



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
**GRIGORE T. POPA** IAȘI

**EVALUAREA CHIMICĂ ȘI BIOLOGICĂ A UNOR  
FRAȚIUNI EXTRACTIVE DIN SPECII DE  
ASTERACEAE ORNAMENTALE**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

Conducător doctorat,  
Prof. Univ. Dr. Monica Hăncianu

Doctorand,  
Farmacist Ana-Flavia Burlec

**2019**





UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
**GRIGORE T. POPA** IAȘI

## **Evaluarea chimică și biologică a unor fracțiuni extractive din specii de *Asteraceae* ornamentale**

### **Rezumatul tezei de doctorat**

Conducător doctorat,  
Prof. Univ. Dr. Monica Hăncianu

Doctorand,  
Farmacist Ana-Flavia Burlec

**2019**

Teza de doctorat *Evaluarea chimică și biologică a unor fracțiuni extractive din specii de Asteraceae ornamentale* conține 164 pagini, 20 tabele, 106 figuri și 355 titluri bibliografice.

Numerotarea figurilor, tabelelor și cuprinsul din cadrul rezumatului păstrează aceeași formă precum cea din teza de doctorat.

**Cuvinte cheie:** *Asteraceae*, polifenoli, flavonoide, antioxidant, citoprotector.

## CUPRINS

|                                                                                                                                                                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>MULȚUMIRI</b> .....                                                                                                                                                                                                         | iii |
| <b>ABREVIERI</b> .....                                                                                                                                                                                                         | iv  |
| <b>PARTEA GENERALĂ</b> .....                                                                                                                                                                                                   | 1   |
| <b>Capitolul I.</b> Cunoștințe și particularități botanice, fitochimice și biologice ale speciilor <i>Rudbeckia hirta</i> L., <i>Tagetes erecta</i> L. și <i>Zinnia elegans</i> Jacq.....                                      | 1   |
| I.1. Încadrarea sistematică a speciilor .....                                                                                                                                                                                  | 1   |
| I.2. <i>Rudbeckia hirta</i> L. ....                                                                                                                                                                                            | 3   |
| I.3. <i>Tagetes erecta</i> L. ....                                                                                                                                                                                             | 10  |
| I.4. <i>Zinnia elegans</i> Jacq. ....                                                                                                                                                                                          | 25  |
| <b>Capitolul II.</b> Compuși polifenolici izolați din specii de <i>Asteraceae</i> : considerații structurale și activități biologice.....                                                                                      | 33  |
| II.1. Considerații structurale .....                                                                                                                                                                                           | 34  |
| II.2. Activități biologice ale acizilor polifenolici și flavonoidelor .....                                                                                                                                                    | 37  |
| <b>PARTEA PERSONALĂ</b> .....                                                                                                                                                                                                  | 41  |
| <b>Capitolul III.</b> Obținerea materialului vegetal și analiza farmacognostică macro- și microscopică a speciilor luate în studiu ( <i>Rudbeckia hirta</i> L., <i>Tagetes erecta</i> L. și <i>Zinnia elegans</i> Jacq.) ..... | 43  |
| III.1. Cultivarea speciilor luate în studiu .....                                                                                                                                                                              | 43  |
| III.2. Analiza macroscopică a speciilor cultivate .....                                                                                                                                                                        | 45  |
| III.3. Analiza histo-anatomică a speciilor investigate .....                                                                                                                                                                   | 46  |
| III.4. Concluzii .....                                                                                                                                                                                                         | 61  |
| <b>Capitolul IV.</b> Obținerea și caracterizarea fitochimică a unor fracțiuni extractive obținute din inflorescențele speciilor <i>Rudbeckia hirta</i> L., <i>Tagetes erecta</i> L. și <i>Zinnia elegans</i> Jacq. ....        | 62  |
| IV.1. Obținerea extractelor metanolice .....                                                                                                                                                                                   | 62  |
| IV.2. Analiza fitochimică a extractelor obținute din inflorescențele speciilor <i>Rudbeckia hirta</i> L., <i>Tagetes erecta</i> L. și <i>Zinnia elegans</i> Jacq. ....                                                         | 64  |
| IV.3. Obținerea de fracțiuni selective prin utilizarea extracției în fază solidă și a cromatografiei pe coloană LH-20 .....                                                                                                    | 83  |
| IV.4. Identificarea compușilor prezenți în fracțiunile selective printr-o metodă HPLC-MS .....                                                                                                                                 | 86  |
| IV.5. Izolarea unor compuși din diverse fracțiuni selective prin utilizarea cromatografiei de tip preparativ .....                                                                                                             | 96  |

|                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| IV.6. Elucidarea structurală prin spectroscopie RMN a unor compuși izolați din extractele vegetale luate în studiu .....                                                                                                                                        | 99  |
| IV.7. Concluzii.....                                                                                                                                                                                                                                            | 112 |
| <b>Capitolul V.</b> Evaluarea acțiunii antioxidante a unor extracte și fracțiuni obținute din speciile luate în studiu ( <i>Rudbeckia hirta</i> L., <i>Tagetes erecta</i> L. și <i>Zinnia elegans</i> Jacq.) .....                                              | 113 |
| V.1. Determinarea capacității de scavenger de radicali liberi (radical DPPH) .....                                                                                                                                                                              | 114 |
| V.2. Determinarea capacității de chelatare a ionilor feroși .....                                                                                                                                                                                               | 117 |
| V.3. Determinarea capacității de inhibare a 15-lipoxigenazei .....                                                                                                                                                                                              | 121 |
| V.4. Concluzii .....                                                                                                                                                                                                                                            | 124 |
| <b>Capitolul VI.</b> Evaluarea acțiunii antimicrobiene a extractelor obținute din speciile <i>Rudbeckia hirta</i> L., <i>Tagetes erecta</i> L. și <i>Zinnia elegans</i> Jacq. ..                                                                                | 126 |
| <b>Capitolul VII.</b> Testarea citotoxicității și a capacității citoprotectoare pe culturi de celule a unor fracțiuni extractive obținute din inflorescențele speciilor <i>Rudbeckia hirta</i> L., <i>Tagetes erecta</i> L. și <i>Zinnia elegans</i> Jacq. .... | 132 |
| VII.1. Testarea citotoxicității <i>in vitro</i> a extractelor totale investigate ....                                                                                                                                                                           | 132 |
| VII.2. Evaluarea acțiunii citoprotectoare <i>in vitro</i> a extractelor totale investigate .....                                                                                                                                                                | 136 |
| VII.3. Evaluarea comparativă a citotoxicității extractului din inflorescențe de <i>Tagetes erecta</i> și a fracțiunii 4Ta 76-90 obținută din acesta .....                                                                                                       | 139 |
| VII.4. Concluzii .....                                                                                                                                                                                                                                          | 143 |
| <b>Capitolul VIII.</b> Concluzii generale. Elemente de originalitate. Perspective de cercetare .....                                                                                                                                                            | 144 |
| Concluzii generale .....                                                                                                                                                                                                                                        | 144 |
| Elemente de originalitate.....                                                                                                                                                                                                                                  | 146 |
| Perspective de cercetare .....                                                                                                                                                                                                                                  | 146 |
| <b>BIBLIOGRAFIE</b> .....                                                                                                                                                                                                                                       | 147 |

## PARTEA PERSONALĂ

### MOTIVAREA ALEGERII SUBIECTULUI TEZEI, SCOPUL ȘI OBIECTIVELE URMĂRITE

Literatura de specialitate cuprinde relativ puține date care să ateste potențialul chimic și biologic al speciilor vegetale ornamentale. Plantele medicinale au reprezentat dintotdeauna o sursă importantă de agenți terapeutici, având o multitudine de principii active cu structuri și activități biologice diferite. Astăzi, principiile active din plante și derivații acestora stau la baza a aproximativ 50% din totalul medicamentelor existente pe piață. Având în vedere constanta necesitate a descoperirii unor noi remedii pentru afecțiunile existente precum maladia canceroasă, bolile inflamatorii și, în general, cele asociate stresului oxidativ, dar și bolile infecțioase, tot mai mulți cercetători se îndreaptă, în prezent, spre regnul vegetal în ideea găsirii unor noi substanțe și tratamente eficiente în diverse patologii sau în vederea confirmării științifice a unor acțiuni observate în medicina tradițională (2, 257).

În cadrul cercetării doctorale de față, ne-am propus să evaluăm câteva specii ornamentale bogate în diverse principii active, asupra cărora nu au fost efectuate suficiente studii referitoare la compoziția chimică și la posibilele întrebuințări terapeutice, precum specii din genurile *Rudbeckia*, *Tagetes* și *Zinnia*, toate aparținând familiei *Asteraceae*. Ținând cont de faptul că speciile din aceste genuri sunt cultivate, în primul rând pentru rolul ornamental, se remarcă lipsa studiilor fitochimice, biologice și toxicologice asupra unor fracțiuni extractive obținute din acestea, mai ales în cazul speciilor *Rudbeckia hirta* L. și *Zinnia elegans* Jacq. Doar specia *Tagetes erecta* L. este în prezent cultivată și pentru inflorescențele sale, care permit extracția în cantități apreciabile a compușilor carotenoidici (66).

În consecință, apreciem ca fiind de interes realizarea unor analize preliminare în ceea ce privește conținutul în anumite principii active, precum acizii polifenolcarboxilici și flavonoidele prezente în cele trei specii, urmată de testarea unor acțiuni biologice pentru fracțiunile bogate în astfel de compuși polifenolici ca și realizarea unor corelații între rezultatele obținute.

În acest sens, scopul acestei teze de doctorat constă în evaluarea din punct de vedere chimic și biologic a unor extracte totale și a unor fracțiuni selective obținute din inflorescențele speciilor luate în studiu, în vederea confirmării, în special, a prezenței reprezentanților clasei polifenolilor, precum și a cuantificării acestora în produsul vegetal. Astfel de compuși pot fi asociați cu o serie de efecte benefice asupra organismului uman, de aceea studiul de față are ca menire investigarea, în special, a acțiunilor antioxidantă, antimicrobiană și citoprotectoare.

Obiectivele concrete ale prezentei teze de doctorat cuprind realizarea unor tipuri de extracte de origine vegetală cu potențial terapeutic, pe care le vom analiza din punct de vedere al randamentului de obținere, compoziției chimice și al potențialului biologic. În acest scop, în cercetarea noastră ne-am orientat către trei specii ornamentale originare din zona Americii de Nord (*Rudbeckia hirta* L., *Tagetes erecta* L. și *Zinnia elegans* Jacq.), dar care sunt în prezent cultivate pe scară largă și la noi în țară ca plante de grădină sau pentru amenajare peisagistică. Acestea prezintă, totodată, și o serie de utilizări în medicina tradițională, așa cum a fost descris în primul capitol al părții generale.

Merită menționat că cercetările complexe desfășurate pe aceste specii în cadrul studiului doctoral de față reprezintă elemente de noutate, având în vedere faptul că cel puțin pentru speciile *Rudbeckia hirta* L. și *Zinnia elegans* Jacq. există foarte puține studii referitoare la compoziția chimică a diverselor organe ale plantei sau la evaluarea potențialului bioactiv al unor extracte realizate din acestea, care să includă și corelații între compoziția chimică și acțiunile biologice demonstrate. În plus, literatura de specialitate include puține referințe pentru aceste specii de plante, fapt ce



deschide posibilitatea publicării de articole într-un domeniu interesant și relativ puțin studiat.

În acest context, obiectivele specifice ale cercetării de față au constat în:

- evidențierea unor caractere morfologice și histo-anatomice specifice produsului vegetal recoltat de la fiecare specie inclusă în studiu (*Rudbeckia hirta* L., *Tagetes erecta* L. și *Zinnia elegans* Jacq.), care să poată permite deosebirea acestora;
- obținerea unor extracte și a unor fracțiuni extractive selective, ce ar putea prezenta efecte biologice importante;
- realizarea studiului fitochimic al claselor de principii active existente în o serie de extracte și fracțiuni selective, prin metode de analiză combinate, urmărind prezența unor compuși reprezentativi din punct de vedere calitativ și cantitativ;
- evaluarea potențialului biologic *in vitro* al extractelor totale și al unor fracțiuni obținute din acestea, din punct de vedere al activităților antioxidante, antimicrobiene și citoprotectoare, în corelație cu prezența anumitor clase de compuși chimici;
- testarea farmacotoxicologică *in vitro* și, implicit, determinarea citotoxicității extractelor totale.

### **Capitolul III. Obținerea materialului vegetal și analiza farmacognostică macro- și microscopică a speciilor luate în studiu (*Rudbeckia hirta* L., *Tagetes erecta* L. și *Zinnia elegans* Jacq.)**

#### **III.1. Cultivarea speciilor luate în studiu**

Datorită solului fertil și a irigației zilnice, în primele două luni de vegetație s-a obținut o cantitate de inflorescențe mult mai mare decât cea preconizată. Astfel, din specia *Rudbeckia hirta* L. au fost recoltate 26,900 kg, din care, după uscare, au rămas 7,520 kg, adică un procent de 27,95%, pierzând prin uscare apă în proporție de 72,05%.

Inflorescențele speciei *Tagetes erecta* au pierdut prin uscare apă în proporție de aproximativ 80%, în timp ce inflorescențele speciei *Zinnia elegans* au pierdut peste 70% din masa inițială. Din specia *Tagetes erecta* au fost recoltate 26,300 kg inflorescențe, în urma uscării rezultând 5,400 kg, ceea ce reprezintă 20,53% din masa florală inițială.

Din ultima specie inclusă în studiu, *Zinnia elegans*, au fost recoltate 29,700 kg, din care a rămas o cantitate de 8,500 kg în urma uscării, ceea ce reprezintă un procent de 28,60% din masa inițială.

#### **III.2. Analiza macroscopică a speciilor cultivate**

În cazul speciei *Rudbeckia hirta*, tulpina este semi-erectă, acoperită de peri, cu o înălțime cuprinsă între 50 și 100 cm, cu frunze pubescente, opuse la bază și alterne în partea de sus, oval-lanceolate, cu marginea întreagă. Florile ligulate sunt de culoare galbenă sau galben-portocalie, iar cele tubuloase sunt de culoare brună, alcătuind un con central. Inflorescența formată este de tip capitul, fiind specifică familiei *Asteraceae*, și are un diametru cuprins între 7 și 14 cm. Planta nu prezintă miros. Notabilă este prezența numeroasă a perilor pe suprafața întregii plante.

