



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI  
FARMACIE „GRIGORE T. POPA” IAȘI  
FACULTATEA DE FARMACIE**

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ DIN  
LUBLIN – FACULTEA DE FARMACIE  
CU DIVIZIE DE ANALITICĂ MEDICALĂ**



## **METABOLIȚI BIOACTIVI DIN SPECII DE *VERBASCUM***

**Rezumatul tezei de doctorat**

**Conducători științifici,  
Prof. Dr. Anca MIRON/  
Prof. Dr. Krystyna SKALICKA-WOZNIAK**

**Doctorand,  
Simon Vlad LUCA**

**2019**

## CUPRINS

PARTEA GENERALĂ .....	1
CAPITOLUL 1. GENUL <i>Verbascum</i> .....	1
1.1. Clasificarea științifică a genului <i>Verbascum</i> .....	1
1.2. Distribuția speciilor de <i>Verbascum</i> .....	1
1.3. Descrierea botanică a speciilor de <i>Verbascum</i> .....	1
1.4. Utilizările tradiționale ale speciilor de <i>Verbascum</i> .....	2
1.5. Studii fitochimice pe specii de <i>Verbascum</i> .....	4
1.5.1. Iridoide.....	4
1.5.2. Glicozide feniletanoidice, fenilpropanoidice și neolignanice.....	10
1.5.3. Flavonoide .....	11
1.5.4. Acizi fenolici .....	15
1.5.5. Saponine .....	16
1.5.6. Alcaloizi sperminici .....	16
1.5.7. Terpene .....	17
1.5.8. Alți constituenți.....	18
1.6. Studii biologice pe specii de <i>Verbascum</i> .....	19
1.6.1. Acțiunea antioxidantă .....	35
1.6.2. Acțiunea antimicrobiană .....	36
1.6.3. Acțiunea citotoxică .....	37
1.6.4. Acțiunea anti-inflamatoare.....	38
1.6.5. Alte acțiuni.....	39
1.7. <i>Verbascum ovalifolium</i> Donn Ex Sims – generalități	41
1.8. <i>Verbascum blattaria</i> L. – generalități .....	42
PARTEA PERSONALĂ .....	43
MOTIVAREA ALEGERII SUBIECTULUI TEZEI ȘI OBJECTIVELE PROPUSE .....	43
CAPITOLUL 2. MATERIAL ȘI METODE .....	45
2.1. Reactivi .....	45
2.2. Echipamente.....	46
2.3. Material vegetal.....	47
2.4. Proceduri extractive .....	47
2.5. Studii fitochimice.....	48
2.5.1. Determinarea cantitativă a polifenolilor .....	48

2.5.2.	Determinarea cantitativă a flavonoidelor.....	48
2.5.3.	Analiza calitativă HPLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS/MS .....	48
2.5.4.	Analiza cantitativă HPLC-DAD .....	49
2.5.5.	Izolarea compușilor puri .....	50
2.5.6.	Elucidarea structurală a compușilor izolați.....	51
2.6.	Studii biologice .....	52
2.6.1.	Determinarea acțiunii antioxidante .....	52
2.6.2.	Determinarea acțiunii citotoxice .....	55
2.6.3.	Testul de apoptoză cu anexină V – iodură de propidiu.....	56
2.6.4.	Testul de fragmentare a ADN-ului .....	56
2.6.5.	Testul de pigmentare a ADN-ului cu iodura de propidiu.....	57
2.6.6.	Testul cu diacetat de 2',7'-diclorodihidrofluoresceină.....	57
2.6.7.	Testul Comet.....	58
2.6.8.	Testul de secreție a citokinelor .....	59
2.7.	Analiza statistică .....	59
CHAPTER 3.	REZULTATE.....	60
3.1.	<i>Verbascum ovalifolium</i> Donn ex Sims – studii fitochimice și biologice .....	60
3.1.1.	Studii fitochimice.....	60
3.1.2.	Separarea prin cromatografie în contracurent de înaltă performanță.....	79
3.1.3.	Studii biologice pe extracte de <i>Verbascum ovalifolium</i> .....	117
3.1.4.	Studii biologice pe compuși izolați din <i>Verbascum ovalifolium</i> .....	125
3.2.	<i>Verbascum blattaria</i> L. – studii fitochimice și biologice.....	132
3.2.1.	Studii fitochimice.....	132
3.2.2.	Separarea prin cromatografie în contracurent de înaltă performanță.....	141
3.2.3.	Studii biologice pe extracte de <i>Verbascum blattaria</i> .....	147

3.2.4. Studii biologice pe compuși izolați din <i>Verbascum blattaria</i> .....	150
CHAPTER 4. DISCUȚII .....	152
4.1. Studii fitochimice pe extracte de <i>Verbascum ovalifolium</i> și <i>Verbascum blattaria</i> .....	152
4.1.1. Totalul polifenolic și flavonoidic.....	152
4.1.2. Determinarea profilului fitochimic prin HPLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS/MS .....	153
4.1.3. Analiza cantitativă HPLC-DAD .....	157
4.2. Separarea prin cromatografie în contracurent de înaltă performanță a compușilor din <i>Verbascum ovalifolium</i> și <i>Verbascum blattaria</i> .....	158
4.2.1. Separarea HPCCC a diglicozidelor iridoidice din <i>Verbascum ovalifolium</i> și <i>Verbascum blattaria</i> .....	161
4.2.2. Separarea HPCCC a altor compuși din <i>Verbascum ovalifolium</i> .....	165
4.3. Studii biologice pe extracte de <i>Verbascum ovalifolium</i> și <i>Verbascum blattaria</i> .....	168
4.3.1. Acțiunea antioxidantă .....	168
4.3.2. Acțiunea citotoxică .....	172
4.3.3. Acțiunea genotoxică/antigenotoxică.....	174
4.3.4. Acțiunea de inhibare a secreției citokinelor....	175
4.4. Studii biologice pe compuși izolați din <i>Verbascum ovalifolium</i> și <i>Verbascum blattaria</i> .....	177
4.4.1. Acțiunea citotoxică .....	177
4.4.2. Acțiunea pro-apoptotică.....	179
4.4.3. Efectul asupra ciclului celular.....	181
4.4.4. Acțiunea pro-oxidantă.....	182
4.4.5. Acțiunea de inhibare a secreției citokinelor....	182
CONCLUZII GENERALE. CONTRIBUȚII ORIGINALE. PERSPECTIVE DE CERCETARE .....	185
REFERINȚE.....	195
ANEXĂ. Spectrele RMN ale compușilor izolați din <i>Verbascum ovalifolium</i> și <i>Verbascum blattaria</i>	

## Listă de abrevieri

CC<sub>50</sub> concentrația citotoxică 50%  
CCS separare în contracurent  
COSY spectroscopie de corelație  
DAD detector cu șir de diode  
DMSO dimetilsulfoxid  
DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazil  
EBWat acetat de etil-*n*-butanol-apă  
ELISA enzyme-linked immunosorbent assay  
ESI ionizare electrospray  
HEBWat *n*-hexan-acetat de etil-*n*-butanol-apă  
HEMWat *n*-hexan-acetat de etil-metanol-apă  
HMBC heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy  
HPCCC cromatografie în contracurent de înaltă performanță  
HPLC cromatografie de lichide de înaltă performanță  
HRESIMS spectrometrie de masă de înaltă rezoluție cu ionizare electrospray  
HSCCC cromatografie în contracurent de înaltă viteză  
HSQC heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy  
IC<sub>50</sub> concentrație inhibitorie 50%  
IL-8 interleukina-8  
LPS lipopolizaharid  
MS spectrometrie de masă  
MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu  
NO oxid nitric  
RMN rezonanță magnetică nucleară  
Q-TOF quadrupole-time-of-flight  
ROESY rotating-frame Overhauser enhancement spectroscopy  
SD deviație standard  
TF total flavonoidic  
TNF- $\alpha$  factorul de necroză tumorală alfa  
TP total polifenolic  
UV ultraviolet

## Cuvinte cheie

*Verbascum blattaria* L., *Verbascum ovalifolium* Donn ex Sims, cromatografie în contracurent, spectrometrie de masă, spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară, viabilitate celulară, apoptoză, activitate de inhibare a citokinelor

**Actuala Teză de Doctorat cuprinde 209 pagini, dintre care 42 dedicate Părții Generale și 167 dedicate Părții Personale.**

**Teza conține 146 figuri, 41 tabele, 1 anexă cu 42 figuri și 279 referințe bibliografice.**

**În acest Rezumat, figurile, tabelele și referințele bibliografice selectate păstrează numărul alocat în textul Tezei de Doctorat.**

## PARTEA PERSONALĂ

### MOTIVAREA ALEGERII TEMEI ȘI OBIECTIVELE PROPUSE

Utilizarea plantelor în medicina tradițională reprezintă o practică ce datează de mii ani, cele mai vechi documente provenind din Mesopotamia (tăblițele cuneiforme de lut, ~2600 î.Hr.), Egipt (*Ebers Papyrus*, ~1500 î.Hr.) sau China (*Materia Medica*, ~1100 î.Hr.). Remediile pe bază de plante continuă să joace un rol crucial chiar și în era modernă, Organizația Mondială a Sănătății (OMS) estimând că aproximativ 80% din populația globală recurge la medicina tradițională în ceea ce privește asistența de sănătate primară (127).

Având o diversitate chimică uriașă, numeroase substanțe izolate din regnul vegetal, precum morfina, paclitaxelul, galantamina, vinblastina, codeina sau cocaina, s-au dovedit a fi printre cele mai promițătoare molecule pentru tratamentul multor patologii severe, printre care cancerul, bolile infecțioase sau bolile rare (128). Poate unul dintre cele mai notabile exemple ce ține de cercetarea în domeniul produșilor naturali îl constituie artemisinină. Lactona sescviterpenică antimalarică a fost izolată din *Artemisia annua* L. de către Youyou Tu, farmacistă de origine chineză, care, pentru descoperirea sa, a primit în 2015 Premiul Nobel pentru Fiziologie sau Medicină. În prezent, derivați semisintetici (artesanat, artemeter) se utilizează în practica clinică drept combinații pe bază de artemisinină pentru tratamentul malariei cauzate de *Plasmodium falciparum* (129). Totuși, metodele de identificare de noi compuși bioactivi din specii vegetale au evoluat considerabil în ultimii ani, datorită progreselor în domeniul automatizării sau a unor noi tehnici de izolare cu avantaje economice incontestabile.

Speciile de *Verbascum* (lumânărică) au fost utilizate în medicina tradițională ca expectorante, mucolitice, emoliente și diuretice pentru combaterea afecțiunilor respiratorii, hemoroizilor, diareei, durerilor reumatice, rănilor, infecțiilor fungice și a altor afecțiuni inflamatorii cutanate. În prezent, pe piața farmaceutică europeană și americană există numeroase produse cu lumânărică: produs vegetal uscat pentru infuzii, extracte apoase, alcoolice sau uleioase, capsule, comprimate. Genul *Verbascum* este cunoscut drept o sursă bogată de metaboliți (glicozide iridoidice, feniletanoidice și neolignanice, saponozide, flavonoide, polizaharide și acizi fenolici) cu proprietăți anticolinesterazice, antimicrobiene, citotoxice, anti-inflamatoare sau antioxidante (6).

