$	RTI.1.	$4,0 \cdot 10^6$
				RTI.1.2.	$7,0 \cdot 10^5$
				A8 (RTI.1.2.)	$1,2 \cdot 10^6$ *
				A9 (RTI.1.2.)	$1,2 \cdot 10^6$ *
				RTI.8.	$1,1 \cdot 10^6$
				RTI.8.1.	$1,1 \cdot 10^6$

Datele cantitative ale celor trei saponine de interes, identificate în probele analizate prin LC-MS sunt centralizate în **Tabelul.7.6.**, iar estimarea concentrației lor în compuşii analizați este reprezentată în graficul din **Figura 7.7.**

Tabel 7.6. Estimarea conținutului celor trei saponine de referință în probele analizate LC-M

Proba	Hederagenin (µg/mL)	α-Hederin (µg/mL)	Hederacozid C (µg/mL)
Referința	5,00	5,00	5,00
RTI1.	2,50	3,64	4,21
RTI.1.1.	2,75	0,54	0,79
RTI1.2.	3,25	0,92	3,68
A2 (RTI.1.2.)	8,50	0,14	0,34
A7 (RTI.1.2.)	3,25	0,92	2,50
A8 (RTI.1.2.)	3,50	1,09	12,76
A9 (RTI.1.2.)	0,19	1,09	14,47
RTI.8.	4,25	1,00	0,53
RTI.8.1.	20,50	1,00	0,33
B2 (RTI.8.1.)	4,25	< 0,10	< 0,10
B6 (RTI.8.1.)	6,25	< 0,10	< 0,20
B11 (RTI.8.1.)	5,50	< 0,10	< 0,10
RTI.9.	2,00	0,09	0,21
RTI.9.1.	7,00	< 0,10	0,79
RTI.9.2.	5,75	< 0,10	0,84

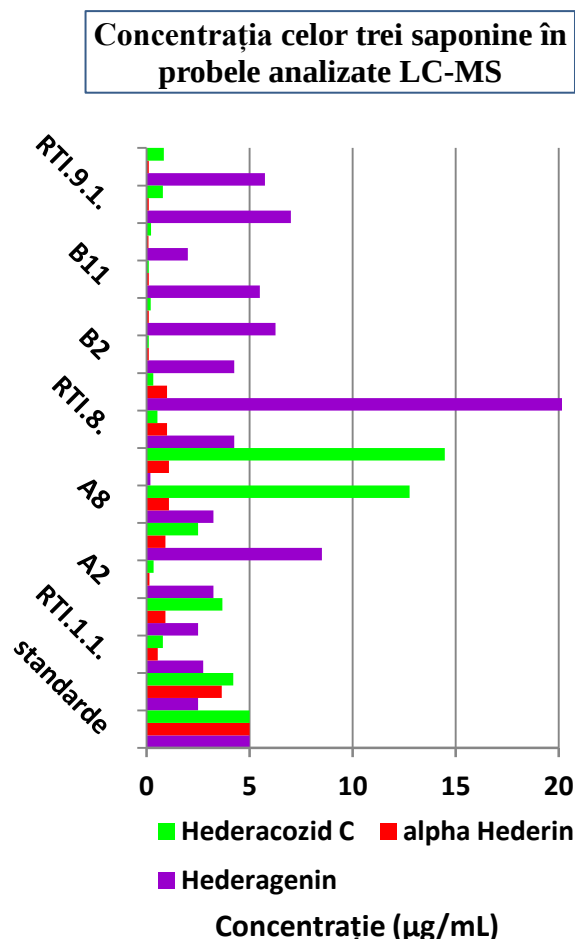


Figura. 7.7. Ponderea celor trei saponine de referință în probele provenite de la cele trei metode de izolare a saponinelor, conform cromatogramelor LC-MS.

7.3.2. Evaluarea *in vitro* a citotoxicității hederageninului izolat RTI.8.1. (folosind metoda MTT)

7.3.2.1. Testarea *in vitro* a biocompatibilității (conform standardului SR EN ISO 10993-5)

Viabilitatea celulară a fost determinată utilizând metoda MTT, pe baza reducerii sării de tetrazoliu sub acțiunea enzimelor dehidrogenazei mitocondriale din celulele metabolice active cu formarea cristalelor insolubile de formazan de culoare violet. Astfel, cantitatea de formazan generată este direct proporțională cu numărul de celule viabile. Pentru experiment, la 24 h și 48 h de incubație mediul de cultură a fost înlocuit cu 50 µg / mL soluție MTT și plăcile au fost incubate timp de 3 ore. După incubare, s-a adăugat izopropanol pentru a solubiliza cristalele de

formazan și plăcile au fost așezate pe un agitator orbital, timp de 15 min. Densitatea optică (DO) a soluției colorate a fost măsurată la o lungime de undă de 570 nm, utilizând cititorul de microplăci Mithras LB 940 (Berthold Technologies). Rezultatele au fost calculate utilizând următoarea formulă:

Culturile celulare utilizate la testarea *in vitro* au fost:

- NCTC (clone 929) fibroblaste dermale normale de șoarece cu densitatea de cultivare 4×10^4 celule/mL;
- Hep-2 epiteliale tumorale de cervix uman, cu densitatea de cultivare 6×10^4 celule/mL;

Mediul de cultură: Minimum Essential Medium (MEM) cu 10% Ser Fetal Bovin (FBS) și 1% amestec de antibiotice: Penicilina, Streptomicina și Neomicina (PSN).

Condiții de incubare: atmosferă umedă cu 5% CO₂ și 37°C.

Pregătirea probelor: solubilizare într-o cantitate mică de DMSO urmată de prepararea soluțiilor stoc de 400 μg/mL în MEM, filtrate steril prin filtru millipore 0,22 μm.

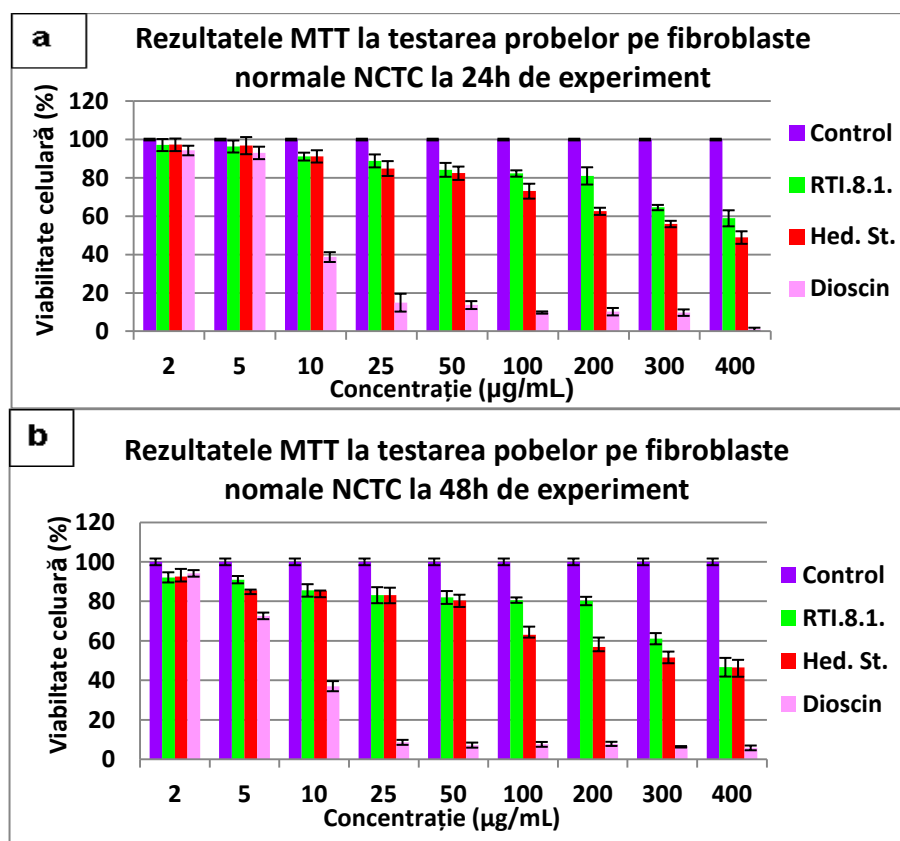


Figura 7.8. Graficele indică variația ale viabilitatii celulelor fibroblaste normale NCTC la testarea probei de hederagenin izolat RTI.8.1., a hederageninului standard și a dioscinului, la 24 h (a) și 48h (b) de experiment, determinate prin testul MTT.

Celulele netratate au fost utilizate ca martor și considerate 100% viabile experimentele au fost efectuate în triplicat și rezultatele au fost exprimate ca medie $\pm$ SD. Dioscinul a avut rol de martor pozitiv [31].