Pentru specia *Tagetes erecta*, s-a observat prezența unei tulpini erecte, glabre, cu o înălțime cuprinsă între 50 și 80 cm. Frunzele alterne sau opuse prezintă culoare verde-închis, fiind penat-sectate, cu foliole lanceolate, denticulate. Inflorescențele de tip capitul prezintă flori marginale galbene sau portocalii, în timp ce florile tubuloase sunt mici, așezate central și prezintă culoare galbenă sau portocalie. Diametrul inflorescenței variază între 5 și 10 cm. Planta este aromată, prezentând un miros caracteristic, plăcut.

Specia *Zinnia elegans* (sin. *Zinnia violacea*) prezintă o tulpină cilindrică, erectă, simplă sau bifurcat ramificată, care prezintă o înălțime ce variază între 40 și 100 cm. Fiecare ramificație prezintă o singură inflorescență. Frunzele întregi și sesile sunt situate opus și prezintă vârf ascuțit, având o formă care variază de la triunghiulară la ovată. Inflorescența este formată din flori marginale, ligulate, de culoare violacee, roșie, galbenă sau albă și flori centrale, tubuloase. Diametrul inflorescenței este cuprins între 7 și 12 cm. Planta prezintă un miros foarte slab, particular.

### **III.3. Analiza histo-anatomică a speciilor investigate**

#### ***Rudbeckia hirta***

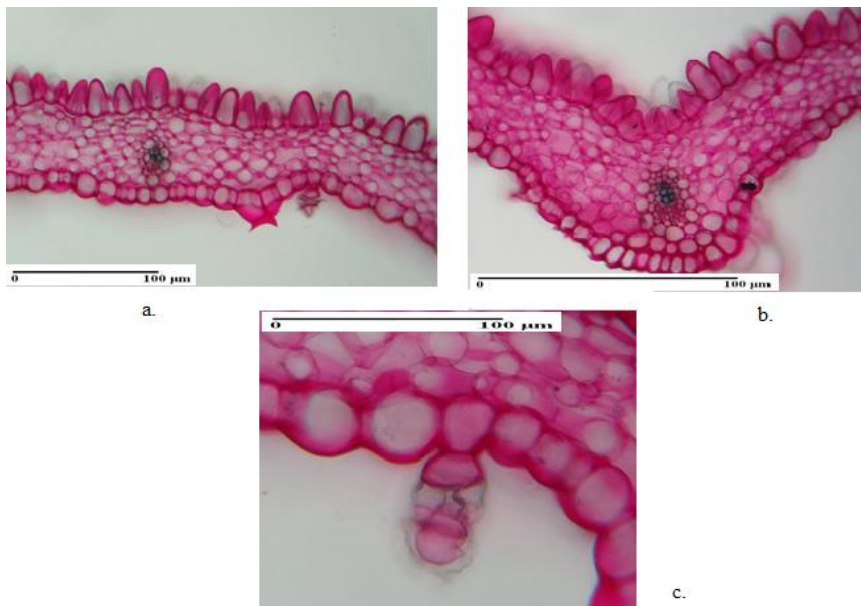
Structura anatomică a limbului foliar este bifacială ecvifacială, cu țesut palisadic sub ambele epiderme: două straturi la fața adaxială și 1-2 straturi la fața abaxială. Ambele epiderme au celule izodiametrice de mărimi diferite, întotdeauna mai mari la fața superioară a limbului.

La nivelul epidermei se află două categorii de peri: unii tectori, lungi, cu vârful obtuz sau ascuțit, cu celula bazală veziculiformă și alții foarte scurți, secretori.

La microscopul electronic de baleiaj se observă că perii tectori pluricelulari sunt mai numeroși pe marginea limbului foliar și prezintă o structură particulară, având o celulă bazală foarte mare, veziculiformă, o celulă de tranziție mai subțire și una terminală

foarte lungă cu vârful ascuțit sau obtuz. Perii secretori sunt foarte scurți.

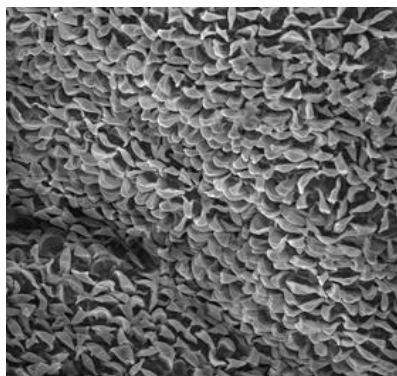
Epiderma superioară a corolei ligulate este formată din celule secretoare papiliforme, adesea de formă conică, cu toți pereții ușor îngroșați. Pe alocuri aceste celule secretoare sunt separate de celule mai mici, izodiametrice (figura III.12).



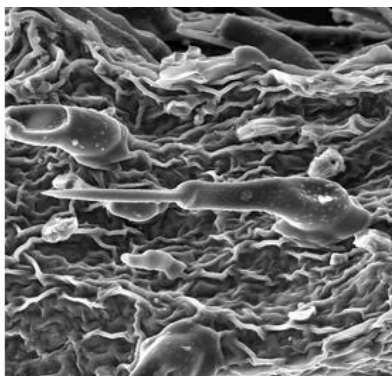
**Figura III.12.** Secțiune transversală prin ligula de *Rudbeckia hirta*: a. imagine de ansamblu, b. nervură mediană, c. păr secretor

La nivelul epidermei inferioare, sunt vizibili peri tectori unicelulari sau bicelulari, relativ scurți și peri secretori scurți, pluricelulari, adesea biseriați, cu glanda unicelulară acoperită de o cuticulă vizibil depărtată.

Folosind microscopul electronic, se observă la nivelul epidermei inferioare aceiași peri tectori foarte lungi, cu partea bazală mult mai groasă decât cea terminală. Perii secretori sunt mult mai scurți și foarte rari, cu glandă sferică (figura III.13).



a.



b.

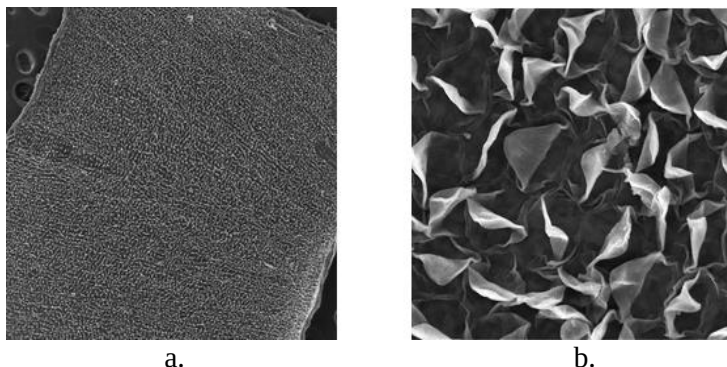
**Figura III.13.** Epiderma ligulei de *Rudbeckia hirta*, văzută de față: a. epiderma superioară cu celule papiliforme, b. epiderma inferioară cu peritectori și secretori

### ***Tagetes erecta***

Structura anatomică a limbului foliar este de tip bifacial heterofacial, cu țesut palisadic la fața superioară, uni- sau bistratificat, cu celule lungi, ocupând 50% din grosimea organului. Țesutul lacunos este pluristratificat, cu celule parenchimatică separate de spații relativ mici.

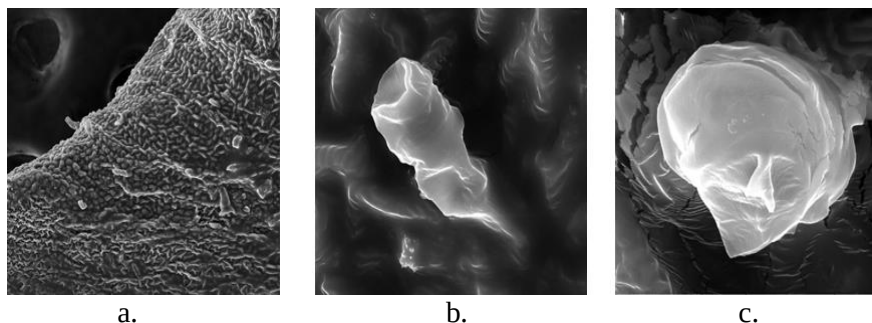
Ambele epiderme sunt formate din celule de mărime diferită, cele mai multe fiind izodiametrice, toate acoperite de un perete exterior gros. La nivelul lor se află stomate, ele fiind mai numeroase la nivelul epidermei inferioare. Perii tectori sunt rari, lungi, uni- sau pluricelulari, uniseriați.

În ceea ce privește floarea ligulată de *Tagetes erecta*, secțiunea transversală prin petală are formă de bandă de grosime diferită, cu nervura mediană ușor proeminentă la fața inferioară. Epiderma superioară este papiliformă, cu toate celulele secretoare de formă conică, având vârful rotunjit și câte un nucleu vizibil în partea bazală (figura III.20). Epiderma inferioară are celule mari, izodiametrice sau alungite radier, de mărime diferită, toate cu pereții interni și, mai ales, externi puternic îngroșați.



**Figura III.20.** Epiderma superioară a ligulei de *Tagetes erecta* văzută de față: a. imagine de ansamblu, b. detaliu celule papiliforme

La microscopul electronic se observă că la nivelul epidermei inferioare sunt prezenți peri tectori relativ lungi și peri secretori scurți, pluricelulari (figura III.21).



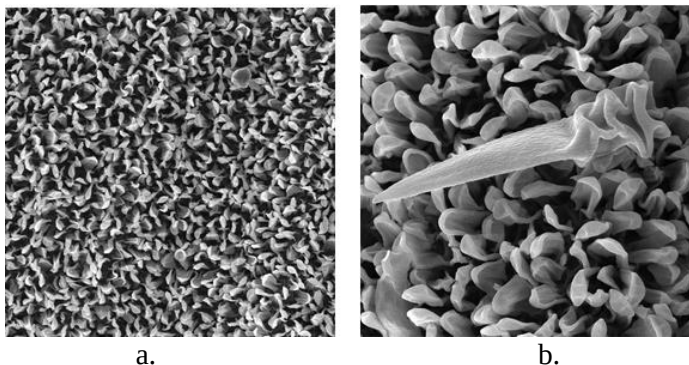
**Figura III.21.** Epiderma inferioară a ligulei de *Tagetes erecta* văzută de față: a. imagine de ansamblu, b. păr tector, c. păr secretor

### ***Zinnia elegans***

Nervura mediană proemină vizibil la fața inferioară a limbului foliar, iar în țesutul ei fundamental, parenchimatic, incolor, se observă un fascicul conducător mare, de tip colateral. La nivelul ambelor epiderme sunt prezente stomate. La microscopul electronic de baleiaj se observă pe suprafața limbului peri tectori relativ lungi,

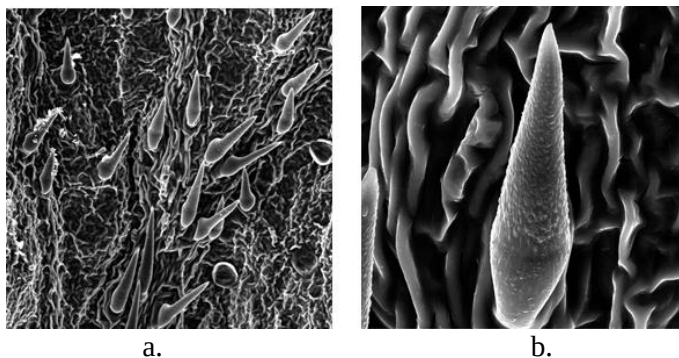
adesea bicelulari, aculeiformi, cu vârful ascuțit și peri secretori foarte scurți, pluricelulari.

Floarea ligulată are zona mediană ușor proeminentă la fața inferioară, aici observându-se un fascicul conducător de tip colateral. Epiderma superioară este papiliformă, cu celule secretoare de formă conică (figura III.28).



**Figura III.28.** Epiderma superioară a ligulei de *Zinnia elegans*, văzută de față: a. celule papiliforme, b. păr

Epiderma inferioară are celule izodiametrice, cu peretele exterior ușor îngroșat (figura III.29). Din loc în loc, se observă peri tectori relativ lungi, cu baza veziculiformă și vârful ascuțit și peri secretori, foarte scurți, pluricelulari.



**Figura III.29.** Epiderma inferioară a ligulei de *Zinnia elegans*, văzută de față: a. imagine de ansamblu, b. păr tector cu ornamentații

## **Capitolul IV. Obținerea și caracterizarea fitochimică a unor fracțiuni extractive obținute din inflorescențele speciilor *Rudbeckia hirta* L., *Tagetes erecta* L. și *Zinnia elegans* Jacq.**

### **IV.1. Obținerea extractelor metanolice**

În vederea evaluării extractibilității, s-a calculat raportul dintre masa produsului vegetal uscat și mărunțit folosit pentru obținerea extractelor și masa extractului uscat obținut în urma evaporării solventului, raport cunoscut și sub denumirea de raport drog-extract (DER) (273, 274). Valorile DER calculate pentru cele trei extracte metanolice uscate sunt prezentate în tabelul IV.1.

**Tabel IV.1.** Valorile DER ale extractelor obținute

| <b>Codificare</b> | <b>Tip de extract</b>                    | <b>DER</b> |
|-------------------|------------------------------------------|------------|
| 4R                | extract metanolic <i>Rudbeckia hirta</i> | 10:0,9033  |
| 4Ta               | extract metanolic <i>Tagetes erecta</i>  | 10:2,4922  |
| 4Z                | extract metanolic <i>Zinnia elegans</i>  | 10:0,8649  |

Cantitatea cea mai mare de extract a fost obținută din specia *Tagetes erecta*, în timp ce cel mai scăzut randament de extracție a fost observat în cazul extractului metanolic uscat obținut din inflorescențele speciei *Zinnia elegans*.

