

**MIISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA  
IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„NICOLAE TESTEMIȚANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA**

**Cu titlu de manuscris  
C.Z.U.: 615.332.582.824**

**BENEA ANNA**

***HYPERICUM PERFORATUM L. – SURSĂ DE NOI FORME  
FARMACEUTICE***

**316.01 - FARMACIE**

Rezumatul tezei de doctor în științe farmaceutice

**CHIȘINĂU, 2023**

Teza a fost elaborată în cadrul Catedrei de farmacognozie și botanică farmaceutică a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova.

**Conducător științific: NISTREANU Anatolie**, dr. șt. farm., prof. univ.

**Consultant științific: PARIU Sergiu**, dr. hab. șt. med., conf. cercet.

**Referenți oficiali:**

**MIRON Anca**, dr. șt. farm., prof. univ., director departament, Departamentul de Științe Farmaceutice II, Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” din Iași, România

**ADAUJI Stela**, dr. șt. farm., conf. univ., Catedra de farmacie socială „Vasile Procopișin”, IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

**Componenta consiliului științific specializat:**

DIUG Eugen, **președinte**, dr. hab. șt. farm., prof. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”

UNCU Livia, **secretar științific**, USMF „Nicolae Testemițanu”

VALICA Vladimir, dr. hab. șt. farm., prof. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”

PROFIRE Lenuța, dr. șt. farm., prof. univ., UMF „Grigore T. Popa” din Iași, România

CIOBANU Nicolae, dr. șt. farm., conf. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”

Susținerea va avea loc la 10.01.2024, ora 14:00, sala de conferințe 204, în ședința Consiliului științific specializat D 316.01-23-58 din cadrul IP Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova, or. Chișinău, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165.

Teza de doctor în științe farmaceutice și rezumatul pot fi consultate la biblioteca științifică medicală a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” și pe pagina web a ANACEC (<https://www.anacec.md/>)

Rezumatul a fost expediat la data de 05.12.2023.

**Secretar științific**

**al Consiliului științific specializat,**

dr. șt. farm., conf. univ.

\_\_\_\_\_

**UNCU Livia**

**Conducător științific,**

dr. șt. farm., prof. univ.

\_\_\_\_\_

**NISTREANU Anatolie**

**Consultant științific,**

dr. hab. șt. med., conf. cercet.

\_\_\_\_\_

**PARIU Sergiu**

**Autor:**

**BENEA Anna**

\_\_\_\_\_

© Benea Anna, 2023

## CUPRINS

<b>REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII .....</b>	<b>4</b>
<b>CONȚINUTUL TEZEI. ....</b>	<b>8</b>
<b>1. CARACTERISTICA GENERALĂ A SPECIILOR GENULUI <i>HYPERICUM</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>2. ANALIZA CHIMICĂ A PRODUSELOR VEGETALE DIN SPECIILE GENULUI <i>HYPERICUM</i> .....</b>	<b>8</b>
2.1. Obținerea produselor vegetale .....	8
2.2. Analiza calitativă a speciilor genului <i>Hypericum</i> .....	10
2.3. Analiza cantitativă a compușilor chimici din speciile genului <i>Hypericum</i>	12
<b>3. OBȚINEREA ȘI STUDIUL CHIMIC AL PRODUSELOR EXTRACTIVE DIN SPECIA <i>HYPERICUM PERFORATUM</i> .....</b>	<b>14</b>
3.1. Obținerea și analiza chimică a uleiului volatil din speciile genului <i>Hypericum</i> .....	14
3.2. Obținerea extractelor uscate din produsele vegetale ale speciei <i>H.</i> <i>perforatum</i> .....	15
3.3. Analiza chimică a extractelor uscate obținute din flori și părți aeriene ale speciei <i>H. perforatum</i> .....	16
3.4. Optimizarea metodei de obținere a extractelor uscate .....	18
3.5. Validarea metodei de dozare a flavonoidelor în extractele uscate .....	18
3.6. Standardizarea extractelor uscate .....	19
3.7. Stabilitatea și termenul de valabilitate .....	20
<b>4. CERCETĂRI FARMACOLOGICE A EXTRACTELOR USCATE ȘI A ULEIULUI VOLATIL DIN <i>H. PERFORATUM</i> .....</b>	<b>21</b>
4.1. Studiul activității antioxidante a extractelor uscate, obținute din <i>Hyperici</i> <i>herba</i> și <i>Hyperici flores</i> .....	21
4.2. Testarea acțiunii antiinflamatoare <i>in vivo</i> .....	21
4.3. Studiul activității antibacteriene și antifungice ale extractelor uscate din părțile aeriene și flori de <i>H. perforatum</i> .....	23
4.4. Studiul activității antibacteriene și antifungice a uleiului volatil din părți aeriene de <i>H. perforatum</i> .....	23
4.5. Studiul toxicității acute a extractelor uscate .....	24
<b>CONCLUZII GENERALE .....</b>	<b>25</b>
<b>RECOMANDĂRI PRACTICE .....</b>	<b>26</b>
<b>BIBLIOGRAFIE .....</b>	<b>27</b>
<b>LISTA PUBLICAȚIILOR .....</b>	<b>29</b>
<b>ANOTAREA .....</b>	<b>32</b>
<b>ANNOTATION .....</b>	<b>33</b>
<b>АННОТАЦИЯ .....</b>	<b>34</b>

## REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

**Actualitatea.** Sunătoarea (*Hypericum perforatum* L.) este o plantă medicinală cu o istorie veche (mai mult de 2400 de ani), fiind cunoscută din secolul al V-lea î.Hr. drept „vindecătoare a rănilor. În prezent, această specie este introdusă în diverse farmacopei [1].

În diferite părți ale plantei au fost identificați și determinați cantitativ metaboliți secundari din diverse grupuri chimice: naftodiantrone, floroglucinoli, proantocianidine, ulei volatil. Studiile farmaceutice curente au pus în evidență proprietăți antidepressive, antioxidante, anticonvulsivante, analgezice, antiinflamatoare, citotoxice și antidiabetice ale compușilor chimici identificați în *H. perforatum* [2]. Extractele polifenolice și uleiul volatil din *H. perforatum* au demonstrat activitate antibacteriană în raport cu microorganismele (gram-pozitive, gram-negative) și fungi [3]. Efectul antidepressiv al *Hyperici herba* se datorează conținutului de hiperforină, hipericină și de pseudohipericină, care interacționează cu receptorii serotoninergici, noradrenergici, dopaminergici, acidul gamma-aminobutiric. Acești compuși inhibă activitatea enzimelor a monoaminooxidazei și catecol-O-metil transferazei [4].

Speciile genului *Hypericum* sunt studiate din diverse criterii: compoziția chimică, în funcție de condițiile de creștere (zone geografice, condiții climatice, plante din flora spontană sau din flora cultivată); faze fenologice; părți ale plantei; acțiuni biologice (antimicrobiene, antidepressive, antiinflamatoare, antioxidante, diuretice, antivirale, anticanceroase); interacțiuni a compușilor chimici cu preparatele sintetice; grad de toxicitate [3].

În flora spontană a Republicii Moldova (RM), sunt atestate 5 specii ale genului *Hypericum*: *H. perforatum* L.; *H. elegans* Steph; *H. hirsutum* L.; *H. tetrapterum* Fries.; *H. montanum* L. Specia *H. perforatum* a fost introdusă în anul 2007 în colecția Centrului Științifico-Practic în Domeniul Plantelor Medicinale a USMF „Nicolae Testemițanu” (CȘPDPM) [5].

În RM părțile aeriene de sunătoare (*H. perforatum*) sunt utilizate pe larg ca remediu astringent, antibacterian, stomahic și antiinflamator. În farmaciile comunitare din țară sortimentul de produse fitoterapeutice autorizate cu conținut de produs vegetal sau extracte este mic, de asemenea, nu sunt produse fitoterapeutice de origine autohtonă. În prezent, planta este limitat valorificată în aspect medical și de industria farmaceutică din RM; nu sunt standardizate produsele vegetale și extractive din *H. perforatum*, de origine autohtonă, care ulterior ar putea servi drept surse în elaborarea de noi forme farmaceutice.

**Scopul lucrării:** studiul farmacognostic al speciilor genului *Hypericum* pentru obținerea, standardizarea și evaluarea acțiunii farmacologice ale produselor extractive.

### Obiectivele de cercetare:

1. Analiza macroscopică și microscopică a speciilor genului *Hypericum* din flora Republicii Moldova.
2. Studiul chimic comparativ al speciilor genului *Hypericum* în vederea identificării produsului vegetal cu conținut maxim de compuși fenolici.

3. Izolarea și analiza chimică a uleiului volatil, obținut din produsele vegetale ale speciilor genului *Hypericum*.
4. Obținerea, analiza chimică, standardizarea și studiul stabilității extractelor uscate din părțile aeriene și din flori de *H. perforatum*.
5. Studiul activităților antibacteriene, antioxidante, antiinflamatoare ale produselor extractive; determinarea gradului de toxicitate acută ale extractelor uscate din *H. perforatum*.
6. Elaborarea Proiectelor de monografii farmaceutice pentru produsul vegetal *Hyperici perforati flores* și pentru produsul extractiv uscat *Hyperici perforati flores extractum siccum*.

**Ipoteza de cercetare.** Ne propunem să valorificăm produsele vegetale și extractive (ulei volatil, extracte uscate), obținute din *Hypericum perforatum*, printr-un studiu complex chimic și biologic, cu elaborarea ulterioară a Documentației Analitice de Normare (DAN), ceea ce va permite utilizarea acestor produse în elaborarea de noi forme farmaceutice de origine vegetală, cu proprietăți antibacteriene, antiinflamatoare și antioxidante.

**Sinteza metodologiei de cercetare.** Recunoașterea speciilor genului (*g.*) *Hypericum* în habitatul natural din RM s-a realizat după caracteristicile macroscopice și microscopice. Colectarea și condiționarea produselor vegetale s-a efectuat conform cerințelor stipulate în monografiile din *Farmacopeea Europeană*, ed. 10, vol. 1, 2019 și din *Farmacopeea Română*, ed. a X-a.

Identificarea și determinarea cantitativă a compușilor chimici, în produsele vegetale și extractive, s-a realizat prin utilizarea metodelor contemporane chimice și fizico-chimice: reacții de culoare și de sedimentare, cromatografie pe strat subțire (CSS), cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC), spectrofotometrie UV-VIS, cromatografie gazoasă-spectrometrie de masă (GC-MS).

Uleiul volatil s-a extras din produsele vegetale proaspete și uscate prin hidrodistilare, metoda 1, descrisă în farmacopeile în vigoare, utilizând recipientul Ginsberg. Extractele uscate au fost obținute prin 2 metode: repercolare cu fracționarea produsului vegetal în părți egale cu ciclul neterminat și macerare fracționată cu agitare.

Termenul de valabilitate al extractelor uscate a fost stabilit prin păstrare în condiții obișnuite (în timp real) și în condiții accelerate.

Activitatea antioxidantă a extractelor uscate, obținute din părți aeriene și din flori de *H. perforatum* a fost determinată prin 2 metode: DPPH<sup>•</sup> și ABTS<sup>•+</sup>. Activitatea antibacteriană și antifungică a uleiului volatil și a extractelor uscate, obținute din produsele vegetale de *H. perforatum*, au fost testate prin utilizarea metodei diluărilor în serie în mediul nutritiv lichid. Testul a fost efectuat pe culturi de microorganisme gram-pozitive, gram-negative și fungi. Cercetările au fost realizate în Laboratorul științific „Infecții intraspitalicești” din cadrul USMF „Nicolae Testemițanu”.

Studiul activității antiinflamatoare a extractelor uscate, obținute din *Hyperici herba* și *Hyperici flores*, produse vegetale colectate din flora spontană a RM și din colecția CȘPDPM, USMF „Nicolae Testemițanu”, a fost realizat *in vivo* prin inducerea edemului labei posterioare la șobolani.

Studiul toxicității acute a extractelor uscate de *H. perforatum* s-a realizat prin metoda dozelor fixe, cu stabilirea gradului toxic, conform ghidului TG 423 (*Acute Toxic Class Method*), recomandat de Organizația Economică pentru Cooperare și Dezvoltare (OECD). Investigațiile preclinice, toxico-farmacologice au fost aprobate de Comitetul de Etică al Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu”, proces-verbal nr. 29 din 24.03.2015.

Rezultatele experimentale au fost supuse analizei statistice descriptive, obținând următorii parametri statistici: media (M), intervalul de încredere 95% (CI), mediana (Me), abaterea standard (SD), abaterea intercuartilă (IQR), valoarea minimă (X min) și maximă (X max). Normalitatea distribuției datelor a fost verificată prin testul *Shapiro-Wilk*. Analiza statistică a semnificației diferențelor între grupuri au fost stabilite, utilizând teste *Kruskal-Wallis* și *Anova*. Calculele au fost efectuate, folosind IBM SPSS *Statistics* versiunea 24.

**Noutatea și originalitatea științifică.** Pentru primă dată a fost realizat *screening*-ul fitochimic la 4 specii a genului *Hypericum* (*H. perforatum* L., *H. elegans* Steph., *H. hirsutum* L., *H. tetrapterum* Fries.) din flora spontană a RM, ce a permis identificarea produsului vegetal cu cel mai înalt conținut de compuși fenolici (*Hyperici perforati flores*); s-a optimizat metoda de obținere a extractelor uscate din produsele vegetale de *H. perforatum*; s-a efectuat studiul farmaceutic, care a permis standardizarea și determinarea termenului de valabilitate al extractelor uscate din *Hyperici flores* și *Hyperici herba*; s-au determinat acțiunile antioxidantă, antibacteriană, antiinflamatoare și gradul de toxicitate acută ale extractelor uscate standardizate; s-a elaborat proiectul Documentației Analitice de Normare pentru produsul vegetal *Hyperici perforati flores* și pentru extractul uscat *Hyperici perforati flores extractum siccum*.

**Problema științifică importantă** constă în *screening*-ul fitochimic al speciilor g. *Hypericum* din flora RM, cu identificarea speciei cu cel mai înalt conținut de flavonoide (*H. perforatum*); în vederea elaborării DAN a calității pentru produsul vegetal *Hyperici perforati flores* și a extractului uscat – o condiție obligatorie pentru elaborarea de noi produse fitofarmaceutice, cu acțiuni: antibacteriană, antioxidantă și antiinflamatoare.

**Semnificația teoretică** a lucrării constă în aprofundarea cunoștințelor referitoare la particularitățile morfo-anatomice a speciilor g. *Hypericum* din flora RM, deosebirea lor după compoziția chimică; principiile de extracție a compușilor chimici polifenolici; determinarea lor calitativă și cantitativă, în produsele vegetale și extractive; studiul proprietăților antibacteriene, antifungice, antioxidante și antiinflamatoare ale extractelor uscate, obținute din *Hypericum perforatum*.