Dintre aceștia, verbascozida și harpagozida reprezintă doi constituenți de seamă. Verbascozida este o glicozidă feniletanoidică descrisă pentru prima dată în 1963 în *V. sinuatum* L. și ulterior în peste 15 specii diferite de lumânărică. Se cunoaște faptul că prezintă o gamă largă de efecte dovedite atât *in vitro* cât și *in vivo*, precum: acțiunea antioxidantă, anti-inflamatoare, anticanceroasă, regeneratoare și neuroprotectoare. *Reh-verbascosida* sau verbascozida totală din frunzele de *Rehmania* (un amestec de glicozide feniletanoidice extrase din *Rehmania glutinosa* Libosch. cu un conținut de minim 30% verbascozidă) a fost inclusă într-un studiu clinic randomizat. Verbascozida a redus eritrocituria și proteinuria la pacienți cu glomerulonefrită primară cronică la 56 de zile după administrarea a 2 comprimate de 200 mg pe zi, în mono- sau biterapie cu irbesartan (130). Deși harpagozida, o acil monoglicozidă iridoidică de tipul harpagidei, este considerată ingredientul activ din *Harpagophytum procumbens* (Burch.) DC. ex Meisn., ea este adesea descrisă și în genul *Verbascum*. Doze zilnice de cel puțin 50 mg harpagozidă (administrată sub formă de extracte apoase de *Harpagophytum*) s-au dovedit a fi eficace în ameliorarea durerii pentru 60% din pacienții cu osteoartrită la



nivelul șoldului sau genunchilor, artrită sau durere dorsală nespecifică. Mai mult, o doză de 60 mg harpagozidă/zi (furnizată din extracte standardizate de *Harpagophytum*), administrată pentru 54 de săptămâni, a îmbunătățit considerabil tabloul clinic al osteoartritei genunchilor (131).

Deși până în prezent au fost izolați numeroși constituenți din diferite specii de *Verbascum*, compuși cu structuri și activități noi sunt încă descoperiți. De exemplu, cei doi stereoizomeri ai 6-*O*-(2"-*O*-*p*-cumaroil-3"-*O*-mentiafoloil)- $\alpha$ -*L*-ramnopiranozilcatalpolului din *V. nobile* Velen. se numără printre primii derivați iridoidici naturali ce conțin radicalul mentiafoloil. De asemenea, aceștia au dovedit o acțiune semnificativă de inhibare a creșterii celulelor Jurkat T stimulate de concanavalină A și a fosforilării kinazelor reglate de semnalizatori extracelulari induse de concanavalină A, de alterare a proliferării dinamice a celulelor CD3 și de reducere a expresiei markerului de activare timpurie CD69 și a nivelului intracelular de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) în celule CD3<sup>+</sup>. Toate acestea sugerează o posibilă utilizare a glicozidelor iridoidice în modularea patologiilor legate de limfocitele T (115).

În acest context, principalele obiective ale cercetărilor prezentate în această teză de doctorat s-au axat pe efectuarea unor studii fitochimice și biologice pe două specii de *Verbascum* anterior neinvestigate (*Verbascum ovalifolium* Donn ex Sims și *Verbascum blattaria* L.) și care cresc spontan pe teritoriul României și al Republicii Moldova. Printre acestea, se numără:

- determinarea profilului fitochimic prin HPLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS/MS;
- evaluarea acțiunilor biologice ale extractelor (antioxidantă, citotoxică, genotoxică/antigenotoxică, anti-inflamatoare) (studii *in vitro*);

- dezvoltarea și optimizarea unor metode de separare prin cromatografie în contracurent de înaltă performanță (HPCCC) în vederea purificării unor constituenți majori și minori;
- elucidarea structurii compușilor izolați prin HRESIMS, ESI-MS/MS, RMN 1D ( $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN) și 2D ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HSQC, HMBC, ROESY);
- evaluarea potențialului citotoxic al compușilor izolați pe diferite linii celulare tumorale, testând efectul asupra viabilității celulare, apoptozei, ciclului celular și statusului oxidativ intracelular;
- evaluarea potențialului anti-inflamator al compușilor izolați prin investigarea inhibării secreției IL-8 și TNF- $\alpha$  în neutrofile stimulate cu LPS.

## CAPITOLUL 3. REZULTATE

### 3.1. *Verbascum ovalifolium* Donn ex Sims – studii chimice și biologice

#### 3.1.2. Separarea prin cromatografie în contracurent de înaltă performanță

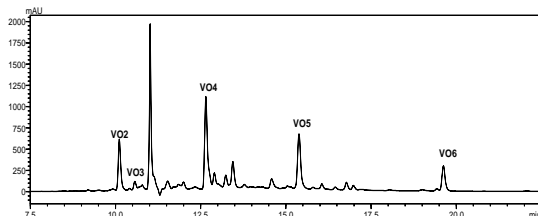
##### 3.1.2.1. *Selectarea sistemelor bifazice de solvenți*

VO-EAE a fost supus cromatografiei pe coloană, așa cum a fost descris în Secțiunea 2.5.5.1. După eluarea cu amestecuri de cloroform-metanol (9:1 → 5:5), au fost obținute cinci fracțiuni (VO-EAE-1 → VO-EAE-5) ce au fost ulterior supuse separării prin HPCCC. Sistemele bifazice de solvenți au fost selectate pe baza valorilor coeficienților de partiție (K). Întrucât au fost efectuate doar separări pe fază inversă, valorile K au fost calculate cu faza organică superioară drept fază staționară și faza apoasă inferioară drept fază mobilă. Compușii țintă au fost codificați de la **VO1** la **VO10**, cu **VO1** prezent în fracțiunea VO-EAE-1 și **VO10** în fracțiunea VO-EAE-5.

##### 3.1.2.2. *Purificarea compușilor*

###### 3.1.2.2.2. *Izolarea constituenților din fracțiunea VO-EAE-2*

Fracțiunea VO-EAE-2 a prezentat cinci compuși țintă (**VO2**, **VO3**, **VO4**, **VO5** și **VO6**) (Fig. 3.21). Valorile K ale acestora au fost calculate pentru cinci sisteme diferite de solvenți: III (EBWat 3:1:4), IV (EBWat 5:1:5), V (EBWat 2:1:3), VI (HEBWat 1:2:1:2) și VII (EWat 1:1).



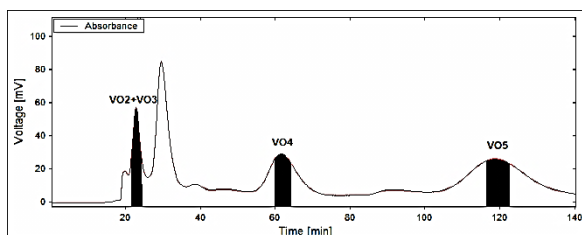
**Fig. 3.21.** Cromatograma HPLC-DAD a fracțiunii VO-EAE-2 ( $\lambda=280$  nm)

Dintre aceste sisteme de solvenți, sistemul VI a oferit valori K optime pentru compușii **VO2-VO5**. În continuare, în vederea optimizării separării, experimentele HPCCC au fost inițial efectuate cu sistemul VI la scară analitică, variind viteza de rotație (între 1200-1600 rpm) și debitul (între 0,6-1 mL/min). În urma analizei HPLC-DAD a tururilor fracțiunilor colectate la un minut, s-a observat că cele mai bune condiții de separare (retenția fazei staționare și rezoluție) s-au obținut la 1600 rpm și 0,7 mL/min.

Trecerea la scară semi-preparativă s-a efectuat multiplicând parametrii corespunzători cu factorul de multiplare (șase), lucrându-se cu un debit de 4,2 mL/min, 1600 rpm și detecția la 280 nm (Fig 3.23). După trei injecții HPCCC repetate ( $3 \times 100$  mg), s-au obținut 14 mg de sub-fracțiune VO-EAE-2.1 (timp HPCCC de eluție 23–25 min), 15 mg de sub-fracțiune VO-EAE-2.2 (timp HPCCC de eluție 60–64 min) și 7 mg de sub-fracțiune VO-EAE-2.3 (timp HPCCC de eluție 117–123 min; compusul **VO5**; puritate HPLC-DAD 96,3%).

Sub-fracțiunea VO-EAE-2.1 a fost purificată ulterior prin HPLC semi-preparativ cu metanol 28%, obținându-se 4 mg de compus **VO2** (puritate HPLC-DAD 95,4%) și 6 mg de compus **VO3** (puritate HPLC-DAD 97,5%). Separarea prin HPLC semi-preparativ a sub-fracțiunii VO-EAE-2.2 cu

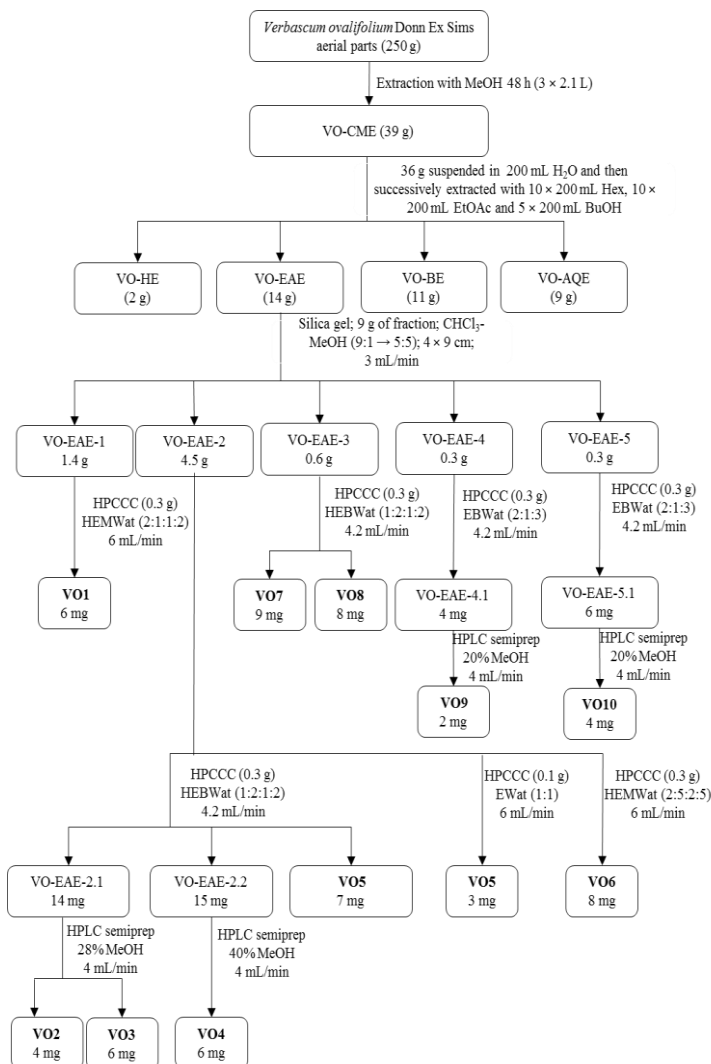
metanol 40% a condus la compusul **VO4** (6 mg, puritate HPLC-DAD 98,3%).