7.3.2.2. Determinarea activității antiproliferative

Evaluarea activității antiproliferative s-a realizat pe celule tumorale de cervix uman Hep-2, testate în mediu de cultură MEM + /- ser fetal bovin (FBS).

Graficele indică variația viabilității celulare în cultură tumorală de cervix Hep-2 (în mediu cu, respectiv fără ser fetal) la testarea probei hederagenin izolat, a hederageninului standard și a dioscinului, la 24 h și 48 h de cultivare, determinate prin testul MTT.

Celulele netratate au fost utilizate ca martor și considerate 100% viabile. Experimentele au fost efectuate în triplicat și rezultatele au fost exprimate ca medie $\pm$ SD.

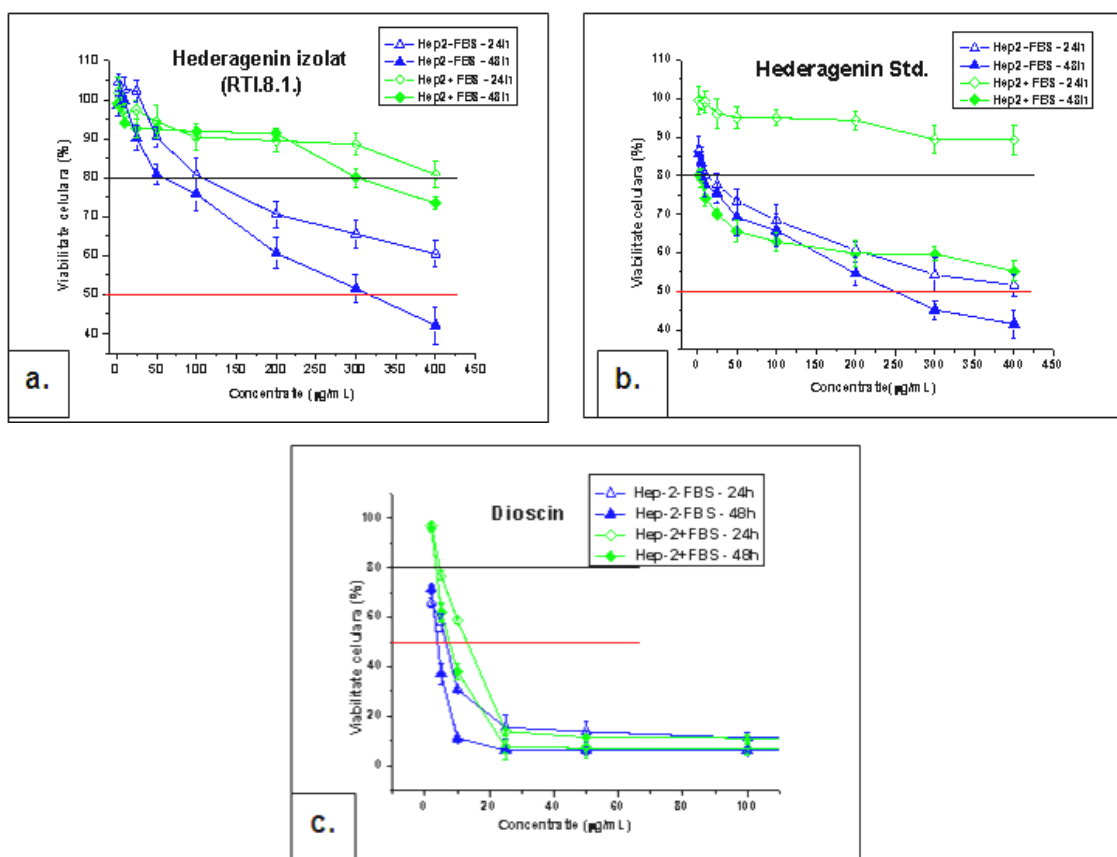


Figura 7.9. Activitatea antitumorală indusă de hederageninul izolat RTI.8.1. (a), standardul de hederagenin (b) și dioscinul (c), determinată prin testul MTT la 24 h și 48 h de experiment în mediu de cultură + / - ser fetal bovin.

Tabelul 7.7. Valorile IC₅₀ determinate pentru hederageninul izolat RTI.8.1., standardul hederagenin și dioscin.

Proba	IC50 (µg/mL)	
	Hep-2-FBS	Hep-2+FBS
Hederagenin izolat, RTI.8.1.	320	> 400
Standard hederagenin	250	> 400
Dioscin	3	6

7.3.2.3. Observarea morfologiei celulare

Morfologia celulelor NCTC și Hep-2 tratate cu proba de hederagenin izolat (RTI8.1.) și cei doi martori, a fost evidențiată prin colorație Giemsa. Folosind un microscop Zeiss au fost realizate imagini ale culturilor tratate.

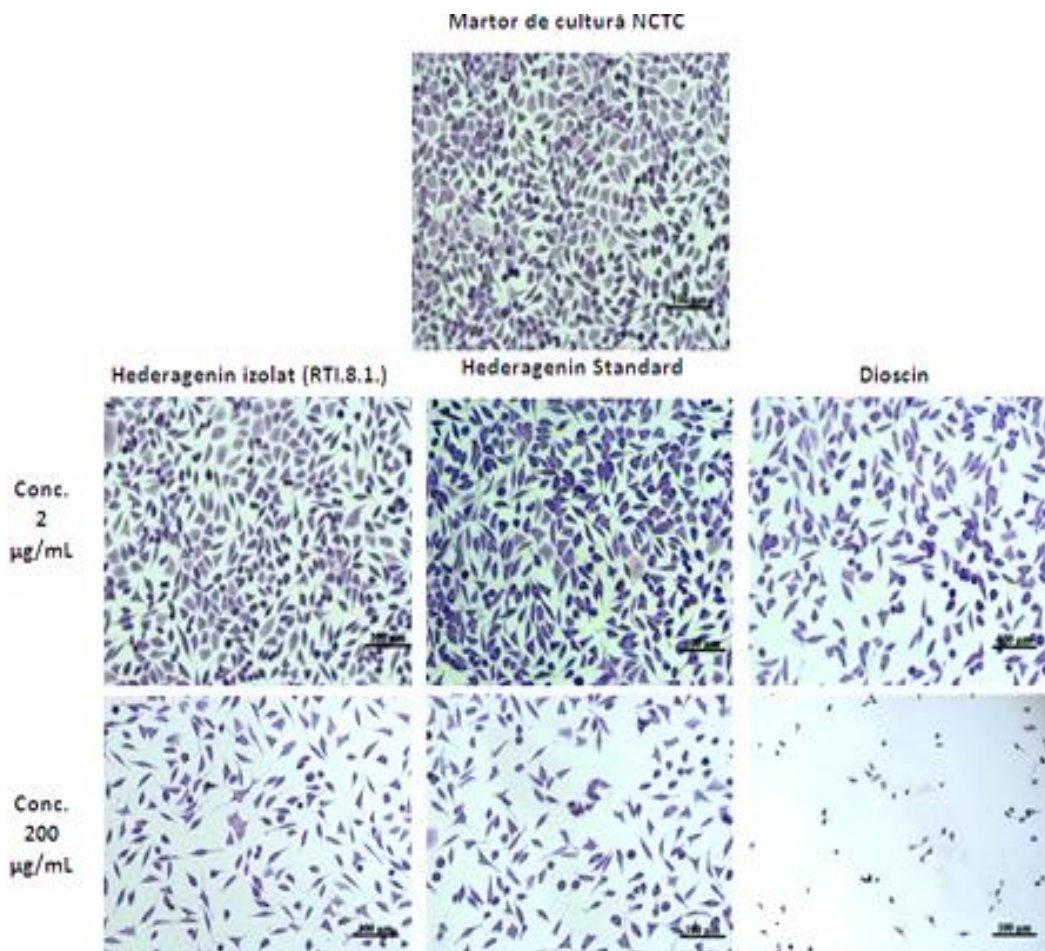


Figura 7.10. Morfologia fibroblastelor normale NCTC evidențiată prin colorație Giemsa, la 48 h de experiment.