**Valoarea aplicativă.** Rezultatele vor contribui la dezvoltarea industriei farmaceutice din RM, în vederea completării arsenalului produselor fitoterapeutice existente pe piață cu altele noi, cu un conținut de produse extractive standardizate din *H. perforatum* de origine autohtonă. Datele obținute permit elaborarea DAN pentru extractele uscate standardizate, care pot servi drept componente de bază în produsele fitoterapeutice cu acțiuni: antioxidantă, antibacteriană și antiinflamatoare.

**Implementarea rezultatelor științifice.** În baza rezultatelor experimentale obținute au fost elaborate Proiectele de monografii farmaceutice pentru produsul vegetal *Hyperici perforati flores* și pentru extractul uscat *Hyperici perforati flores extractum siccum*. Rezultatele studiului au fost implementate: în procesul didactic-instructiv în cadrul Catedrei de farmacognozie și botanică farmaceutică; în procesul științifico-practic în cadrul Centrului Științific al Medicamentului (CȘM) și Centrului Științifico-Practic în Domeniul Plantelor Medicinale (CȘPDPM) al USMF „Nicolae Testemițanu”.

**Aprobarea rezultatelor:** Zilele Universității și Conferința științifico-practică anuală a USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015; Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених, присвячена 155-річчю з дня народження В. В. Підвисоцького, Одеса, Україна, 19-20 квітня 2012; 4<sup>th</sup> International Medical Congress for Students and Young Doctors MedEspera, USMF „Nicolae Testemițanu”, Chisinau, Republic of Moldova, 12-14 May 2012; Conferința științifică internațională „Museum and scientific research”, Craiova, România, 12-14 septembrie 2013; Conference „Phytochemicals in Medicine and Pharmacognosy”, Piatra-Neamt, România, 27-30 April 2014; Conferința științifică națională cu participare internațională „De la *design*-ul medicamentului la calitate și inofensivitate”, în memoria profesorului Filip Babilev „80 ani de la naștere”, Chișinău, Republica Moldova, 11 noiembrie 2016; XXIII<sup>th</sup> International Congress “Phytopharm 2019”, Saint-Petersburg, Russia, 1-3 July, 2019; Conferința științifico-practică dedicată aniversării a 55 de ani de la fondarea Facultății de Farmacie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, cu genericul „Învățământul farmaceutic superior în serviciul ocrotirii sănătății”. Expoziții internaționale specializate MOLDMEDIZIN & MOLDDENT, Chișinău, Republica Moldova, 11 septembrie 2019; Conferința științifică cu participare internațională „Obținerea și cercetarea farmaceutică a unor noi molecule și produse farmaceutice cu potențial terapeutic”, în cadrul Proiectului bilateral internațional moldo-belarus, Chișinău, 31 ianuarie 2020; Congresul Național de Farmacie, ediția a XVIII-a 2021. „Farmacia: De la inovare la buna practică farmaceutică”. Editura Universității din Oradea, 15-17 septembrie 2021, *on-line*; Conferința științifico-practică națională cu participare internațională „Actualități și perspective în studiul farmaceutic al plantelor medicinale”, Chișinău, 1-2 octombrie 2021; Conferința științifică anuală „Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță”, Chișinău, 20-22 octombrie 2021; Phytochemical Society of Europe Meeting. Natural Products in Drug Discovery and Development-Advances and Perspectives. Iasi, Romania, 19-22 September 2022.

În baza materialelor tezei, au fost publicate 25 de lucrări științifice, inclusiv 10 articole: în materialele comunicărilor științifice naționale – 8 și materialele comunicărilor științifice internaționale – 2, monoautor – 4; 15 teze în materialele conferințelor științifice internaționale și naționale. Au fost elaborate și implementate 3 acte de implementare a rezultatelor cercetărilor științifice (Anexa 7); 4 certificate de inovator (Anexa 8) și obținute 3 certificate de înregistrare a obiectelor dreptului de autor și a drepturilor conexe (Anexa 9).

**Sumarul compartimentelor tezei.** Lucrarea este scrisă în limba română pe 133 pagini și include secțiunile: adnotare (în trei limbi), cuprins, lista de tabele, lista de figuri, lista abrevierilor, introducere, 4 capitole, inclusiv sinteza rezultatelor obținute, concluzii generale, recomandări practice și bibliografie (199 de surse), declarația privind asumarea răspunderii, CV-ul autorului, anexe (figuri și tabele, complementare tezei). Materialul ilustrativ include 47 de tabele, 47 de figuri și 9 anexe.

## CONȚINUTUL TEZEI

### 1. CARACTERISTICA GENERALĂ A SPECIILOR GENULUI *HYPERICUM*

Capitolul include date bibliografice referitor la arealul de răspândire a speciilor genului *Hypericum*; caracteristicile de diferențiere morfologică și anatomică după formă, culoare, tip și localizarea structurilor secretoare ale speciilor de *Hypericum* (*H. perforatum* L., *H. elegans* Steph., *H. hirsutum* L., *H. tetrapterum* Fries.). Sunt prezentate date privind compoziția chimică și acțiunile farmacologice a speciilor g. *Hypericum*; utilizarea produselor extractive, obținute din produsele vegetale de *H. perforatum* în medicină drept ingrediente în diverse forme farmaceutice, cu proprietăți antibacteriene, antiinflamatoare, antidepresive, cicatrizante, etc.

### 2. ANALIZA CHIMICĂ A PRODUSELOR VEGETALE DIN SPECIILE GENULUI *HYPERICUM*

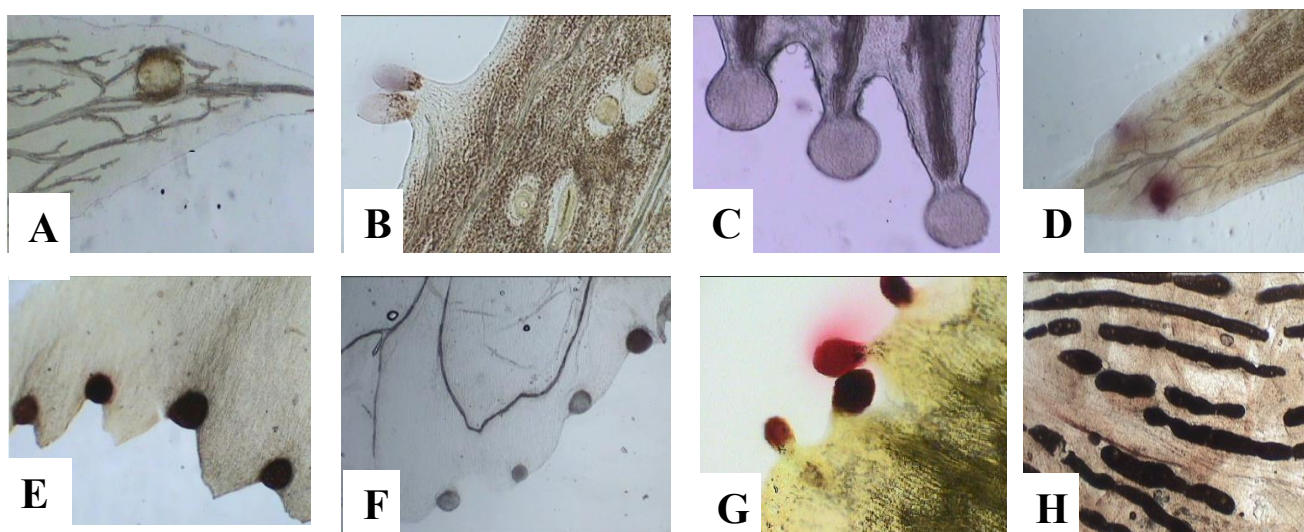
#### 2.1. Obținerea produselor vegetale

Produsele vegetale (părți aeriene, flori, frunze, tulpini) au fost obținute de la speciile *H. perforatum*, *H. elegans* în pădurea satului Tîrnova, r-nul Dondușeni; *H. hirsutum* și *H. tetrapterum* în Rezervația naturală „Codrii”, r-nul Strășeni. Pentru studiul compușilor chimici au fost colectate părțile aeriene ale speciei *H. perforatum*, în diferite faze fenologice (începutul butonizării, butonizare, începutul înfloririi, înflorire în masă, fructificare) și zone geografice (colina s. Nimoreni, r-nul Ialoveni; pădurea s. Tîrnova, r-nul Dondușeni; pădurea s. Lopățica, r-nul Cahul). De asemenea părțile aeriene de *H. perforatum* au fost recoltate din colecția CȘPDPM, USMF „Nicolae Testemițanu”. Stabilirea identității acestor specii a fost efectuată prin examinarea macro- și microscopică a produselor vegetale colectate. Identificarea microscopică a speciilor g. *Hypericum* a fost efectuată în funcție de caracteristicile morfologice, utilizând determinatoarele de plante [5, 6] în comparație cu plantele herbarizate, păstrate în colecțiile herbarelor Grădinii Botanice Naționale (Institut) „Al. Ciubotaru” și a Rezervației științifice „Codrii”. Analiza microscopică a fost realizată la microscopul „Micros” la Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică a USMF „Nicolae Testemițanu”.

Caracterele distinctive pentru frunzele și elementele florale (sepale, petale) ale speciilor g. *Hypericum*, prezentate în tabelul 2.1, se bazează pe particularitățile structurilor secretoare: tipul (glande pigmentate, buzunare translucide, canale secretoare); forma (rotundă, ovală, alungită), culoarea (roșu-purpuriu sau translucidă); localizarea (pe marginea limbului, sepalei, petalei sau pe toată suprafața); frecvența lor (dense sau rare).



Cele mai distinctive structuri secretoare pigmentate, sunt localizate pe sepalele (fig. 2.1 A, B, C, D) și petalele speciilor g. *Hypericum* (fig. 2.1 E, F, G, H).



**Fig. 2.1. Structurile secretoare ale speciilor g. *Hypericum*. Sepale: *H. perforatum* – A, x10; *H. elegans* – B, x10; *H. hirsutum* – B, x10; *H. tetrapterum* – B, x40. Petale: *H. perforatum* – E, x10; *H. elegans* – F, x4; *H. hirsutum* – K, x4; *H. tetrapterum* – H, x10**

**Tabelul 2.1. Structurile secretoare ale frunzelor și elementelor florale**

<b>Frunze</b>	<b>Sepale</b>	<b>Petale</b>
<b><i>H. perforatum</i></b>		
Glande negre de formă ovală, localizate pe apexul și marginea limbului; buzunare translucide, mici, dens distribuite pe toată suprafața limbului.	Glande negre ovale pe apexul limbului (fig, 2.1. A), situate rar pe margini; buzunare translucide de formă alungită și canale secretoare cu un conținut galben pe toată suprafața.	Glande negre sferiforme, localizate pe marginea oblică a petalelor (fig, 2.1. E), buzunare translucide ovale și canale secretoare localizate între nervuri.
<b><i>H. elegans</i></b>		
Glande negre, sferice pe marginea limbului, buzunare translucide sferice, mici, dense, distribuite pe toată suprafața frunzei.	Glande negre, ovale, pe picioruș lung, cu aspect curbat, situate pe margine (fig, 2.1. A) și vârf; tot aici sunt localizate glande negre, oval-convexe. Buzunare translucide de formă oval-alungită – pe toată suprafața.	Glande negre globulare situate pe marginea oblică a petalelor (fig, 2.1. F) și de formă ovală, rar situate pe marginea petalei la bază; buzunare translucide ovale și canale secretoare localizate între nervuri.
<b><i>H. hirsutum</i></b>		
Tricomi unicelelari, denși și papile pe ambele suprafețe ale frunzei; glandele negre lipsesc, buzunare translucide rotunde,	Glande negre, sferice, pe piciorușe scurte de-a lungul marginii și pe apex (fig, 2.1. C).	Glande negre de formă ovală cu un picioruș scurt pe marginea petalelor (fig, 2.1. K) și buzunare translucide, alungite pe toată suprafața.

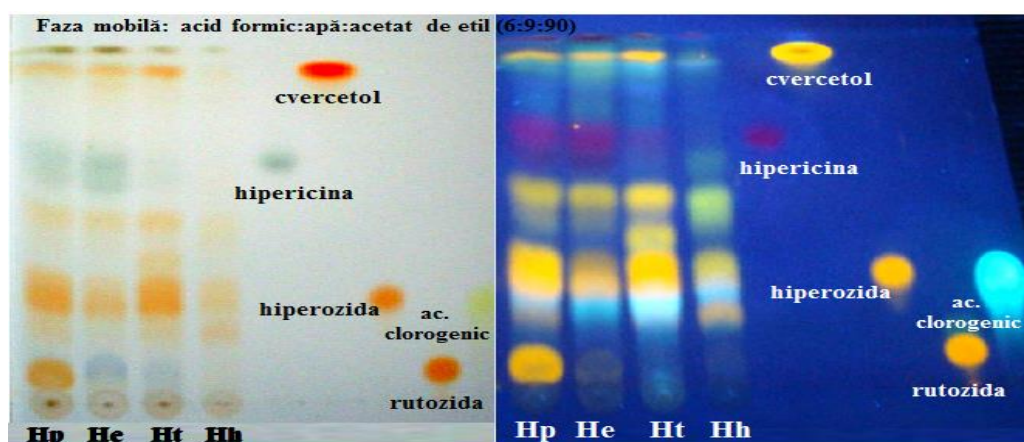
mici pe toată suprafața limbului.		
<b><i>H. tetrapterum</i></b>		
Glande negre pe marginea și pe apexul limbului, buzunare translucide pe toată suprafața limbului.	Glande negre, sferice sau oval-alungite predominant se observă la vârfuri (fig, 2.1. D), mai rar pe margini; buzunare translucide de formă ovală distribuite între nervuri pe întreaga suprafață	Canale secretoare pe toată suprafața (fig, 2.1. H); buzunare de formă ovală cu conținut galben observate doar la bază.

Rezultatele studiului microscopic a 4 specii de *Hypericum* din flora spontană a RM a permis evidențierea indicilor microscopici cu rol de identificare a speciilor: particularitățile structurilor secretoare și gradul de pubescentă a părților aeriene.

## 2.2. Analiza calitativă a speciilor genului *Hypericum*

Solvenții și reactivele utilizate pentru reacții calitative (de culoare și sedimentare) au fost preparate în corespundere cu rigorile *Farmacopeei Europiene* și *Farmacopeei Române*. Solvenții cu grad „pentru cromatografie” (acetonitril, acid acetic glacial, metanol), substanțele de referință, utilizate pentru analize chimice prin CSS și HPLC au fost procurate de la Sigma-Aldrich (rutozida, izocvercetrozida, cvercitol, apigenina-7-glicozida, I3, II8–biapigenina, acid clorogenic, acid cafeic, hipericina, hiperforina), HWI pharma services GmbH (hiperozida) și Ph. Eur. Referens standard (cvercetrozida).