**Fig. 3.23.** Cromatograma HPLCCC la scară semi-preparativă a fracțiunii VO-EAE-2

Suplimentar, compusul **VO5** a fost izolat din VO-EAE-2 utilizând sistemul VII (EWat 1:1). După o singură injectare (100 mg, fază inversă, 6 mL/min, 1600 rpm, 280 nm), au fost obținute 3 mg de compus **VO5** (puritate HPLC-DAD 96,0%) în sub-fracțiunea VO-EAE-2.4 (timp HPLCCC de eluție 31-33 min).

În final, alte sisteme bifazice de solvenți (VIII HEMWat 1:2:1:2 și IX HEMWat 2:5:2:5) au fost investigate în vederea obținerii valorilor K optime pentru izolarea compusului **VO6** din fracțiunea VO-EAE-2. După trei injectări HPLCCC repetate cu sistemul IX ( $3 \times 100$  mg, fază inversă, 6 mL/min, 1600 rpm, 280 nm), au fost obținute 8 mg de compus **VO6** (puritate HPLC-DAD 95,3%) în sub-fracțiunea VO-EAE-2.5 (timp de eluție HPLCCC 20-22 min). Fig. 3.41. sumarizează metodele de izolare ale tuturor compușilor obținuți din părțile aeriene de *V. ovalifolium*.

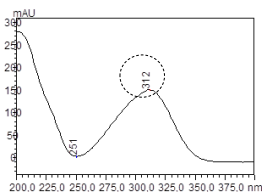


**Fig.3.41.** Schema de separare a compușilor din părțile aeriene de *V. ovalifolium*

### 3.1.2.3. Elucidarea structurală a compușilor izolați

#### 3.1.2.3.2. Identificarea compusului VO2

Analizele spectrale (UV, HRESIMS, ESI-MS/MS și RMN) au condus la identificarea compusului VO2 drept **premnacorimbozida B [6-O-(3''-O-trans-p-cumaroil)- $\alpha$ -L-ramnopiranozilcatalpol]**.

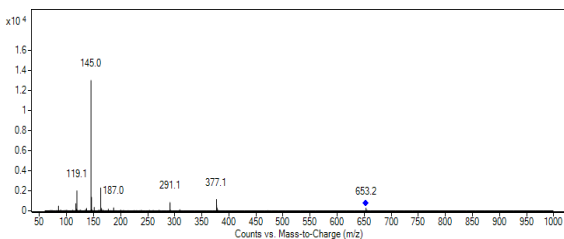


**Fig.3.44.** Spectrul UV al compusului VO2

Compusul VO2 a prezentat două maxime UV la 219 și 226 nm (caracteristice unui sistem enol-eter aparținând unei iridoide) și un maxim adițional de absorbantă la 312 nm aparținând cromoforului cinamoil (Fig. 3.44).

Spectrul HRESIMS (ionizare în negativ) a prezentat un ion  $m/z$  la 653,2090  $[M-H]^-$  (calculat pt.  $C_{30}H_{37}O_{16}$ , 653,2087,  $\Delta = 0,45$  ppm).

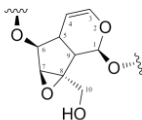
Ionul precursor de la  $m/z$  653 a generat următoarele fragmente ionice observate în spectrul ESI-MS/MS: 491  $[(M-H)\text{-glucozil}]^-$ ; 377  $[(M-H)\text{-glucozil-C}_5\text{H}_6\text{O}_3]^-$ ; 309  $[(M-H)\text{-glucozil-C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4]^-$ ; 291  $[(M-H)\text{-glucozil-C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4\text{-H}_2\text{O}]^-$ ; 205  $[(M-H)\text{-glucozil-C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4\text{-C}_4\text{H}_8\text{O}_3]^-$ ; 187  $[(M-H)\text{-glucozil-C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4\text{-C}_4\text{H}_8\text{O}_3\text{-H}_2\text{O}]^-$ ; 163  $[p\text{-cumarat}]^-$ ; 145  $[p\text{-cumaroil-H}]^-$  and 119  $[p\text{-cumarat-CO}_2]^-$  (Fig. 3.45).



**Fig.3.45.** Spectrul ESI-MS/MS al compusului VO2

**Premnacorimbozida B** (compusul **VO2**) poate fi formal împărțit în patru elemente structurale distincte: catalpolgenina (unitatea agliconică), glucoză, ramnoză și restul de acid *trans-p*-cumaric.

Unitatea agliconică (*catalpolgenina*) a fost elucidată datorită unor semnale caracteristice din spectrul <sup>1</sup>H-RMN



(Tabelul 3.VI). Cei doi protoni olefinici (H3 și H4) au apărut la deplasări chimice mari:  $\delta_H$  6,39 ppm (*dd*,  $J = 6,0, 1,8$  Hz) și, respectiv, 5,12 ppm (*dd*,  $J = 6,0, 4,6$  Hz). Următorul proton (H1) a apărut la 5,10 ppm (*d*,  $J = 9,8$  Hz), ca urmare a acțiunii dezecranante a oxigenului piranozic și a grupării hidroxil de la C1. Semnalul de la 4,05 ppm (*dd*,  $J = 8,2, 1,0$  Hz, H6) a fost cuplat cu cele de la 3,66 ppm (*d*,  $J = 1,0$  Hz, H7) și 2,46 ppm (*m*, H5). Mai mult, valoarea deplasării chimice corespunzătoare lui H6 a indicat prezența unei funcțiuni oxigenate în această poziție (C6). Datorită faptului că H5 a fost cuplat atât cu H4 și H6, dar și cu semnalul de la 2,57 ppm (*dd*,  $J = 9,8, 7,5$  Hz, H9), H5 a apărut sub forma unui multiplu. Dubletele de la 4,15 ppm ( $J = 13,0$  Hz) și 3,82 ppm ( $J = 13,0$  Hz) au fost caracteristice protonilor metilenici de la C10.

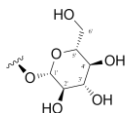
Spectrul <sup>13</sup>C-RMN a confirmat structura aglionului. Așa cum era de așteptat, cei doi atomi de carbon olefinici (C3 și C4) au fost cei mai dezecrași ( $\delta_C$  la 142,2 și, respectiv 103,6 ppm). Semnalele de la 95,2 și 83,8 ppm au fost atribuite atomilor de carbon care au prezentat funcțiuni oxigenate (C6 și, respectiv, C1). Atomii cei mai puțin dezecrași au fost cei de la 43,3 și 37,3 ppm, caracteristici atomilor de carbon alifatici terțiari C9 și, respectiv, C5.

De asemenea, spectrele RMN bidimensionale au confirmat și ele structura agliconului. În spectrul <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY al compusului **VO2**, au fost observate următoarele cuplaje între protonii vicinali: H3/H4 (6,39/6,12), H5/H6 (2,46/4,05), H5/H9 (2,46/2,57) și H1/H9 (5,10/2,57). Spectrul



**HSQC** a permis asocierea protonului H1 cu C1 (5,10/95,2), H3 cu C3 (6,39/142,2), H4 cu C4 (5,12/103,6), H5 cu C5 (2,46/37,3), H6 cu C6 (4,05/83,8), H7 cu C7 (3,66/59,2), H9 cu C9 (2,57/43,3), H10a cu C10 (4,15/61,5) și H10b (3,82/61,5).

Prima unitate glucidică (***β-D-glucopiranoza***) a fost elucidată pe baza semnalelor caracteristice din spectrul **<sup>1</sup>H-RMN** al compusului **VO2**. Dubletul de la  $\delta_{\text{H}}$  4,78 ppm ( $J = 7,9$  Hz) este sugestiv pentru protonul anomic H1'. Valoarea deplasării chimice a acestui proton s-a datorat efectului



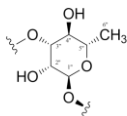
dezacranant al atomului de oxigen din nucleul piranozic și hidroxilului glicozidic de la C1' (configurație  $\beta$ ). Următorul semnal a fost observat ca dublet de dublete la 3,92 ppm ( $J = 12,0, 2,1$  Hz), fiind atribuit protonului H6a'. Acest proton a fost cuplat cu dubletul de dublete de la 3,63 ppm ( $J = 12,0, 6,7$  Hz, H6'b) și multipletul de la 3,31 ppm (H5').

Așa cum era de așteptat, atomul de carbon cel mai dezecranat din spectrul **<sup>13</sup>C-RMN** a fost cel de la  $\delta_{\text{C}}$  99,7 ppm corespunzător lui C1', datorită efectului atomului de oxigen piranozic și hidroxilului glicozidic. Atomii C5' (78,7 ppm) și C3' (77,7 ppm) au rezonat aproximativ cu aceeași intensitate (C5' este în vecinătatea oxigenului piranozic și a atomilor C4' și C6', în timp ce atomul C3' este în vecinătatea unei grupări hidroxil și a atomului C4'). Atomii C2' și C4' au apărut la 74,9 și, respectiv 71.8 ppm, pe când atomul C6' a fost cel mai puțin dezecranat la 63,0 ppm.

Spectrele RMN bidimensionale au furnizat informații structurale adiționale. În spectrul **<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY** al compusului **VO2** au fost observate următoarele cuplaje caracteristice H1'/H2' (4,78/3,26) și H5'/H6'b (3,31/3,63). Spectrul **HSQC** a corelat fiecare proton cu atomul de carbon corespunzător, astfel: H1'/C1' (4,78/99,7), H2'/C2' (3,26/74,9), H3'/C3' (3,40/77,7), H4'/C4' (3,25/71,8), H5'/C5' (3,31/78,7),

H6'a,b/C6' (3,92, 3,63/63,0). Spectrul **HMBC** a evidențiat prezența unor peak-uri încrucișate între H1/C1' (5,10/99,7) și H1'/C1 (4,78/95,2) care au sugerat faptul că prima glicozilare a avut loc între hidroxilul de la C1' al  $\beta$ -glucopiranozei și hidroxilul de la C1 al catalpolgeninei. Această poziție de eterificare a fost confirmată și de spectrul **ROESY**, când un cuplaj sugestiv între H1 și H1' (5,10/4,78) a fost observat.

Structura celei de-a doua unități glucidice ( **$\alpha$ -L-ramnopiranoza**) a fost elucidată pe baza semnalelor caracteristice  **$^1\text{H-RMN}$** . Doubletul de la  $\delta_{\text{H}}$  4,97 ppm ( $J = 4,8$  Hz) a fost atribuit protonului anomic având configurația  $\alpha$  a grupării hidroxil de la nivelul C1". Acest proton a fost cuplat cu H2" (4,08, *dd*,  $J = 3,3,$



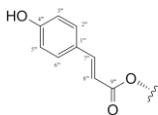
1,8 Hz) care la rândul său a fost cuplat cu multipletul de la 5,09 ppm (H3"). Protonici metilici (H6") au fost ecranati la 1,31 ppm. Ca urmare a efectului dezecranant al grupării carbonil din vecinătate, protonul H3" a fost cel mai dezecranat, presupunându-se astfel legarea grupării acil de carbonul C3" al unității ramnozice.

În spectrul  **$^{13}\text{C-RMN}$** , C1" a fost cel mai dezecranat atom la  $\delta_{\text{C}}$  100,3 ppm ca urmare a prezenței oxigenului piranozic și a hidroxilului glicozidic. Următorul semnal (75,3 ppm) a fost atribuit lui C3", reîntărind ideea că restul acil este atașat în această poziție. Atomii C2" (70,3 ppm), C4" (71,4 ppm) și C5" (70,4 ppm) au fost aproape suprapuși, datorită ambianței magnetice similare (fiecare atom are o grupare hidroxil atașată). Ținând cont că nicio grupare hidroxil nu este legată de carbonul C6", acesta a fost cel mai ecranat (18,0 ppm).