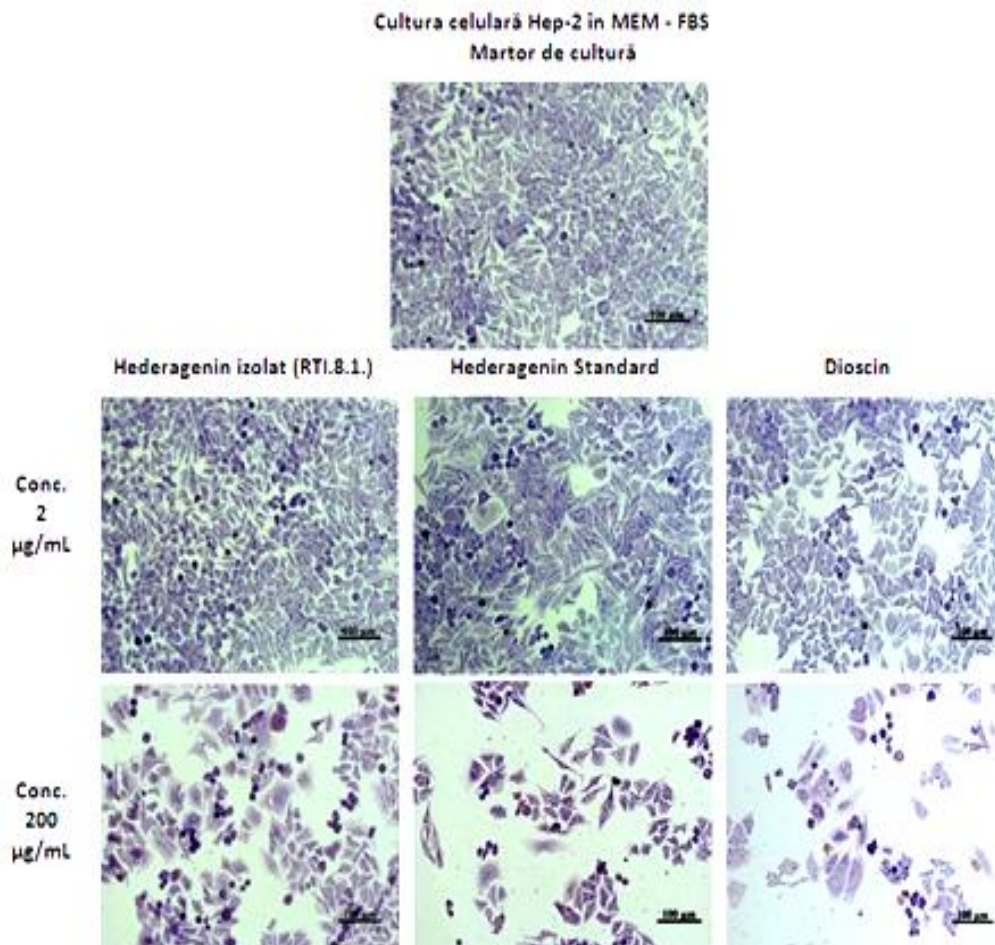


Figura 7.11. Morfologia celulelor epiteliale tumorale Hep-2 la testarea cu MEM fără FBS, evidențiată prin colorație Giemsa, la 48 ore de experiment.

CAPITOLUL 8. EVALUAREA POTENȚIALULUI FITOCHIMIC ȘI ANTIPROLIFERATIV AL FRAȚIILOR DE EXTRACT DIN FRUNZE DE IEDERĂ, SEPARATE PRIN FLASH CROMATOGRAFIE

Obiective:

- ❖ Obținerea extractului etanolic din frunze de *Hedera helix*
- ❖ Fraționarea extractului etanolic
- ❖ Caracterizarea biologică *in vitro* a extractului etanolic și a fracțiilor sale
- ❖ Caracterizarea fitochimică a probelor selectate

Metodele de analiză:

- Evaluarea *in vitro* a activității biologice utilizând testul MTT
- Determinarea conținutului total de flavonoide
- Determinarea conținutului total de polifenoli
- Determinarea activității antioxidante ABTS
- Determinarea conținutului total de saponine (CTS)

8.1. Obținerea extractului etanolic din frunze de iederă

Frunze de *Hedera helix* uscate și mărunțite au fost extrase prin refluxare cu soluție etanol : apa (1:1) la 80° C, cu agitare timp de 2 ore. Extractul obținut a fost concentrat la presiune redusă, rezultând un extract concentrate de consistența siropului.

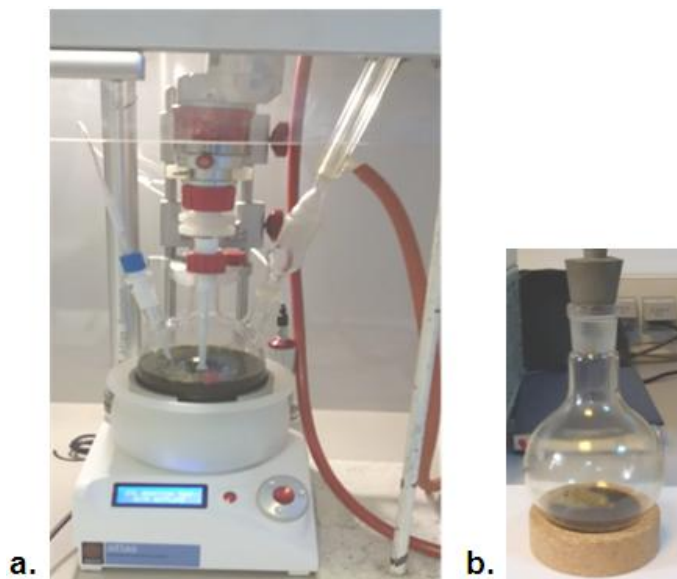


Figura 8.1. a) Instalația de obținere prin refluxare a extractului etanolic din frunze de iederă; b) extractul de iederă concentrat, rezultat în urma concentrării la presiune redusă.

Tabel 8.1. Datele obținerii prin refluxare a extractului etanolic din frunze de iederă.

Masa vegetală (g)	Volum solvent EtOH / H ₂ O (1:1)(mL)	Masa vegetală reziduala (g)	Volum extract etanolic (mL)	Volum extract concentrat (mL)	Culoare
100	500	82,4	403	31	verde închis

8.2. Fraționarea prin flash cromatografie a extractului etanolic din frunze de iederă

Condiții de testare:

Sistem de separare: Flash cromatograf Biotage (Charlotte) cu detector UV-VIS

- Coloană de separare SNAP Ultra C18 (10g), umplut cu granule de silicagel HP-Sphere TM 10 μ m.
- Autosampler: tip Fraction Collector Rack (16 x100mm).

Sistem de solvenți: acetonitril : apă 30:100 (cu 0,1% acid fosforic) cu volumul (1CV),

Debitul de curgere: 10 mL / min,

Domeniul de detecție: 200-800 nm.

Fracțiile separate de software-ul sistemului Flash cromatograf în funcție de spectrul de absorbție UV, au fost colectate în dispozitivul colector. Au rezultat nouă fracțiuni notate Fr.1 - Fr.9 cu volumul de aprox. 10 mL, ce au fost aduse la sec [32].

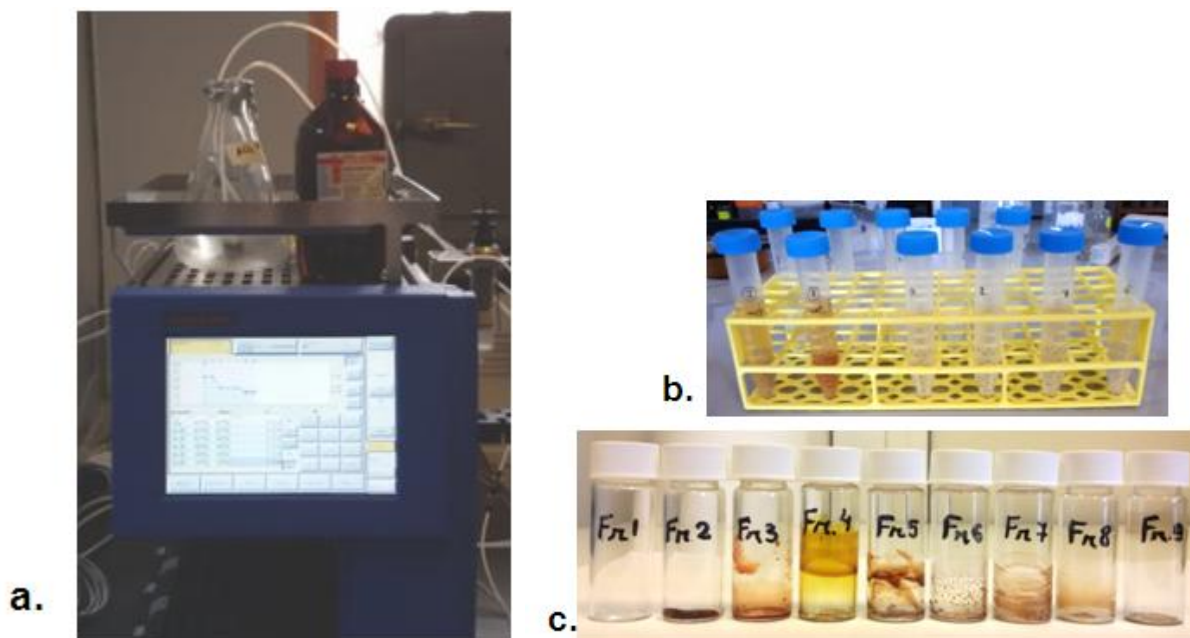


Figura 8.2. a) Sistemul de separare Flash cromatograf Biotage, cu detector UV-VIS; b) fracțiile colectate la fracționarea extractului din frunze de iederă; c) fracțiile aduse la sec.