### **IV.2. Analiza fitochimică a extractelor obținute din inflorescențele speciilor *Rudbeckia hirta* L., *Tagetes erecta* L. și *Zinnia elegans* Jacq.**

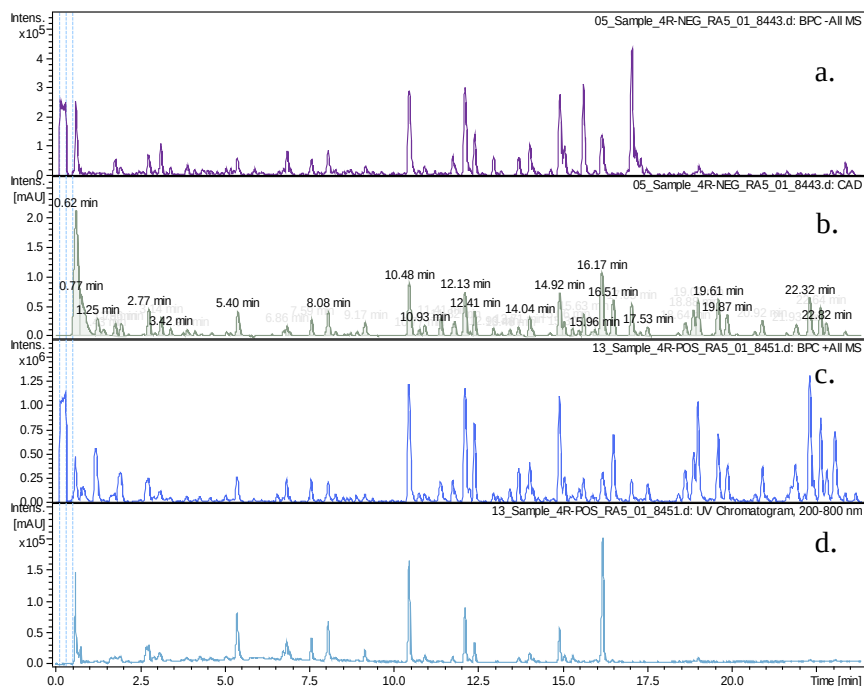
#### **IV.2.1. Analiza calitativă a compușilor prezenți în extractele metanolice printr-o metodă UHPLC-MS**

Pentru specia *Rudbeckia hirta* au fost puși în evidență peste 25 de compuși, între aceștia numărându-se: o serie de aminoacizi (fenilalanină, triptofan), acizi mono- și diacilclorogenici, precum și



o serie de flavonoide, în special sub formă de glicozide ale patuletinei, eupalitinei, cvercetolului, cvercetagetinei, dar și sub formă de aglicon (eupatolitină), doar o parte dintre aceștia fiind descriși anterior în literatura de specialitate (32, 34).

Cromatogramele obținute pentru ionizarea în mod pozitiv, în mod negativ, precum și cele date de detectorul UV-Vis și de CAD în cazul extractului metanolic total din inflorescențele speciei *Rudbeckia hirta* pot fi observate în figura IV.2.



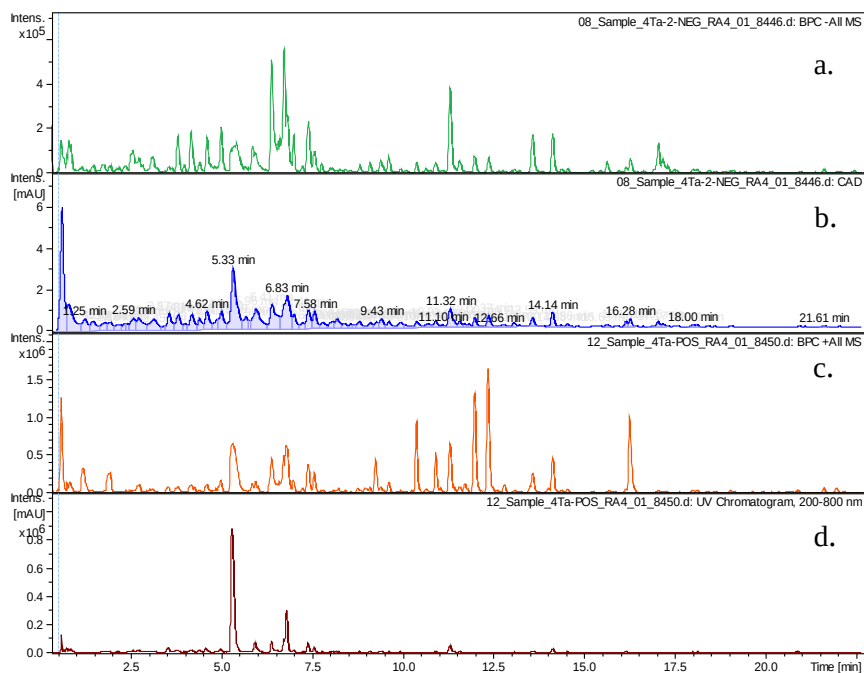
**Figura IV.2.** Cromatogramele obținute (dectecție prin: a. ionizare în mod negativ, b. CAD, c. ionizare în mod pozitiv, d. UV-Vis) pentru extractul metanolic din inflorescențele speciei *Rudbeckia hirta*

Pentru specia *Tagetes erecta*, au fost puși în evidență peste 50 de compuși, între aceștia numărându-se: o serie de aminoacizi (fenilalanină, triptofan), derivați ai acidului galic, ai acidului chinic, ai acidului siringic și ai acidului elagic, acizi mono- și

diacilclorogenici, precum și o serie de flavonoide, în special sub formă de glicozide ale cvercetagetinei, cvercetolului, kaempferolului, patuletinei, dar s-a putut pune în evidență și prezența unor agliconi, precum cvercetol, kaempferol, patuletină, isoramnetină și axilarină.

Rezultatele obținute sunt în acord cu datele din literatură, pentru această specie fiind deja pusă în evidență prezența unor compuși precum cvercetagetină și derivați ai acesteia, acid siringic (85), cvercetol, kaempferol (86), acid elagic (291) și acid galic sau derivații săi (83).

Cromatogramele obținute în cazul ionizării în mod pozitiv, în mod negativ, precum și cele date de detectorul UV-Vis și de CAD pentru extractul metanolic total din inflorescențele speciei *Tagetes erecta* pot fi observate în figura IV.3.

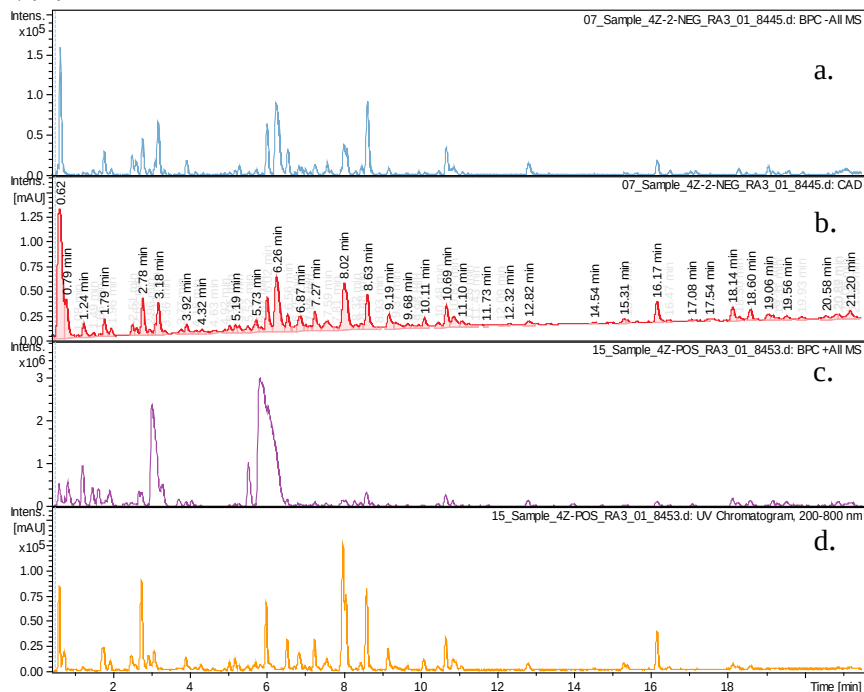


**Figura IV.3.** Cromatogramele obținute (dectecție prin: a. ionizare în mod negativ, b. CAD, c. ionizare în mod pozitiv, d. UV-Vis) pentru extractul metanolic din inflorescențele speciei *Tagetes erecta*

În ceea ce privește specia *Zinnia elegans*, au fost puși în evidență peste 50 de compuși, între aceștia numărându-se: o serie de aminoacizi (fenilalanină, triptofan, (izo)leucină), alcaloizi derivați de guanidină (acid plantagoguanidinic, plumbagin B și izomeri ai acestuia), derivați ai acidului galic, acizi mono- și diacilclorogenici, precum și o serie de flavonoide, în special sub formă de glicozide ale kaempferolului, cvercitolului, apigeninei și resokaempferolului.

Rezultatele obținute sunt în acord cu datele existente în literatură referitoare, pentru extractele obținute din inflorescențele acestei specii fiind anterior pusă în evidență prezența unor compuși precum kaempferol, apigenină și glicozide ale acestora (153).

Cromatogramele obținute în cazul extractului metanolic total din inflorescențele speciei *Zinnia elegans* pot fi observate în figura IV.4.



**Figura IV.4.** Cromatogramele obținute (dectecție prin: a. ionizare în mod negativ, b. CAD, c. ionizare în mod pozitiv, d. UV-Vis) pentru extractul metanolic din inflorescențele speciei *Zinnia elegans*

## IV.2.2. Determinarea cantitativă a unor clase de compuși prezente în extractele metanolice

### IV.2.2.1. Determinare cantitativă a polifenolilor totali

În urma analizei rezultatelor obținute, se observă că cea mai mare cantitate de polifenoli este prezentă în extractul metanolic obținut din inflorescențele speciei *Tagetes erecta* ( $263,1667 \pm 1,7095$  mg GAE/ g extract uscat), cantitatea cea mai redusă regăsindu-se în extractul obținut din inflorescențele speciei *Rudbeckia hirta* (tabel IV.7).

**Tabel IV.7.** Conținutul în polifenoli totali și flavonoide din extractele metanolice ale celor trei specii luate în studiu (medie $\pm$ deviație standard)

| Probă | Polifenoli totali<br>(mg GAE/ g extract uscat) | Flavonoide totale<br>(mg QE/ g extract uscat) |
|-------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 4R    | 72,5433 $\pm$ 2,1334                           | 61,6333 $\pm$ 1,5694                          |
| 4Ta   | 263,1667 $\pm$ 1,7095                          | 218,2466 $\pm$ 1,5723                         |
| 4Z    | 136,1400 $\pm$ 1,5878                          | 269,978 $\pm$ 1,2140                          |

### IV.2.2.2 Determinarea cantitativă a flavonoidelor totale

În ceea ce privește conținutul în flavonoide totale, se observă că extractul metanolic obținut din inflorescențele speciei *Zinnia elegans* conține cea mai importantă cantitate ( $269,978 \pm 1,2140$  mg QE/ g extract uscat), urmat de extractul obținut din specia *Tagetes erecta* și, în final, de cel obținut din specia *Rudbeckia hirta*.

## IV.3. Obținerea de fracțiuni selective prin utilizarea extracției în fază solidă și a cromatografiei pe coloană LH-20

Pentru fiecare extract metanolic, în urma aplicării extracției în fază solidă, s-au obținut 5 fracțiuni (codificate A, B, C, D și E). Frațiunea B (fracțiune extractivă obținută cu MeOH 85%), care este

considerată cea mai valoroasă din punct de vedere al prezenței compușilor polifenolici, a fost mai apoi supusă cromatografiei pe coloană Sephadex LH-20.

În cazul speciei *Rudbeckia hirta*, s-au obținut 8 fracțiuni prin reunirea eluatelor care corespund anumitor semnale de pe cromatogramă: 4R 18-26, 4R 27-35, 4R 36-40, 4R 41-47, 4R 48-55, 4R 56-59, 4R 60-74 și 4R 75-87.

În cazul speciei *Tagetes erecta*, în urma analizei peak-urilor observate, s-au obținut 4 fracțiuni reprezentative, prin reunirea eluatelor care corespund anumitor semnale de pe cromatogramă: 4Ta 16-33, 4Ta 34-49, 4Ta 63-75 și 4Ta 76-90.

Pentru specia *Zinnia elegans*, s-au obținut 5 fracțiuni prin reunirea eluatelor care corespund anumitor semnale de pe cromatogramă: 4Z 15-35, 4Z 36-49, 4Z 50-54, 4Z 55-69 și 4Z 70-82.

#### **IV.4. Identificarea compușilor prezenți în fracțiunile selective printr-o metodă HPLC-MS**

Prima fracțiune separată din extractul obținut din inflorescențele speciei *Rudbeckia hirta*, 4R 18-26, conține doi compuși majoritari, un acid trihidroxi-octadecadienoic (acid 9,10,11-trihidroxi-octadeca-12,15-dienoic sau acid 9,12,13-trihidroxi-10,15-octadecadienoic) cu  $m/z = 327.2$  (valoare măsurată în modul de ionizare negativ) și un acid trihidroxi-octadecenoic ( $m/z = 329.0$ ), structurile stabilite pentru aceștia reprezentând tentative de identificare pe baza rapoartelor de masă și a tipului de fragmentare. Așa cum era de așteptat, fracțiunea 4R 27-35 prezintă o compoziție calitativă similară primei fracțiuni și conține, ca și aceasta, un acid trihidroxi-octadecadienoic (acid 9,10,11-trihidroxi-octadeca-12,15-dienoic sau acid 9,12,13-trihidroxi-10,15-octadecadienoic) cu  $m/z = 327.3$  și un acid trihidroxi-octadecenoic ( $m/z = 329.6$ ).

Fracțiunea 4R 36-40 conține fenilalanină ca și compus majoritar, care are un timp de retenție de 1.96 min și  $m/z = 163.0$ , în timp ce următoarea fracțiune separată, codificată 4R 41-47, diferă

semnificativ ca și compoziție, aceasta conținând, în special, acid chinic ( $m/z = 190.9$ ), eupalitin-glucozidă ( $m/z = 490.9$ ) și acetil-eupatolin ( $m/z = 532.7$ ).

Fracțiunea 4R 48-55 conține trei compuși majoritari, ușor de observat pe cromatograma obținută în urma ionizării în mod negativ: eupatolitin-3-glucozidă ( $m/z = 506.8$ ), eupatolin ( $m/z = 490.7$ ) și acetil-eupatolin ( $m/z = 532.9$ ).

Fracțiunea 4R 56-69 conține o serie de metaboliți secundari precum cianidin-3-glucozidă ( $m/z = 448.7$ ), eupatolitin-3-glucozidă ( $m/z = 507.1$ ) și eupatolin ( $m/z = 490.7$ ), având o compoziție similară cu fracțiunea anterioară.