Câteva cuplaje sugestive au fost observate în spectrul  **$^1\text{H-}^1\text{H COSY}$**  al compusului **VO2**, conectând toți protonii cu același spin: H1"/H2" (4,97/4,08), H2"/H3" (4,08, 5,09), H3"/H4" (5,09/3,68), H4"/H5" (3,68/3,82), H5"/H6" (3,82/1,31). Spectrul **HSQC** a atribuit toți protonii atomilor de carbon corespunzători: H1"/C1" (4,97/100,3), H2"/C2"

(4,08/70,3), H3"/C3" (5,09/75,3), H4"/C4" (3,68/71,4), H5"/C5" (3,82/70,4), H6"/C6" (1,31/18,0). Corelațiile din spectrul **HMBC** [H6"/C1" (4,05/100,3) și H1"/C6 (4,97/83,8)] au dovedit faptul că a doua poziție de glicozilare a avut loc între gruparea hidroxil de la C1" al  $\alpha$ -ramnopiranozei și gruparea hidroxil de la C6 al catalpolgeninei. Acest lucru a fost indicat și de cuplajul între H6/H1" (4,05/4,97) din spectrul **ROESY**.

Structura restului de **acid trans-p-cumaric** a fost stabilită din datele spectrului **<sup>1</sup>H-RMN**. Dubletele de la  $\delta_H$  7,70 ppm (H7''') și 6,42 ppm (H8''') cu aceeași constantă de cuplaj  $J = 15,8$  Hz au sugerat prezența unei legături duble *trans* carbon-carbon. Mai mult, cele două perechi de protoni aromatici cuplați *orto* la 7,48 ppm (H2''', H6''') și 6,81 ppm (H3''', H5''') cu  $J = 8,7$  Hz, au sugerat o substituție în *para* a nucleului benzenic. Spectrul **<sup>13</sup>C-RMN** a evidențiat prezența unei grupări carbonil puternic dezecranate la  $\delta_C$  168,9 ppm (C9'''), doi atomi de carbon olefinici

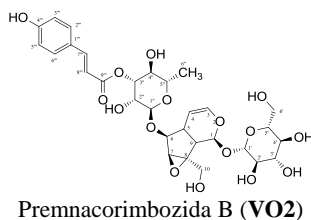


146,7 (C7''') și 115,4 ppm (C8'''), precum și șase atomi de carbon aromatici (C1'''-C6'''), cu două perechi de câte doi atomi de carbon cuplați în *orto* ca urmare a prezenței unei grupări hidroxil în *para*.

Spectrul **<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY** al compusului **VO2** a indicat două cuplaje caracteristice între H2'''/H3''' (7,48/6,81) și H7'''/H8''' (7,70/6,42), în timp ce spectrul **HSQC** a corelat toți protonii cu atomii aferenți (H2/6'''/C2/6'', H3/5'''/C3/5'', H7'''/C7'' și H8'''/C8'''). Cuplajul H3"/C9" (5,09/168,8) din spectrul **HMBC** a confirmat poziția de esterificare a acidului *trans-p-cumaric* cu hidroxilul de la C3" al restului de  $\alpha$ -ramnopiranoză.

**Table 3.VI.** Datele  $^1\text{H}$ -RMN și  $^{13}\text{C}$ -RMN ale compusului **VO2**

Atom	Compusul VO2	
	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), <i>J</i> (Hz)
<i>Aglc</i>		
1	95,2	5,10 <i>d</i> (9,8)
2	-	-
3	142,2	6,39 <i>dd</i> (6,0, 1,8)
4	103,6	5,12 <i>dd</i> (6,0, 4,6)
5	37,3	2,46 <i>m</i>
6	83,8	4,05 <i>dd</i> (8,2, 1,0)
7	59,2	3,66 <i>d</i> (1,0)
8	66,6	-
9	43,3	2,57 <i>dd</i> (9,8, 7,5)
10	61,5	<i>a.</i> 4,15 <i>d</i> (13,0) <i>b.</i> 3,82 <i>d</i> (13,0)
<i>Glc</i>		
1'	99,7	4,78 <i>d</i> (7,9)
2'	74,9	3,26 <i>dd</i> (9,0, 7,9)
3'	77,7	3,40 <i>t</i> (9,0)
4'	71,8	3,25 <i>t</i> (9,0)
5'	78,7	3,31 <i>m</i>
6'	63,0	<i>a.</i> 3,92 <i>dd</i> (12,0, 2,1) <i>b.</i> 3,63 <i>dd</i> (12,0, 6,7)
<i>Rha</i>		
1''	100,3	4,97 <i>d</i> (1,8)
2''	70,3	4,08 <i>dd</i> (3,3, 1,9)
3''	75,3	5,09 <i>m</i>
4''	71,4	3,68 <i>t</i> (9,7)
5''	70,4	3,82 <i>m</i>
6''	18,0	1,31 <i>d</i> (6,2, 3H)
<i>Acyl</i>		
1'''	127,3	-
2'''/6'''	131,1	7,48 <i>d</i> (8,7)
3'''/5'''	116,8	6,81 <i>d</i> (8,7)
4'''	161,2	-
7'''	146,7	7,70 <i>d</i> (15,8)
8'''	115,4	6,42 <i>d</i> (15,8)
9'''	168,8	-



### 3.1.4. Studii biologice pe compuși izolați din *Verbascum ovalifolium*

#### 3.1.4.1. Evaluarea acțiunii citotoxice

Inițial, premnacorimbozida B (**VO2**), sacatozida (**VO3**), premnacorimbozida A (**VO4**), scorodiozida (**VO5**), 6-*O*-(3", 4"-di-*O*-*trans*-cinamoil)- $\alpha$ -*L*-ramnopiranozilcatalpolulul (**VO6**) și verbascozida (**VO7**) au fost evaluați privind efectele asupra viabilității a trei tipuri de linii celulare tumorale (MCF-7, HT-29 și A549) și una normală (MCF-10A) prin metoda MTT. Compușii au fost investigați la o concentrație de 100  $\mu\text{g/mL}$ , după o incubare de 24 h și 48 h. Dintre aceștia, patru compuși (**VO2–VO5**) nu au produs niciun efect semnificativ asupra viabilității celulelor tumorale.

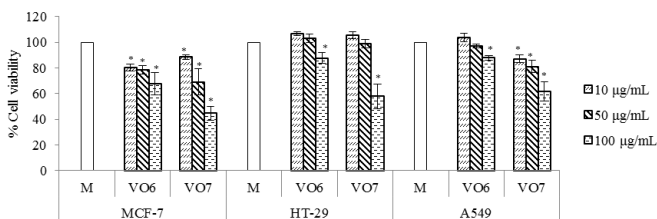
Compusul **VO6** a prezentat efecte citotoxice în toate cele trei linii tumorale doar după o incubare de 48 h. Celulele MCF-7 au fost cele mai sensibile, cu o viabilitate de  $67,82 \pm 8,74\%$ . Celelalte două linii celulare au fost afectate într-o manieră mai redusă, **VO6** determinând viabilități de  $87,85 \pm 4,20\%$  în celulele HT-29 și  $88,03 \pm 1,83\%$  în celulele A549. Mai mult, nu au fost observate niciun fel de efecte citotoxice în celulele normale MCF-10A.

Compusul **VO7** a fost singurul compus ce a prezentat activitate după ambele perioade de incubare (24 și 48 h). Celulele MCF-7 au fost cele mai sensibile la acțiunea **VO7**, viabilitatea lor ajungând la  $69,68 \pm 4,23\%$  și  $44,61 \pm 5,34\%$  după 24 și, respectiv, 48 h. Cele mai scăzute efecte citotoxice au fost observate în celulele A549 (viabilități de  $92,54 \pm 2,33\%$  și  $61,46 \pm 7,54\%$  la 24 și, respectiv, 48 h). Viabilitatea celulelor normale MCF-10A nu a fost afectată de tratamentul cu **VO7**. Comparând activitățile citotoxice la 48 h, este clar faptul că **VO7** a fost mult mai activ decât **VO6**, indiferent de linia tumorală.

În continuare, a fost studiată relația doză-efect pentru cei doi compuși (**VO6** și **VO7**) pe domeniul de concentrație cuprins între 10 și 100  $\mu\text{g/mL}$ , pentru o incubare de 48 h.

Viabilitatea celulelor MCF-7 a fost redusă într-o manieră dependentă de doză de către ambii compuși, de la  $80,21 \pm 2,73\%$  (la 10  $\mu\text{g/mL}$ ) la  $67,82 \pm 8,74\%$  (la 100  $\mu\text{g/mL}$ ) în cazul compusului **VO6** și de la  $88,48 \pm 1,74\%$  (la 10  $\mu\text{g/mL}$ ) la  $44,61 \pm 5,34\%$  (la 100  $\mu\text{g/mL}$ ) în cazul compusului **VO7** (Fig. 3.86). Valoarea  $\text{CC}_{50}$  de  $84,69 \pm 15,65 \mu\text{g/mL}$  a fost calculată doar pentru compusul **VO7**.

Atunci când doze mai scăzute (10 și 50  $\mu\text{g/mL}$ ) din cei doi compuși au fost incubate în celulele HT-29, nu au fost observate efecte semnificative din punct de vedere statistic. În celulele A549, compusul **VO6** nu a afectat viabilitatea la concentrații mai mici de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Însă, efectele produse de **VO7** au fost dependente doză, viabilitatea scăzând de la  $87,18 \pm 3,17\%$  (la 10  $\mu\text{g/mL}$ ) la  $61,46 \pm 7,54\%$  (la 100  $\mu\text{g/mL}$ ). Întrucât cea mai mare concentrație testată nu a produs efecte citotoxice de peste 50% în celulele HT-29 și A549 cells, valorile  $\text{CC}_{50}$  nu au fost extrase.

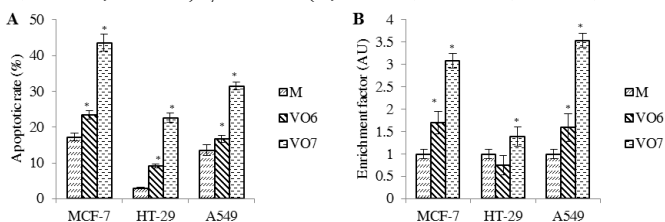


**Fig. 3.86.** Viabilitatea celulelor MCF-7, HT-29 și A549 după o incubare de 48 h cu **VO6** și **VO7** izolați din *V. ovalifolium*

### 3.1.4.2. Evaluarea activității pro-apoptice

Efectele pro-apoptice produse de compușii **VO6** și **VO7** au fost evaluate prin două tipuri de teste: testul cu anexină V – iodură de propidiu și testul de fragmentare a ADN-ului. Prin comparare cu martorul negativ, compusul **VO6** a determinat o creștere semnificativă a ratei de apoptoză în celulele MCF-7 (23,4% vs. 17,2%), HT-29 (9,1% vs. 3,0%) și A549 (16,7% vs. 13,5%) determinate prin testul cu anexină V – iodură de propidiu (Fig. 3.88A). Totuși, creșteri semnificative ale factorului de îmbogățire au fost observate doar în celulele MCF-7 ( $1,70 \pm 0,25$  vs.  $1,00 \pm 0,10$  AU) și A549 ( $1,60 \pm 0,31$  vs.  $1,00 \pm 0,10$  AU) în testul de fragmentare a ADN-ului (Fig. 3.88B).