Identificarea grupurilor de compuși chimici, în părțile aeriene la speciile g. *Hypericum*, prin reacții de culoare și sedimentare, au pus în evidență prezența flavonoidelor, substanțelor tanante, cumarinelor. Analiza calitativă nu a demonstrat prezența alcaloizilor [7]. Prin CSS s-au analizat soluțiile hidroalcoolice 70% la 4 specii de *Hypericum*, comparând Rf-urile spoturilor compușilor chimici cu a substanțelor de referință (fig. 2.2.). Plăcile cromatografice au fost analizate vizual în lumina vizibilă și în lumina UV 366 nm, după revelarea cu soluție de 10 g/l reactiv NEU (difenilboriloxietilamină) în metanol, urmată de soluția de 50 g/l de polietilenglicol 4000 în methanol [8].

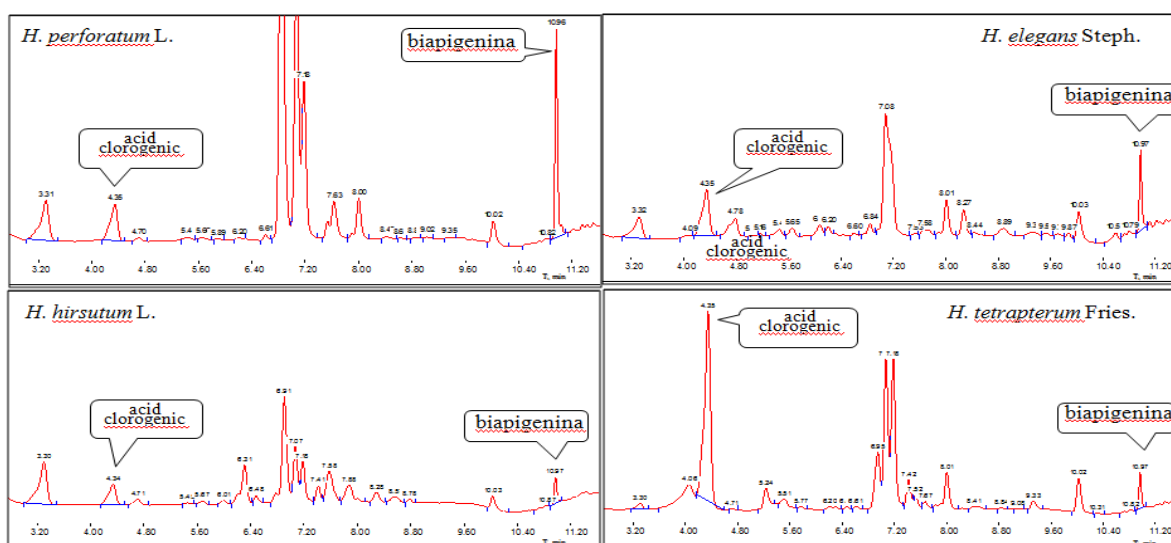


**Fig. 2.2. Cromatograma pe strat subțire a extractelor hidroetanolicе 70% din părțile aeriene a speciilor de *Hypericum*: *H. perforatum* (Hp), *H. elegans* (He); *H. tetrapterum* (Ht), *H. hirsutum* (Hh)**

Intensitatea spoturilor și valorile Rf-urilor sunt caracteristicile esențiale (fig. 2.2), care stau la baza identificării diferențelor între speciile analizate de *Hypericum*. Rutozida cu spot de culoare oranj (Rf = 0,08), s-a identificat în speciile *H. perforatum* și *H. elegans*, cu o intensitate mai mare la *H. perforatum*; iar în extractul etanolic din părțile aeriene de *H. tetrapterum* și *H. hirsutum* lipsește spotul corespunzător pentru rutozidă. Spotul de culoare portocalie corespunzător hiperozidei (Rf = 0,29) a fost prezent în toate speciile analizate, dar cu o intensitate mai mică la *H. elegans*. Spotul de culoare portocalie corespunzător cvercitolului este identificat la toate speciile (Rf = 0,96). Acidul clorogenic (Rf = 0,24), având fluorescență albastră, este atestat în toate speciile supuse studiului, dar cu o intensitate mai mică la *H. perforatum*. Hypericina (Rf = 0,69) este prezentă în toate speciile studiate, cu o fluorescență roșie. Astfel, prin CSS s-a demonstrat prezența flavonoidelor, hipericinei și acidului clorogenic.

Pentru identificarea compușilor fenolici, în extractele etanolice din părțile aeriene de *H. perforatum*, *H. elegans*, *H. hirsutum*, *H. tetrapterum*, colectate în faza de înflorire în masă, a fost folosită și metoda HPLC. Studiile au fost efectuate în cadrul Centrului Științific al Medicamentului al USMF „Nicolae Testemițanu” [9]. Identificarea compușilor chimici s-a realizat după spectrele UV și prin compararea timpilor de retenție (tR)

În urma studiului, s-a demonstrat prezența hiperforinei (tR ≈ 3,88 min), adhiperforinei (tR ≈ 4,36 min) în extractul hidroalcoolic din părțile aeriene de *H. perforatum* L. și lipsa lor în extractele din *H. elegans*, *H. hirsutum*, *H. tetrapterum*. Detecția derivaților de naftodiantronă (hipericină, pseudohipericină) s-a efectuat la o lungime de undă de 592 nm. Prezența hipericinei (tR ≈ 13,2 min) și a pseudohipericinei (tR ≈ 12,1 min) a fost confirmată în toate speciile de *Hypericum* analizate. În urma analizei calitative, s-a demonstrat prezența acidului clorogenic (tR ≈ 4,4 min) și a biapigeninei (tR 10,74 min), în extractele hidroalcoolice din speciile de *Hypericum* luate în studiu. Detecția acestor compuși s-a efectuat la o lungime de undă de 328 nm (fig. 2.3).



**Fig. 2.3. Cromatogramele HPLC ale extractelor hidroetanolic din patru specii genului *Hypericum***

Din grupul flavonozidelor au fost detectați: rutozida ( $tR \approx 6,84$  min), hiperozida ( $tR \approx 7,07$  min), izocvercetrozida ( $tR \approx 7,18$  min), la lungimea de undă de 360 nm.

### 2.3. Analiza cantitativă a compușilor chimici din speciile genului *Hypericum* Determinarea spectrofotometrică a totalului de flavonoide și derivaților de antracen în produsele vegetale ale speciilor genului *Hypericum*

Dozarea flavonoidelor și a derivaților de antracen în diferite produse vegetale (flori, frunze, tulpini, părți aeriene), din patru specii de *Hypericum*, s-a efectuat prin tehnica spectrofotometrică UV/VIS, elaborată de către Pravdivțeva O. *et al.* (2008) [10]. Măsurările absorbantei au fost efectuate la spectrofotometrul UV-VIS Agilent-8453 în cadrul CȘM USMF „Nicolae Testemițanu”. Absorbanta soluțiilor analizate s-a măsurat la lungimea de undă de 412 nm și 591 nm.

Rezultatele obținute denotă faptul că totalul de flavonoide (%) este mai înalt în părțile aeriene și în flori la specia *H. perforatum*. În frunze, cel mai înalt conținut de flavonoide se înregistrează la specia *H. tetrapterum*, iar în tulpini, totalul de flavonoide este cel mai mic la toate speciile (tabelul 2.2). Testul neparametric *Kruskal-Wallis* a demonstrat o diferență statistic semnificativă a totalului de flavonoide în toate produsele analizate (părțile aeriene  $p = 0,000471$ ; flori  $p = 0,001$ ; frunze  $p = 0,002$ ).

Totalul derivaților de antracen (%), în recalcul la hipericină, este mai înalt în părți aeriene de *H. elegans*, urmat de *H. perforatum*, *H. tetrapterum*, *H. hirsutum*. Concentrația acestui grup de compuși chimici în flori și frunze este mai mare la *H. perforatum* și este cea mai mică în tulpini, la toate speciile de *Hypericum* studiate (tabelul 2.2).

**Tabelul 2.2. Totalul de flavonoide și derivați de antracen în produsele vegetale analizate**

Produse vegetale	<i>H. perforatum</i> , Me (IQR)	<i>H. elegans</i> , Me (IQR)	<i>H. hirsutum</i> , Me (IQR)	<i>H. tetrapterum</i> , Me (IQR)
<b>Concentrația flavonoidelor (%), în recalcul la rutozidă</b>				
Părți aeriene	5,582 (0,019)	3,688 (0,052)	2,943 (0,242)	4,327 (0,888)
Flori	8,223 (0,194)	4,664 (0,025)	2,942 (0,343)	6,973 (0,057)
Frunze	7,477(0,024)	5,400 (0,019)	5,763 (0,465)	8,576 (0,055)
Tulpini	1,537 (0,109)	0,769 (0,027)	n/d	1,443 (0,019)
<b>Concentrația derivaților de antracen (%), în recalcul la hipericină</b>				
Părți aeriene	0,22 (0,005)	0,37 (0,005)	0,06 (0,003)	0,17 (0,005)
Flori	0,58 (0,004)	0,53 (0,005)	0,08 (0,002)	0,35 (0,008)
Frunze	0,26 (0,006)	0,21 (0,004)	0,14 (0,007)	0,21 (0,007)
Tulpini	0,036 (0,001)	0,032 (0,001)	0,035 (0,001)	0,015 (0,004)

Notă: n/d – totalul de flavonoide nu s-a determinat

### Analiza cantitativă a polifenolilor, derivaților de naftodiantronă și floroglucinol, prin metoda HPLC

Studiile au fost efectuate în cadrul CȘM al USMF „Nicolae Testemițanu”. A fost folosit sistemul cromatografic din seria *Jasco LC-2000*, echipat cu două pompe,

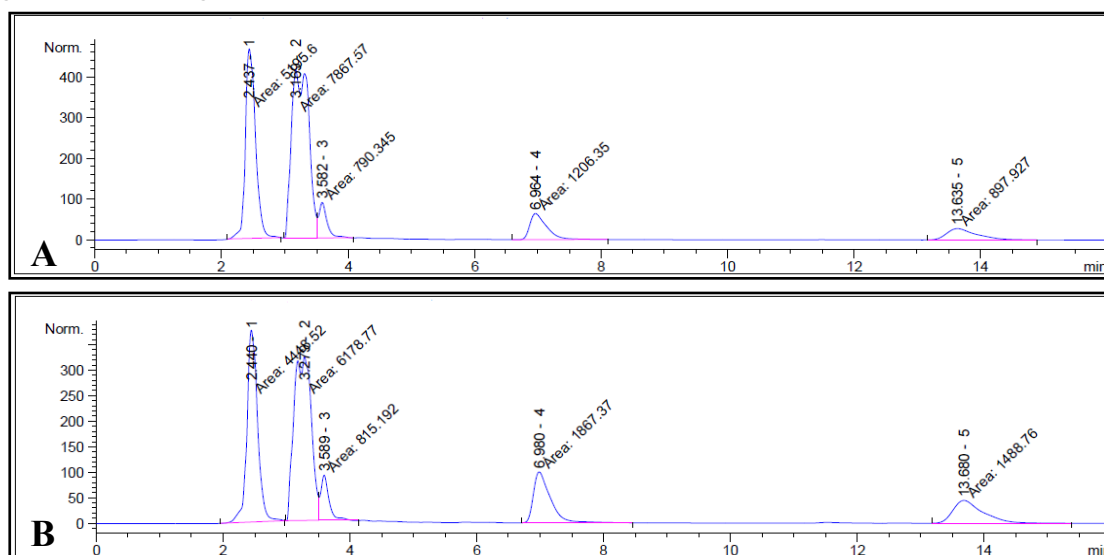
amestecător dinamic de presiune înaltă, injector manual, termostat de coloane și detector UV-VIS, cu un șir de diode (DAD) [9].

În urma studiului comparativ, s-a dovedit că totalul derivaților de antracen, exprimat în hipericină, este mai înalt în părțile aeriene de *H. elegans* (2,87 mg/g), fiind urmat de *H. perforatum* (2,06 mg/g). Totalul de flavonoide variază de la 30,3 mg/g (*H. perforatum*) până la 5,92 mg/g (*H. elegans*), iar totalul de acizi hidroxicinamici este mai înalt în părțile aeriene de *H. tetrapterum* (10,7 mg/g). Rezultatele obținute denotă următoarele: conținutul de compuși chimici din diverse grupe este mai mare în produsul vegetal de *H. perforatum*, fiind urmat de *H. tetrapterum*.

Rezultatele au confirmat faptul că produsul vegetal *Hyperici herba*, colectat de la sp. *H. perforatum*, deține un conținut mai înalt de flavonoide, ce a impus necesitatea de a analiza calitativ și cantitativ flavonoidele în părțile aeriene de *H. perforatum*, colectate din flora spontană și din cultură. Părțile aeriene de sunătoare au fost colectate din colecția CȘPDPM, iar cele din flora spontană – din câmpia s. Nimoreni.

Pentru determinarea calitativă și cantitativă a flavonoidelor s-a utilizat cromatograful de lichide de model *Agilent Technologies*, seria 1200, termostatul TCC G13116A, DAD G 1315B. Metoda de analiză HPLC implementată în studiu a fost preluată din sursele bibliografice și ajustată la condițiile de lucru [11]. Au fost utilizate în cercetare 5 substanțe standard: rutozida, hiperozida, cvercetrozida, cvercetol, I3, II8-biapigenina, procurate de la *Sigma-Aldrich*. Identificarea derivaților de flavonol s-a efectuat prin compararea timpului de retenție a substanțelor-standard și a compușilor din proba de analizat.

Analiza cantitativă a flavonoidelor s-a realizat prin compararea ariei picurilor de compuși chimici din extractele hidroalcoolice (70 %) cu ariile picurilor substanțelor de referință rutozida (1), hiperozida (2), cvercetrozida (3), cvercetolul (4), I3, II8-biapigenina (5) (fig. 2.4).



**Fig. 2.4. Cromatograma HPLC a extractelor hidroetanolice (70%), din părțile aeriene de *H. perforatum*, colectate din flora spontană (A) și din flora cultivată (B). Compuși chimici identificați: rutozidă (1), hiperozidă (2), cvercetrozidă (3), cvercetol (4), I3, II8-biapigenină (5)**

Rutozida este substanța chimică care prevalează după conținut în ambele produse vegetale, urmată de hiperozidă, cvercetrozidă, I3, II8-biapigenină și cvercetol. Concentrațiile de rutozidă și de hiperozidă sunt mai înalte în *H. perforatum* din flora spontană, în comparație cu *H. perforatum* din colecție, iar conținutul de cvercetol și de I3, II8-biapigenină este mai mare în produsul vegetal din colecția CȘPDPM. Conținutul de cvercetrozidă, în ambele produse vegetale, nu diferă semnificativ (tabelul 2.3).