Compușii majoritari identificați în fracțiunea 4R 60-74 sunt, în ordinea timpului de retenție, izocverceto ( $m/z = 463.0$ ), patuletin-glucozidă ( $m/z = 492.9$ ) și acid clorogenic ( $m/z = 353.1$ ).

Ultima fracțiune separată, 4R 75-87, prezintă, ca și constituenți principali, cvercetagitrină ( $m/z = 478.8$ ) și helicrisozidă ( $m/z = 609.0$ ). Structurile propuse pentru acești compuși au fost stabilite pe baza rapoartelor  $m/z$  și a modului de fragmentare. Cu toate acestea, pentru identificarea certă a acestora este necesară realizarea mai multor analize de structură (spectroscopie RMN, IR).

O serie de metaboliți prezenți în extractul metanolic total obținut din inflorescențe de *Tagetes erecta* au putut fi identificați și în fracțiunile LH-20 obținute.

Fracțiunea 4Ta 16-33 conține compuși precum acidul siringic ( $m/z = 197.1$ ) și derivați ai acestuia, precum acid siringic-(dihidroxi-trimetoxi-acid benzoic)-hexozidă cu  $m/z = 568.7$ .

Fracțiunea 4Ta 34-49 conține, ca și constituenți majoritari, derivați ai acidului siringic, precum hexozida acidului di-siringic ( $m/z = 539.1$ ;  $m/z = 538.7$ ), în timp ce fracțiunea 4Ta 63-75 conține digaloil-hexozidă ( $m/z = 482.5$ ), o hexozidă a acidului elagic ( $m/z = 462.9$ ), o hexozidă a cvercetagetinei ( $m/z = 478.7$ ) și cverceto ( $m/z = 300.9$ ).

Ultima fracțiune separată (4Ta 76-90) prezintă un singur compus majoritar, o hexozidă a cvercetagetinei, cvercetagitrina, cu  $m/z = 478.7$ . Gradul avansat de puritate al fracțiunii separate a permis

realizarea analizelor de spectroscopie RMN, fără a exista necesitatea realizării unor purificări suplimentare.

Metaboliții identificați în extractul metanolic total obținut din inflorescențele speciei *Zinnia elegans* s-au regăsit și în fracțiunile LH-20. Astfel, fracțiunea 4Z 15-35 conține, ca și compuși majori, doi alcaloizi guanidinici (plumbagin B și acid plantagoguanidinic) cu  $m/z = 222.1$ , respectiv  $m/z = 224.0$ , valori măsurate în modul de ionizare negativ.

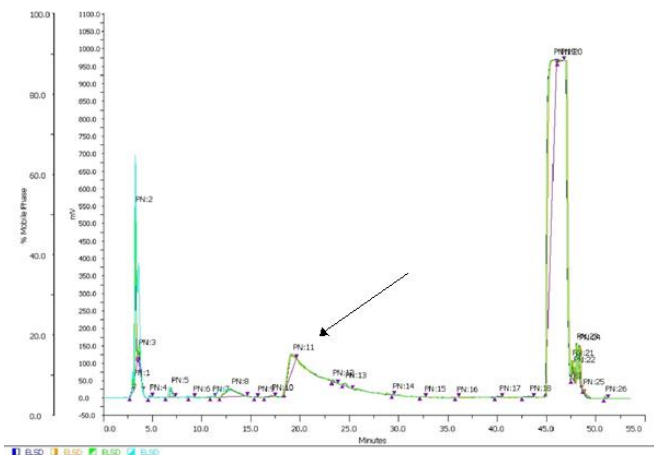
Cea de-a doua fracțiune, 4Z 36-49, conține, în special, acizi monoacilclorogenici (3-CQA, 5-CQA, 4-CQA, 5-*p*CoQA), dar și glicozide ale kaempferolului, precum kaempferol 3-*O*-beta-D-glucuropiranozil-(1>2) beta-D-glucopiranozidă cu  $m/z = 622.9$ .

În fracțiunea 4Z 50-54 se regăsesc următorii compuși majoritari: acid cafeic, clovamidă și flavonoide sub formă de glicozide, precum kaempferol 3-*O*-(pentoil-hexoză) ( $m/z = 578.8$ ), apigenină-7-*O*-dihexozidă ( $m/z = 592.6$ ) și resokaempferol 3-*O*-hexozidă ( $m/z = 430.8$ ).

Fracțiunea 4Z 55-69 conține cvercitol 3-*O*-hexozidă ( $m/z = 462.8$ ), acizi diacilclorogenici, resokaempferol 3-*O*-hexozidă ( $m/z = 430.9$ ), în timp ce ultima fracțiune conține kaempferol-3-*O*-hexozidă ( $m/z = 446.7$ ), acizi diacilclorogenici ( $m/z = 514.8$ ) și apigenină ( $m/z = 268.9$ ).

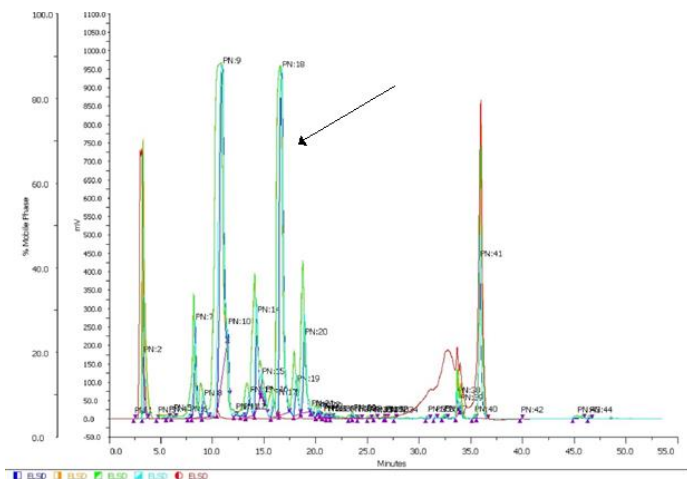
#### **IV.5. Izolarea unor compuși din diverse fracțiuni selective prin utilizarea cromatografiei de tip preparativ**

Deși, pentru fracțiunea 4Z 15-35 au fost colectate două subfracțiuni (peak min. 13 și peak min. 20), din considerente cantitative, doar una din acestea, care prezintă peak în jurul minutului 20, a fost mai apoi supusă analizelor de spectroscopie RMN. Forma peak-ului de la min. 20 indică prezența unui compus cu azot, ținând cont de lărgirea bazei spre final (figura IV.28).



**Figura IV.28.** Cromatograma obținută pentru fracțiunea 4Z 15-35, peak de interes (min. 20) supus ulterior analizelor de spectroscopie RMN

Pentru fracțiunea 4Z 36-49, deși au fost colectate trei subfracțiuni (peak min. 10, peak min. 17 și peak min. 35), din considerente cantitative, doar una din acestea, observată în jurul minutului 17, a fost mai apoi supusă analizelor de spectroscopie RMN (figura IV.29).

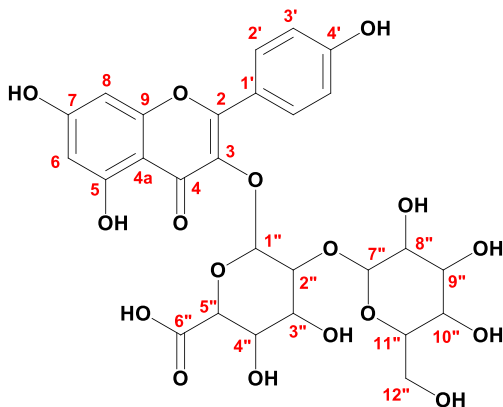


**Figura IV.29.** Cromatogramă obținută pentru fracțiunea 4Z 36-49, peak de interes (min. 17) supus ulterior analizelor de spectroscopie RMN



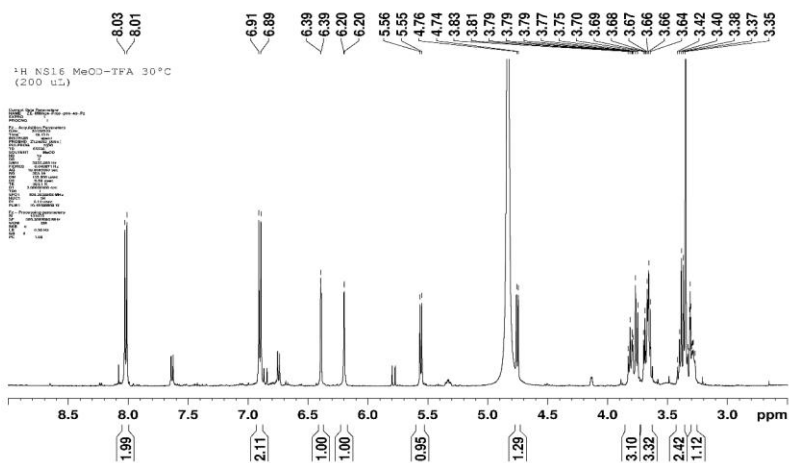
#### IV.6. Elucidarea structurală prin spectroscopie RMN a unor compuși izolați din extractele vegetale luate în studiu

Compusul FR85-P2 a fost purificat prin tehnici cromatografice de tip preparativ din fracțiunea 4Z 36-49, obținută anterior din extractul metanolic din inflorescențe de *Zinnia elegans*. Folosind informațiile din spectrele RMN uni- și bidimensionale, coroborate cu cele din spectrometria de masă, a fost propusă următoarea structură pentru compusul FR85-P2, cu denumirea de kaempferol 3-O-[β-glucopiranozil-(1→2)-β-glucuronopiranozidă] (figura IV.30).

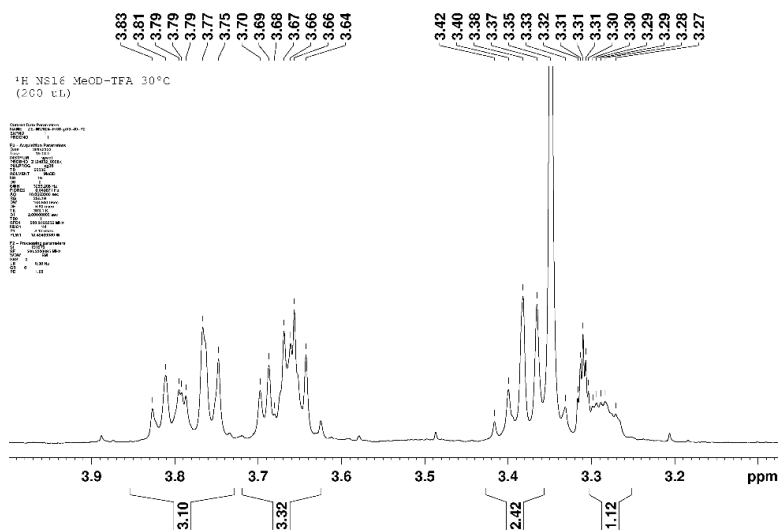


**Figura IV.30.** Structura propusă pentru compusul FR85-P2

Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN corespunzător compusului FR85-P2 este prezentat în figurile IV.31 și IV.32. Din acest tip de spectru se obțin informații despre deplasarea chimică, structura multipletelor, constante de cuplaj și integrale pentru toți protonii prezenți în probă. Toate aceste informații sunt esențiale pentru determinarea structurii chimice corespunzătoare compușilor individuali izolați din plante.



**Figura IV.31.** Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN corespunzător compusului FR85-P2, înregistrat în MeOD cu acid trifluoroacetic (TFA)



**Figura IV.32.** Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN corespunzător compusului FR85-P2, fereastra spectrală 3-4 ppm

Profilul spectral obținut indică prezența unui nucleu aromatic *para*-substituit (semnale caracteristice în intervalul 6.5-8.5 ppm), a unei legături duble sau heteroaromatie (semnale caracteristice în intervalul 5.5-6.0 ppm) și a unui rest de mono- sau dizaharidă. Semnalele sub formă de dublet de la 4.7 și 5.5 ppm sunt caracteristice protonilor anomerici din zaharide. Protonul H-1 din  $\beta$ -glucoză apare la 4.7 ppm, iar protonul H-1 din acidul glucuronic apare la 5.5 ppm. Semnalele corespunzătoare grupelor hidroxil nu mai sunt vizibile în spectrul  $^1\text{H}$ -RMN, ele unindu-se cu semnalul acidului trifluoroacetic. În tabelul IV.8 sunt prezentate atribuțiile semnalelor din spectrul  $^1\text{H}$ -RMN.

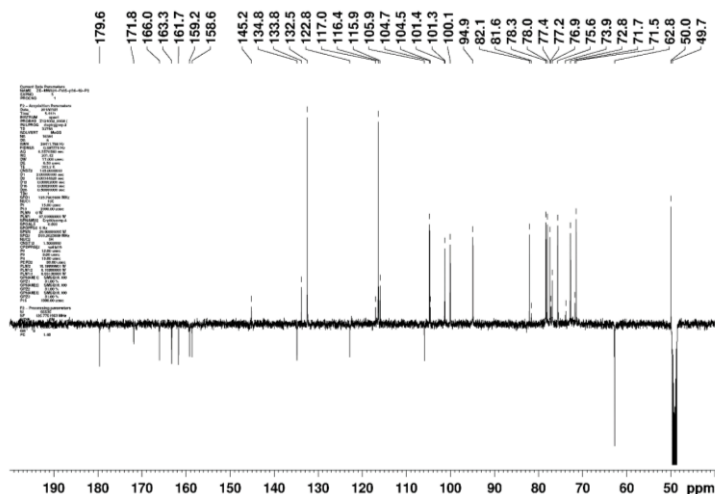
**Tabel IV.8.** Caracteristicile spectrele corespunzătoare compusului FR85-P2

| Proton                       | Deplasare chimică [ppm] | Forma semnalului | Constanta de cuplaj [Hz] |
|------------------------------|-------------------------|------------------|--------------------------|
| H-11''                       | 3.27-3.30               | multiplet        | -                        |
| H-8'', H-9'' și H-10''       | 3.33-3.41               | multiplet        | -                        |
| H-3'', H-4' și 1H din H-12'' | 3.64-3.70               | multiplet        | -                        |
| H-6'' și 1H din H-12''       | 3.74-3.80               | multiplet        |                          |
| H-2''                        | 3.81                    | triplet          | 8.0                      |
| H-7''                        | 4.75                    | dublet           | 7.4                      |
| H-1''                        | 5.56                    | dublet           | 7.4                      |
| H-6                          | 6.19                    | dublet           | 1.6                      |
| H-8                          | 6.39                    | dublet           | 1.7                      |
| H-3'                         | 6.90                    | dublet           | 8.9                      |
| H-2'                         | 8.02                    | dublet           | 8.8                      |

În figura IV.33 este prezentat spectrul de carbon editat, versiunea DEPTQ (Distorsionless enhancement by polarization transfer including the detection of quaternary nuclei), corespunzător compusului FR85-P2. În acest tip de experiment, semnalele corespunzătoare atomilor de carbon sunt diferențiate în funcție de numărul de protoni atașați astfel: grupele  $\text{CH}_3$  și  $\text{CH}$  sunt indicate de obicei cu fază pozitivă, iar grupele  $\text{CH}_2$  și  $\text{C}$  cu fază negativă.