În cazul compusului **VO7**, rata de apoptoză a fost cea mai ridicată în celulele MCF-7 (43,6% vs. 17,2%), fiind urmată de celulele A549 (31,5% vs. 13,5%) și HT-29 (22,6% vs. 3,0%). Aceste rezultate au fost corelate cu factorii de îmbogățire care au fost crescuți semnificativ în toate liniile celulare, astfel: MCF-7 ( $3,08 \pm 0,25$  vs.  $1,00 \pm 0,10$  AU), HT-29 ( $1,40 \pm 0,21$  vs.  $1,00 \pm 0,10$  AU) și A549 ( $3,54 \pm 0,16$  vs.  $1,00 \pm 0,10$  AU).



**Fig. 3.88. A.** Rata de apoptoză și **B.** Factorul de îmbogățire în celulele MCF-7, HT-29 și A549 după o incubare de 48 h cu **VO6** și **VO7** (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) izolați din *V. ovalifolium*

### 3.1.4.3. Analiza ciclului celular

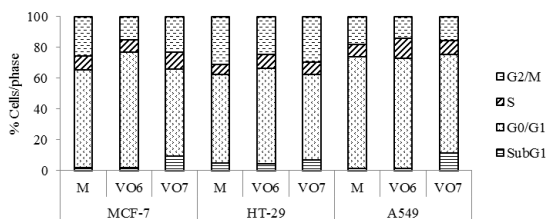
Efectele compușilor **VO6** și **VO7** asupra ciclului celulelor MCF-7, HT-29 și A549 au fost investigate prin metoda de pigmentare a ADN-ului cu iodură de propidiu. Compușii au fost testați la o concentrație de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  și o incubare de 48 h.

Citogramele și histogramele au sugerat efecte diferențiale ale celor doi compuși asupra conținutului de ADN în celulele MCF-7. **VO6** a produs blocarea ciclului celular în faza  $G_0/G_1$  (75,1% vs. 63,6% în martorul negativ) cu o reducere compensatorie a procentului de celule în fazele S (5,5% vs. 8,7%) și  $G_2/M$  (23,3% vs. 13,8%). Chiar dacă procentul celulelor MCF-7 în faza  $G_0/G_1$  a fost redus de **VO7** (56,7% vs. 63,6% în martorul negativ), populația celulelor în faza sub $G_1$  a fost crescută considerabil (9,2% vs. 1,8%).

În urma incubării celulelor HT-29 cu **VO6** s-a observat o blocare a ciclului celular în faza  $G_0/G_1$  (62,2% vs. 57,5% în martorul negativ). Aceasta a fost acompaniată de o creștere a procentului celulelor în faza S (8,8% vs. 4,5%) și scădere a numărului lor în faza  $G_2/M$  (24,5% vs. 31,1%). Totuși, compusul **VO7** a crescut populația celulelor aflate în faza  $G_0/G_1$  (55,4% vs. 57,5%), dar a produs o creștere ușoară a procentului de celule în faza sub $G_1$  (7,1% vs. 5,0%) (Fig. 3.90).

**VO6** nu produs modificări importante în ciclul celulelor A549. În schimb, compusul **VO7** a determinat o creștere majoră a populației celulare în faza sub $G_1$  phase (11,2% vs. 1,3% în martorul negativ). Global, acumularea celulelor în faza sub $G_1$  produsă de **VO7** a fost cea mai intensă în celulele A549 cells (creștere de 9,9%), fiind urmată de celulele MCF-7 (creștere de 7,4%) și HT-29 (creștere de 2,1%) (Fig. 3.90).



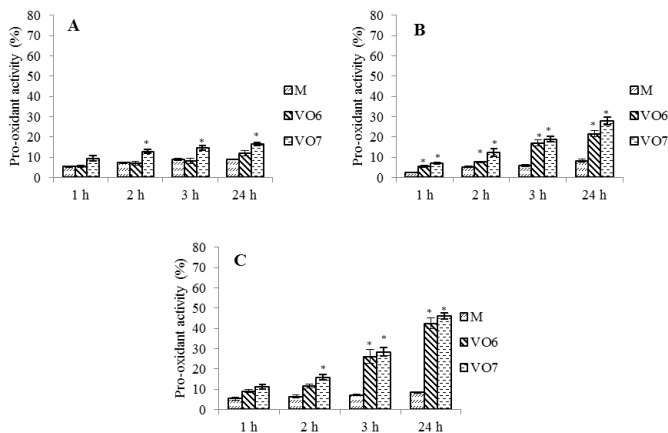


**Fig. 3.90.** Distribuția ciclului celular al celulelor MCF-7, HT-29 și A549 după o incubare de 48 h cu **VO6** și **VO7** izolați din *V. ovalifolium*

#### 3.1.4.4. Evaluarea acțiunii pro-oxidante

Capacitatea compușilor **VO6** și **VO7** (100  $\mu\text{g/mL}$ ) de a induce efecte pro-oxidante în celulele MCF-7, HT-29 și A549 a fost evaluată prin metoda cu DFCH-DA la 1, 2, 3 și 24 h. Comparativ cu martorul negativ, **VO6** a crescut semnificativ nivelul SRO doar în celulele HT-29 și A549 (Fig. 3.91). Efectul a fost dependent de timp în celulele HT-29, activitatea pro-oxidantă variind după cum urmează:  $5,65 \pm 0,54\%$ ,  $7,73 \pm 0,38\%$ ,  $17,06 \pm 1,60\%$  și  $21,59 \pm 1,60\%$ , după 1, 2, 3 și, respectiv 24 h. În celulele A549, nivelul SRO a crescut doar după 3 și 24 h ( $26,17 \pm 2,56\%$  și, respectiv  $42,57 \pm 2,56\%$ ).

În ceea ce privește compusul **VO7**, acesta a manifestat efecte pro-oxidante potente în toate cele trei linii tumorale. În celulele MCF-7, activitate a variat foarte puțin, între  $12,78 \pm 0,68\%$  la 2 h și  $16,53 \pm 0,70\%$ , la 24 h. O activitate dependentă de timp a fost observată în celule HT-29:  $6,99 \pm 0,51\%$ ,  $12,35 \pm 1,92\%$ ,  $18,99 \pm 1,29\%$  și  $27,97 \pm 1,86\%$  (la 1, 2, 3 și, respectiv, 24 h). Celulele A549 au fost cele mai sensibile la acțiunea compusului **VO7**, cu nivelul ROS de  $15,95 \pm 1,19\%$ ,  $28,48 \pm 2,14\%$  și  $46,21 \pm 1,55\%$  după 2, 3 și, respectiv 24 h.



**Fig.3.91.** Activitatea pro-oxidantă în celulele (A) MCF-7, (B) HT-29 și (C) A549 după incubarea cu **VO6** și **VO7** izolați din *V. ovalifolium*

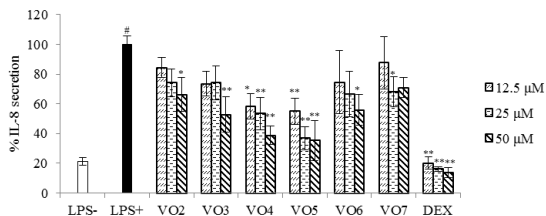
### 3.1.4.5. Evaluarea acțiunii de inhibare a secreției citokinelor

#### 3.1.4.5.1. Inhibarea secreției interleukinei-8

Acțiunea de inhibare a secreției IL-8 a fost evaluată în neutrofile stimulate cu LPS (100 ng/mL) după 30 min de incubare cu doze de 12.5-50  $\mu$ M ale compușilor izolați din *V. ovalifolium* (Fig. 3.92).

Compușii **VO4** și **VO5** au produs o reducere dependentă de doză a eliberării IL-8 de la  $58,21 \pm 8,68\%$  la 12,5  $\mu$ M la  $38,77 \pm 6,19\%$  la 50  $\mu$ M (**VO4**) și de la  $55,04 \pm 8,80\%$  la 12,5  $\mu$ M la  $35,34 \pm 13,48\%$  la 50  $\mu$ M (**VO5**). **VO2** ( $66,35 \pm 11,39\%$ ), **VO3** ( $52,85 \pm 12,15\%$ ) și **VO6** ( $55,83 \pm 10,37\%$ ) au fost activi doar la cea mai mare concentrație testată (50  $\mu$ M). Pe de altă parte, compusul **VO7** a redus semnificativ secreția IL-8 la 25  $\mu$ M ( $68,02 \pm 10,15\%$ ), dar nu și la 50  $\mu$ M. Oricum, efectele produse de compușii testați au fost mai reduse decât

cele manifestate de dexametazonă care a diminuat eliberarea IL-8 din neutrofilele stimulate cu LPS de la  $16,16 \pm 1,58\%$  ( $12,5 \mu\text{M}$ ) la  $13,77 \pm 3,27\%$  ( $25 \mu\text{M}$ ). La  $50 \mu\text{M}$ , următoarea ordine de activitate a fost observată: **VO5 ~ VO4 > VO3 ~ VO6 > VO2 > VO7**.



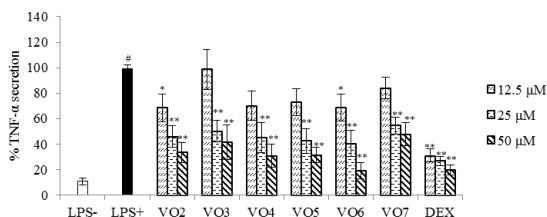
**Fig.3.92.** Nivelul IL-8 în neutrofilele stimulate cu LPS după o incubare de 30 min cu **VO2-VO7** izolați din *V. ovalifolium*

#### 3.1.4.5.2. Inhibarea secreției factorului de necroză tumorală-α

Cele cinci diglicozide iridoidice acilate (**VO2-VO6**) și verbascozida (**VO7**) au fost investigate în ceea ce privește proprietățile de inhibare a TNF-α în neutrofilele stimulate cu LPS (Fig. 3.93).

Compușii **VO2** și **VO6** au produs o reducere dependentă de doză a secreției TNF-α; nivelul TNF-α a fost redus de la  $68,61 \pm 10,90\%$  (la  $12,5 \mu\text{M}$ ) la  $33,41 \pm 7,85\%$  (la  $50 \mu\text{M}$ ) în cazul lui **VO2** și de la  $68,59 \pm 10,34\%$  (la  $12,5 \mu\text{M}$ ) la  $18,97 \pm 6,33\%$  (la  $50 \mu\text{M}$ ) în cazul lui **VO6**. Ceilalți compuși au fost activi doar la 25 și 50 μM. La cea mai ridicată concentrație testată, **VO3**, **VO4**, **VO5** și **VO7** au diminuat producția TNF-α la  $41,35 \pm 13,43\%$ ,  $30,84 \pm 8,98\%$ ,  $31,28 \pm 6,12\%$  și, respectiv,  $47,81 \pm 8,90\%$ . Prin urmare, următoarea ordine a activității a fost observată la  $50 \mu\text{M}$ : **VO6 > VO4 ~ VO5 ~ VO2 > VO3 > VO7**. Totuși, efectele manifestate de compușii

testați au fost mai reduse decât dexametazona care a determinat nivelele TNF- $\alpha$  de  $26,72 \pm 3,73\%$  (la  $12,5 \mu\text{M}$ ) și  $19,74 \pm 3,99\%$  (la  $25 \mu\text{M}$ ).