**Tabelul 2.3. Conținutul (%) a unor flavonoide în produsul vegetal  
*Hyperici herba***

<i>Hyperici herba</i>	Concentrația (%) compușilor chimici, Me (IQR)				
	Rutozida	Hiperozida	Cvercetrozida	Cvercetol	I3,II8-biapigenina
<b>PV din flora spontană</b>	2,01 (0,081)	0,95 (0,036)	0,50 (0,089)	0,16 (0,009)	0,17 (0,020)
<b>PV din colecția CȘPDPM</b>	1,76 (0,041)	0,02 (0,008)	0,54 (0,055)	0,25 (0,001)	0,28 (0,034)

Evaluarea comparativă a datelor pentru compușii chimici din produsele vegetale cercetate a arătat o diferență statistică semnificativă pentru rutozidă ( $p = 0,0209$ ), hiperozidă ( $p = 0,0209$ ), cvercetol ( $p = 0,0201$ ) și I3, II8-biapigenină ( $p = 0,0209$ ), iar pentru cvercetrozidă – o diferență statistic nesemnificativă ( $p = 0,248$ ).

### **3. OBȚINEREA ȘI STUDIUL CHIMIC AL PRODUSELOR EXTRACTIVE DIN SPECIA *HYPERICUM PERFORATUM***

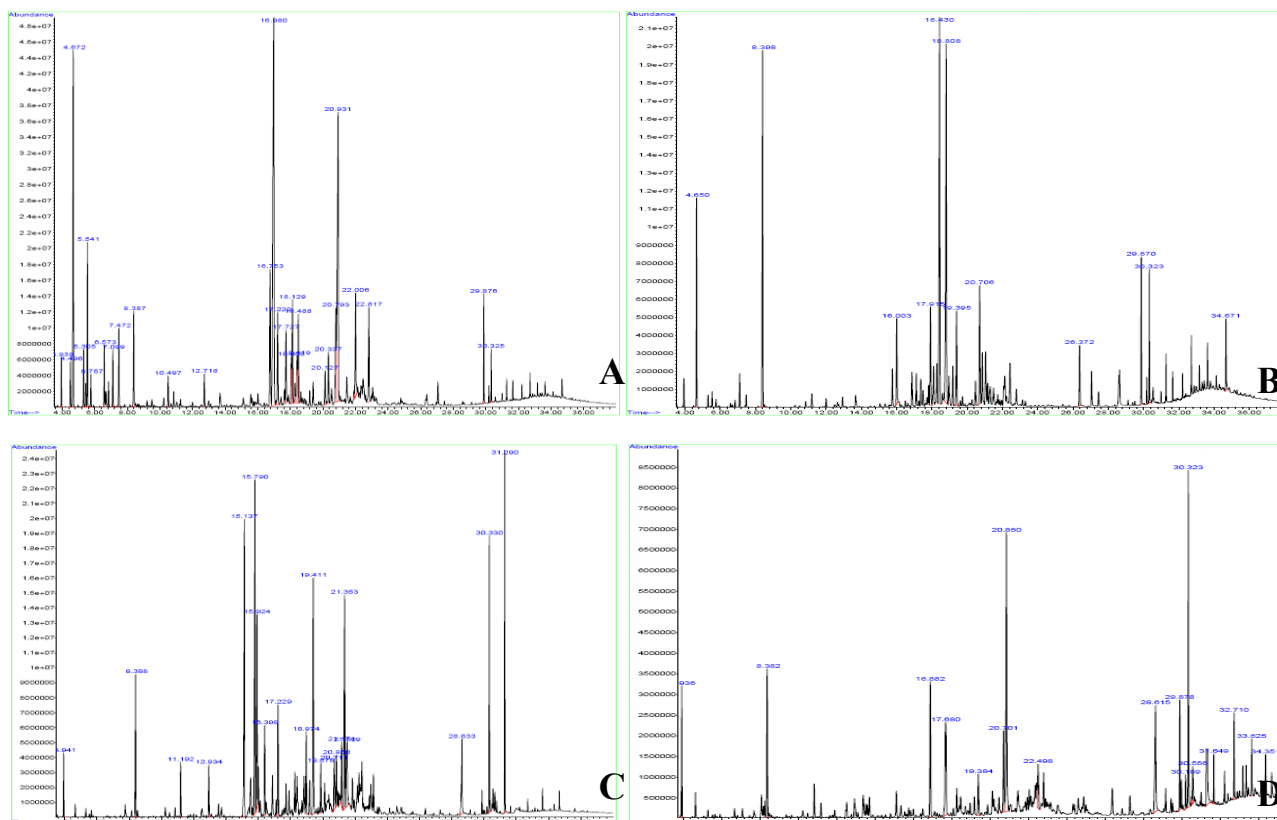
#### **3.1. Obținerea și analiza chimică a uleiului volatil din speciile genului *Hypericum***

Extracția uleiului volatil din părțile aeriene proaspete și uscate s-a efectuat prin hidrodistilare. Metoda este descrisă în *Farmacopeea Republicii Belarus* (metoda B) și *Farmacopeea de Stat a Federației Ruse*, ed. a XIV-a (metoda 1). A fost atestat cel mai ridicat nivel de ulei volatil în părțile aeriene de *H. perforatum* (0,26%), urmat de *H. elegans* (0,15%), *H. tetrapterum* (0,13%), cu cel mai jos indice la *H. hirsutum* (0,094%).

Analiza cantitativă și calitativă a uleiurilor volatile s-a efectuat prin cromatografie gazoasă – spectrometrie de masă (GC-MS), realizată cu ajutorul aparatului Agilent Technologies, tip 7890 GC system, MS Agilent Technologies, tip 5975 C Mass Selective Detector. Analiza chimică a uleiurilor volatile a fost realizată în Laboratorul Chimia compușilor naturali și biologic activi al Institutului de chimie [12].

În uleiul volatil din specia *H. perforatum* s-au constatat 74 de componenți (fig. 3.1 A), dintre care 33 au fost identificați și determinați cantitativ. Totalul acestora constituie 71,277%, inclusiv: cariofilen (12,175%),  $\alpha$ -pinen (8,574%), oxid de cariofilen (12,119%). Cercetările întreprinse au demonstrat faptul că în uleiul volatil de *H. elegans*, sunt prezenți 49 de componenți (fig. 3.1 B), dintre aceștia s-au identificat 18. Compușii chimici cu concentrație mai înaltă au fost g-gurjunen (14,532%), aromadendren (13,99%), undecan (10,262%) și  $\alpha$ -pinen (4,779%). În uleiul volatil de *H. tetrapterum* s-au constatat 56 de componenți (fig. 3.1 C). Dintre aceștia, au fost

identificați 22, componenții majori fiind: copaen (9,271%),  $\alpha$ -longipinen (8,489%),  $\delta$ -cadinen (6,423%). uleiul volatil din *H. hirsutum* conține 24 de componenți, dintre care au fost identificați 9, ceea ce constituie 33,96% (fig. 3.1 D). Componenții majori identificați în uleiul volatil al acestei specii sunt: oxid de cariofilen (10,435%), fitol (6,056%) și  $\alpha$ -cariofilen (5,086%).



**Fig. 3.1. Gaz-cromatograma uleiului volatil din părțile aeriene de: A - *H. perforatum*; B - *H. elegans*; C - *H. tetrapterum*; D - *H. hirsutum***

Rezultatele obținute au evidențiat diferențe între speciile genului *Hypericum* din flora Republicii Moldova, după randament și compoziția chimică a uleiului volatil.

### **3.2. Obținerea extractelor uscate din produsele vegetale ale speciei *H. perforatum***

*Obținerea soluțiilor extractive din Hyperici herba prin repercolare, cu fracționarea produsului vegetal în părți egale cu ciclul neterminat.* Părțile aeriene de sunătoare au fost colectate în faza de înflorire din flora spontană și din colecția CȘPDPM. Florile, frunzele și tulpinile au fost prelevate de la plante din flora spontană. Produsele vegetale au fost uscate în mod natural, mărunțite și trecute prin sită cu orificiile de 3 mm. În calitate de solvent s-a utilizat alcoolul etilic. Pentru evaporarea solventului din soluțiile extractive s-a utilizat evaporatorul rotativ *Laborota 4011-digital*.

Pentru determinarea gradului de extracție a compușilor fenolici, cu alcool etilic în concentrații de: 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, a fost folosită metoda de repercolare cu fracționarea produsului vegetal (*Hyperici herba*) în părți egale cu ciclul neterminat. Extractele uscate din părți aeriene de *H. perforatum*, obținute la extragerea

cu etanol, prezentă pulberi amorfe, higroscopice de culoare brună și brun-roșiatică, cu miros specific balsamic [13]. Randamentul extractelor a fost calculat în raport cu produsul vegetal uscat. Rezultatele au demonstrat că randamentul extractelor obținute cu alcool etilic în concentrații 40-90% variază de la 23,3%, pentru alcool de 40%, până la 43,6% pentru 60%.

**Obținerea soluțiilor extractive din produsele vegetale de *H. perforatum* prin macerare fracționată cu agitare.** Soluțiile extractive din părți aeriene, flori, frunze, și tulpini au fost obținute prin macerare repetată cu agitare: a câte 5 g de produs vegetal, cu 8 porțiuni de alcool etilic 70% (100 ml). Fiecare extracție a durat câte 1 oră, cu separarea lichidului extractiv de reziduu vegetal. Agitarea a fost efectuată cu agitator magnetic, apoi fracțiunile soluțiilor extractive – reunite. Extractele s-au păstrat la rece, timp de 8 ore, apoi filtrate, cu evaporarea ulterioară a solventului [13]. Rezultatele confirmă faptul că macerarea fracționată cu agitare a fost mai eficientă pentru extragerea principiilor active din produsele vegetale de *H. perforatum*. Cel mai înalt randament, în recalcul la produs vegetal absolut uscat, a fost la extractul obținut din flori (50,54%), urmat de extractele obținute din părți aeriene (45,16%) și din frunze (44,26%). Rezultatele date au stat la baza determinării condițiilor optime pentru a maximaliza extragerea compușilor chimici din produsele vegetale de *H. perforatum*.

### 3.3. Analiza chimică a extractelor uscate obținute din flori și părți aeriene ale speciei *H. perforatum*

Totalul de polifenoli, flavonoide și derivați de antracen în extractele uscate de *H. perforatum* au fost determinate prin metode spectrofotometrice UV-VIS (tabelul 3.1) [14]

**Tabelul 3.1. Totalul de polifenoli, flavonoide și derivați de antracen în extractele uscate obținute din *Hyperici herba* cu alcool etilic în concentrații 40-90%**

Extracte uscate/ concentrația alcoolului etilic	TP (%), exprimat în acid galic, Me; IQR	TF (%), exprimat în rutozidă, Me; IQR	TDA (%), exprimat în hipericină, Me; IQR
40%	6,62; 0,11	8,75; 0,25	0,26; 0,02
50%	9,91; 0,48	12,48; 0,30	0,38; 0,03
60%	10,69; 1,00	15,07; 0,09	0,39; 0,02
70%	9,86; 0,38	15,54; 0,25	0,41; 0,004
80%	9,64; 0,46	18,53; 0,08	0,36; 0,03
90%	8,24; 0,73	18,00; 0,13	n/a
70% (CȘPDPM)	8,73; 4,89	12,37; 1,00	0,34; 0,01
<b>P</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>

*Notă:* n/a- analiza nu a fost efectuată; TP –totalul de polifenoli; TF – totalul de flavonoide; TDA – totalul derivaților de antracen

S-au determinat concentrațiile optime de alcool etilic pentru extragerea maximală din *Hyperici herba* a totalului de polifenoli (60%), de flavonoide (80%) și derivaților de antracen (70%). Prin metoda de macerare fracționată cu agitare, polifenolii, flavonoidele și derivații de antracen s-au extras cel mai mult din flori de *H. perforatum*.



Totalul de polifenoli, flavonoide și derivați de antracen (%) s-a prezentat cu un conținut mai înalt în extractul uscat din părți aeriene din colecție, comparativ cu extractul uscat din flora spontană (tabelul 3.2)

**Tabelul 3.2. Totalul de polifenoli, flavonoide și derivați de antracen în extractele uscate obținute din produsele vegetale de *H. perforatum* prin metoda de macerare**

Produse vegetale	TP (%), exprimat în acid galic, Me (IQR)	TF (%), exprimat în rutozidă, Me (IQR)	TDA (%), exprimat în hipericină, Me (IQR)
<b>Părți aeriene (CȘPDPM)</b>	10,832 (6,94)	12,65 (0,49)	0,437 (0,007)
<b>Părți aeriene (flora spontană)</b>	10,825 (2,77)	10,60 (0,75)	0,289 (0,011)
<b>Flori (flora spontană)</b>	15,091 (0,84)	14,47 (0,24)	0,845 (0,022)
<b>Frunze (flora spontană)</b>	11,511 (1,03)	13,32 (0,30)	0,269 (0,004)
<b>Tulpini (flora spontană)</b>	3,348 (0,16)	5,070 (0,37)	0,036 (0,01)

*Notă: TP – totalul de polifenoli; TF – totalul de flavonoide; TDA – totalul derivaților de antracen*

Analiza HPLC a fost aplicată și în studiul comparativ, care a inclus extracte de sunătoare obținute din părțile aeriene și din flori prin macerare fracționată cu agitare, folosind în calitate de solvent alcoolul etilic de 70% și 80% (tabelul 3.3). Datele relevă că compusul chimic predominant dintre flavonoidele analizate a fost rutozida, urmată de hiperozidă, cvercetrozidă, cvercetol și de I3, II8-biapigenină. S-a stabilit un conținut mai înalt de rutozidă în extractele din *Hyperici herba*, în comparație cu extractele din *Hyperici flores*. Concentrația de hiperozidă, urmată de cvercetrozidă, cvercetol și I3, II8- biapigenină, în extractul din flori (flora spontană) s-a dovedit a fi mai mare, comparativ cu alte extracte analizate. Se remarcă faptul că în ambele extracte obținute din flori (flora spontană și cultivată), concentrația de I3, II8-biapigenină a fost mai mare versus extractelor obținute din *Hyperici herba* (tabelul 3.3).