8.3.1. Evaluarea biocompatibilității și activității antiproliferative a extractului de iederă și a fracțiilor sale

Extractul de frunze de *Hedera helix* și fracțiunile sale au fost testate *in vitro* pe cultură NCTC la 24 de ore, pentru determinarea citotoxicității acestora. Testarea activității antiproliferative a extractului de frunze de *Hedera helix* și a celor nouă fracții a fost efectuată pe celule tumorale Hep-2, în variante ale mediului de cultură cu sau fără ser fetal bovin [12] la 24h.

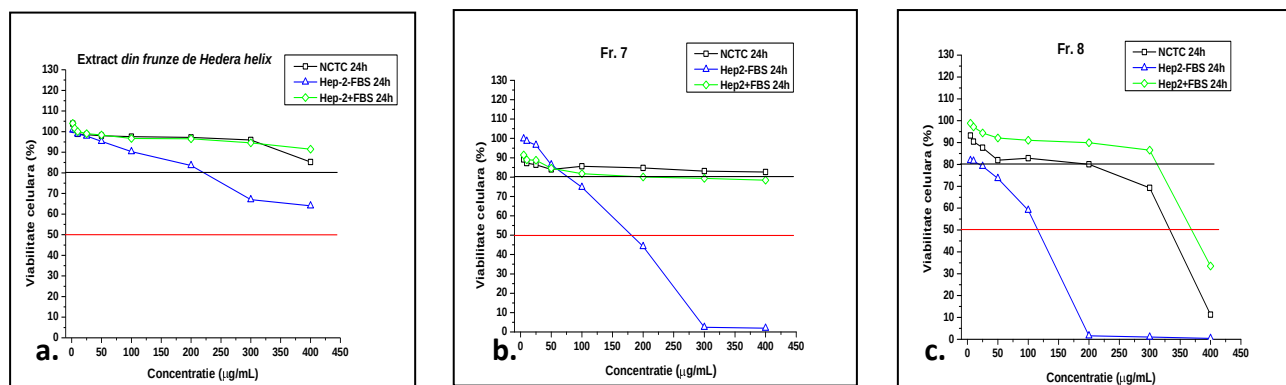


Figura 8.3. Variația viabilității celulare a fibroblastelor normale NCTC și a celulelor tumorale epiteliale Hep-2 în MEM+/-FBS, la testarea probelor: a) extractul din frunze de iederă b) fracția 7 și c) fracția 8, determinate prin testul MTT la 24h.

Tabelul 8.2. Valorile IC₅₀ determinate pentru extractul de *Hedera helix* și fracțiile sale pe cultura celulară Hep-2.

Proba	IC50 (μg/mL)	
	Hep-2-FBS	Hep-2+FBS
Extract de <i>Hedera helix</i>	> 400	> 400
Fr.1	> 400	> 400
Fr.2	> 400	> 400
Fr.3	> 400	> 400
Fr.4	> 400	> 400
Fr.5	> 400	> 400
Fr.6	> 400	> 400
Fr.7	181	> 400
Fr.8	115,7	368,9
Fr.9	> 400	> 400

8.3.2. Caracterizarea fizico-chimică a extractului de iederă și a fracțiilor 7 și 8

Fracțiile Fr.7 și Fr.8 cu efect antiproliferativ puternic, au fost evaluate biochimic față de extractul de iederă pentru a releva corelația dintre cantitatea de fitocompuși precum flavonoide, polifenoli și saponine și activitățile lor antioxidante și antiproliferative.

Determinarea conținutului total de flavonoizi (metoda colorimetrică)

Probă a fost tratată cu metanol, AlCl₃ 10%, acetat de sodiu și apă distilată, incubată 30 min. la 23°C, standardul de flavonoidă utilizat fiind quercetina. Absorbanța a fost citită la lungimea de undă 415 nm utilizând un cititor de plăci Sunrise Tecan (Austria).

Ecuția curbei de calibrare a fost: $y = 0,0038 x + 0,0064$, cu coeficientul de corelație: 0,9993.

8.4.3. Determinarea activității antioxidante ABTS (acid 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazoline-6-sulfonic)

Proba testată a fost amestecată cu o soluție a sarii de diamoniu ABTS (Fluka) cu valoarea OD de absorbție de 0,7, incubată la temperatura camerei timp de 6 min. Absorbanța a fost citită la lungimea de undă 734 nm la un spectrofotometru UV-VIS (Jasco V -530, Japonia)

Ecuția curbei de calibrare Trolox a fost realizată pentru intervalul de concentrație de 0 - 250 μM. Rezultatele calculate ale capacității antioxidante au fost exprimate sub formă de echivalenți de Trolox (TEAC) în mM Trolox / g substanță uscată, folosind formula:

$$TEAC_{proba} = C_{Trolox} \times f \times \frac{OD_{proba} - OD_{blank}}{OD_{Trolox} - OD_{blank}}$$

unde: C_{Trolox} este concentrația de Trolox mM / g substanță uscată și f este factorul de diluare a probei.

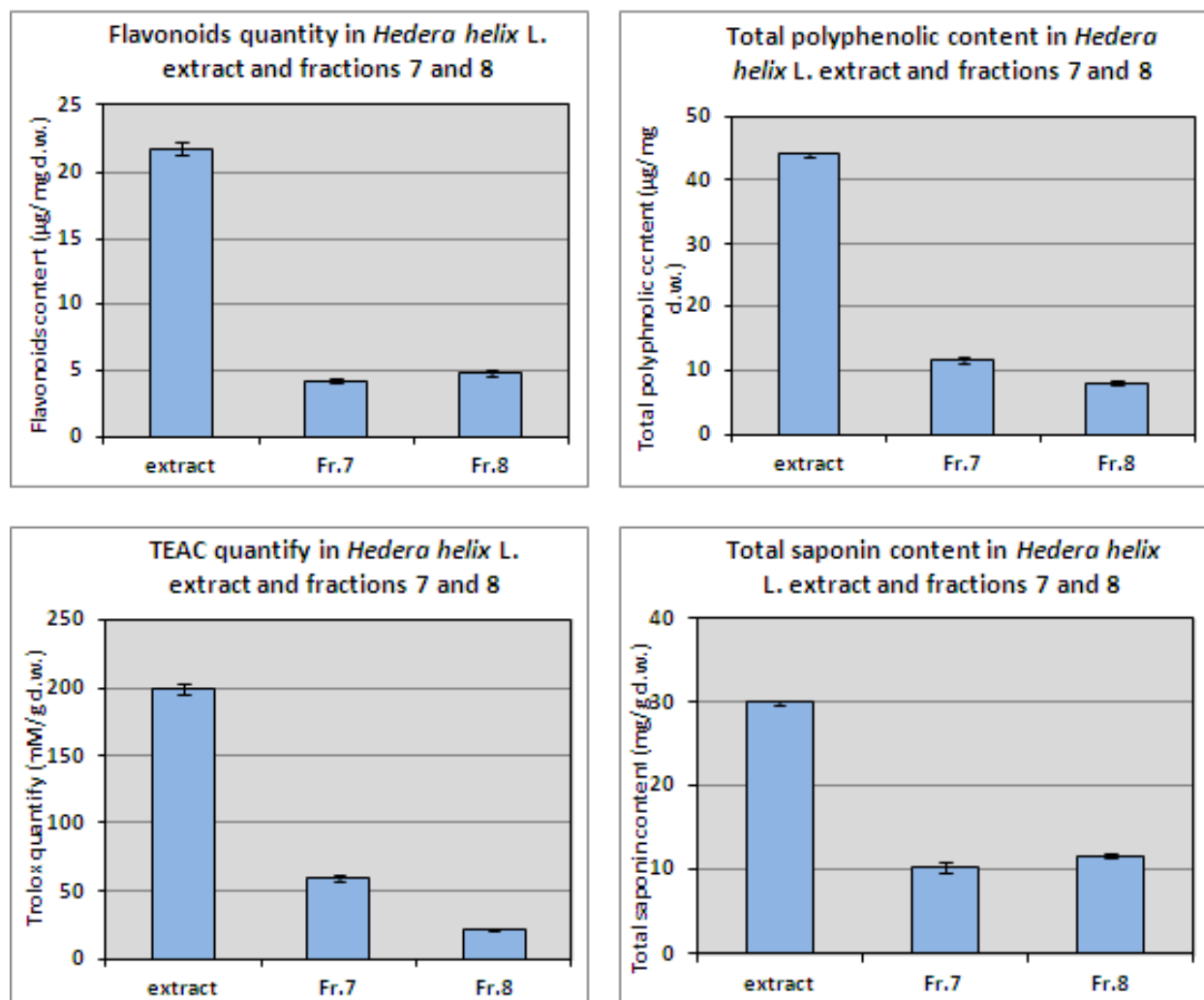


Figura 8.4. Rezultatele determinărilor conținutului total de flavonoizi, polifenoli, saponine și activitatea antioxidantă ale extractului de iederă și fracțiilor 7 și 8.