**Fig. 3.93.** Nivelul TNF- $\alpha$  în neutrofile stimulate cu LPS după o incubare de 30 min cu VO2-VO7 izolați din *V. ovalifolium*

## CONCLUZII GENERALE. CONTRIBUȚII ORIGINALE. PERSPECTIVE DE CERCETARE

În acest studiu au fost investigate din punct de vedere chimic și biologic părțile aeriene provenind de la două specii de lumânărică, și anume *Verbascum ovalifolium* Donn ex Sims și *Verbascum blattaria* L.

**Determinarea cantitativă a polifenolilor totali și a flavonoidelor** din extractul metanolic brut (VO-CME), hexanic (VO-HE), în acetat de etil (VO-EAE), butanolic (VO-BE) și apos (VO-AQE) de *V. ovalifolium*, precum și din extractul hexanic (VB-HE), în acetat de etil (VB-EAE), butanolic (VB-BE), metanolic (VB-ME) și apos (VB-AQE) de *V. blattaria* a evidențiat următoarele:

- **VO-BE** ( $185,82 \pm 1,33$  mg GAE/g;  $106,57 \pm 0,52$  mg CE/g) și **VO-EAE** ( $177,78 \pm 2,21$  mg GAE/g;  $107,42 \pm 0,34$  mg CE/g) au avut cel mai ridicat conținut polifenolic și flavonoidic din *V. ovalifolium*;
- **VB-ME** ( $56,69 \pm 1,07$  mg GAE/g;  $26,34 \pm 0,32$  mg CE/g extract) a prezentat concentrațiile cele mai mari de polifenoli și flavonoide din *V. blattaria*;
- **VO-HE** ( $14,18 \pm 0,75$  mg GAE/g) și **VB-HE** ( $1,53 \pm 0,21$  mg GAE/g) au avut cele mai scăzute valori;
- Extractele de *V. ovalifolium* s-au dovedit o sursă mai bogată în polifenoli și flavonoide față de extractele de *V. blattaria*.

**Determinarea profilului chimic prin HPLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS/MS** a extractelor de *V. ovalifolium* și *V. blattaria* a evidențiat prezența a 53 de constituenți în *V. ovalifolium* și 35 de constituenți în *V. blattaria*, după cum urmează:

<b>CONSTITUENȚI IDENTIFICAȚI ÎN <i>VERBASCUM OVALIFOLIUM</i></b>		
<b>Clasă</b>	<b>Subclasă</b>	<b>Constituenți</b>
28 glicozide iridoidice	5 monoglicozide iridoidice	catalpol aucubina harpagida aiugol lateriozida
	7 diglicozide iridoidice monoacilate	cafeoil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol (×2) <i>p</i> -cumaroil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol (×2) feruloil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol cinamoil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol <i>p</i> -metoxicinamoil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol
	11 diglicozide iridoidice diacilate	cafeoil acetil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol <i>p</i> -cumaroil acetil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol (×2) cinamoil acetil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol (×2) <i>p</i> -metoxicinamoil acetil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol cinamoil <i>p</i> -cumaroil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol (×2) feruloil cinamoil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol dicinamoil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol (×2)
	3 diglicozide iridoidice monoacilate	<i>p</i> -cumaroil diacetil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol cafeoil cinamoil acetil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol cinamoil diacetil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol
	2 alte glicozide iridoidice	6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol <i>p</i> -cumaroil 6- <i>O</i> -ramnozilaucubin
11 glicozide feniletanoidice	6 diglicozide fenilethanoidice	verbascozida izoverbascozida martinozida izomartinozida forsitozida E eukovozida

<b>CONSTITUENȚI IDENTIFICAȚI ÎN <i>VERBASCUM OVALIFOLIUM</i></b>		
<b>Clasă</b>	<b>Subclasă</b>	<b>Constituenți</b>
	5 triglicozide feniletanoidice	angorozida C alisonozida pentozil forsitozida E angorozisa A forsitozida B/F
8 flavonoide	4 glicozide flavonoidice	luteolin-7-glucozida luteolin rutinozida luteolin diglucozida apigenin pentozida
	4 flavonoide non- glicozilate	luteolina apigenina disometina crizoeriol
1 saponină oleanan-triterpenică		desramnozilverbasosaponina
5 acizi organici și fenolici		acid clorogenic acid <i>p</i> -cumaroilchinic glucozida acidului cafeic acid chinic izomerul acidului clorogenic

<b>CONSTITUENȚI IDENTIFICAȚI ÎN <i>VERBASCUM BLATTARIA</i></b>		
<b>Clasă</b>	<b>Subclasă</b>	<b>Constituenți</b>
18 glicozide iridoidice	3 monoglicozide iridoidice	catalpol aiugol lateriozida
	3 diglicozide iridoidice monoacilate	cafeoil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol feruloil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol <i>p</i> -cumaroil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol

<b>CONSTITUENȚI IDENTIFICAȚI ÎN VERBASCUM BLATTARIA</b>		
<b>Clasă</b>	<b>Subclasă</b>	<b>Constituenți</b>
	10 diglicozide iridoidice diacilate	cafeoil acetil 6- <i>O</i> - ramnozilcatalpol <i>p</i> -cumaroil acetil 6- <i>O</i> - ramnozilcatalpol (×3) di- <i>p</i> -cumaroil 6- <i>O</i> - ramnozilcatalpol feruloil <i>p</i> -cumaroil 6- <i>O</i> - ramnozilcatalpol di-feruloil 6- <i>O</i> -ramnozilcatalpol cinamoil acetil 6- <i>O</i> - ramnozilcatalpol (×2) feruloil cinamoil 6- <i>O</i> - ramnozilcatalpol
	2 diglicozide iridoidice triacilate	cafeoil feruloil <i>p</i> -cumaroil 6- <i>O</i> - ramnozilcatalpol <i>p</i> -cumaroil diacetil 6- <i>O</i> - ramnozilcatalpol
3 glicozide feniletanoidice	1 diglicozidă feniletanoidică	verbascozida
	2 triglicozide feniletanoidice	angorozida C angorozida A
4 flavonoide	4 glicozide flavonoidice	apigenin pentozida luteolin glucozida luteolin glucozil-gluconida apigenin glucozil-gluconida
8 saponine oleanan- triterpenice	2 saponine tridesmozidice	desramnozilverbascosaponina buddlejasaponina IV
	6 saponine tetradesmozidice	songarosaponinele A și B ilwensisaponina C verbascosaponina buddlejasaponina I mulleinsaponina IV
2 acizi fenolici		acid <i>p</i> -cumaroilchinic glucozida acidului cafeic



**Determinarea cantitativă HPLC-DAD a extractelor de *V. ovalifolium* a evidențiat că:**

- **VO-EAE** a avut cantitatea cea mai mare de verbascozidă ( $101,40 \pm 0,96$  mg/g), acid clorogenic ( $28,87 \pm 0,55$  mg/g), luteolin-7-*O*-glucozidă ( $16,44 \pm 0,13$  mg/g) și luteolină ( $11,36 \pm 0,84$  mg/g);
- **VO-BE** a concentrat cele mai ridicate nivele de aucubină ( $26,40 \pm 0,29$  mg/g);
- **VO-HE** a avut cele mai scăzute cantități de verbascozidă ( $0,88 \pm 0,01$  mg/g), acid clorogenic ( $0,34 \pm 0,01$  mg/g), luteolin-7-*O*-glucozidă ( $0,16 \pm 0,01$  mg/g) și luteolină ( $0,27 \pm 0,01$  mg/g);
- **VO-CME** a fost singurul extract în care toți compușii au fost cuantificați: verbascozida ( $55,51 \pm 0,68$  mg/g), acid clorogenic ( $19,99 \pm 0,24$  mg/g), aucubină ( $15,88 \pm 0,54$  mg/g), luteolin-7-*O*-glucozidă ( $9,06 \pm 0,91$  mg/g) și luteolină ( $3,46 \pm 0,55$  mg/g).

**Potențialul antioxidant al extractelor de *Verbascum* a fost evaluat prin diferite metode spectrofotometrice *in vitro* arătând că:**

- **VO-BE** a fost cel mai potent scavenger față de radicalul DPPH și anionul superoxid, cu valori  $IC_{50}$  de  $29,40 \pm 0,25$  și, respectiv,  $490,49 \pm 2,57$   $\mu$ g/mL;
- **VO-EAE** a exercitat cea mai mare capacitate reducătoare ( $IC_{50} = 15,19 \pm 0,37$   $\mu$ g/mL);
- **VO-HE** și **VO-AQE** au fost cei mai activi agenți chelatori, cu valori  $IC_{50}$  de  $0,10 \pm 0,01$  și, respectiv,  $0,53 \pm 0,03$  mg/mL;
- **VB-BE** a prezentat cea mai ridicată activitate de scavenger față de radicalul hidroxil ( $IC_{50} = 224,14 \pm 10,35$   $\mu$ g/mL);
- **VO-CME** a prezentat o bună activitate de scavenger față de radicalii DPPH ( $IC_{50} = 40,97 \pm 0,54$   $\mu$ g/mL), hidroxil ( $IC_{50} = 910,88 \pm 5,83$   $\mu$ g/mL) și anionul

superoxid ( $IC_{50} = 573,31 \pm 2,05 \mu\text{g/mL}$ ), o bună putere reducătoare ( $IC_{50} = 22,56 \pm 1,04 \mu\text{g/mL}$ ) și o bună abilitate de chelatare a ionului feros ( $IC_{50} = 3,66 \pm 0,28 \text{ mg/mL}$ );

- **VB-ME** a avut o activitate antioxidantă *in vitro* inferioară, cu valori  $IC_{50}$  de  $591,67 \pm 25,58 \mu\text{g/mL}$  în testul de determinare a capacității de scavenger față de radicalul DPPH și  $49,67 \pm 1,40 \mu\text{g/mL}$  în testul de determinare a capacității reducătoare.

**Coeficienții de corelație dintre acțiunea antioxidantă ( $IC_{50}$ ) și profilul polifenolic** a evidențiat că activitatea de scavenger față de radicalul DPPH a extractelor de *Verbascum* a fost puternic corelată ( $R \in [-0,7186; -0,9634]$ ,  $p < 0,05$ ) cu totalul polifenolic, flavonoidic și conținutul de acid clorogenic. Puterea reducătoare a fost foarte puternic corelată ( $R \in [-0,9254; -0,9984]$ ,  $p < 0,05$ ) cu total polifenolic, flavonoidic, verbascozida și acidul clorogenic. Corelații foarte puternice ( $R = -0,9910$  și  $-0,9987$ ,  $p < 0,05$ ) și moderate ( $R = -0,6976$  și  $-0,5892$ ,  $p < 0,05$ ) au fost observate între activitatea de scavenger față de anionul radicalic superoxid și totalul polifenolic, flavonoidic, concentrația de acid clorogenic și, respectiv, concentrația verbascozidei. Activitatea de scavenger față de radicalul hidroxil a fost puternic corelată ( $R = -0,8939$ ,  $p < 0,05$ ) doar cu total polifenolic.