**Tabelul 3.3. Concentrația (%) a unor flavonoide în extracte uscate din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* obținute prin metoda de macerare**

Extracte uscate analizate	Concentrația (%) compușilor chimici, Me (IQR)				
	Rutozida	Hiperozida	Cvercetrozida	Cvercetol	I3, II8- biapigenina
<i>Hyperici herba</i> (flora spontană)	6,39 (0,127)	2,32 (0,140)	0,65 (0,051)	0,16 (0,001)	0,18 (0,006)
<i>Hyperici herba</i> (colecția CȘPDPM)	7,01 (0,031)	2,40 (0,052)	1,09 (0,077)	0,57 (0,012)	0,38 (0,004)
<i>Hyperici flores</i> (flora spontană)	4,50 (0,343)	2,54 (0,034)	1,47 (0,244)	0,57 (0,023)	1,49 (0,166)
<i>Hyperici flores</i> (colecția CȘPDPM)	4,24 (0,094)	2,51 (0,059)	0,95 (0,079)	0,57 (0,031)	0,62 (0,015)

### 3.4. Optimizarea metodei de obținere a extractelor uscate

În scopul obținerii randamentului maxim de extragere a principiilor active din *Hyperici flores* au fost stabilite condiții optime de lucru în cadrul metodei de macerare fracționată cu agitare: raportul dintre produsul vegetal și extragent; numărul de extracții repetate și durata de timp per extracție. Au fost luate patru probe de *Hyperici flores* (10,0 g), la care s-a adăugat soluție hidroetanolică de 80% în raport de 1:20. Din fiecare probă extragerea compușilor chimici s-a realizat prin cinci cicluri de extracție pentru probele I, II, III și șase cicluri pentru proba IV, până la obținerea soluțiilor extractive incolore (tabelul 3.4). Timpul pentru un ciclu de extracție la 4 probe a variat: 60 de minute – proba I; 45 de minute – proba II; 30 de minute – proba III; 15 de minute – proba IV. Au fost determinate: masa rezidului uscat, obținut per ciclu de extracție (X, g); randamentul procentual al extractului uscat raportat la masa produsului vegetal absolut uscat (Y, %); eficacitatea extracției S (%) (tabelul 3.4).

**Tabelul 3.4. Caracteristicile cantitative în procesul de obținere a extractului uscat din *Hyperici flores***

Ciclul de extracție (Nr.)	Numărul probei, timpul de extracție per ciclu (min)											
	Proba I – 60			Proba II – 45			Proba III – 30			Proba IV – 15		
	X, g	Y, %	S, %	X, g	Y, %	S, %	X, g	Y, %	S, %	X, g	Y, %	S, %
I	2,27	24,38	54,51	2,36	25,40	56,80	2,30	24,74	55,32	2,055	22,10	49,42
II	0,924	9,53	21,31	0,826	8,88	19,68	0,956	10,28	22,99	0,818	8,88	19,86
III	0,409	4,40	9,83	0,344	3,70	8,25	0,306	3,29	7,40	0,407	4,38	9,79
IV	0,224	2,3	5,14	0,239	2,57	5,75	0,182	1,96	4,38	0,255	2,73	6,10
V	0,136	1,46	3,26	0,129	1,39	3,11	0,162	1,74	3,89	0,195	2,10	4,69
VI	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,160	1,72	3,85
<b>Totalul</b>	<b>3,963</b>	<b>42,61</b>	<b>94,05</b>	<b>3,90</b>	<b>41,94</b>	<b>93,59</b>	<b>3,906</b>	<b>41,98</b>	<b>93,98</b>	<b>3,89</b>	<b>41,91</b>	<b>93,71</b>

**Notă:** „–” – nu a fost determinat.

Rezultatele studiului au demonstrat, că masa totală, randamentul total și eficacitatea extracției substanțelor solubile în alcool etilic de 80% au fost mai mari în proba I.

S-a efectuat determinarea cantitativă a totalului de flavonoide și de polifenoli în extractele sus menționate pentru a demonstra gradul înalt de eficacitate în extracția compușilor chimici, prin macerare fracționată cu agitare, în dependență de timpul de extracție. Valoarea maximă a conținutului total sumativ de flavonoide (55,35 mg/g) și de polifenoli (100,04 mg/g) în urma la cinci extracții a fost la proba I (durata unei extracții – 60 min).

Au fost stabiliți parametri optimi pentru obținerea extractului uscat din flori de sunătoare, utilizând metoda de macerare fracționată cu agitare: extragentul – alcool etilic 80%; timpul de extracție – 5 ore; numărul de fracțiuni – 5, timpul de extracție per ciclu – 60 de minute, raportul dintre produsul vegetal și solvent – 1 :20.

### 3.5. Validarea metodei de dozare a flavonoidelor în extractele uscate

A fost validată metoda spectrofotometrică UV-VIS de dozare a totalului de flavonoide, preluată din literatura de specialitate [15] și ajustată în procedura de analiză

a extractelor uscate din flori și părțile aeriene de *H. perforatum* S-au cercetat următorii parametri de validare: linearitate, exactitate, precizie și robustețe [16,17].

**Linearitate.** La 3 eșantioane de soluții pregătite din extract uscat de *Hyperici herba*, cu concentrații de 1, 2, 3, 4, 5, 6 și 7 mg/ml, s-a determinat absorbanta la lungimea de undă 412 nm. Valorile înregistrate au fost supuse prelucrării statistice, aplicând metoda celor mai mici pătrate, obținându-se ecuația regresiei liniare  $y = 0,10783 + 0,0029x$  și coeficientul de regresie –  $R^2 = 0,9995$ . Din extractul uscat de flori au fost preparate soluții cu concentrația de 0,028; 0,032; 0,036; 0,040; 0,044; 0,048; 0,060 mg/ml și s-a determinat absorbanta la 412 nm. Ecuația regresiei liniare pentru dozarea totalului de flavonoide în extracte uscate din flori a fost:  $y = 2,8056x + 0,0058$ ,  $R^2 = 0,9969$ . Metoda este considerată liniară dacă  $R^2$  nu este mai mic de 0,98

**Precizie.** Procedura este cunoscută și sub denumirea de *Repetabilitate*. Repetabilitatea a fost determinată prin dozarea a câte 6 soluții de extract uscat din părțile aeriene cu concentrația 5 mg/ml și din flori cu concentrația 1mg/ml în aceeași zi și aceleași condiții, în conformitate cu metoda validată, într-o perioadă scurtă de timp, utilizând același set de reactivi și cu participarea aceluiași cercetător. Valoarea medie a totalului de flavonoide, în ambele extracte, abaterea standard și abaterea standard relativă (RSD) a rezultatelor obținute a fost calculată cu ajutorul programului SPSS versiunea 24. Valoarea RSD pentru extractul din *Hyperici herba* a fost 1,83%, iar pentru extractul din *Hyperici flores* 1,44%. Condiția de admisibilitate prevede faptul că o metodă poate fi considerată reproductivă dacă  $RSD \leq 2$ . Datele denotă, că pentru extractele uscate analizate condiția a fost acoperită, ce indică precizia metodei.

Pentru stabilirea preciziei metodei validate a fost determinată și precizia intermediară (reproductibilitate intermediară). Soluții individuale de extracte uscate, din părțile aeriene (5 mg/ml) și din flori (1 mg/ml) au fost analizate de către doi cercetători în același laborator, dar în zile diferite. Valorile RSD atestate la probele analizate nu depășesc 2%, variind de la 0,63% până la 1,42%.

**Exactitatea.** Exactitatea metodei a fost stabilită prin determinarea totalului de flavonoide în recalcul la rutozidă în soluțiile analizate de extract uscat din *Hyperici flores* prin adăugarea unei cantități de substanță standard (rutozida). S-au pregătit soluții cu 3 nivele de concentrații prin adăugarea la 1 ml de soluție de analizat (1 mg/ml) a câte 0,8 ml, 1 ml și 1,2 ml de soluție stoc (0,5 mg/ml) a rutozidei (substanță standard), ceea ce corespunde la 80%, 100% și 120% din concentrația inițială a rutozidei în soluția stoc. Criteriul acceptabilității este procentul mediu al randamentului de recuperare, unde valoarea medie trebuie să fie în limita de  $100 \pm 5\%$ , iar eroarea relativă a rezultatului mediu în metodele spectrofotometrice nu trebuie să depășească 2% [149]. În rezultatul cercetării, s-au atestat indicii exactității metodei validate: valoarea medie a randamentului de regăsire (100,42%), limita de regăsire (98,04-102,32%), abaterea standard relativă a rezultatului mediu (1,53%).

### 3.6. Standardizarea extractelor uscate

Extractele uscate obținute din *Hyperici flores* și *Hyperici herba* au fost supuse standardizării în conformitate cu prevederile *Farmacopeei Europene ed.10 (Ph. Eur.)*, monografiei farmaceutice *Extracta a Farmacopeei Române*, ed. a X-a (FR),

*Farmacopeei Republicii Belarus (FRB) și a Farmacopeei de Stat a Federației Ruse, ed. a XIV-a (FS).*

**Descriere.** Extractul uscat din flori reprezintă pulbere brun-purpurie, higroscopică, cu miros balsamic, plăcut și cu gust amar, astringent; extractul uscat din părțile aeriene – pulbere brună, higroscopică, cu miros balsamic, plăcut și cu gust astringent.

**Identificare.** Identificarea compușilor chimici în extractele de *H. perforatum* s-a realizat prin intermediul reacțiilor calitative și prin cromatografie pe strat subțire (CSS). Au fost identificați rutozida, hiperozida, izocvercetrozida, cvercetolul, acidul clorogenic, acidul cafeic, hipericina, substanțele tanante, catechinele.

**Dozare.** Totalul de flavonoide în extractele analizate a fost determinat, aplicând metoda spectrofotometrică UV-VIS, preluată din literatura de specialitate și ajustată în procedura de analiză a extractelor uscate din flori și din părțile aeriene de *H. perforatum* [15].

**Pierderea prin uscare.** Testul *Pierderea prin uscare* s-a efectuat în etuvă, utilizând metoda descrisă în *FR*, capitolul IX. C.15. Datele experimentale au relevat faptul că pierderea prin uscare a extractelor uscate nu depășește 5%.

**Determinarea metalelor grele.** Conținutul de metale grele din extractele uscate de *H. perforatum* a fost determinat în Laboratorul de încercări de spectroscopie atomică din cadrul Institutului de chimie al Academiei de Științe a Moldovei, utilizând metoda spectrometriei de absorbție atomică. Cercetarea s-a efectuat la spectrofotometrul de absorbție atomică AAS-3. În ambele extracte, concentrația de Ni, Pb, Cd nu a depășit limitele maxime admisibile față de normele indicate în *FS*, 1.5.3.0009.15 (Cd – 1 mg/kg, Pb – 6 mg/kg) și în *FR*, p. 420 (cel mult 4%).

### 3.7. Stabilitatea și termenul de valabilitate

Stabilitatea și termenul de valabilitate a extractelor uscate au fost determinate în timp real, la temperatura de  $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , la umiditate relativă de  $60\pm 5\%$  și în condiții accelerate, condițiile de depozitare fiind temperatura de  $+40\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Determinările au avut loc pentru 3 serii din fiecare extract păstrate în recipiente din sticlă întunecată, bine închise și depozitate, în loc ferit de lumină. Extractele uscate din părți aeriene și din flori au fost examinate după următorii parametri de calitate: descriere, identificare și dozare [18].

**Descriere.** Determinarea aspectului s-a efectuat în conformitate cu prevederile monografiei *Extracta* din *FR*. În decursul perioadei de testare (36 de luni) a extractelor uscate, păstrate în trei serii la temperatura de  $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$  și  $+40\pm 2^{\circ}\text{C}$ , nu s-au atestat modificări la nivel de culoare, miros și gust.

**Identificare.** Identificarea compușilor activi din diverse grupuri chimice (flavonoide, derivați de antracen, acizi fenolici) în extractele uscate, păstrate în trei serii în condiții normale și de stres timp de 42 de luni, s-a realizat prin cromatografie pe strat subțire. Această analiză s-a realizat după tehnica descrisă în *Ph. Eur.*, 6.2, 2008 și *FRB* în monografia *Hyperici herba*. În urma examinării cromatogramelor extractelor uscate, păstrate în condiții accelerate, s-au identificat: rutozida ( $R_f = 0,77$ ), hiperozida ( $R_f = 0,41$ ), izocvercetrozida ( $R_f = 0,47$ ), acidul clorogenic ( $R_f = 0,43$ ) și hipericina ( $R_f = 0,77$ ).

**Dozare.** Dozare. Rezultatele dozarii spectrofotometrice UV-VIS a totalului de flavonoide în extractele uscate denotă faptul că conținutul totalului de flavonoide nu a scăzut sub 5% timp de 36 de luni (conform prevederilor FS, monografia 1.1.0009.18), ceea ce a permis stabilirea termenului de valabilitate pentru *Hyperici perforati herba extractum siccum* și pentru *Hyperici perforati flores extractum siccum* de 36 de luni.

#### 4. CERCETĂRI FARMACOLOGICE ALE EXTRACTELOR USCATE ȘI ALE ULEIULUI VOLATIL DIN *H. PERFORATUM*

##### 4.1. Studiul activității antioxidante a extractelor uscate, obținute din *Hyperici herba* și *Hyperici flores*

A fost determinată activitatea antioxidantă a extractelor polifenolice, obținute din părți aeriene și din flori de *H. perforatum*. Evaluarea activității antioxidante a extractelor s-a efectuat utilizând metodele de captare a radicalului organic DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) și de decolorare a cation-radicalului ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolină-6-acid sulfonic), de asemenea, a fost determinată capacitatea de chelare a Fe<sup>2+</sup> [19, 20]. Valorile obținute denotă o capacitate de inhibare a radicalului liber DPPH• la ambele extracte ca fiind una bună, mai mare în cazul extractului uscat din flori, fapt care se datorează conținutului ridicat de flavonoide, comparativ cu extractul din părți aeriene (tabelul 4.1). În urma testului neparametric Spearman (p = 0,787), a fost demonstrată o corelație directă între activitatea extractelor uscate de reducere a cation-radicalului ABTS<sup>•+</sup> și concentrația de flavonoide. Testul ABTS a demonstrat faptul că extractul uscat din flori posedă o activitate antioxidantă mai puternică, în comparație cu extractul din părțile aeriene de sunătoare (p<0,001) (tabelul 4.1).

**Tabelul 4.1. Activitatea antioxidantă a extractelor uscate din *Hyperici herba* și *Hyperici flores*, determinată prin metodele DPPH și ABTS**

Proba de analizat	DPPH, IC <sub>50</sub> μg/ml, Me (IQR)	ABTS, μM TE/g masă uscată, Me (IQR)	Totalul de flavonoide mg Ru/g extract uscat, Me (IQR)
Extract uscat din <i>Hyperici herba</i>	22,15 (1,11)	23,12 (5,87)	37,74 (1,95)
Extract uscat din <i>Hyperici flores</i>	13,08 (1,13)	28,80 (0,16)	66,49 (2,68)
Trolox	4,18 (1,81)	-	-

Capacitate de chelare a fierului pentru extractele uscate din sunătoare s-a realizat în comparație cu un agent chelator care captează ionii metalici EDTA (acid etilendiaminotetraacetic). Studiul a demonstrat o capacitate de chelare mai scăzută pentru extractul uscat din flori (45,98%; 2,98) și părți aeriene (35,63%; 3,90), comparativ cu EDTA (99,33%; 1,28).