Tabelul 8.3. Caracteristici fitochimice ale extractului de *H. helix* și ale fracțiilor sale 7 și 8.

Proba	Conținut total de polifenoli* (mg acid galic / g s.u.)	Conținut total de flavonoizi* (mg quercetin / g s.u.)	ABTS Capacitate antioxidantă* (mM Trolox / g s.u.)	Conținut total de saponine* (mg ginsenosid / g s.u.)
Extract <i>H. helix</i>	44,02 ± 0.26	21,75 ± 0.51	199,27 ± 4.44	30,02 ± 0,68
Fr.7	11,60 ± 0.50	4,18 ± 0.14	59,37 ± 2.63	41,30 ± 0,26
Fr.8	8,03 ± 0.25	4,75 ± 0.21	22,11 ± 1.31	44,90 ± 0,19

9. OPTIMIZAREA PRIN MODELARE MATEMATICĂ A UNEI COMPOZIȚII DE SAPONINE TRITERPENICE CU ACTIVITATE ANTIPROLIFERATIVĂ

Obiectivul studiului

Scopul studiului a fost de a evalua *in vitro* activitatea citotoxică și antiproliferativă indusă de trei saponine triterpenice standard: α -hederin, hederagenin și hederacozid C, și de a optimiza un amestec ale celor trei saponine, pentru producerea unui efect antiproliferativ maxim.

Etapele studiului:

1. Evaluarea *in vitro* a activității citotoxice și antiproliferative indusă de trei saponine triterpenice standard: α -hederin, hederagenin și hederacozid C
2. Modelarea matematică a amestecurilor folosind RSM cu ajutorul software-ului Design Expert 11.
3. Determinarea influenței amestecurilor celor trei saponine în variantele generate prin modelare matematică, asupra viabilității celulare
4. Analiza statistică

9.1. Influența saponinelor standard asupra viabilității celulare

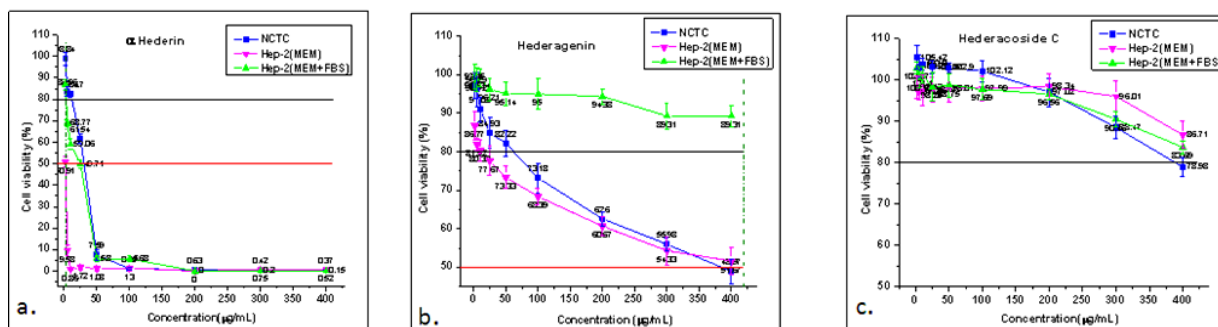


Figura 9.1. Citotoxicitatea și activitatea antiproliferativă *in vitro* a saponinelor standard: a) α -hederin, b) hederagenin și c) hederacozid C, testate pe celulele fibroblaste NCTC și celulele tumorale Hep-2 în mediu de cultură fără FBS (MEM) sau mediu cu FBS (MEM + FBS), determinate prin testul MTT. Valorile reprezintă media $\pm$ SD (n = 3).

Tabelul 9.1. Rezultatele de citotoxicitate ale saponinelor asupra celulelor NCTC.

Efectul indus pe celule normale NCTC	α -Hederin		Hederagenin		Hederacozid C	
	Conc. (μg/mL)	Viabilit. celulară (%)	Conc. (μg/mL)	Viabilit. celulară (%)	Conc. (μg/mL)	Viabilit. celulară (%)
Biocompatibil	≤ 10	$\geq 80,00$	≤ 50	≥ 80	2 - 300	105,42 – 88,47
Ușor citotoxic	25	61,54	100 – 300	73 – 55		
Citotoxic	50-400	$\geq 0,37$	400	48,97	400	78,98

Tabelul 9.2. Valorile IC₅₀ ale saponinele cultivate pe celule tumorale Hep-2 în MEM +/- FBS.

Saponină standard	IC ₅₀ (µg/mL)	
	Hep-2 MEM	Hep-2 MEM + FBS
α-Hederin	2,00	24,85
Hederagenin	413,36	>500
Hederacozid C	>400	>400

9.2. Optimizarea amestecurilor de saponine cu efect antiproliferativ.

9.2.1. Modelarea matematică a amestecurilor de saponine folosind Response Surface Method cu ajutorul software-ului Design Expert 11.

Tabelul 9.3. Factorii independenți luați în considerare și limitele de variație ale acestora în µg/mL.

Compon.	Denumire	Conc. min. (µg/mL)	Conc. max. (µg/mL)
A	α-Hederin	2	8
B	Hederagenin	100	498
C	Hederacozid C	200	598
Total			700,00

Matricea experimental utilizată la proiectarea amestecului a avut următoarele caracteristici:

- Model de tip: Scheffe
- Absența punctelor de potrivire: 5
- Puncte replicate: 3
- Puncte suplimentare de model: 0
- Puncte centrale suplimentare: 0
- Blocuri: 1
- Total rulări: 14

9.2.2. Influența asupra viabilității celulare a amestecurilor celor trei saponine în variantele generate prin modelare matematică

Tabelul 9.4. Rezultatele *in vitro* ale viabilității celulare determinate prin testul MTT ale celor 14 variante de amestecuri formate din cele trei saponine, generate prin modelare matematică conform matricei experimentale.

Varianta amestec.	Compoziția amestecului (μg/mL)			Viabilitate celulară (%)		
	A: α-Hederin	B: Hederagenin	C: Hederacozid C	NCTC	Hep-2 (MEM)	Hep-2 (MEM + FBS)
1	8,000	381,029	310,971	43,94	4,44	49,39
2	3,824	100,000	596,176	77,28	37,13	77,00
3	2,000	279,100	418,900	72,08	59,84	66,10
4	3,514	496,486	200,000	63,43	37,54	68,92
5	8,000	139,800	552,200	68,85	1,82	61,50
6	2,000	343,630	354,370	72,91	49,04	63,66
7	2,000	188,104	509,896	79,46	57,11	73,15
8	5,305	301,292	393,403	60,27	2,02	63,00
9	3,824	100,000	596,176	80,89	35,52	76,53
10	5,305	301,292	393,403	64,71	2,12	66,57
11	2,000	424,557	273,443	70,58	63,37	68,54
12	8,000	462,150	229,850	49,81	16,75	44,32
13	8,000	230,898	461,102	65,16	1,61	69,58
14	5,305	301,292	393,403	63,21	2,32	62,07
Gama de răspuns				de la 43,94 până la 80,89	de la 1,61 până la 63,37	de la 44,32 până la 76,99
Raportul de la max. la min.				1,84	39,25	1,73
Transformare				fără	Log natural	fără

9.3. Analize statistice

Utilizând analiza varianței, software-ul a propus modelele prezentate în **Tabelele 9.6. și 9.7.**

Tabelul 9.6. Variabilitatea parametrilor *F* și *p* conform analizei varianței.

Răspuns	Tip model	Model		Lipsa de potrivire		R ²
		Valoare F	Valoare p	Valoare F	Valoare p	
NCTC	Model Quadratic	22,77	0,0002	2,79	0,2142	0,9343
Hep-2 (MEM)	Model Cubic	457,91	<0,0001	5,18	0,1072	0,9990
Hep-2 (MEM+FBS)	Model Special Quartic	52,48	0,0002	0,191	0,8355	0,9882

- Valorile *F* și *p* au arătat că modelele au fost semnificative
- Precizia modelului propus a fost evaluată cu valoarea coeficientului de corelație

Valorile reprezintă media ± SD (n = 3).

Limitele de variație au fost foarte mari și prin urmare, s-a utilizat ca medie de transformare: ln (Y).

Tabelul 9.7. Coeficienții modelului și valorile p asociate.