Efectul produs de extractele de *V. ovalifolium* asupra **viabilității celulelor tumorale de melanom malign SK-MEL-2 și a celulelor non-tumorale fibroblastice V79 provenind de la hamsteri chinezești** a fost determinat spectrofotometric prin metoda MTT (incubare de 24 h). La  $100 \mu\text{g/mL}$ , viabilitatea celulelor SK-MEL-2 a fost redusă semnificativ de toate extractele în comparație cu martorul negativ; **VO-BE** a fost cel mai citotoxic extract ( $CC_{50} = 77,98$

$\pm 3,05 \mu\text{g/mL}$ ). **VO-CME** și **VO-EAE** au exercitat ușoare efecte de citotoxicitate selectivă, cu o reducere mai pronunțată a viabilității celulelor tumorale SK-MEL-2 (de 25,41% și, respectiv, 30,74%) decât a celor normale V79 (de 10,02% și, respectiv, 15,78%).

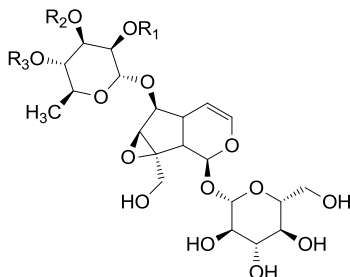
**Activitatea genotoxică produsă extractele din *V. ovalifolium*** cu cea mai scăzută citotoxicitate în celulele V79, VO-CME și VO-EAE, a fost evaluată prin testul Comet (100  $\mu\text{g/mL}$ , incubare de 24 h). **VO-CME** ( $2,17 \pm 0,37\%$  ADN în coadă) și **VO-EAE** ( $9,27 \pm 1,20\%$  ADN în coadă) s-au dovedit lipsite de genotoxicate prin comparație cu martorul negativ ( $10,18 \pm 1,04\%$  ADN în coadă). Dintre aceste două extracte, numai **VO-CME** a prezentat un efect ușor **antigenotoxic** împotriva leziunilor produse de razele UV (100  $\text{J/m}^2$ , 15 min) ( $47,14 \pm 1,07\%$  vs.  $59,67 \pm 1,00\%$  DNA în coada celulelor expuse doar la UV).

**Activitatea de inhibare a secreției citokinelor de către extractele de *V. ovalifolium* și *V. blattaria*** a fost evaluată prin citometrie în flux în neutrofile stimulate cu LPS. La 100  $\mu\text{g/mL}$ , **VB-ME**, cel mai activ extract, a diminuat eliberarea IL-8 și TNF- $\alpha$  cu  $34,69 \pm 6,61\%$  și, respectiv,  $83,93 \pm 1,72\%$ . VO-CME nu a produs efecte semnificative asupra secreției de IL-8, în timp ce VO-EAE nu a influențat eliberarea TNF- $\alpha$ . Global, extractul metanolic de *V. blattaria* a produs efecte anti-secretorii mai pronunțate asupra IL-8 și TNF- $\alpha$  decât extractele de *V. ovalifolium*.

**Separarea prin cromatografie în contracurent de înaltă performanță** a permis izolarea rapidă a 13 constituenți majori și minori din extractele de *V. ovalifolium* și *V. blattaria*. Structurile compușilor izolați au fost elucidate prin analiza spectrelor UV, HRESIMS, ESI-MS/MS, RMN 1D ( $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN), RMN 2D ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HSQC,

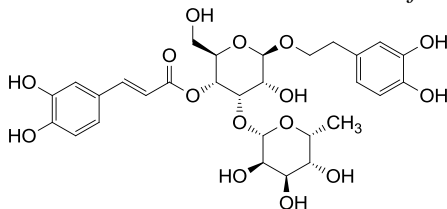
HMBC și ROESY) și compararea acestora cu datele din literatură. Prin urmare, următorii compuși au fost izolați:

- 8 glicozide iridoidice:
  - 5 diglicozide iridoidice acilate de tipul catalpolului din *V. ovalifolium*
  - 3 diglicozide iridoidice acilate de tipul catalpolului din *V. blattaria*



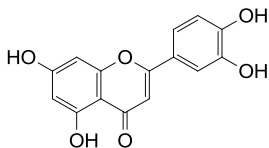
Compus	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Cant.	Puritate
<b>VO2</b> Premnacorumbozida B	H	Coum	H	4 mg	95,4%
<b>VO3</b> Sacatozida	Coum	H	H	6 mg	97,5%
<b>VO4</b> Premnacorumbozida A	Coum	Ac	H	6 mg	98,3%
<b>VO5</b> Scorodiozida	Cinn	Ac	H	10 mg	96,0%
<b>VO6</b> 6- <i>O</i> -(3'',4''-di- <i>O</i> - <i>trans</i> -cinamoil)- $\alpha$ - <i>L</i> -ramnopyranozilcatalpol	H	Cinn	Cinn	8 mg	95,3%
<b>VB1</b> Scropoliozida F	H	H	Coum	2 mg	95,8%
<b>VB2</b> Scrofulozida A3	H	Ac	Coum	16 mg	94,3%
<b>VB3</b> Gmelinozida L	H	Ac	Cinn	13 mg	93,1%

- 1 glicozidă feniletanoidică din *V. ovalifolium*:



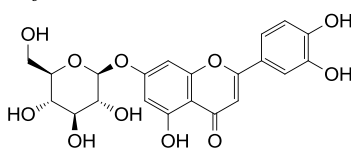
Verbascosida  
(**VO7**, 9 mg, puritate 98,0%)

- 2 flavonoide din *V. ovalifolium*:



Luteolina

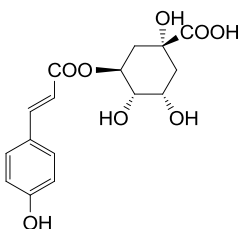
(VO1, 8 mg, puritate 99,0%)



Luteolin-7-*O*-glucozida

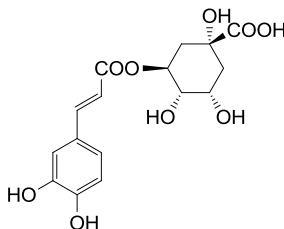
(VO8, 8 mg, puritate 97,0%)

- 2 acizi fenolici din *V. ovalifolium*:



Acid 3-*O*-*p*-*trans*-cumaroilchinic

(VO9, 2 mg, puritate 96,1%)



Acid clorogenic

(VO10, 4 mg, puritate 99,0%)

Dacă flavonoidele (luteolina, luteolin-7-*O*-glucozida), acizii fenolici (acidul 3-*O*-*p*-*trans*-cumaroilchinic, acidul clorogenic), glicozida feniletanoidică (verbascosida), sacatozida, premnacorimbozida B și scropoliozida F au fost anterior descrise în specii de *Verbascum*, ceilalți compuși sunt raportați pentru prima dată în acest gen. Este cazul premnacorimbozidei A, scorodiozidei, 6-*O*-(3'', 4''-di-*O*-*trans*-cinamoil)- $\alpha$ -*L*-ramnopiranozilcatalpolului izolați din *V. ovalifolium* și a scrofulozidei A3 și gmelinozidei L izolate din *V. blattaria*. Acești constituenți pot servi drept markeri chemotaxonomici.

Efectele produse de **glicozidele iridoidice și feniletanoidice izolate din *V. ovalifolium* asupra viabilității celulare, apoptozei, ciclului celular și a nivelului de SRO** în celulele umane de adenocarcinom mamar MCF-7, colorectal

HT-29 și pulmonar A549, precum și în celule epiteliale mamare normale MCF-10A au fost investigate prin testul MTT, anexina V – iodură de propidiu, de fragmentare a ADN-ului, de pigmentare a ADN-ului cu iodură de propidiu și DCFH-DA. Patru compuși (premnacorimbozida A și B, saccatozida și scorodiozida) au fost inactivi. Ceilalți doi compuși au prezentat, la 100 μg/mL și incubare de 48 h, următoarele efecte citotoxice:

- **6-O-(3'', 4''-di-O-trans-cinamoil)-α-L-ramno-piranozilcatalpol:** 32,18 ± 8,74%, 12,15 ± 4,20% și 11,97 ± 1,83% în celulele MCF-7, HT-29 și, respectiv, A549; fără citotoxicitate în celulele MCF-10A;
- **verbascozida:** 55,39 ± 5,34%, 42,17 ± 9,41% și 38,54 ± 7,54% în celule MCF-7, HT-29 și, respectiv, A549; fără citotoxicitate în celulele MCF-10A; valoare CC<sub>50</sub> de 84,69 ± 15,65 μg/mL în celulele MCF-7.

**6-O-(3'', 4''-di-O-trans-Cinamoil)-α-L-ramno-piranozilcatalpolul** a indus:

- blocarea ciclului celular în faza G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> în celulele MCF-7, procentul de ADN crescând cu 11,5%;
- apoptoză în celulele MCF-7, cu rata celulelor apoptotice crescând cu 6,2% și factorul de îmbogățire cu 0,70 AU;
- efecte pro-oxidante în celulele HT-29 și A549, cu nivelul SRO la 24 h de 21,59 ± 1,60% și, respectiv, 42,57 ± 2,56%.

**Verbascozida** a indus

- o creștere a procentului celulelor MCF-7 și A549 în faza subG<sub>1</sub> de 7,4% și, respectiv, 9,9%;
- apoptoză în celulele MCF-7, HT-29 și A549, cu rata celulelor apoptotice crescând cu 26,4%, 19,6% și, respectiv, 18,0%; factorii de îmbogățire au crescut

semnificativ cu 2,08 și 2,54 AU în celulele MCF-7 și, respectiv, A549;

- efecte pro-oxidante în celulele MCF-7, HT-29 și A549, cu nivele SRO la 24 h de  $16,53 \pm 0,70\%$ ,  $27,97 \pm 1,86\%$  și, respectiv,  $46,21 \pm 1,55\%$ .

**Activitatea inhibitorie a glicozidelor iridoidice și feniletanoidice izolate din *V. ovalifolium* și *V. blattaria* asupra secreției citokinelor** a fost investigată prin citometrie în flux în neutrofile stimulate cu LPS, observându-se că:

- **scorodiozida** a prezentat cea mai mare reducere a eliberării IL-8 (de  $66,64 \pm 13,48\%$ ), fiind urmată de **premnacorimbozida A** (de  $61,23 \pm 6,19\%$ );
- **6-O-(3'', 4''-di-O-trans-cinamoil)- $\alpha$ -L-ramnopiranozilcatalpolul** a fost cel mai potent compus în testul TNF- $\alpha$ , producând o reducere a nivelului TNF- $\alpha$  de  $81,03 \pm 6,33\%$ ;
- **verbascozida** a fost cea mai puțin activă, cu efecte supresive de  $29,23 \pm 6,76\%$  și  $52,19 \pm 8,90\%$  asupra secreției IL-8 și a TNF- $\alpha$ .