##### 4.2. Testarea acțiunii antiinflamatoare *in vivo*

Determinarea proprietăților antiinflamatoare ale extractelor uscate, obținute din *Hyperici herba* și *Hyperici flores*, din flora spontană și colecția CȘPDPM, a fost efectuată în Laboratorul „Ecofiziologie umană și animală” din cadrul Universității de Stat din Moldova. Animalele de laborator (șobolani) au fost distribuite a câte 5 în 7

loturi (tabelul 4.2). [21]:Reacția inflamatorie acută (edemul) a fost modelată prin administrarea intraplantară, în laba posterioară dreaptă a șobolanilor a câte 0,1 ml soluție de histamină 1%, introdusă la 30 de minute, după administrarea intraperitoneală a extractelor analizate (loturile experimentale), a serului fiziologic de 0,9% (lot de control) și a substanței de referință – soluție de diclofenac de sodiu de 50 mg/kg (lotul de referință). În lotul martor s-a administrat intraplantar 0,1 ml ser fiziologic 0,9%.

Activitatea antiinflamatoare a extractelor analizate, estimată prin scăderea edemului, a fost exprimată în procente, în comparație cu lotul control. Analiza *post-hoc* a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul de control și toate loturile experimentale în examinarea extinderii edemului ( $p < 0,001$ ), și ne semnificative ( $p > 0,05$ ) în examinarea inhibiției edemului, comparând rezultatele loturilor experimentale cu rezultatul lotului de referință (tabelul 4.2).

**Tabelul 4.2. Acțiunea antiinflamatoare a extractelor polifenolice din *Hyperici flores* și *Hyperici herba* asupra edemului indus de histamină**

Loturi experimentale	Extinderea edemului (%), M±SD	Inhibiția edemului (%), M ±SD
<b>1. Lotul-martor</b> – intraplantar 0,1 ml ser fiziologic de 0,9%	5,34±3,62	—
<b>2. Lotul de control</b> – intraperitoneal 1 ml ser fiziologic de 0,9%; intraplantar 0,1 ml soluție histamină de 1%	44,20±7,914 p = 2,4272E-8	—
<b>3. Lotul de referință</b> –intraperitoneal 1 ml soluție diclofenac de sodiu de 50 mg/kg; intraplantar 0,1 ml soluție histamină de 1%	22,15±2,45 p = 0,000003	49,90±5,53
<b>4. Lotul experimental – intraperitoneal 1 ml extract (100 mg/kg) din <i>Hyperici herba</i></b> (flora spontană); intraplantar 0,1 ml soluție histamină de 1%	24,68±4,42 p = 0,000292	44,20±10,01 p = 0,785
<b>5. Lotul experimental – intraperitoneal 1 ml extract (100 mg/kg) <i>Hyperici flores</i></b> (flora spontană); intraplantar 0,1 ml soluție histamină de 1%	28,19±4,54 p = 0,000021	39,33±9,77 p = 0,313
<b>6. Lotul experimental – intraperitoneal 1 ml extract (100 mg/kg) <i>Hyperici herba</i></b> (colecția CȘPDPM); intraplantar 0,1 ml soluție histamină de 1%	28,33±5,59 p = 0,006	35,89±12,64 p = 0,124
<b>7. Lotul experimental – intraperitoneal 1 ml extract (100 mg/kg) din <i>Hyperici flores</i></b> (colecția CȘPDPM); intraplantar 0,1 ml soluție histamină de 1%	32,21±4,94 p = 0,000325	27,13±11,19 p = 0,007

Datele obținute denotă eficacitatea antiinflamatoare a extractelor polifenolice din *Hyperici herba* și *Hyperici flores*, produsele vegetale colectate din flora spontană

și din CȘPDPM, care nu diferă semnificativ de substanța de referință – diclofenac de sodiu. Rezultate extractelor, obținute din produsele vegetale colectate din flora spontană, au fost mai aproape de cele ale substanței de referință, în comparație cu extractele obținute din produsele vegetale din colecție.

#### 4.3. Studiul activității antibacteriene și antifungice ale extractelor uscate din părțile aeriene și din flori de *H. perforatum*

Cercetările au fost efectuate în Laboratorul de infecții intraspitalicești, USMF „Nicolae Testemițanu”. Studiul activității antibacteriene a extractelor analizate s-a efectuat prin intermediul metodei de diluție în serie în mediul nutritiv lichid (bulion peptonat din carne de 2%, pH=7,0) [22].

Activitatea antibacteriană a fost analizată pe următoarele culturi de referință ale microorganismelor gram-pozitive: *Staphylococcus aureus* 209-P, *Enterococcus faecalis* ATCC 2592; și gram-negative: *Escherichia coli* ATCC 2592, *Proteus vulgaris* HX 1922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Extractul din *Hyperici flores* a manifestat activitate bacteriostatică în raport cu *S. aureus* 209-P în concentrație de 37,5 μg/ml și în raport cu *E. faecalis* ATCC 19433 în concentrație de 75 μg/ml; față de celelalte test-culturi bacteriene, activitatea bacteriostatică este evidentă în concentrație mai mare de 300 μg/ml.

Extractul din *Hyperici herba* posedă activitate bacteriostatică față de *S. aureus* 209-P în concentrație de 150 μg/ml și față de *E. faecalis* ATCC 19433 în concentrație de 300 μg/ml, iar activitatea bactericidă față de test-culturile incluse în studiu este evidentă în concentrație mai mare de 300 μg/ml (tabelul 4.3).

**Tabelul 4.3. Activitatea antibacteriană a extractelor uscate, obținute din flori și părți aeriene de *H. perforatum***

Extract uscat analizat	Test-cultură bacteriană (g/ml)									
	<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC19433		<i>Escherichia coli</i> ATCC 5922		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 2785		<i>Proteus vulgaris</i> HX 19222	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Hyperici flores</i>	37,5	300	75	300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	>300
<i>Hyperici herba</i>	150	300	300	> 300	>300	> 300	> 300	> 300	> 300	>300

**Notă:** CMI – concentrația minimă de inhibiție; CMB – concentrația minimă bactericidă.

Activitatea antifungică a extractelor analizate a fost studiată pe următoarele tulpini fungice: *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* și *Penicillium*. Datele experimentale au demonstrat faptul că extractul uscat din flori a manifestat acțiuni fungistatică și fungicidă față de *C. albicans*, în concentrații mai mari de 300 μg/ml.

#### 4.4. Studiul activității antibacteriene și antifungice a uleiului volatil din părți aeriene de *H. perforatum*

Uleiul volatil, obținut prin hidrodistilare din *Hyperici herba*, a manifestat o activitate bacteriostatică înaltă în raport cu microorganismele gram-pozitive în

concentrație de 0,0009% – *S. aureus* 209-P și 0,125% – *E. faecalis* ATCC 19433. Activitatea bactericidă față de *S. aureus* 209-P constituie 0,0037% și față de *E. faecalis* – 0,25%. Concentrațiile bacteriostatică și bactericidă ale uleiului volatil în raport cu microorganismele gram-negative: *E. coli* ATCC 25922, *P. vulgaris* HX 19222 și *P. aeruginosa* ATCC 27853 sunt mai mari de 0,5%. Uleiul volatil din *Hyperici herba* a manifestat proprietăți antifungice până la concentrația de 0,5% în raport cu: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* și *Penicillium*, ce denotă că *Hyperici herba* poate servi drept sursă pentru obținerea uleiului volatil cu proprietăți antifungice pronunțate.

#### 4.5. Studiul toxicității acute a extractelor uscate

Determinarea toxicității acute a extractelor uscate, obținute din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* (produse vegetale din flora spontană și colecție), s-a realizat în cadrul Laboratorului evaluare preclinică și clinică a medicamentelor din cadrul Centrului Științific al Medicamentului.

Toxicitatea acută a fost determinată prin metoda dozelor fixe cu stabilirea clasei de toxicitate conform ghidului TG 423 (*Acute Toxic Class Method*), recomandat de Organizația Economică pentru Cooperare și Dezvoltare (OECD) [23]. Studiul a fost efectuat pe două grupuri de animale de laborator: 168 de șoareci (masculi și femele) și 54 de șobolani (femele). Extractele analizate au fost administrate în doze de 50, 300, 1000, 2000 mg/kg, intraperitoneal și intragastral.

În baza rezultatelor obținute (în experimente pe șoareci) s-a stabilit LD 0% la administrarea enterală a extractelor uscate, care a constituit pentru probele obținute din părțile aeriene (flora spontană și colecție) și flori din flora spontană 1000 mg/kg, iar pentru extractul obținut din flori din colecție – 50 mg/kg. Procentajul maxim de letalitate a fost de 17%, la toate probele analizate, mortalitatea LD 25%, LD 50%, LD 100% după Kerber nu a fost posibil de stabilit. La estimarea LD<sub>50</sub> în baza TG 423: *Acute Toxic Class Method*, s-a stabilit că extractele obținute din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* din flora spontană posedă clasa 5 de toxicitate (> 2000-5000 – practic netoxic), iar extractele obținute din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* din colecție posedă clasa 4 de toxicitate (> 300-2000 – toxicitate redusă). Conform clasificării substanțelor toxice după Sidorov K. (1977) (administrare intraperitoneală), extractele uscate din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* (flora spontană) pot fi atribuite la gradul 5 de toxicitate (substanțe practic netoxice), dar extractele din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* (colecție) – la gradul 4 de toxicitate (substanțe cu toxicitate redusă).

A fost determinată clasa de toxicitate în administrare enterală la șobolani a extractelor uscate din flori și părțile aeriene de *H. perforatum* (flora spontană și colecție) conform clasificării propuse de OECD [188]. Datele experimentale, obținute în urma administrării enterale a extractelor la șobolani, relevă faptul că extractele uscate din *Hyperici herba*, *Hyperici flores* (flora spontană), *Hyperici herba* (colecție) corespund gradului de toxicitate 5, pentru care LD<sub>50</sub> estimat este  $\geq 5000$  mg/kg, iar proba *Hyperici flores* (colecție) corespunde gradului de toxicitate 5, pentru care LD<sub>50</sub> este estimat cu 2500 mg/kg.



## CONCLUZII GENERALE

1. Studiul macro- și microscopic al frunzelor și elementelor florale la speciile *H. perforatum*, *H. elegans*, *H. tetrapterum*, *H. hirsutum* din flora spontană a Republicii Moldova a permis evidențierea caracterelor macroscopice (numărul de coaste și modul de aranjare pe tulpini, pubescenta părților aeriene) și microscopice (structurelor secretoare – glande negre, buzunare translucide și canale, cu caracteristici de diferențiere – tipul, culoarea, forma, localizarea), pentru identificarea produselor vegetale.
2. Analiza cantitativă comparativă a compușilor chimici (mg/g), a 4 specii de *Hypericum* (părți aeriene), prin metoda HPLC, relevă că: specia *H. perforatum* se deosebește prin conținut maxim de flavonoide (30,3); conținutul de acizi hidroxicinamici variază de la 10,7 în *H. tetrapterum* până la 1,82 în *H. elegans*; conținutul sporit de hipericină s-a determinat în *H. elegans* – 1,34, iar hiperforina a fost identificată doar în *H. perforatum* (27,90).
3. Conținutul maxim de flavonoide în părțile aeriene de *H. perforatum* a fost ca reper pentru dozarea ulterioară a unor flavonoide (%) în plantele din flora spontană și cultivată (colecția CȘPDPM, USMF „Nicolae testemițanu”): rutozida (2,01) și hiperozida (0,95) prevalează în plantele din flora spontană, iar cvercetrozida (0,54), cvercetol (0,25) și I3,II8-biapigenină (0,28) în cele cultivate.
4. Studiul comparativ al uleiului volatil, obținut prin hidrodistilare, 4 specii de *Hypericum* a pus în evidență părțile aeriene de *H. perforatum* prin conținut maximal – 0,26%. Taxonomia speciei corelează cu componenții majori ai uleiului volatil în produsele vegetale: *H. perforatum* –  $\beta$ -cariofilen (12,175%), oxid de cariofilen (12,119%) și  $\alpha$ -pinen (8,574%); *H. elegans* – g-gurjunen (13,99%), aromadendren (13,99%) și undecan (10,262%); *H. tetrapterum* – dodecanal (9,271%) și  $\alpha$ -longipinen (8,489%); *H. hirsutum* – oxid de cariofilen (10,435%) și fitol (6,056%).
5. S-au determinat parametri optimi (concentrația solventului, numărul de fracții și timpul de extragere) pentru metoda de macerare fracționată cu agitare în vederea sporirii randamentului de extragere a compușilor chimici din flori de *H. perforatum*. Analiza chimică comparativă a extractelor uscate a evidențiat *Hyperici flores* cu valori maxime ale totalului de flavonoide (14,470%), polifenoli (15,091%) și derivați ai antracenului (0,845%) comparativ cu *Hyperici herba*. Parametri de standardizare a extractelor uscate se încadrează în limitele admisibile și corespund cerințelor DAN. Studiul de stabilitate, efectuat în timp real și în condiții accelerate, a permis determinarea termenului de valabilitate de 36 luni pentru extractele uscate din flori și părți aeriene de *H. perforatum*.
6. Extractele uscate din flori și părți aeriene de *H. perforatum* posedă activități biologice: activitate antioxidantă, determinată prin metodele DPPH, ABTS și capacitatea de chelare a fierului în extractul uscat din flori au fost mai mari, comparativ cu extractul din părți aeriene ( $p < 0,05$ ); activitatea antiinflamatoare a extractelor, obținute din *Hyperici herba* (44,2%) și *Hyperici flores* (39,33%) din flora spontană nu diferă semnificativ ( $p > 0,05$ ) de rezultatele substanței de referință – diclofenacul de sodiu (49,76%); activitatea bactericidă a extractului uscat din

flori s-a manifestat, în concentrație mai joasă, față de *S. aureus* 209-P (37,5 µg/ml) și *E. faecalis* (75 µg/ml), comparativ cu extractul obținut din părți aeriene de *H. perforatum* (300 µg/ml).

7. Studiul toxicității acute a stabilit gradele 5 și 4 de toxicitate ale extractelor uscate, obținute din flori și părți aeriene de *H. perforatum* din flora spontană (LD50 > 5000 mg/kg) și cultivată (LD50 = 2500 mg/kg), administrate enteral și parenteral animalelor de laborator, ce denotă inofensivitatea extractelor de sunătoare.
8. În baza rezultatelor obținute au fost elaborate Proiectele monografiilor farmaceutice pentru produsul vegetal „Flori de Sunătoare – *Hyperici flores*” și pentru produsul farmaceutic „Extract uscat din flori de Sunătoare – *Hyperici flores extractum siccum*”.

### RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Prezenta lucrare științifică oferă noi perspective de cercetare a studiului chimic al speciilor *H. elegans* și *H. tetrapterum* pentru identificarea noilor surse de hipericină și acizi hidroxicinamici – compuși chimici valoroși pentru proprietățile antidepresive, antibacteriene și antioxidante.
2. Metodele implementate (obținerea, analiza chimică, standardizarea produselor vegetale și extractelor din speciile g. *Hypericum*) pot fi aplicate în cadrul laboratoarelor de control ale calității medicamentelor și departamentelor de cercetare-dezvoltare ale întreprinderilor farmaceutice.
3. Rezultatele studiului farmaceutic ale speciei *H. perforatum* impun necesitatea unor noi cercetări, preclinice și clinice, ale produselor extractive (ulei volatil, extracte uscate), obținute din *Hyperici herba* și *Hyperici flores*, pentru elaborarea de produse noi fitoterapeutice în Republica Moldova, cu proprietăți antibacteriene, antidepresive și anxiolitice.
4. Rezultatele obținute pot fi implementate în procesul didactico-instructiv al studenților de la Facultatea de Farmacie, în cadrul disciplinelor Botanică farmaceutică, Farmacognozie, Tehnologie farmaceutică magistrală, Chimie farmaceutică, Elaborarea medicamentului și cercetarea farmaceutică; a rezidenților, în cadrul modulului conex Plante în sănătatea umană și a farmaciștilor, în cadrul cursului de educație continuă în farmacie Actualități în domeniul plantelor medicinale și fitopreparatelor.

## BIBLIOGRAFIE

1. CHIMSHIROVA, R., KARSHEVA, M., DIANKOV, S., HINKOV, I. Extraction of valuable compounds from bulgarian St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). antioxidant capacity and total polyphenolic content. In: Journal of Chemical Technology and Metallurgy. 2019, 54, 5, pp. 952-961. ISSN 1314-7978 (Online).
2. BÉJAOUÏ, A. et al. Bioactive compounds from *Hypericum humifusum* and *Hypericum perforatum*: inhibition potential of polyphenols with acetylcholinesterase and key enzymes linked to type-2 diabetes. In: Pharmaceutical Biology. 2017, Vol. 55, № 1, pp. 906-911. ISSN 1744-5116 (Online).
3. ÇELEN, G., ÖZKAN, S., AYHAN, F. The phenolic compounds from *Hypericum perforatum* and their antimicrobial activities. In: Hacettepe Journal of Biology and Chemistry. 2008, 36 (4), pp. 339-345. ISSN 2687-475X.
4. ZANOLI, P. Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. In: CNS Drug Reviews. 2004, Vol. 10, № 3, pp. 203-218. ISSN 1527-3458 (Online).
5. NEGRU, A. și a. Lumea vegetală a Moldovei. Plante cu flori – II. Chișinău: Știința, 2006. p 13. ISBN 978-9975-67-535-2.
6. GÎTEA, D., ȘIPOȘ, M., TĂMAȘ, M., PAȘCA B. Secretory structures at species of *Hypericum* genera from Bihor county, Romania. Note I. Vegetative organs. In: Farmacia. 2011, Vol. 59, 3, pp. 424-431. ISSN 2065-0019 (Online).
7. NISTREANU, A., CALALB, T. Analiza farmacognostică a produselor vegetale medicinale. Chișinău: CEP Medicina, 2016. 310 p. ISBN 978-9975-82-032-5.
8. European Pharmacopoeia 6.0, Vol 2. Council of Europe, Strasbourg, 2008. pp. 2958-2959. ISBN 978-92-871-6054-6.
9. CASIAN, I., CASIAN, A., VALICA, V. Elaborarea metodei HPLC pentru studiu fitochimic al speciei *Hypericum perforatum* L. In: Analele științifice ale USMF „N. Testemițanu”. 2009, 1 (10), pp. 327-332. ISSN 1857-1719.
10. ПРАВДИВЦЕВА, О., КУРКИН, В. Исследования по обоснованию новых подходов к стандартизации сырья и препаратов зверобоя продырявленного. В: Химия растительного сырья. 2008, 1, с. 81-86. ISSN 1029-5143 (Online).
11. ЗИМИНА, Л., КУРКИН, В., РЫЖОВ, В. Сравнительное исследование компонентного состава травы фармакопейных видов зверобоя методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. В: Химия растительного сырья. 2013, 1, с. 205-208. ISSN 1029-5143 (Online).
12. GONCEARIUC, M. ș. a. Essential oil of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* L. and *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart from Moldova: Content and Chemical Composition. In: International Journal of Agriculture Innovations and Research. 2014, 3(2), pp. 659-663. ISSN 2319-1473.
12. POPOVICI, I., LUPULEASA, D. Tehnologia farmaceutică. Volumul 1. Ediția a IV-a. Iași: Poliform. 2017. pp. 468-475. ISBN: 978-973-46-6579-2.
14. SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of the phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-

- Ciocalteu reagent. In: *Methods in Enzymology*. 1999, Vol. 299, pp. 152–178. ISSN 0076-6879.
15. КУРКИН, В.А., ПРАВДИЦЕВА, О. Е. Сравнительное исследование содержания суммы флавоноидов и антраценпроизводных в препаратах травы зверобоя. В: *Химико-фармацевтический журнал*. 2008, Том 42, 10, с. 40-41. ISSN 0023-1134.
  16. ICH Harmonised tripartite guideline Q2(R1). Validation of Analytical Procedure: Methodology. In: *International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*, 2005, [citat 12.02.2017]. Disponibil:  
[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf).
  17. DONICI, E. Elaborarea și validarea metodei spectrofotometrice în ultraviolet și vizibil de dozare a fluocinolonului acetonid dintr-un unguent combinat: studiu experimental. În: *Moldovan Journal of Health Sciences. Revista de Științe ale Sănătății din Moldova*. 2017, Vol. 13, № 3, pp. 53-58. ISSN 2345-146.
  18. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products 2003. Disponibil: [https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q1A\(R2\)Step4\(2\).pdf](https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q1A(R2)Step4(2).pdf)
  19. RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. In: *Free Radical Biology & Medicine*. 1999, Vol. 26 (9-10), pp. 1231-1237. ISSN: 0891-5849.
  20. LEHMANN, C. et al. The utility of iron chelators in the management of inflammatory disorders. In: *Mediators of Inflammation*. 2015, pp. 1-12. ISBN 1466-1861 (Online).
  21. ШАМСУДИНОВ, Ш.Н., АВЕЗОВ, С.А. Противовоспалительное свойство сухого экстракта зверобоя продырявленного. В: *Доклады академии наук Республики Таджикистан. Гастроэнтерология*. 2015, том 58, № 3, с. 252-256. ISSN 0002-3469 (Online).
  22. PRISACARI, V., BURACIOV, S., UNCU, L., VÂSLOUH, O., ȚAPCOV, V. Unguent „Izofural” - preparat antibacterian nou. Comunicare I. Studiul activității antibacteriene. În: *Anale științifice ale Universității de Stat de Medicină și Farmacie Nicolae Testemițanu*. 2010, vol. 2, pp. 12-15. ISBN 978-9975-4134-0-4.
  23. OECD Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. 2001, No 423, 14 p. ISSN 20745788 (online). Disponibil: <https://doi.org/10.1787/20745788>

## LISTA PUBLICAȚIILOR LA TEMA TEZEI

### 1. Articole în reviste științifice

#### 1.1. în reviste din bazele de date SCOPUS

- 1.1.1. CIOBANU, N., COJOCARU-TOMA, M., CIOBANU, C., **BENEA, A.** Evaluation of polyphenolic profile and antioxidant activity of some species cultivated in the Republic of Moldova. In: *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*. 2018, nr. 3(13), pp. 441-447. ISSN 1306-3057.

#### 1.2. în reviste din străinătate recunoscute

- 1.2.1. **BENEA, A.** et al. Essential oil chemical composition biodiversity in the *Hypericum L.* species from the spontaneous flora of the Republic of Moldova. In: *Oltenia Journal for Studies in Natural Sciences*. 2013, tom. 29, no. 2, pp. 47-52. ISSN 1454-6914.

#### 1.3. în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, cu indicarea categoriei - categoria B

- 1.3.1. **BENEA, A.** ș.a. Conținutul și componența uleiului esențial la specii de *Hypericum L.* (sunătoare) din flora spontană a Republicii Moldova. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții*. 2013, nr. 2(320), pp. 87-93. ISSN 1857-064X.
- 1.3.2. COJOCARU-TOMA, M., CIOBANU, C., **BENEA, A.**, CIOBANU, N. Valorificarea speciilor din colecția Centrului Științifico-Practic în Domeniul Plantelor Medicinale a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. În: *Revista de Științe ale Sănătății din Moldova*. 2020, nr. 4(25), pp. 89-100. ISSN 2345-1467.

#### - categoria C

- 1.3.3. **BENEA, A.**, NISTREANU, A., TIHON, I. Studiul chimic al unor specii din genul *Hypericum L.* din flora Republicii Moldova. În: *Anale Științifice ale USMF „N. Testemițanu”*. 2011, nr. 1(12), pp. 418-421. ISSN 1857-1719.
- 1.3.4. **BENEA, A.** Studiul totalului antracenderivaților în speciile genului *Hypericum* din flora Republicii Moldova. În: *Anale Științifice ale USMF „N. Testemițanu”*. 2012, nr. 1(13), pp. 316-319. ISSN 1857-1719.
- 1.3.5. **BENEA, A.** Conținutul polifenolic în extracte uscate de *Hypericum perforatum L.* din flora Republicii Moldova. În: *Anale științifice ale IP USMF “Nicolae Testemițanu”*. 2013, nr. 1(14), pp. 411-416. ISBN 978-9975- 118-03-3.
- 1.3.6. **BENEA, A.**, PRISACARI, V., DIZDARI, A., CHIRU, T. Acțiunea antibacteriană și antifungică a uleiului volatil din *Hypericum perforatum L.* din flora Republicii Moldova. În: *Revista Farmaceutică a Moldovei*. 2016, nr. 1-4, pp. 88-90. ISSN 1812-5077.

#### 1.4. alte reviste de specialitate

- 1.4.1. **BENEA, A.** Compoziția chimică a speciilor genului *Hypericum L.* În: *Revista Farmaceutică a Moldovei*. 2021, vol. 45, nr. 1, p. 82-84. ISSN 1812-5077.
- 1.4.2. **BENEA, A.** Efectele farmacologice ale compușilor chimici din specia *Hypericum perforatum L.* În: *Revista Farmaceutică a Moldovei*, 2021, vol. 45, nr. 1, p. 55-57. ISSN 1812-5077.

### 2. Teze în culegeri științifice

#### 2.1. în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)

- 2.1.1. **БЕНЯ, А.** и др. Изучение содержания и состава эфирного масла различных видов сырья *Hypericum perforatum L.*, произрастающего в Республике Молдова. В: *Тези доповідей. Сучасні теоретичні та практичні клінічної медицини. Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених, присвячена 155-річчю з дня народження В. В. Підвисоцького.* Одеса, Ucraina, 2012, с. 95. ISBN 978-966-443-053-8.
- 2.1.2. **BENEA, A.** et al. Study of volatile oil from the aerial parts of *Hypericum perforatum L.* By GC-MS. In: *Phytochemicals in medicine and pharmacognosy. Piatra-Neamț, Romania, 2014*, p. 37. ISBN-13 978-0-9565472-4-8.
- 2.1.3. **BENEA, A.** et al. Bioactive compounds of the aerial parts of *Hypericum* species from Republic of Moldova. In: *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy 23 th International Congress Phytopharm.* Saint-Petersburg, Russia, 2019, pp. 7-8. ISSN 1683-4100 (print).
- 2.1.4. **BENEA, A.** ș.a. Studii de stabilitate a extractelor uscate de *Hypericum perforatum L.* În: *Congresul Național de Farmacie, ediția a XVIII-a 2021. Farmacia: de la inovare la Buna Practică Farmaceutică.* Editura Universității din Oradea, 2021, p. 115. I-SBN 978-606-10-2144-42.
- 2.1.5. **CIOBANU, N.** ș.a. Acțiunea antibacteriană a unor specii din colecția Centrului Științifico-Practic în Domeniul Plantelor Medicinale a USMF “Nicolae Testemițanu”. În: *Congresul Național de Farmacie, ediția a XVIII-a 2021. Farmacia: de la inovare la Buna Practică Farmaceutică.* Editura Universității din Oradea, 2021, p. 111. I-SBN 978-606-10-2144-42.
- 2.1.6. **COJOCARU-TOMA, M.** ș. a. Evaluarea activității antioxidante a unor specii cultivate în Republica Moldova. În: *Congresul Național de Farmacie, ediția a XVIII-a 2021. Farmacia: de la inovare la Buna Practică Farmaceutică.* Editura Universității din Oradea, 2021, p. 92. I-SBN 978-606-10-2144-42.
- 2.1.7. **BENEA, A.** Chemical composition of the ethanolic extracts of the aerial parts and flowers of *Hypericum perforatum L.* from Republic of Moldova. In: *Abstract Book. PSE Meeting 2022, Natural Products in Drug Discovery and Development-Advances and Perspectives.* Iasi, Romania, 2022, p. 152.
- 2.2. în lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)**
- 2.2.1. **BENEA, A.** Comparative studies of the total anthracene derivatives in species of genus *Hypericum L.* from the flora of Republic of Moldova. In: *Abstract book 4<sup>th</sup> International Medical Congress for Students and Yang Doctors.* Chisinau, 2012, p. 238. ISBN 978-9975-57-031-2.
- 2.2.2. **SOROCA, I., BENEА, A., CIBOTARU, N.** The spectrophotometric determination of the total degree of flavonoids and polyphenols in the aerial parts of *Hypericum perforatum L.* and *Hypericum elegans Steph.* In: *International Scientific Symposium “Conversation of Plant Diversity”, 5th edition.* Chișinău, 2017, p. 107. ISBN 978-9975-4182-1-8.
- 2.2.3. **CIBOTARU, N., BENEА, A., SOROCA, I.** Comparative analysis of the total degree of flavonoids and polyphenols in different products of *Hypericum perforatum L.* In: *International Scientific Symposium “Conversation of Plant Diversity”, 5th edition.* Chișinău, 2017, p. 72. ISBN 978-9975-4182-1-8.

2.2.4. **BENEA, A., SAVA, V., NISTREANU, A.** Produse extractive de *Hypericum perforatum* L. cu proprietăți antimicrobiene. În: *Conferința Științifico-Practică Națională cu Participare Internațională „Actualități și perspective în studiul farmaceutic al plantelor medicinale”*. Chișinău, 2021, p. 75, ISBN 978-9975-56-909-5.

### 2.3. în lucrările conferințelor științifice naționale

2.3.1. **BENEA, A., NISTREANU, A., GOTCĂ, C.** Conținutul substanțelor tanante în produse vegetale și extracte din *Hypericum perforatum* L. Materialele conferinței științifice consacrate jubileului de 50 de ani de la fondarea Facultății de Farmacie și 80 de ani de la nașterea patriarhului farmaciei moldave Vasile Procopișin. În: *Revista Farmaceutică a Moldovei*. Chișinău, 2014, nr. 3-4, p. 65. ISSN 1812-5077.

2.3.2. **BENEA, A.** Totalul flavonoidelor în extracte uscate din *Hypericum perforatum* L., obținut prin diverse metode. În: *Conferința științifică anuală a colaboratorilor și studenților: culegere de rezumate științifice ale IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemitanu" din Republica Moldova*. Chișinău, 2014, p. 22. ISSN 1857-1719.