Model	Coeficienții (ecuației codate) și valoarea p										
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	AB(A-B)	AC(A-C)	ABC ²	A
NCTC	18786,6	70,9735	8,3454	-20,7322	-19,5965	15,8615	-	-	-	-	18,7866
valoare p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,5880	0,6085	0,1430	-	-	-	-	<0,0001
In Hep-2 (MEM)	5,65968 E+06	4,51276	3,99676	8,5363 E+06	8,552 E+06	1,0551	5,76906 E+06	2,87669 E+06	2,89269 E+06	-	5,65968 E+06
valoare p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0052	0,0052	0,3829	0,0052	0,0053	0,0052	-	<0,0001
Hep-2 (MEM + FBS)	-9343,46	76,5045	88,5913	7533,95	6852,24	71,2811	-	-	-	16,7169	-9343,46
valoare p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,9173	0,9248	0,0152	-	-	-	0,0391	<0,0001

- Relația dintre răspuns și variabile semnificative reprezentate de ecuație sunt corecte
- Condiția că modelul să fie considerat statistic semnificativ a fost îndeplinită, valoarea lui F a fost mai mare, iar valoarea lui p mai mică de 0,05.

Folosind modelele generate de software, s-a putut descrie suprafața de răspuns pentru fiecare variantă.

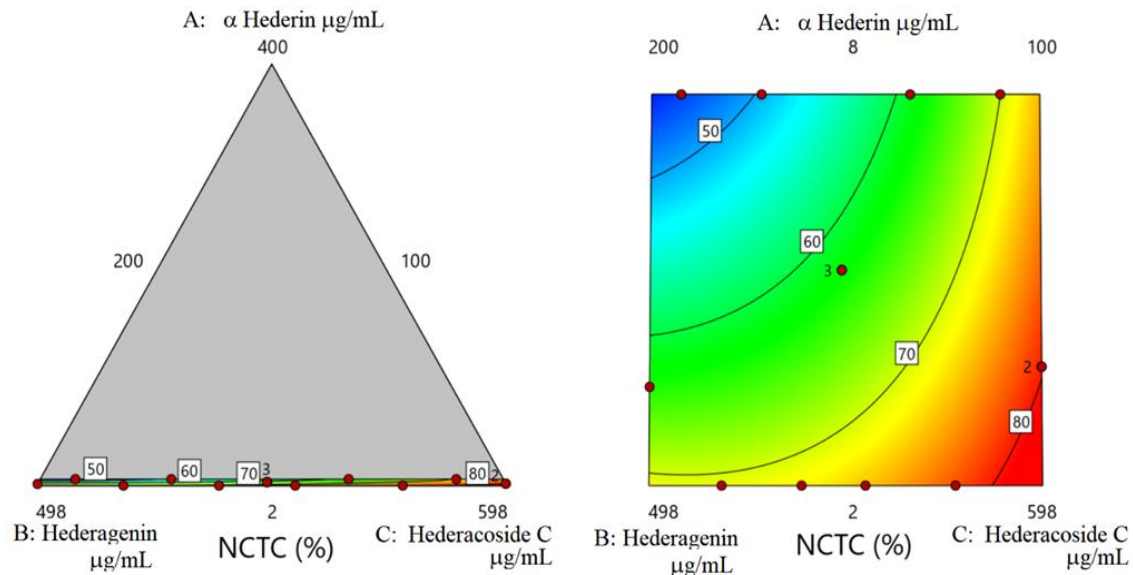


Figura 9.2. Suprafața de răspuns a viabilității celulare ternare a fibroblastelor NCTC și zona de concentrație a compușilor testați.

Graficul ternar a indicat o diferență mare între domeniile de variație dintre α -hederin și celelalte două componente, fiind necesară prezentarea diagramei mărite pentru relevarea zonei de concentrare.

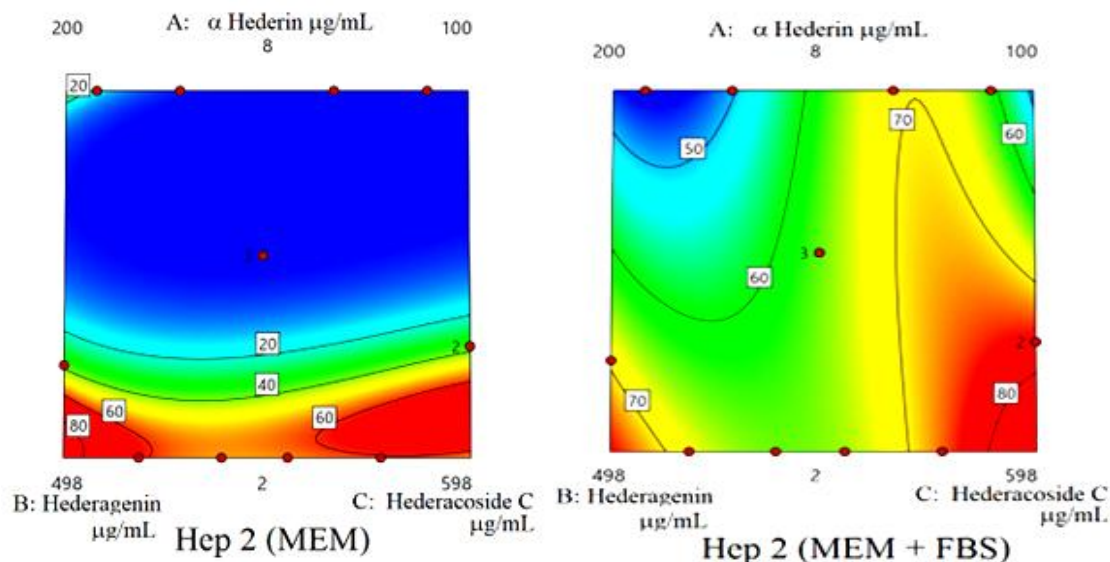


Figura 9.3. Suprafețele de răspuns ale viabilității celulare pentru zona de concentrație a compușilor testați pe: a) celulele Hep-2 în MEM (fără FBS); b) Hep-2 în MEM + FBS.

Viabilitatea celulelor Hep-2 a fost mai mică în prezența MEM fără FBS decât cea cu FBS. Zonele cu viabilitate celulară sub 50% au fost determinate în special de concentrația α -hederinului pentru Hep-2 (MEM), în timp ce pentru Hep-2 (MEM + FBS) factorii implicați au fost mai numeroși, zona cu viabilitate sub 50 % fiind mult mai restrânsă [33].

Tabelul 9.8. Restricții pentru suprafețele de răspuns.

Denumire	Obiectiv	Limită minimă	Limită maximă
A: α -Hederin	să fie în gamă	2,00	8,00
B: Hederagenin	să fie în gamă	100,00	498,00
C: Hederacoside C	să fie în gamă	200,00	598,00
NCTC	maximizare	79,00	80,89
Hep-2 (MEM)	minimizare	1,614	50,00
Hep-2 (MEM + FBS)	fără restricții	44,319	76,99

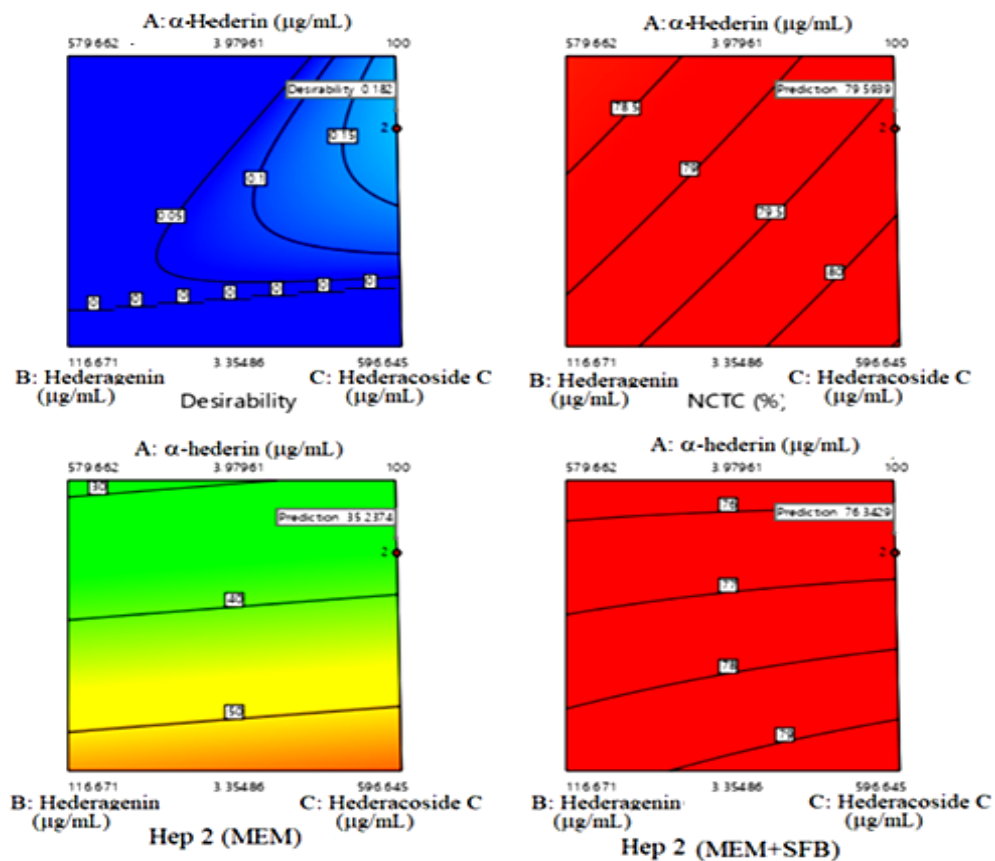


Figura 9.4. Dezirabilitatea suprafeței de răspuns și viabilitatea celulelor tratate NCTC și Hep-2.