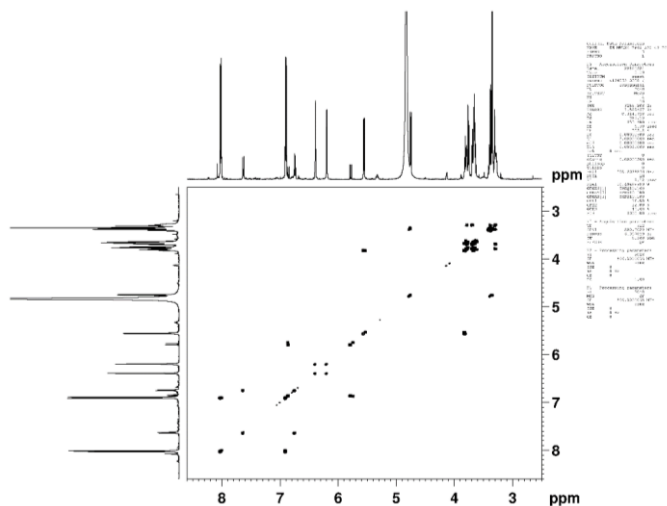
Spre deosebire de spectrul  $^1\text{H}$ -RMN, în spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN toate semnalele au formă de singlet, cuplajele care dau multiplicitatea fiind eliminate în timpul înregistrării experimentului, prin decuplare de proton.

Atribuirea exactă a semnalelor a fost obținută din spectrele de corelație bidimensionale: 62.8 ( $\text{CH}_2$ -12''), 71.5 ( $\text{CH}$ -10''), 72.8 ( $\text{CH}$ -4''), 75.6 ( $\text{CH}$ -8''), 76.9 ( $\text{CH}$ -5''), 77.4 ( $\text{CH}$ -3''), 78.0 ( $\text{CH}$ -9''), 78.3 ( $\text{CH}$ -11''), 82.1 ( $\text{CH}$ -2''), 94.9 ( $\text{CH}$ -8), 100.1 ( $\text{CH}$ -6), 101.2 ( $\text{CH}$ -1''), 104.7 ( $\text{CH}$ -7''), 105.9 (C-4a), 116.4 ( $\text{CH}$ -3'), 122.8 (C-1'), 132.5 ( $\text{CH}$ -2'), 134.8 (C-3), 158.6 (C-9), 159.1 (C-2), 161.7 (C-4'), 163.2 (C-5), 166.0 (C-7), 179.6 (C-4).



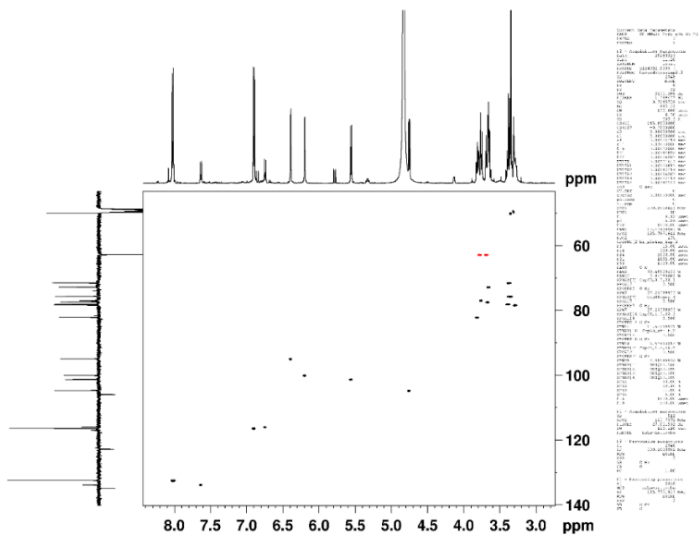
**Figura IV.33.** Spectrul  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ-RMN corespunzător compusului FR85-P2, înregistrat în MeOD cu TFA

Pentru atribuirea exactă a semnalelor din spectrele unidimensionale s-au folosit informații obținute din spectre de corelație bidimensionale. Unul dintre experimentele folosite este COSY (Correlation spectroscopy), spectru de corelație homonuclear din care se obțin informații despre cuplajele protonilor vicinali și geminali. Spectrul COSY corespunzător compusului FR85-P2 este prezentat în figura IV.36.



**Figura IV.36.** Spectrul COSY corespunzător compusului FR85-P2

Spectrul HSQC corespunzător compusului FR85-P2 este prezentat în figura IV.38. Pe axele spectrului bidimensional se află spectrele unidimensionale  $^1\text{H}$ -RMN și  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ-RMN.

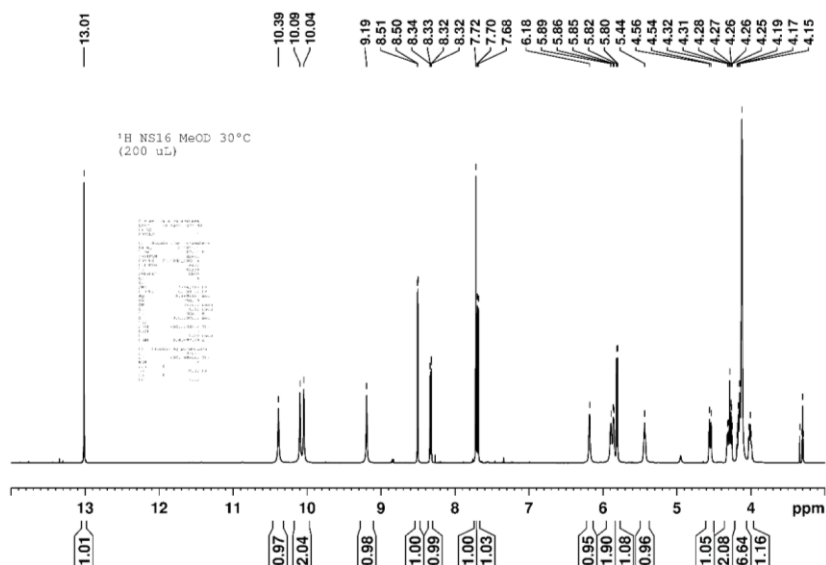


**Figura IV.38.** Spectrul HSQC corespunzător compusului FR85-P2

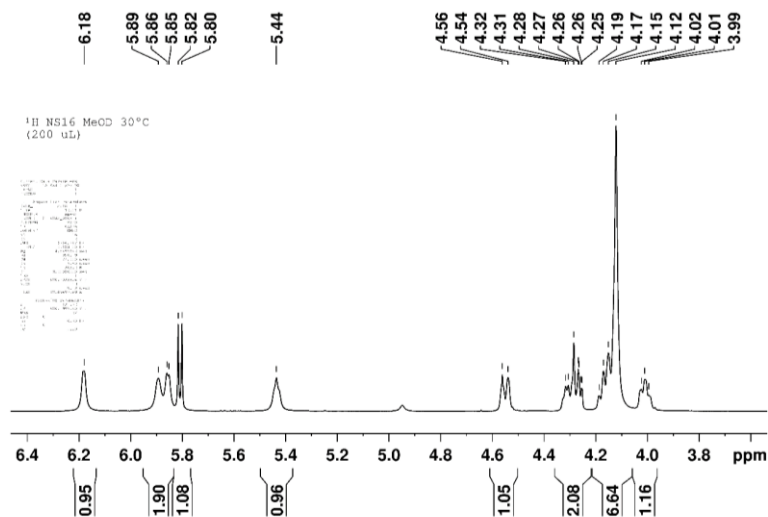


În spectrul de proton, prezentat în figurile IV.42-IV.44, acest compus prezintă semnale caracteristice în intervalul 3.8-6.5 ppm pentru inelul glicozidic și 7.5-10.5 ppm pentru unitatea cvercetagetină.

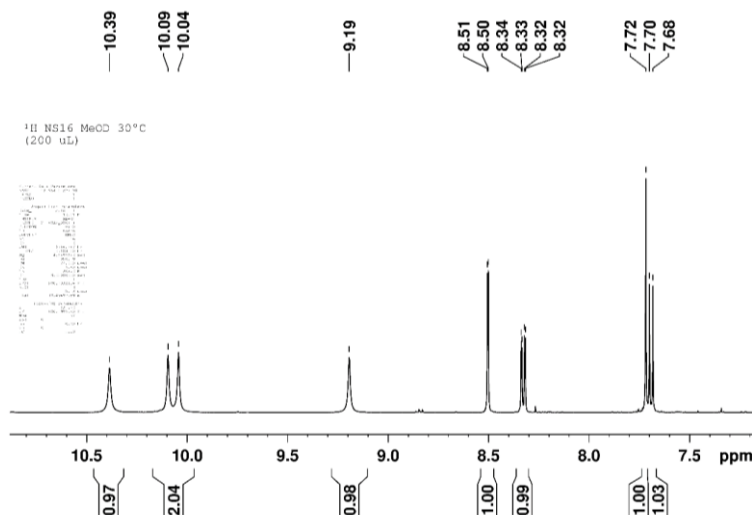
Atribuțiile semnalelor sunt: 4.01 (1H, t, H-4), 4.12-4.18 (2H, m, H-2 și H-3), 4.25-4.31 (2H, m, H-6 și H-5), 4.55 (1H, d, H-6), 5.43 (t, OH-6), 5.80 (1H, d, H-1), 5.86 (1H, d, OH-4), 5.89 (1H, bs, OH-3), 6.18 (1H, bs, OH-2), 7.70 (1H, d, H-3'), 7.72 (1H, s, H-8'), 8.33 (1H, dd, H-2'), 8.50 (1H, d, H-6'), 9.20 (1H, s, OH-6), 10.04 (1H, s, OH-5'), 10.10 (1H, s, OH-3), 10.38 (1H, s, OH-4'), 13.01 (1H, s, OH-5).



**Figura IV.42.** Spectrul <sup>1</sup>H-RMN corespunzător compusului din fracțiunea 4Ta 76-90, înregistrat în MeOD cu TFA



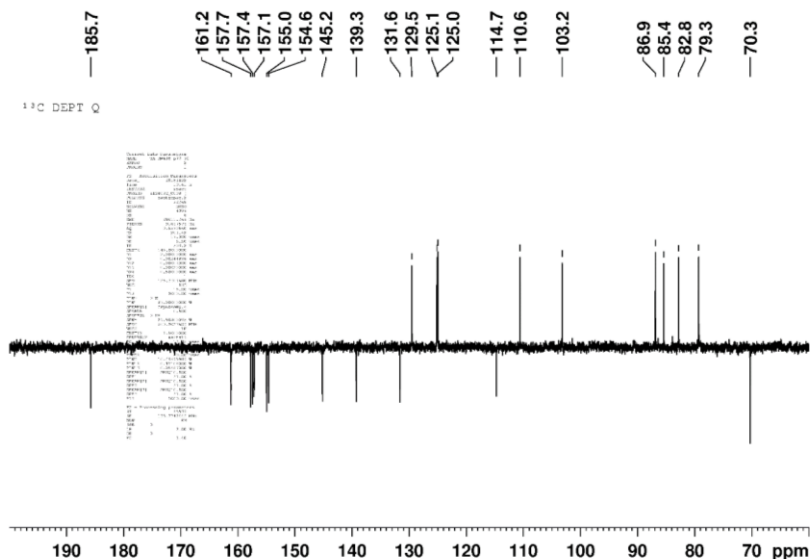
**Figura IV.43.** Spectrul <sup>1</sup>H-RMN corespunzător compusului din fracțiunea 4Ta 76-90, înregistrat în MeOD cu TFA, fereastra spectrală 3.8-6.4 ppm



**Figura IV.44.** Spectrul <sup>1</sup>H-RMN corespunzător compusului din fracțiunea 4Ta 76-90, înregistrat în MeOD cu TFA, fereastra spectrală 7.5-10.5 ppm



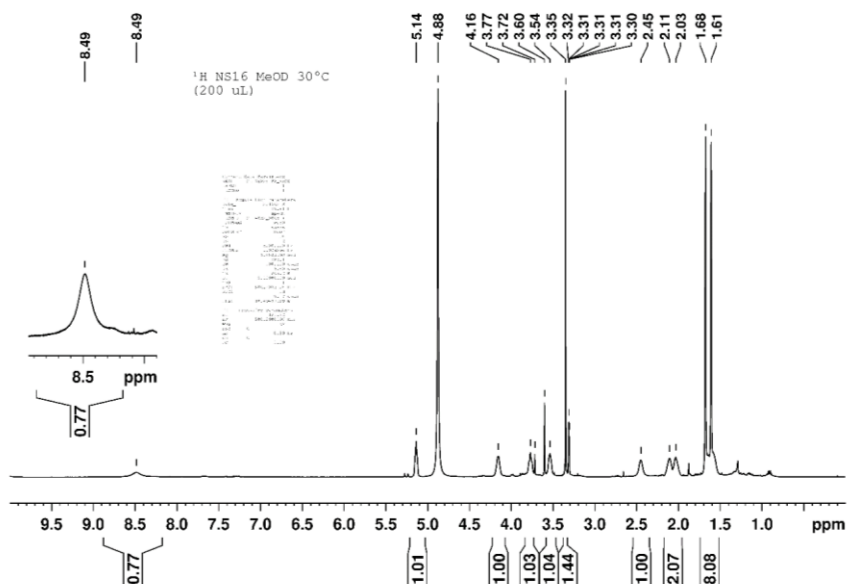
Numărul de semnale și valorile deplasărilor chimice din spectrul DEPTQ (figura IV.45) confirmă prezența cvercetagitrinei. Atribuțiile semnalelor sunt: 70.3 (CH<sub>2</sub>-6), 79.3 (CH-4), 82.8 (CH-2), 85.4 (CH-3), 86.9 (CH-5), 103.2 (CH-8), 110.6 (CH-1), 114.7 (C-4a), 125.0 (CH-6'), 125.1 (CH-3'), 129.5 (CH-2'), 131.6 (C-1'), 139.3 (C-6), 145.2 (C-3), 154.6 (C-5'), 155.0 (C-5), 157.1 (C-2), 157.4 (C-4'), 157.7 (C-9), 161.2 (C-7), 186.7 (CO).