## **Contribuții originale. Perspective de cercetare**

**Originalitatea** tezei de doctorat constă în:

- investigarea din punct de vedere chimic și biologic a două specii de *Verbascum* (*Verbascum ovalifolium* Donn ex Sims și *Verbascum blattaria* L.) care cresc spontan pe teritoriul României și al Republicii Moldova și care nu au fost anterior studiate;
- determinarea profilului chimic al extractelor obținute din părțile aeriene ale celor două specii de lumânărică prin HPLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS/MS și descrierea pentru prima dată a strategiilor de identificare a diglicozidelor iridoidice acilate de tipul catalpolului;

- izolarea unui număr de 13 compuși prin cromatografie în contracurent de înaltă performanță, 10 din *V. ovalifolium* și 3 din *V. blattaria*; toți compușii au fost descriși pentru prima dată în aceste două specii, cu cinci dintre ei raportați pentru prima dată în genul *Verbascum*;
- utilizarea pentru prima dată a cromatografiei în contracurent de înaltă performanță ca o metodă eficientă de separare a constituenților din specii de *Verbascum*; condițiile cromatografice pentru purificarea diglicozidelor iridoidice acilate de tipul catalpolului au fost descrise pentru prima dată;
- evaluarea acțiunii citotoxice, pro-apoptotice, genotoxice/antigenotoxice și de inhibare a secreției citokinelor pentru extracte și/sau compuși din cele două specii de *Verbascum*;
- evidențierea pentru doi compuși [6-*O*-(3", 4"-*di-O-trans*-cinamoil)- $\alpha$ -*L*-ramnopiranozilcatalpol și verbascozida] a unor efecte citotoxice selective față de celulele tumorale; primul compus a produs blocarea ciclului celular în faza  $G_0/G_1$ , în timp ce cel de-al doilea a indus acumularea celulelor în faza sub $G_1$ ; mai mult, ambii compuși au prezentat efecte pro-apoptotice și pro-oxidante semnificative în celule tumorale;
- evidențierea efectului de inhibare a secreției de IL-8 și TNF- $\alpha$  în neutrofile stimulate cu LPS de către toate diglicozidele iridoidice izolate.

### **Perspective de cercetare**

Rezultatele promițătoare obținute în cadrul actualei tezei de doctorat ar putea justifica următoarele direcții posibile:

- optimizarea condițiilor de cromatografie în contracurent de înaltă performanță pentru purificarea la scară largă a compușilor din cele două specii de *Verbascum*;



- elucidarea mecanismelor care stau la baza citotoxicității compușilor activi în celule tumorale;
- investigarea posibilelor interacțiuni de sinergism dintre compușii activi și medicamente anticanceroase, cu scopul de a reduce dozele chimioterapice și, astfel, toxicitatea lor;
- evaluarea efectelor de inhibare a secreției altor citokine pro-inflamatorii (IL-1, IL-6, NF-κB, matrix metaloproteinaze, proteina chemoatractantă monocitară 1, proteine inflamatorii macrofagiale 1α și 1β);
- investigarea posibilelor interacțiuni de sinergism dintre compușii activi și medicamente anti-inflamatoare, cu scopul de a reduce doza și, astfel, toxicitatea, anti-inflamatoarelor;
- prepararea și caracterizarea unor preparate farmaceutice care să înglobeze compușii activi, astfel încât să le crească stabilitatea și bioactivitatea;
- evaluarea potențialului antitumoral și anti-inflamator prin studii *in vivo* ale preparatelor;
- dezvoltarea unor biotehnologii pentru creșterea productivității compușilor care au dovedit eficacitate *in vitro*;
- (semi)sinteza unor analogi structurali cu efecte biologice, toxicitate și proprietăți fizico-chimice îmbunătățite;
- izolarea altor compuși din cele două specii de *Verbascum* species și evaluarea efectelor biologice.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

6. Alipieva KI, Orhan IE, Cankaya IIT *et al.* Treasure from garden: chemical profiling, pharmacology and biotechnology of mulleins. *Phytochem Rev* 2014; 13: 417-444.
8. Georgiev MI, Ali K, Alipieva K *et al.* Metabolic differentiations and classification of *Verbascum* species by NMR-based metabolomics. *Phytochemistry* 2011; 72: 2045-2051.
9. Mihailovic V, Kreft S, Benkovic ET *et al.* Chemical profile, antioxidant activity and stability in stimulated gastrointestinal tract model system of three *Verbascum* species. *Ind Crops Prod* 2016; 89: 141-151.
10. Sarbu I, Stefan N, Oprea A. Plante vasculare din Romania: determinator ilustrat de teren. Bucuresti: Victor B Victor, 2013, 690-694.
13. Georgiev MI, Ludwig-Muller J, Alipieva K, Lippert A. Sonication-assisted *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Verbascum xanthophoenicum* Griseb. for bioactive metabolite accumulation. *Plant Cell Rep* 2011; 30: 859-866.
17. Kahraman C, Akdemir ZS, Tatli II. Promising cytotoxic activity profile, biological activities and phytochemical screening of *Verbascum* L. species. *Med Aromat Plant Sci Biotechnol* 2012; 6: 63-75.
44. Tatli II, Akdemir ZS. Chemical constituents of *Verbascum* L. species. *FABAD J Pharm Sci* 2004; 29: 93-107.
47. Akdemir ZS, Tatli II, Bedir E, Khan IA. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Verbascum lasianthum*. *Turk J Chem* 2004; 28: 227-234.
51. Dimitrova P, Kostadinova E, Milanova V *et al.* Antiinflammatory properties of extracts and compounds isolated from *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. *Phytother Res* 2012; 26: 1681-1687.

58. Alipieva K, Korkina L, Orhan IE, Georgiev MI. Verbascoside - a review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnol Adv* 2014; 32: 1065-1076.
64. Georgiev M, Alipieva K, Orhan I *et al.* Antioxidant and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. and its phenylethanoid glycosides. *Food Chem* 2011; 128: 100-105.
77. Hartleb I, Seifert K. Songarosaponin D - a triterpenoid saponin from *Verbascum songaricum*. *Phytochemistry* 1993; 35: 1009-1011.
90. Dimitrova P, Georgiev MI, Khan MTH, Ivanovska N. Evaluation of *Verbascum* species and harpagoside in models of acute and chronic inflammation. *Cent Eur J Biol* 2013; 8: 188-194.
91. Karamian R, Ghasemlou F. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of three *Verbascum* species from Iran. *J Med Plant By-Prod* 2013; 1: 43-51.
92. Paun G, Neagu E, Albu C, Radu GL. *Verbascum phlomoides* and *Solidago virgaureae* herbs as natural source for preventing neurodegenerative diseases. *J Herb Med* 2016; 6:180-186.
95. Tatli II, Akdemir ZS. Cytotoxic activity on some *Verbascum* species growing in Turkey. *Hacett Univ J Fac Pharm* 2006; 26: 77-85.
100. Nofouzi K. Study on the antioxidant activity and *in vitro* antifungal activity of *Verbascum speciosum* methanolic extract. *J Mycol Res* 2015; 2: 97-103.
112. Georgiev M, Pastore S, Lulli D *et al.* *Verbascum xanthophoeniceum*-derived phenylethanoid glycosides are potent inhibitors of inflammatory chemokines in dormant and interferon-gamma-stimulated human keratinocytes. *J Ethnopharmacol* 2012; 144: 754-760.
115. Dimitrova P, Alipieva K, Grozdanova T *et al.* New iridoids from *Verbascum nobile* and their effect on lectin-

induced T cell activation and proliferation. *Food Chem Toxicol* 2018; 111: 605-615.

124. Grabias B, Swiatek L. Iridoid glucosides in *Verbascum* genus. *Herba Pol* 1987; 33: 225-232.

126. Youn IS, Han AR, Rob MS, Seo EK. Constituents of the leaves of *Verbascum blattaria*. *Nat Prod Commun* 2015; 10: 445-446.

158. Brownstein KJ, Gargouri M, Folk WR, Gang DR. Iridoid and phenylethanoid/phenylpropanoid metabolite profiles of *Scrophularia* and *Verbascum* species used medicinally in North America. *Metabolomics* 2017; 13: 133.

161. Warashina T, Miyase T, Ueno A. Iridoid glycosides from *Verbascum thapsus* L. *Chem Pharm Bull* 1991; 39: 3261-3264.

188. Marston A, Hostettmann K. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. *J Chromatogr A* 2006; 1112: 181-194.

190. Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 2005; 1065: 145-168.

192. Garrard IJ. Simple approach to the development of a CCC solvent selection protocol suitable for automation. *J Liq Chromatogr Rel Technol* 2005; 28: 1923-1935.

204. Fernandez L, Diaz AM, Ollivier E *et al.* An iridoid diglycoside isolated from *Scrophularia scorodonia*. *Phytochemistry* 1995; 40: 1569-1571.

205. Taskova RM, Gotfredsen CH, Jensen SR. Chemotaxonomy of *Veronicaceae* and its allies in the *Plantaginaceae*. *Phytochemistry* 2006; 67:2 86-301.

206. Miyase T, Mimatsu A. Acylated iridoid and phenylethanoid glycosides from the aerial parts of *Scrophularia nodosa*. *J Nat Prod* 1999; 62: 1079-1084.

207. Hosny M, Rosazza JPN. Gmelinosides A-L, twelve acylated iridoid glycosides from *Gmelina arborea*. *J Nat Prod* 1998; 61: 734-742.

215. Xiong J, Wu, XY, Wang PP *et al.* Acylated iridoid diglycosides from the cultivated endangered ornamental tree *Gmelina hainanensis*. *Phytochem Lett* 2018; 25: 17-21.

225. Leitao GC, Pinto SC, de Oliveira DR *et al.* Gradient x isocratic elution CCC on the isolation of verbascoside and other phenylethanoids: influence of the complexity of the matrix. *Planta Med* 2015; 81: 1609-1613.

243. Anter J, Tasset I, Demyda-Peyrás S *et al.* Evaluation of potential antigenotoxic, cytotoxic and proapoptotic effects of the olive oil by-product "alperujo", hydroxytyrosol, tyrosol and verbascoside. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2014; 772: 25-33.

244. Harput US, Genc Y, Saracoglu I. Cytotoxic and antioxidative activities of *Plantago lagopus* L. and characterization of its bioactive compounds. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 1554-1559.

263. Zhou L, Feng Y, Jin Y *et al.* Verbascoside promotes apoptosis by regulating HIPK2-p53 signaling in human colorectal cancer. *BMC Cancer* 2014; 14: 747.

269. Attia YM, El-Kersh DM, Wagdy HA, Elmazar MM. Verbascoside: identification, quantification, and potential sensitization of colorectal cancer cells to 5-FU by targetting PI3K/AKT pathway. *Sci Rep* 2018; 8: 16939.

275. Cheimondi C, Samara P, Polychronopoulos *et al.* Selective cytotoxicity of the herbal substance acteoside against tumor cells and its mechanistic insights. *Redox Biol* 2018; 16: 169-178.

277. Zhu T, Zhang L, Ling S *et al.* Anti-inflammatory activity comparison among scropoliosides – catalpol derivatives with 6-O-substituted cinnamoyl moieties. *Molecules* 2015; 20: 19823-19836.