Tabelul 9.9. Varianta optimă găsită.

Nr. soluții	Concentrația saponinei ($\mu\text{g/mL}$)			Viabilitate celulară (%)			Dezirabilitate
	α -Hederin	Hederagenin	Hederacozid C	NCTC	Hep-2 (MEM)	Hep-2 (MEM + SFB)	
1.	3,863	100,000	596,137	79,594	34,833	76,368	0,182

CONTRIBUȚII PROPRII

Cercetarea științifică care a stat la baza acestei lucrări s-a axat pe studii care au urmărit evidențierea și optimizarea efectului antiproliferativ al saponinelor de tipul hederagenin, α -hederin și hederacozid C provenite din extracte obținute din frunzele de *Hedera helix* L și fracții ale acestora, respectiv compușilor standard comercializați.

Studiile efectuate au generat următoarele contribuții proprii:

❖ Amestecurile de saponine în stare amorfă au fost izolate la precipitarea cu dietil eter a extractului etanolic obținut prin macerarea a două tipuri de material vegetal: frunze de iederă neselectate și respectiv frunze selectate de formă palmară (Metoda I-a), randamentele de izolare fiind de 4,78 % și respectiv 3,89%. Analiza CSS și LC-MS a fracțiilor de saponine izolate din frunze de iederă neselectate, a indicat prezența preponderentă a hederageninului în fracția A2 în cantitate de 8,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ și a hederacozidului C în fracțiile A8 și A9 cu 12,76 și respectiv 14,47 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

❖ Hederagenin brut a fost izolat prin două metode:

- din extract etanolic rezultat prin macerare repetată a frunzelor de iederă, urmată de hidroliză acidă și purificare cu acetonitril (Metoda a II-a), randamentul de izolare a hederageninului (notat RTI.8.1.) fiind de 9,22% - având eficiența cea mai bună dintre cele trei metode de izolare saponine aplicate.

- din extract etanolic al frunzelor de iederă obținut prin refluxare, supus hidrolizei acide și purificării cu acetat de plumb, (Metoda a III-a), cu un randament de izolare a hederageninului (RTI.9.2.) de 6,42%.

Cantitatea de hederageninului în proba de hederagenin brut RTI.8.1. estimată pe baza cromatogramelor LC-MS a fost de 20,50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de cca. 5 ori mai mult decât în extractul de proveniență. Testat *in vitro*, hederageninul brut RTI.8.1. la concentrații de 2-200 $\mu\text{g} / \text{mL}$ a manifestat biocompatibilitate asupra celulelor NCTC fibroblaste normale de șoarece, și a avut activitate antitumorală pe celule Hep-2 tumorale epiteliate de cervix uman la concentrațiile 100-400 $\mu\text{g} / \text{mL}$, cu o valoare IC_{50} 320 $\mu\text{g} / \text{mL}$ apropiată de cea a hederageninului standard IC_{50} of 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Aceste rezultate evidențiază capacitatea antiproliferativă a hederageninului brut izolat din extract de *Hedera helix* și potențialul său de a fi utilizat ca agent terapeutic în terapia antitumorală.

❖ Metoda Flash-cromatografică cu detecție UV-Vis a fost utilizată la obținerea fracțiilor de extract hidroetanolic refluxat din frunze de *Hedera helix*, care au fost caracterizate biologic și biochimic. Activitatea antiproliferativă a probelor studiate a fost dependentă de conținutul de saponine, iar activitatea lor antioxidantă a fost corelată cu conținutul în polifenoli și flavonoizi. Fracțiile 7 și 8 bogate în saponine au manifestat un efect antiproliferativ puternic la testarea *in vitro* pe celule Hep-2 tumorale de cervix uman cu valori IC_{50} de 181 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de pentru Fr. 7 în MEM și 115,7 $\mu\text{g} / \text{mL}$ în MEM cu FBS, în timp ce Fr.8 testat în MEM cu FBS a înregistrat un IC_{50} de 368,9 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Ambele fracții testate pe celule NCTC fibroblaste normale de șoarece, nu au fost citotoxice pe intervalul de concentrație de 2-200 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

❖ S-a realizat optimizarea unui amestec de saponine constituit din α -hederi, hederagenin și hederacozid C cu efect antiproliferativ maxim, prin modelarea matematică cu ajutorul Metoda Suprafeței de Răspuns (RSM) generată de software-ul Design Expert 11. Prelucrarea de către

software a rezultatelor testării individuale *in vitro* a saponinelor pe celule normale NCTC fibroblaste de șoarece și tumorale Hep-2 epiteliale de cervix uman în MEM și MEM fără FBS la 24 ore de tratament, a generat 14 variante posibile de amestec al celor trei componente, acestea fiind de asemenea testate *in vitro*. Modelarea matematică cu RSM a datelor obținute a indicat ca soluție varianta în care α -hederin: hederagenin: hederacozid C au raportul de masă 3,863: 100,000: 596,137 (μg), acesta fiind amestecul cu efect antiproliferativ maxim asupra celulelor tumorale Hep-2 cultivate în MEM fără FBS (viabilitate 34,83%) și a fost biocompatibil cu celulele normale NCTC (viabilitate 79,59%).

PERSPECTIVE DE DEZVOLTARE

- Din studiile noastre a rezultat că metoda de izolare a hederageninului din extract etanolic din frunze de *Hedera helix* rezultat prin macerare repetată, urmată de hidroliză acidă și purificare cu acetonitril (Metoda a II-a), s-a dovedit eficientă având un randament de 9,22 % . În perspectivă aceasta metodă completată cu efectuarea unor etape eficiente de purificare a compusului izolat, poate constitui o tehnologie inovatoare de obținere a hederageninului.
- Frații de extract de iederă bogate în saponine, rezultate prin Flash-cromatografia cu detecție UV-Vis cu caracter puternic antiproliferativ, au potențialul de deveni agenți utili în terapii ale cancerului, însă pentru aceasta sunt necesare studii suplimentare specifice biologiei celulare și moleculare precum și testarea lor pe o gamă mai largă de linii celulare tumorale.
- Amestecul de saponine optimizat prin modelare matematică, constituit din α -hederin: hederagenin: hederacozid C în raportul de masă 3,863: 100,000: 596,137 (μg) stabilit cu ajutorul RSM și software-ul Design Expert 11., are efect antitumoral scontat asupra celulelor Hep-2 tumorale de cervix uman. Studiul nostru indică posibila utilizare a acestui amestec de saponine cu raportul de masa menționat, în aplicații farmacologice antitumorale.

Bibliografie selectivă:

1. P. Ovadge, A. Roma, M.Steckle, L.Nicoletti, J.T. Arnason, S. Pandey, Advances in the research and development of natural health products as pain stream cancer therapeutics evidence-based complementary and alternative medicine, Review Article, Hindawi Publishing Corporation, (2015), pp.1-12.
2. Burlando, L. Verotta, L. Cornara, E. Bottini-Massa, Herbal Principles in Cosmetics: Properties and Mechanisms of Action, CRC Press, 2010, Print ISBN: 978-1-4398-1213-6, eBook.
3. W.C. Evans, Trease and Evans Pharmacognosy (16th ed.). Elsevier Science limited, UK, 48 (2009).
4. J. Ackerfield , J. Wen, A morphometric analysis of *Hedera* L. (the ivy genus, Araliaceae) and its taxonomic implications, ADANSONIA, ser. 3, 24 (2002), pp.197-212.
5. P.A. Gleeson, M.A. Jermyn, Alteration in the composition of β -lectins caused by chemical and enzymic attack, Austral J Plant Physiol, 6 (1979), pp. 25-38.