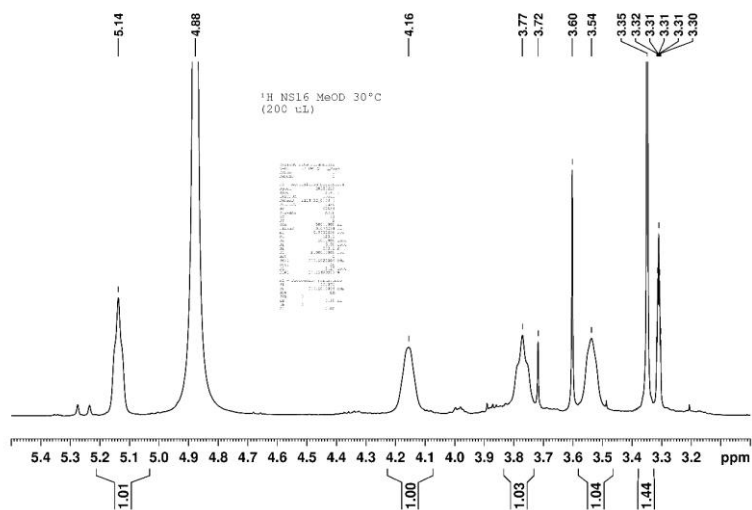
**Figura IV.45.** Spectrul <sup>13</sup>C-DEPTQ-RMN corespunzător compusului din fracțiunea 4Ta 76-90, înregistrat în MeOD cu TFA

Un alt compus (MW-225) supus analizelor RMN a fost anterior purificat din fracțiunea 4Z 15-35, obținută din extractul metanolic din inflorescențe de *Zinnia elegans* în urma aplicării extracției în fază solidă și a cromatografiei de tip preparativ, fiind pusă în evidență astfel prezența acidului plantagoganidinic (305). Spectrele de proton și carbon sunt ilustrate în figurile IV.46-IV.48.

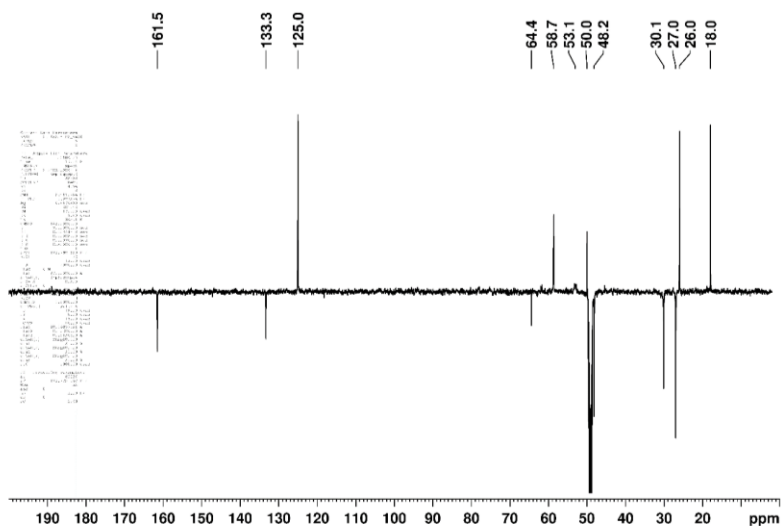
Atribuirea semnalelor în spectrele  $^1\text{H}$  și  $^{13}\text{C}$ -RMN este următoarea:  $^1\text{H}$  RMN: 1.61 (3H, s, H-7), 1.68 (3H, s, H-8), 1.60-1.67 (2H, m, H-3), 2.03 (1H, m, H-4b), 2.10 (1H, m, H-4a), 2.45 (1H, m, H-2), 3.54 (1H, m, H-5'b), 3.77 (1H, t,  $J = 9.5$  Hz, H-5'a), 4.16 (1H, m, H-4'), 5.14 (1H, t,  $J = 6.9$  Hz, H-5), 8.48 (OH).  $^{13}\text{C}$  RMN: 18.0 ( $\text{CH}_3$ -7), 26.0 ( $\text{CH}_3$ -8), 27.0 ( $\text{CH}_2$ -4), 30.1 ( $\text{CH}_2$ -3), 48.2 ( $\text{CH}_2$ -5'), 53.1 ( $\text{CH}$ -2), 58.5 ( $\text{CH}$ -4'), 125.0 ( $\text{CH}$ -5), 133.3 (C-6), 161.5 (C-2'), 181.0 (C-1).



**Figura IV.46.** Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN corespunzător compusului MW-225, înregistrat în MeOD cu TFA, fereastra spectrală 3.8-6.4 ppm



**Figura IV.47.** Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN corespunzător compusului MW-225, înregistrat în MeOD cu TFA, fereastra spectrală 3.0-5.5 ppm



**Figura IV.48.** Spectrul  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ-RMN corespunzător compusului MW-225, înregistrat în MeOD cu TFA

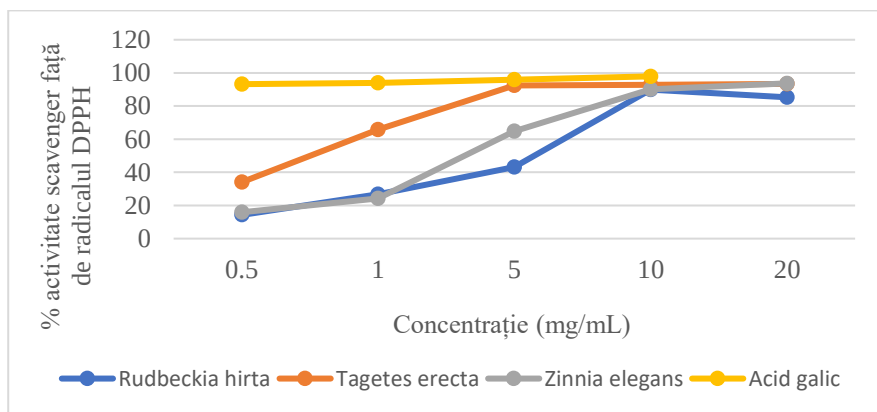
## Capitolul V. Evaluarea acțiunii antioxidante a unor extracte și fracțiuni obținute din speciile luate în studiu (*Rudbeckia hirta* L., *Tagetes erecta* L. și *Zinnia elegans* Jacq.)

### V.1. Determinarea capacității de scavenger de radicali liberi (radical DPPH)

Rezultatele testului indică faptul că toate cele trei extracte prezintă potențial de scavenger față de radicalul DPPH, chiar și la concentrații reduse (5 mg/mL).

Ținând cont de datele obținute în cadrul acestui test, se observă că acțiunea antioxidantă demonstrată prin acest mecanism este direct proporțională cu cantitatea de extract/etalon luată în lucru. Mai mult, pentru extractele metanolice ale speciilor care prezintă cea mai mare cantitate de polifenoli totali (*Tagetes erecta*) și flavonoide totale (*Zinnia elegans*) s-au obținut valori bune ale activității de scavenger.

În vederea realizării facile a unei comparații între rezultatele obținute pentru probe și etalon, intensitatea acțiunii antioxidante a extractelor în domeniul de concentrație 0,5 - 20 mg/mL este ilustrată comparativ cu cea a etalonului, în figura V.1.



**Figura V.1.** Capacitatea de scavenger față de radicalul DPPH determinată pentru extractele testate și pentru acidul galic

În scopul evidențierii diferențelor de intensitate ale activității între extractele analizate și etalon s-a realizat și calcularea concentrației eficace 50. O valoare scăzută a acesteia indică o capacitate antioxidantă bună. Se observă astfel că cea mai importantă activitate antioxidantă prin acest mecanism de testare o prezintă extractul metanolic obținut din inflorescențele speciei *Tagetes erecta*, pentru care se observă o activitate scavenger față de radicalul DPPH mai mare de 50% începând cu o concentrație de 1 mg/mL și pentru care  $CE_{50} = 11,80 \pm 0,09$  (tabel V.2). O promițătoare capacitate de scavenger față de radicalul DPPH se observă și în cazul speciei *Zinnia elegans*, în timp ce pentru *Rudbeckia hirta* se remarcă o activitate mai slabă.

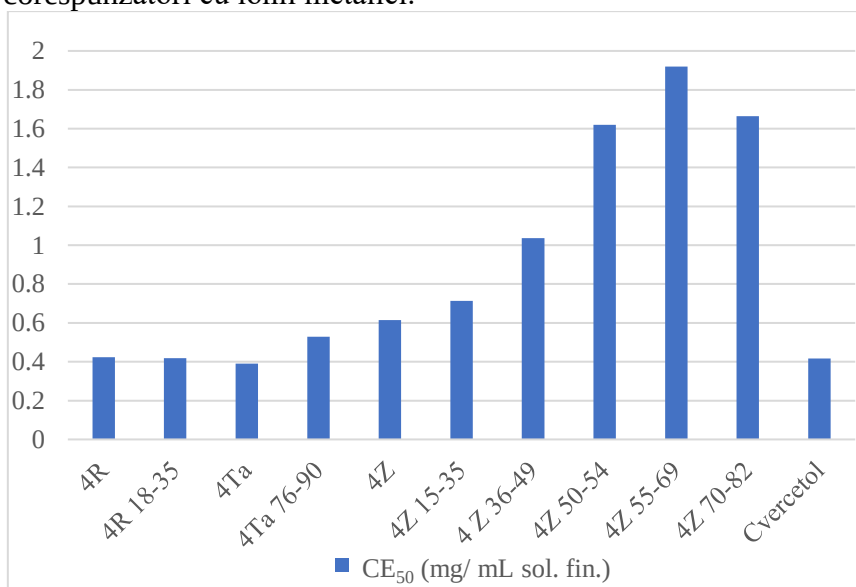
**Tabel V.2.** Valorile  $CE_{50}$  obținute în cadrul testării activității scavenger față de radicalul DPPH pentru extractele metanolice și pentru etalon

|                                                                           | Proba            |                  |                  |                  |
|---------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                                                           | 4R               | 4Ta              | 4Z               | Acid galic       |
| <b><math>CE_{50}</math><br/>(<math>\mu\text{g/mL sol. finală}</math>)</b> | 92,25 $\pm$ 0,44 | 11,80 $\pm$ 0,09 | 46,38 $\pm$ 1,26 | 1,584 $\pm$ 0,02 |

## V.2. Determinarea capacității de chelatare a ionilor feroși

Rezultatele obținute indică, în general, o activitate chelatantă mai bună pentru cele trei extracte metanolice în comparație cu fracțiunile obținute din acestea, cu excepția fracțiunii obținute din extractul metanolic din inflorescențe de *Rudbeckia hirta* (4R 18-35), pentru care s-au obținut valori similare ale  $CE_{50}$ . Rezultatele pot fi justificate de existența mai multor compuși polifenolici precum taninurile în extractul total, care sporesc numărul de grupări hidroxil libere care pot forma complecși cu ionii feroși. În funcție de potența observată pentru cele trei extracte, speciile pot fi ordonate crescător după cum urmează: *Zinnia elegans*, *Rudbeckia hirta* și *Tagetes erecta*.

Extractul total obținut din specia *Tagetes erecta* a prezentat cea mai scăzută valoare a  $CE_{50}$ , aceasta fiind mai redusă și în comparație cu cea a cvercetolului, care a fost folosit ca etalon. Acest extract a prezentat cel mai mare total polifenolic dintre cele trei extracte testate, fapt ce poate justifica rezultatul obținut. În plus, specia este recunoscută pentru prezența carotenoidelor în cantități ridicate, compuși ce pot contribui la efectul antioxidant demonstrat prin mecanismul de chelatare a ionilor feroși (332). Cu toate acestea, în cazul speciei *Zinnia elegans*, pentru care s-a pus în evidență cea mai mare cantitate de flavonoide, nu există o corelație directă între concentrația în astfel de substanțe și activitatea demonstrată în cadrul acestui test. Acest lucru ar putea fi explicat prin faptul că o serie de grupări hidroxil sunt legate de structuri glucidice sau de alte tipuri de grupări și astfel nu pot participa la formarea complexilor corespunzători cu ionii metalici.

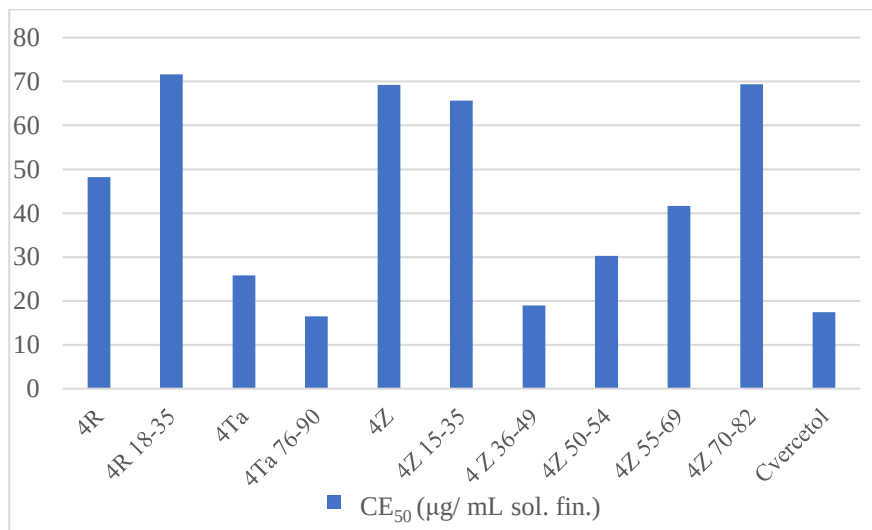


**Figura V.2.** Reprezentarea grafică a valorilor  $CE_{50}$  obținute pentru extractele inițiale și pentru o serie de fracțiuni în cadrul testului de chelatare a fierului

### V.3. Determinarea capacității de inhibare a 15-lipoxigenazei

În urma analizei rezultatelor, se poate observa că diversele metode de separare aplicate extractelor totale sunt utile pentru obținerea de fracțiuni cu capacitate antioxidantă sporită, cu excepția speciei *Rudbeckia hirta*. Comparând valorile  $CE_{50}$  obținute pentru cele trei extracte inițiale, se poate observa că intensitatea acțiunii antioxidante prin acest mecanism de acțiune descrește în ordinea  $4Ta > 4R > 4Z$ . Astfel, poate fi realizată o dată în plus corelația dintre totalul polifenolic și acțiunea antioxidantă demonstrată prin mecanismul de față, mai ales pentru specia *Tagetes erecta*.