2.3.3. **BENEA, A., NICOLAI, E., PUHNAIA, A., VALICA, V.** Evaluarea toxicității acute a extractelor uscate din produsele vegetale de *Hypericum perforatum* L. În: *Conferința științifică anuală a colaboratorilor și studenților: culegere de rezumate științifice ale IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemitanu” din Republica Moldova*. Chișinău, 2015, p. 288. ISSN 1857-1719.

2.3.4. **BENEA, A.** Optimizarea procesului de obținere și studiul chimic al extractelor uscate din *Hyperici flores*. În: *Conferința științifică anuală a colaboratorilor și studenților: culegere de rezumate științifice ale IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemitanu" din Republica Moldova*. Chișinău, 2015, p. 290. ISSN 1857-1719.

### 3. Brevete de invenții și alte obiecte de proprietate intelectuală

3.1. **BENEA, Anna, PARII, Sergiu.** *Cercetări farmacologice a extractelor uscate și uleiului volatil din Hypericum perforatum L.* Certificat de înregistrare a obiectelor dreptului de autor și drepturilor conexe. Seria O Nr 6918. din 02.06.21, eliberat de către Agenția de Stat pentru Proprietatea Intelectuală a Republicii Moldova, Chișinău, R. Moldova.

3.2 **BENEA, Anna, CIOBANU, Nicolae, UNCU, Livia.** *Obținerea și studiul chimic al extractelor uscate din Hyperici herba și Hyperici flores.* Certificat de înregistrare a obiectelor dreptului de autor și drepturilor conexe. Seria O Nr 6919 din 02.06.21, eliberat de către Agenția de Stat pentru Proprietatea Intelectuală a Republicii Moldova, Chișinău, R. Moldova.

3.3. **BENEA, Anna, NISTREANU, Anatolie, COJOCARU-TOMA, Maria.** *Analiza chimică a produselor vegetale și uleiului volatil de la speciile genului Hypericum L.* Certificat de înregistrare a obiectelor dreptului de autor și drepturilor conexe. Seria O Nr 6920 din 02.06.21, eliberat de către Agenția de Stat pentru Proprietatea Intelectuală a Republicii Moldova, Chișinău, R. Moldova.

## ADNOTARE

**Benea Anna „*Hypericum perforatum* L. – sursă de noi forme farmaceutice”, teză de doctor în științe farmaceutice, Chișinău, 2023**

**Structura tezei:** Introducere, patru capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie (199 de titluri), 9 anexe, 141 pagini de text de bază, 47 figuri, 47 tabele. Rezultatele au fost publicate în 25 de lucrări științifice și au fost prezentate la 18 forumuri științifice.

**Cuvinte-cheie:** genul *Hypericum*, *Hypericum perforatum* L., *Hyperici flores*, *Hyperici herba*, extract uscat, polifenoli, flavonoide, standardizare, activitate antibacteriană, antioxidantă, antiinflamatoare.

**Scopul lucrării:** studiul farmacognostic al speciilor genului *Hypericum* pentru obținerea, standardizarea și evaluarea acțiunii farmacologice ale produselor extractive.

**Obiectivele cercetării:** analiza morfo-anatomică a speciilor g. *Hypericum* din flora Republicii Moldova; studiu chimic comparativ al speciilor g. *Hypericum* în vederea identificării produsului vegetal cu conținut maxim de compuși fenolici; izolarea și analiza chimică a uleiului volatil, obținut din produsele vegetale ale speciilor g. *Hypericum*; obținerea, analiza chimică, standardizarea și studiul stabilității extractelor uscate din părți aeriene și din flori de *H. perforatum*; studiul activităților antibacteriene, antioxidante, antiinflamatoare ale produselor extractive; determinarea gradului de toxicitate acută ale extractelor uscate din *H. perforatum*, elaborarea proiectelor de monografii farmaceutice pentru produsul vegetal *Hyperici perforati flores* și pentru produsul extractiv uscat *Hyperici perforati flores extractum siccum*.

**Noutatea și originalitatea științifică.** Pentru primă dată a fost realizat *screening*-ul fitochimic la 4 specii a genului *Hypericum* din flora spontană a RM, ce a permis identificarea produsului vegetal cu cel mai înalt conținut de compuși fenolici (*Hyperici perforati flores*); s-a optimizat metoda de obținere a extractelor uscate din produsele vegetale de *H. perforatum*; s-a efectuat studiul farmaceutic, care a permis standardizarea și determinarea termenului de valabilitate a extractelor uscate din *Hyperici flores* și *Hyperici herba*; s-a determinat acțiunile antioxidantă, antibacteriană, antiinflamatoare și gradul de toxicitate acută ale extractelor uscate standardizate; s-au elaborat proiectele Documentației Analitice de Normare (DAN) pentru produsul vegetal *Hyperici perforati flores* și pentru extractul uscat *Hyperici perforati flores extractum siccum*.

**Problema științifică importantă** constă în *screening*-ul fitochimic al speciilor genului *Hypericum* din flora RM, cu identificarea speciei cu cel mai înalt conținut de flavonoide (*H. perforatum*) în vederea elaborării DAN pentru produsul vegetal *Hyperici perforati flores* și extractul uscat al acestuia – o condiție obligatorie pentru elaborarea de noi produse fitofarmaceutice, cu acțiuni: antibacteriană, antioxidantă și antiinflamatoare.

**Semnificația teoretică** a lucrării constă în aprofundarea cunoștințelor referitoare la: particularitățile microscopice ale speciilor g. *Hypericum* din flora RM, diferențierea lor după compoziția chimică; principiile de extracție a compușilor fenolici; determinarea lor calitativă și cantitativă în produsele vegetale și extractive; studiul proprietăților antibacteriene, antifungice, antioxidante și antiinflamatoare ale extractelor uscate, obținute din *H. perforatum*.

**Valoarea aplicativă.** Rezultatele vor contribui la dezvoltarea industriei farmaceutice din RM, în vederea completării produselor fitoterapeutice existente pe piață farmaceutică cu altele noi, cu conținut de produse extractive standardizate din *H. perforatum* de origine autohtonă. Datele obținute permit elaborarea DAN pentru extractele uscate standardizate, care pot servi drept componente de bază în produsele fitoterapeutice cu acțiune antioxidantă, antibacteriană și antiinflamatoare.

**Implementarea rezultatelor științifice:** în baza rezultatelor obținute au fost elaborate Proiectele de Monografii farmaceutice pentru produsul vegetal *Hyperici perforati flores* și pentru extractul uscat *Hyperici perforati flores extractum siccum*. Rezultatele studiului au fost implementate în procesul didactic la Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică și în procesul științifico-practic în cadrul Centrului Științific al Medicamentului și în cadrul CȘPDPM al USMF „Nicolae Testemițanu”.



## ANNOTATION

**Benea Anna „*Hypericum perforatum* L. – a source of new pharmaceutical forms”, PhD thesis in pharmaceutical sciences, Chisinau, 2023**

**Thesis structure:** introduction, four chapters, general conclusions and recommendations, references (199 titles), 9 annexes, 139 basic text pages (up to references) 47 figures, 47 tables. The obtained results were published in 25 scientific papers and presented in 18 scientific forums.

**Keywords:** *Hypericum* genus, *Hypericum perforatum* L., *Hyperici flores*, *Hyperici herba*, dry extract, polyphenols, flavonoids, standardization, antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory activity.

**Aim of the work:** pharmacognostic study of the species of the genus *Hypericum* to obtain, standardize and evaluate the pharmacological action of extractive products.

**Study objectives:** the macro- and microscopical analysis of the species *Hypericum* genus from the flora of Republic of Moldova (RM); the comparative chemical study of the species g. *Hypericum* in order to identify the plant product with the highest content of phenolic compounds; the isolation and chemical analysis of volatile oil, obtained from plant products of species of the *Hypericum* genus; obtaining, chemical analysis, standardization and study of the stability of dry extracts from the aerial parts and flowers of *H. perforatum*; the study of the antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory activities of the extractive products; determination of the degree of acute toxicity of dry extracts of *H. perforatum*, the elaboration of draft pharmacopoeial monographs for the plant product *Hyperici perforati flores* and for the dry extract *Hyperici perforati flores extractum siccum*.

**Scientific novelty and originality.** For the first time, phytochemical screening has been performed on 4 species of the genus *Hypericum* (*H. perforatum* L., *H. elegans* Steph., *H. hirsutum* L., *H. tetrapterum* Fries.) from the spontaneous flora of the RM, which allowed the identification of the plant materials with the highest content of phenolic compounds (*Hyperici perforati flores*); the method of obtaining dry extracts from *H. perforatum* plant materials has been optimised; a pharmaceutical study was carried out to standardise and determine the shelf life of the dried extracts of *Hyperici flores* and *Hyperici herba*; the antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory activity and acute toxicity of the standardised dried extracts were determined; it was drawn up the draft of Analytical Standardisation Documentation was drawn up for the *Hyperici perforati flores* plant material and the dried extract *Hyperici perforati flores extractum siccum*.

**The important scientific problem.** The phytochemical screening of the species of the genus *Hypericum* from the flora of the RM, with the identification of the species with the highest flavonoid content (*H. perforatum*); in order to elaborate Regulatory Analytical Documentatio for the plant material *Hyperici perforati flores* and its dry extract - a mandatory condition for the development of new phytopharmaceutical products with antibacterial, antioxidant and anti-inflammatory activities.

**The theoretical significance.** Deepening the knowledge regarding microscopical peculiarities of the species of the genus *Hypericum* in the flora of the RM, their distinguishing them according to their chemical composition; principles of extraction of chemical compounds; their qualitative and quantitative determination in plant materials and in extracts; study of the antibacterial, antifungal, antioxidant and anti-inflammatory properties of dry extracts obtained from *H. perforatum*.

**Applicative value:** the results will contribute to the development of the pharmaceutical industry in the RM, in order to complete the existing phytotherapeutic products on the pharmaceutical market with new ones, containing standardized extractive products from *H. perforatum* of native origin. The obtained data allow the elaboration of RAD for standardized dry extracts, which can serve as basic components in phytotherapeutic products with antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory action.

**Implementation of scientific results.** The projects on Pharmacopoeial monographs have been prepared on the plant material of *Hyperici perforati flores* and the dry extract of *Hyperici perforati flores extractum siccum*. The results of the study were implemented in the didactic process at the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany and in the scientific-practical process at the Scientific Centre of Medicines and the SPCMP „Nicolae Testemițanu” SUMPh.

## АННОТАЦИЯ

**Беня Анна „*Hypericum perforatum* L.– источник новых лекарственных форм”,  
диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук,  
Кишинев, 2023**

**Структура диссертации:** введение, четыре главы, выводы и практические рекомендации, библиография (199 наименований), 9 приложений, 141 страниц основного текста, 47 рисунков, 47 таблиц. Результаты были опубликованы в 25 научных работах и представлены в рамках 18 научных форумах.

**Ключевые слова:** род *Hypericum*, *Hypericum perforatum* L., *Hyperici flores*, *Hyperici herba*, сухой экстракт, полифенолы, флавоноиды, стандартизация, антибактериальная, антиоксидантная, противовоспалительная активность.

**Цель работы:** фармакогностическое изучение видов р. *Hypericum* для получения экстрактивных веществ, их стандартизации и оценки фармакологического действия.

**Задачи исследования:** морфо-анатомический анализ видов р. *Hypericum* флоры РМ; сравнительное химическое исследование видов р. *Hypericum* с целью выявления растительного сырья с наибольшим содержанием фенольных соединений; извлечение и химический анализ эфирного масла, полученного из растительного сырья видов р. *Hypericum*; получение, химический анализ, стандартизация и изучение стабильности сухих экстрактов из травы и цветков *H. perforatum*; изучение антибактериальной, антиоксидантной, противовоспалительной активности экстрактивных веществ; определение острой токсичности сухих экстрактов *H. perforatum*, разработка проекта фармакопейной статьи для растительного сырья *Hyperici perforati flores* и для сухого экстракта *Hyperici perforati flores extractum siccum*.

**Научная новизна и оригинальность.** Впервые проведен фитохимический скрининг 4 видов рю *Hypericum*, дикорастущих в РМ, что позволило выделить сырьё с наибольшим содержанием фенольных соединений (цветки зверобоя продырявленного); разработан метод получения сухих экстрактов из растительного сырья *H. perforatum*; проведено фармацевтическое исследование с целью стандартизации и определения срока годности сухих экстрактов из *Hyperici flores* и *Hyperici herba*; определено антиоксидантное, антибактериальное, противовоспалительное действие и острая токсичность стандартизированных сухих экстрактов; подготовлены проекты Нормативно-Аналитической Документации (НАД) для растительного сырья *Hyperici perforati flores* и сухого экстракта *Hyperici perforati flores extractum siccum*.

**Важной научной проблемой** является фитохимический скрининг видов рода *Hypericum* из флоры РМ для выявления вида с самым высоким содержанием флавоноидов (*H. perforatum*), с целью разработки НАД для стандартизации растительного сырья *Hyperici perforati flores* и его сухого экстракта - необходимое условие для разработки новых фитофармацевтических препаратов с антибактериальным, антиоксидантным и противовоспалительным действием.

**Теоретическая значимость** заключается в углублении знаний об: морфо-анатомических особенностях видов рода *Hypericum* флоры РМ, их различии по химическому составу; принципах выделения химических соединений; химическом анализе растительного сырья и экстрактов; изучении антибактериальных, противогрибковых, антиоксидантных и противовоспалительных свойств сухих экстрактов, полученных из *H. perforatum*.

**Практическая значимость.** Результаты исследования будут способствовать развитию фармацевтической промышленности РМ, с целью пополнения ассортимента новыми фитопрепаратами, содержащими стандартизированные экстракты *H. perforatum* отечественного производства. Полученные данные позволяют разработать НАД для стандартизированных сухих экстрактов, которые могут служить основным компонентом в фитотерапевтических препаратах с антиоксидантным, антибактериальным и противовоспалительным действием.

**Внедрение научных результатов:** были созданы проекты Фармакопейных статей для растительного сырья *Hyperici perforati flores* и сухого экстракта *Hyperici perforati flores extractum siccum*. Результаты исследования внедрены в учебный процесс на Кафедре фармакогнозии и фармацевтической ботаники; в научно-практический процесс Научного центра лекарственных средств и Научно-Практическом Центре Лекарственных Растений КГУМФ имени Николая Тестемицану.

**BENEA ANNA**

***HYPERICUM PERFORATUM L. – SURSĂ DE NOI FORME  
FARMACEUTICE***

**316.02- FARMACIE**

Rezumatul tezei de doctor în științe farmaceutice

---

Aprobat spre tipar: 16.11.2023  
Hârtie 80gr/m2. Tipar laser.  
Coli de tipar: 1,92

Formatul hârtiei 60x84 1/16  
Tiraj 50. Ex.  
Comanda nr. 10

---

Îl „Covalciuc Maria" Chișinău, str. Vl. Korolenko 61/3