6. S. Fazio, J. Pouso, D. Dolinsky, A. Fernandez, M. Hernandez, G. Clavier, M. Hecker, Tolerance safety and efficacy of *Hedera helix* extract in inflammatory bronchial diseases under clinical practice conditions: A prospective, open, multicentre postmarketing study in 9657 patients, *Phytomedicine*, (2006), doi 10.1016/j.phymed.2006.05.003.
7. D. Hofmann, M. Hecker, A. Vopl, Efficacy of dry extract of ivy leaves in children with bronchial asthma—A review of randomized controlled trials, *Phytomedicine*, 10 (2003), pp. 213-220.
8. H. Suleyman, V. Mshvildaze, A. Gepdiremen, R. Elias, Acute and chronic anti-inflammatory profile of the ivy plant, *Hedera helix*, in rats, *Phytomedicine*, 10 (2003), pp. 370-374.
9. R.M. Facino, M. Carini, R. Stefani, G. Aldini, L. Saibene, Anti-elastase and anti-hyaluronidase activities of saponins and sapogenins from *Hedera helix*, *Aesculus hippocastanum*, and *Ruscus aculeatus*: Factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 328 (1995), pp. 720-724.
10. S. Danloy, J. Quetin-Leclercq, P. Coucke, M.C. De Pauw-Gillet, R. Elias, G. Balansard, L. Angenot, R. Bassleer, Effects of α -hederin, a saponin extracted from *Hedera helix*, on cells cultured *in vitro*, *Planta Medica*, 60 (1994), pp. 45-49.
11. J. Liu, Y. Liu, P. Bullock, C.D. Klaassen, Suppression of liver cytochrome P450 by α -hederin: Relevance to hepatoprotection, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 134 (1995), pp. 124-131.
12. J. Liu, S. Choudhuri, Y. Liu, H. Kreppel, G.K. Andrews, C.D. Klaassen, Induction of metallothionein by α -hederin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 121 (1993), pp. 144-151.
13. C. Cioca, C. Margineanu, V. Cucu, The saponins from *Hedera helix* with antibacterial activity, *Pharmazie*, 33 (1978), pp. 609-610.
14. J. Julien, M. Gasquet, C. Maillard, P. Timon-David, Extracts of the ivy plant, *Hedera helix*, and their antihelminthic activity on liver flukes, *Planta Med*, (1985), pp. 203-205.
15. B. Majester-Savornin, R. Elias, A.M. Diaz-Lanza, G. Balansard, M. Gasquet, F. Delmas, Saponins of the ivy plant, *Hedera helix*, and their leishmanicidal activity, *Planta Med*, (1991), pp. 57-61.
16. A. Gepdiremen, V. Mshvildadze, H. Suleyman, R. Elias, Acute anti-inflammatory activity of four saponins isolated from ivy: α -hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F in carrageenan-induced rat paw edema, *Phytomedicine*, 12 (2005), pp. 440-444.
17. J. Quetin-Leclercq, R. Elias, G. Balansard, Cytotoxic activity of some triterpenoid saponins, *Planta Med*, 58(1992), pp. 279-280.
18. L. Cheng, T.S. Xia, Y.F. Wang, W. Zhou, X.Q. Liang, J.Q. Xue, L. Shi, Y. Wang, Q. Ding, M. Wang, The anticancer effect and mechanism of α -hederin on breast cancer cells, *International Journal Of Oncology*, 45 (2014), pp. 757-763.
19. N. Dias, C. Bailly, Drugs targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth, *Biochem Pharmacol*, 70 (2005), pp. 1-12.
20. J.J., Liu Lin M., J.Y. Yu, B. Liu, J.K. Bao, Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics, *Cancer Lett*, 300 (2011), pp. 105-114.

21. Q.F. Wang, J.C. Chen, S.J. Hsieh, C.C. Cheng, S.L. Hsu, Regulation of Bcl-2 family molecules and activation of caspase cascade involved in gypenosides-induced apoptosis in human hepatoma cells, *Cancer Lett*, 183 (2002), pp. 169-178.
22. J. Wang, XZ. Zhao, Q. Qi, et al., Macranthoside B, α -hederagenin, saponin extracted from *Lonicera macranthoides* and its anti-tumor activities *in vitro* and *in vivo*, *Food Chem Toxicol*, 47 (2009), pp. 1716-1721.
23. H.M. Park, S.J. Kim, J.S. Kim, H.S. Kang, Reactive oxygen species mediated ginsenoside Rg3- and Rh2-induced apoptosis in hepatoma cells through mitochondrial signaling pathways, *Food Chem Toxicol*, 50 (2012), pp. 2736-2741.
24. J. Chun, I.J. Ha, Y.S. Kim, Antiproliferative and apoptotic activities of triterpenoid saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* and their structure-activity relationships, *Planta Med.*, 79 (2013), pp. 639-645.
25. S. Mo, H. Xiong, G. Shu, et al., Phaseoloideside E, a novel natural triterpenoid saponin identified from *Entada phaseoloides*, induces apoptosis in Ec-109 esophageal cancer cells through reactive oxygen species generation, *J. Pharmacol. Sci.*, 122 (2013), pp. 163-175.
26. C.Z. Wang, X.L. Li, Q.F. Wang, S.R. Mehendale, AB. Fishbein, A.H. Han, S. Sun, C.S. Yuan The mitochondrial pathway is involved in American ginseng-induced apoptosis of SW-480 colon cancer cells, *Oncol. Rep.*, 21 (2009), pp. 577-584.
27. S.M. Swamy, B.T. Huat, Intracellular glutathione depletion and reactive oxygen species generation are important in α -hederin-induced apoptosis of P388 cells, *Mol. Cell. Biochem.*, 245 (2003), pp. 127-139.
28. S. Hiai, H. Oura, T. Hakajima, Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid, *Planta Medica*, 29 (2), (1976), pp. 116-122.
29. A. Suhaib, A. Hussien, J. Zainab, J. Awad, Isolation and characterization of triterpenoid saponin hederacoside C. present in the leaves of *Hedera helix* L. cultivated in Iraq, *Iraqi J Pharm Sci*, 23(2), (2014), pp. 33-41.
30. J.B. Harborne, *Phytochemical methods*. John Wiley & Sons, Inc. Newyork, 1973.
31. R. Tatia, C. Zălaru, I. Țârcomnicu, L. Moldovan, O. Crăciunescu, I. Călinescu, Isolation and characterization of hederagenin from *Hedera Helix* L. extract with antitumor activity, *Rev.Chim.(Bucharest)*, 70 (4), 2019, pp.1157-1161.
32. R. Tatia, A. Toma, L. Moldovan, C. Zălaru, I. Călinescu, Phytochemical and antiproliferative potential of *Hedera helix* extract fractions, *Buletin Științific U.P.B., Seria B: Chimie și Știința Materialelor*, 2020, articol în curs de publicare.
33. R. Tatia, C. Zălaru, O. Crăciunescu, L. Moldovan, A. Oancea, I. Călinescu, Optimization of triterpene saponins mixture with antiproliferative activity, *Appl. Sci.*, 9, 5160, 2019; doi:10.3390/app.9235160.

DISEMINARE REZUTATE

Articole științifice:

1. **Rodica Tatia**, Agnes Toma, Lucia Moldovan, Christina Zălaru, Ioan Călinescu, Phytochemical and antiproliferative potential of *Hedera helix* extract fractions, Buletin Științific U.P.B., Seria B: Chimie și Știința Materialelor, 2020, articol în curs de publicare (F.I. = 0,41).
2. **Rodica Tatia**, Christina Zălaru, Oana Crăciunescu, Lucia Moldovan, Anca Oancea, Ioan Călinescu, Optimization of triterpene saponins mixture with antiproliferative activity, Appl. Sci., 9, 5160, 2019; doi:10.3390/app, 9235160, (F.I. = 2,474).
3. **Rodica Tatia**, Christina Zălaru, Isabela Țârcomnicu, Lucia Moldovan, Oana Crăciunescu, Ioan Călinescu, Isolation and characterization of hederagenin from *Hedera Helix* L. extract with antitumor activity, Rev.Chim.(Bucharest), 70 (4), 2019, pp.1157-1161, (F.I. = 1,755).

Conferințe internaționale:

1. **Rodica Tatia**, Lucia Moldovan, Christina Zălaru, Isabela Țârcomnicu, Mihaela Enache, Ioan Călinescu, Antiproliferative activity evaluation of some saponine extracts from *Hedera helix*, ICGEB Workshop Modern Biotechnological Advances for Human Health – BAHH2, May 28 – 31 2019, Bucharest, Romania.
2. **Rodica Tatia**, Ioan Calinescu, Christina Zălaru, Isabela Țârcomnicu, Lucia Moldovan, *In vitro* cytotoxicity evaluation of isolated saponins from *Hedera helix* L. extract, RICCE 20th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, September 6 – 9 2017, Poiana Brașov, Romania.