Dintre probele testate, cele mai scăzute valori ale  $CE_{50}$  se remarcă pentru fracțiunea 4Ta 76-90, care conține predominant cvercetagitrină, valoarea sa fiind mai scăzută și decât cea obținută pentru martorul pozitiv, și pentru fracțiunea 4Z 36-49, care conține acizi clorogenici și glicozide ale kaempferolului (figura V.3).



**Figura V.3.** Reprezentarea grafică a valorilor  $CE_{50}$  obținute la evaluarea capacității de inhibare a 15-LOX a extractelor metanolice și a unor fracțiuni separate din acestea

## Capitolul VI. Evaluarea acțiunii antimicrobiene a extractelor obținute din speciile *Rudbeckia hirta* L., *Tagetes erecta* L. și *Zinnia elegans* Jacq.

Diametrele zonelor de inhibiție (în mm) corespunzătoare celor trei extracte vegetale testate și standardelor folosite sunt prezentate în tabelul VI.1. Valorile CMI și CMB sunt afișate în tabelul VI.2.

**Tabel VI.1.** Acțiunile antibacteriană și antifungică a extractelor testate

| Extract vegetal/<br>Martor/<br>Standard | Diametrul zonelor de inhibiție (mm)        |                                       |                                             |                                       |                                           |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|
|                                         | <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 25923 | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25922 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853 | <i>Candida albicans</i><br>ATCC 90028 | <i>Candida parapsilosis</i><br>ATCC 22019 |
| 4R                                      | 16,0±0,00                                  | 10,0±0,00                             | 10,0±0,00                                   | 15,0±0,00                             | 17,0±0,00                                 |
| 4Ta                                     | 15,3±0,57                                  | 11,0±0,00                             | 0                                           | 19,0±0,00                             | 17,0±0,00                                 |
| 4Z                                      | 13,0±0,00                                  | 0                                     | 11,0±0,00                                   | *NT                                   | 13,0±0,00                                 |
| DMSO                                    | 0                                          | 0                                     | 0                                           | 0                                     | 0                                         |
| Ciprofloxacină                          | 28,7±0,06                                  | 36,5±0,50                             | 31,5±0,50                                   | *NT                                   | *NT                                       |
| Fluconazol                              | *NT                                        | *NT                                   | *NT                                         | 30,5±0,50                             | 21,0±0,00                                 |
| Nistatină                               | *NT                                        | *NT                                   | *NT                                         | 23,5±0,50                             | 20,0±0,00                                 |

\*NT – netestat

**Tabel VI.2.** Valorile CMI și CMB ale extractelor din *Rudbeckia hirta* și *Tagetes erecta*

| Extract vegetal/<br>Standard | <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 25923 |                | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25922 |                |
|------------------------------|--------------------------------------------|----------------|---------------------------------------|----------------|
|                              | CMI<br>(mg/mL)                             | CMB<br>(mg/mL) | CMI<br>(mg/mL)                        | CMB<br>(mg/mL) |
| 4R                           | 0,25                                       | 0,5            | 0,25                                  | >0,5           |
| 4Ta                          | 0,125                                      | 0,5            | 0,25                                  | 0,5            |
| Ciprofloxacină               | 1*                                         | 1*             | 1*                                    | 2*             |

\* valorile sunt exprimate în µg/mL

Referitor la acțiunea manifestată asupra bacteriei Gram pozitive, extractul metanolic obținut din specia *Rudbeckia hirta* (4R), s-a dovedit a fi cel mai activ, având o bună capacitate de



inhibare a creșterii bacteriene (16,0 mm). Față de bacteriile Gram negative, extractul a prezentat o acțiune moderată de inhibare a creșterii acestora (10,0 mm). Totodată, același extract a prezentat o bună acțiune antifungică, cu o activitate notabilă asupra speciei *Candida parapsilosis* (17,0 mm), similară cu cea observată pentru standardele folosite (20,0 mm pentru nistatină, respectiv 21,0 mm pentru fluconazol). Toate extractele luate în lucru au prezentat o acțiune antifungică bună.

În ceea ce privește evaluarea extractului din specia *Tagetes erecta* (4Ta), se observă că acesta prezintă cea mai bună activitate antifungică din toate cele trei extracte testate, având potențialul de a inhiba creșterea speciilor *Candida albicans* și *Candida parapsilosis* asemănător cu cel al nistatinei. Extractul prezintă acțiune de inhibare a tulpinilor *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*, dar nu prezintă activitate antibacteriană asupra *Pseudomonas aeruginosa*.

Rezultatele obținute pentru specia *Zinnia elegans* indică faptul că extractul metanolic prezintă capacitate de inhibare a unor tulpini bacteriene și fungice, această acțiune fiind însă mai slabă în comparație cu celelalte două specii testate. Acțiunea antibacteriană pare a fi mai bună pe bacterii Gram pozitive decât pe cele Gram negative.

În ceea ce privește determinarea valorilor CMI și CMB, se observă, în general, că valorile CMB sunt de 2-4 ori mai mari decât cele pentru CMI, dar mult mai ridicate decât cele date de standardul folosit, ciprofloxacina, indicând astfel o potență relativ scăzută în comparație cu acesta.

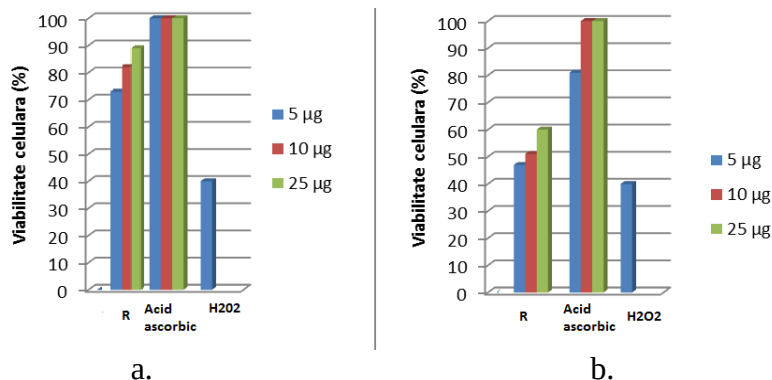
## Capitolul VII. Testarea citotoxicității și a capacității citoprotectoare pe culturi de celule a unor fracțiuni extractive obținute din inflorescențele speciilor *Rudbeckia hirta* L., *Tagetes erecta* L. și *Zinnia elegans* Jacq.

### VII.1. Testarea citotoxicității *in vitro* a extractelor totale investigate

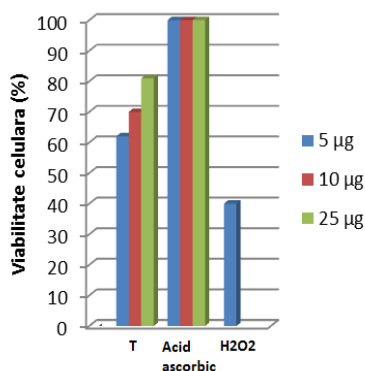
În cadrul acestui experiment nu s-au evidențiat efecte citotoxice semnificative asupra liniei celulare sănătoase de fibroblaste murine NIH3T3 pentru niciuna din probele testate, valorile  $CI_{50}$  fiind cuprinse între  $64,71 \pm 3,22$  și  $91,91 \pm 2,92$   $\mu\text{g/mL}$ , doze dificil de realizat *in vivo*.

### VII.2. Evaluarea acțiunii citoprotectoare *in vitro* a extractelor totale investigate

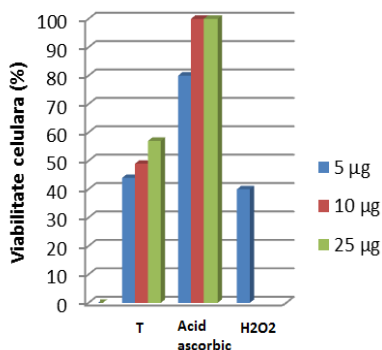
Rezultatele testelor de viabilitate celulară în condiții de stres oxidativ pentru cele trei extracte testate sunt redată în figurile VII.5-VII.7.



**Figura VII.5.** Efectul citoprotector al extractului obținut de la specia *Rudbeckia hirta* asupra liniei celulare NIH3T3: a. pretratament timp de 24h înainte de aplicarea  $\text{H}_2\text{O}_2$ , b. pretratament 60 min. înainte de aplicarea  $\text{H}_2\text{O}_2$

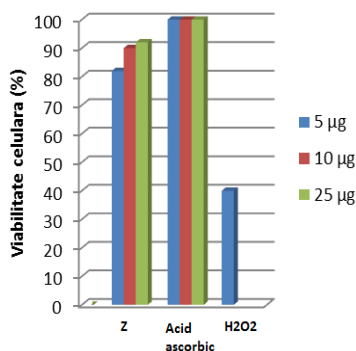


a.

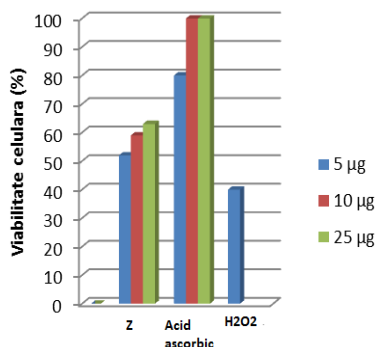


b.

**Figura VII.6.** Efectul citoprotector al extractului obținut de la specia *Tagetes erecta* asupra liniei celulare NIH3T3: a. pretratament timp de 24h înainte de aplicarea H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; b. pretratament 60 min. înainte de aplicarea H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



a.



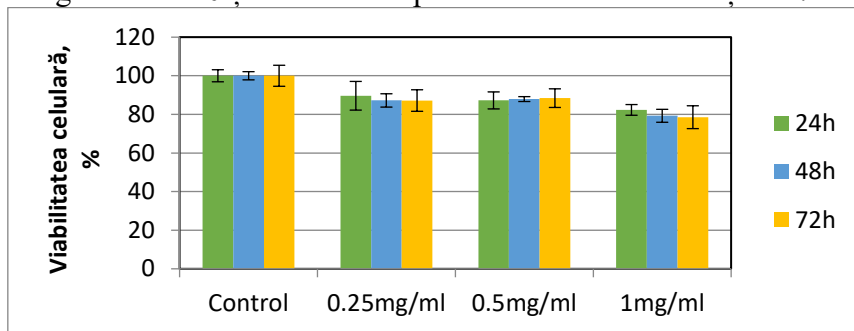
b.

**Figura VII.7.** Efectul citoprotector al extractului obținut de la specia *Zinnia elegans* asupra liniei celulare NIH3T3: a. pretratament timp de 24h înainte de aplicarea H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, b. pretratament 60 min. înainte de aplicarea H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

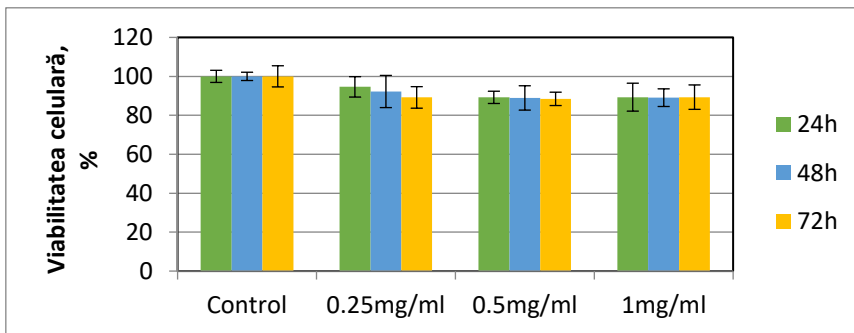
Se poate observa că în cazul pretratamentului prelungit (24 h), celulele au dezvoltat reacții de protecție față de stresul oxidativ, ce au fost ilustrate printr-o rată înaltă de supraviețuire celulară. Efectul citoprotector nu a fost însă semnificativ în cazul celulelor expuse pe termen scurt la cele trei extracte vegetale.

### VII.3. Evaluarea comparativă a citotoxicității extractului din inflorescențe de *Tagetes erecta* și a fracțiunii 4Ta 76-90 obținută din acesta

Prezența celulelor viabile în culturile incubate cu extractul inițial și cu fracțiunea 4Ta 76-90 a fost evaluată prin metoda MTT. În figurile VII.10 și VII.11 sunt prezentate rezultatele obținute.



**Figura VII.10.** Viabilitatea celulară determinată prin testul MTT pentru extractul obținut din inflorescențe de *Tagetes erecta*



**Figura VII.11.** Viabilitatea celulară determinată prin testul MTT pentru fracțiunea 4Ta 76-90

Pentru extractul obținut din *Tagetes erecta* (4Ta) se observă o ușoară tendință de diminuare a viabilității celulare odată cu creșterea concentrației și a timpului de contact, fapt ce indică existența unui potențial citotoxic la concentrații mai mari. Cu toate acestea, fracțiunea analizată nu este citotoxică în domeniul de concentrații investigat.

## CONCLUZII GENERALE. ELEMENTE DE ORIGINALITATE. PERSPECTIVE DE CERCETARE

### CONCLUZII GENERALE

Teza de doctorat intitulată **Evaluarea chimică și biologică a unor fracțiuni extractive din specii de *Asteraceae* ornamentale** are ca principal obiectiv evaluarea potențialului biologic al unor extracte totale din speciile ornamentale *Rudbeckia hirta* L., *Tagetes erecta* L. și *Zinnia elegans* Jacq., precum și al unor fracțiuni separate din acestea în corelație cu prezența anumitor compuși din clasa polifenolilor. Testările de ordin chimic și biologic realizate pe extractele inițiale și pe diverse fracțiuni din acestea reprezintă elemente de noutate în ceea ce privește investigarea potențialului terapeutic al acestor plante, în literatura de specialitate existând foarte puține date în acest sens.

Evaluarea caracterelor macroscopice a permis stabilirea unor deosebiri importante între cele trei specii din familia *Asteraceae*, în special referitor la dimensiuni, miros, culoare și structura frunzelor, inflorescențele fiind însă toate de tip capitul.

Referitor la caracterizarea histo-anatomică a speciilor, a fost evidențiat faptul că limbul foliar are structură bifacială ecvifacială la *Rudbeckia hirta* și structură bifacială heterofacială la *Tagetes erecta* și *Zinnia elegans*. Toate cele trei specii de *Asteraceae* prezintă peritectori uni- sau pluricelulari și peri secretori pluricelulari. Aceștia din urmă se regăsesc în toate organele aeriene, dar cu precădere în frunze și flori. În general, la florile tubuloase, perii secretori, care sunt adesea biseriați, sunt prezenți atât pe corolă, cât și pe organele de reproducere.

În vederea extracției compușilor polifenolici din matricea vegetală, s-a optat pentru realizarea unor extracte metanolice din inflorescențele speciilor luate în lucru, pentru specia *Tagetes erecta* obținându-se cea mai mare cantitate de extract uscat.

Evaluarea fitochimică a inflorescențelor speciilor recoltate în anul 2017 din cultura realizată în condiții ecologice a presupus analiza din punct de vedere calitativ și cantitativ a extractelor metanolice obținute, precum și analiza calitativă a fracțiunilor separate din acestea.

În ceea ce privește analiza calitativă prin tehnica UHPLC-MS a extractului metanolic din inflorescențe de *Rudbeckia hirta* L., s-a observat că acesta conține aminoacizi, acizi clorogenici, precum și o serie de flavonoide, în special sub formă de glicozide ale patuletinei, eupalitinei, cvercetolului și cvercetagetinei.

Extractul metanolic din inflorescențe de *Tagetes erecta* L. conține aminoacizi, acizi clorogenici, derivați ai acizilor galic, chinic, elagic și siringic, precum și o serie de flavonoide sub formă de glicozide ale cvercetagetinei, cvercetolului, kaempferolului și patuletinei.

În cazul speciei *Zinnia elegans* au fost puși în evidență pentru extractul metanolic o serie de compuși precum alcaloizi derivați de guanidină (acid plantagoganidinic și plumbagin B), derivați ai acidului galic, o serie de acizi mono- și diacilclorogenici, precum și glicozide ale apigeninei, cvercetolului, kaempferolului și resokaempferolului.

O serie de compuși, în special din clasa polifenolilor, identificați în extractul metanolic inițial se regăsesc selectiv și în fracțiunile obținute după realizarea extracției în fază solidă și a separărilor cromatografice pe coloană LH-20, fapt confirmat prin analizele LC-MS.

Referitor la determinările cantitative spectrofotometrice ale flavonoidelor și polifenolilor totali din extractele metanolice, se observă că extractul obținut de la specia *Tagetes erecta* prezintă cel mai ridicat conținut în polifenoli, în timp ce cea mai ridicată concentrație în compuși flavonoidici este prezentă în extractul metanolic din inflorescențe de *Zinnia elegans*.

Fracționările realizate prin diverse metode extractive și cromatografice au permis izolarea mai multor compuși din speciile *Zinnia elegans* și *Tagetes erecta*. Astfel, în cadrul prezentei teze de

doctorat sunt descrise, pentru prima dată, existența compusului kaempferol 3-O-[ $\beta$ -glucopiranozil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -glucuronopiranozidă] și, implicit, prezența sa în specia *Zinnia elegans*, precum și prezența acidului plantagoganidinic în aceeași specie. Structura acestor compuși a fost elucidată coroborând rezultatele obținute în urma analizelor spectroscopice (spectrometria de masă și spectroscopia RMN). Mai mult, s-a reușit și izolarea cvercetagitrinei din specia *Tagetes erecta*, compus deja cunoscut în literatură.

Evaluarea *in vitro* a acțiunii antioxidante a diverselor fracțiuni extractive s-a realizat prin trei mecanisme diferite de testare. Astfel, testarea activității de scavenger a radicalilor liberi DPPH a constituit un test preliminar ce a permis identificarea celor mai active extrakte inițiale și mai apoi, includerea unor fracțiuni din acestea în următoarele teste antioxidante efectuate. Extractele metanolice obținute din inflorescențele speciilor *Tagetes erecta* și *Zinnia elegans* au prezentat cele mai bune valori ale CE<sub>50</sub>.

Extractul metanolic de *Tagetes erecta* a prezentat o valoare CE<sub>50</sub> mai bună decât cea obținută pentru cvercetol în cadrul testării capacității de chelatare a ionilor feroși. Pentru acest test, s-au obținut, în general, rezultate mai bune pentru extractele inițiale decât pentru fracțiunile separate din acestea.

Determinarea activității de inhibare a 15-LOX a dus la obținerea unor rezultate diferite de cele obținute în testul precedent. Astfel, separările realizate s-au dovedit a fi utile în vederea obținerii unor fracțiuni mai active prin acest mecanism de acțiune. Două dintre fracțiunile separate din *Tagetes erecta* (4Ta 76-90), respectiv *Zinnia elegans* (4Z 36-49) prezintă valori similare cu cea a cvercetolului, folosit ca etalon.

Luând în considerare rezultatele evaluării acțiunii antimicrobiene a extractelor metanolice obținute din inflorescențele speciilor luate în studiu, putem afirma că acestea prezintă acțiuni antifungice și antibacteriene promițătoare pe bacterii Gram pozitive, remarcându-se, de asemenea, o acțiune de inhibare a creșterii bacteriene pentru anumite bacterii Gram negative. Cea mai bună acțiune antibacteriană a fost observată în cazul extractului metanolic

din inflorescențe de *Rudbeckia hirta*, în timp ce cea mai importantă acțiune antifungică a fost observată pentru extractul din inflorescențe de *Tagetes erecta*, rezultatele fiind similare cu cele obținute pentru etaloanele folosite (nistatină, fluconazol).

Evaluarea *in vitro* a efectului citotoxic exercitat de extractele vegetale asupra fibroblastelor murine NIH3T3 a permis observarea unor efecte citotoxice doar la concentrații de peste 50 µg/mL în cazul tuturor probelor investigate. Ținând cont de dozele utilizate, considerăm că produsele testate sunt practic lipsite de citotoxicitate.

În plus, testarea capacității citoprotectoare pe culturi de celule a permis evidențierea unei activități promițătoare pentru toate extractele în condițiile unui pretratament de 24 ore, fapt observat printr-o înaltă rată de supraviețuire celulară. Mai mult, evaluarea comparativă a citotoxicității extractului din inflorescențe de *Tagetes erecta* și a fracțiunii 4Ta 76-90 obținută din acesta, cu un conținut majoritar de cvercetagitrină, a relevat importanța aplicării diverselor tehnici de separare în vederea obținerii de compuși cu acțiuni biologice sporite și cu citotoxicitate redusă în comparație cu extractul din care au fost izolați.

## ELEMENTE DE ORIGINALITATE

Originalitatea prezentului studiu constă în investigarea pentru prima dată în țara noastră a inflorescențelor speciilor ornamentale *Rudbeckia hirta* L., *Tagetes erecta* L. și *Zinnia elegans* Jacq., cultivate în condiții ecologice, din punct de vedere farmacognostic și biologic. A fost realizată caracterizarea morfologică și histo-anatomică a inflorescențelor recoltate de la cele trei specii, precum și evaluarea compoziției chimice a extractelor metanolice totale și a unor fracțiuni extractive selective obținute din acestea prin diverse metode de separare. Mai mult, s-a pus în evidență prezența a doi compuși care nu au fost anterior descriși în literatură pentru specia *Zinnia elegans*, structura lor fiind stabilită prin intermediul tehnicilor spectrometriei de masă și a spectroscopiei RMN.



Pentru extractele metanolice și pentru o serie de fracțiuni separate s-au realizat:

- ❖ testarea capacității antioxidante *in vitro* prin trei metode diferite,
- ❖ testarea acțiunii antibacteriene și antifungice,
- ❖ evaluarea *in vitro* a citotoxicității extractelor metanolice,
- ❖ evaluarea capacității citoprotectoare a extractelor metanolice.

## PERSPECTIVE DE CERCETARE

În urma corelării rezultatelor obținute în cadrul prezentei teze de doctorat, se justifică continuarea studiului în următoarele direcții:

- ❖ purificarea fracțiunilor deja separate din extractele inițiale, în scopul izolării unor compuși individuali și evaluarea comparativă a acțiunilor biologice a acestora comparativ cu extractul inițial total;
- ❖ obținerea și investigarea unor fracțiuni volatile din speciile luate în studiu, în scopul analizei calitative și cantitative a compușilor extrași, precum și observarea efectelor biologice induse de aceștia, în comparație cu fracțiunile analizate în cadrul acestei cercetări;
- ❖ evaluarea potențialului antioxidant al tuturor fracțiunilor obținute din extractele metanolice, precum și aplicarea altor teste antioxidante;
- ❖ continuarea evaluării potențialul antimicrobian și antifungic prin includerea în studii a altor tulpini bacteriene și fungice, precum și realizarea testării pe fracțiunile obținute;
- ❖ evaluarea mai multor fracțiuni reprezentative separate din cele trei extracte inițiale printr-un număr suplimentar de teste pe linii celulare în vederea stabilirii mecanismelor ce stau la baza acțiunii antioxidante și antiinflamatoare.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

2. Evans WC. *Trease and Evans' Pharmacognosy*, 16th ed. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2009.
7. Lim TK. *Tagetes erecta*. In: *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014, 432-447.
18. Cornelius WW, Wycliffe W. *Tagetes (Tagetes minuta)* oils. In: Preedy VR (ed.). *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. London: Elsevier, 2016, 791-802.
21. Mircea (Arsene) C, Cioancă O, Draghia L, Hăncianu M. Morphological characteristics and polyphenol variations in *Rudbeckia hirta* L. *Rom Biotechnol Lett* 2015; 20(4): 10688-10695.
26. Glimn-Lacy J, Kaufman PB. *Botany Illustrated*, 2nd ed. New York: Springer US, 2006.
32. Michael BR, Gedara SR, Amer MM et al. Evidence-based medicinal value of *Rudbeckia hirta* L. flowers. *Nat Prod Res* 2014; 28(12): 909-913.
34. Schlangen K, Miosic S, Castro A et al. Formation of UV-honey guides in *Rudbeckia hirta*. *Phytochemistry* 2009; 70(7): 889-898.
38. Stewart CD, Jones CD, Setzer WN. Leaf essential oil compositions of *Rudbeckia fulgida* Aiton, *Rudbeckia hirta* L., and *Symphyotrichum novaeangliae* (L.) G.L. Nesom (*Asteraceae*). *Am J Essent Oils Nat Prod* 2014; 2(1): 36-38.
53. Ribeiro D, Freitas M, Tomé SM et al. Inhibition of LOX by flavonoids: a structure–activity relationship study. *Eur J Med Chem* 2014; 72:137-145.
66. Lin J-H, Lee D-J, Chang J-S. Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae. *Bioresour Technol* 2015; 184: 421-428.
83. Moliner C, Barros L, Dias M et al. Edible flowers of *Tagetes erecta* L. as functional ingredients: phenolic composition, antioxidant and protective effects on *Caenorhabditis elegans*.

- Nutrients* 2018; 10(12): 2002.
85. Xu L-W, Wang G-Y, Shi Y-P. Chemical constituents from *Tagetes erecta* flowers. *Chem Nat Compd* 2011; 47(2): 281-283.
  86. Xu L, Chen J, Qi H, Shi Y. Phytochemicals and their biological activities of plants in *Tagetes* L. *Chinese Herb Med* 2012; 4(3): 103-117.
  112. Gupta P, Vasudeva N. Marigold A potential ornamental plant. *Hamdard Med* 2012; 55(1): 45-59.
  153. Gomaa A, Samy M, Desoukey S, Kamel M. A comprehensive review of phytoconstituents and biological activities of genus *Zinnia*. *J Adv Biomed Pharm Sci* 2018; 2(1):29-37.
  164. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chemie Int Ed* 2011; 50(3): 586-621.
  171. Tresserra-Rimbau A, Lamuela-Raventos RM, Moreno JJ. Polyphenols, food and pharma. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol* 2018; 156: 186-195.
  175. Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci Food Agric* 2000; 80(7): 1033-1043.
  196. Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci* 2007; 30(18): 3268-3295.
  239. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol* 2012; 23: 174-181.
  257. Gach K, Długosz A, Janecka A. The role of oxidative stress in anticancer activity of sesquiterpene lactones. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2015; 388(5): 477-486.
  269. Sacchetti G, Romagnoli C, Bruni A, Poli F. Secretory tissue ultrastructure in *Tagetes patula* L. (*Asteraceae*) and thiophene localization through X-ray microanalysis. *Phyt - Ann Rei Bot* 2001; 41(1): 35-48.

272. Iancu CE. Contribuții la evaluarea farmacognostică și biologică a unor specii din familia *Geraniaceae*. Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa” Iași, 2016.
273. \*\*\* *Farmacopeea Română*, ediția a X-a. București: Editura Medicală; 1993.
274. Grădinariu V. Contribuții la identificarea și caracterizarea unor extracte vegetale din specii indigene sau aclimatizate în România cu acțiune favorabilă în afecțiunile neurodegenerative. Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa” Iași, 2015.
283. Clifford MN, Johnston KL, Knight S, Kuhnert N. Hierarchical scheme for LC-MS n identification of chlorogenic acids. *J Agric Food Chem* 2003; 51(10): 2900-2911.
291. Meurer MC, Mees M, Mariano LNB et al. Hydroalcoholic extract of *Tagetes erecta* L. flowers, rich in the carotenoid lutein, attenuates inflammatory cytokine secretion and improves the oxidative stress in an animal model of ulcerative colitis. *Nutr Res* 2019; 66: 95-106.
292. Fang N, Yu S, Prior RL. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. *J Agric Food Chem* 2002; 50(12): 3579-3585.
297. Parejo I, Jáuregui O, Viladomat F et al. Characterization of acylated flavonoid-O-glycosides and methoxylated flavonoids from *Tagetes maxima* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004; 18(23): 2801-2810.
305. Cong H-J, Zhang S-W, Shen Y et al. Guanidine Alkaloids from *Plumbago zeylanica*. *J Nat Prod* 2013; 76(7): 1351-1357.
306. Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom* 2004; 39:1-15.
308. Tava A, Pecio Ł, Lo Scalzo R et al. Phenolic content and antioxidant activity in *Trifolium* germplasm from different environments. *Molecules* 2019; 24(2): 298.
332. Young A, Lowe G. Carotenoids—antioxidant properties. *Antioxidants* 2018; 7(2):28.