

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
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

Teză de doctor în științe farmaceutice

Conducător științific

Nistreanu Anatolie, doctor în științe
farmaceutice, profesor universitar

Consultant științific:

Parii Sergiu, doctor habilitat în științe
medicale, conferențiar cercetător

Autor:

Benea Anna

CHIȘINĂU, 2023

© Benea Anna, 2023

CUPRINS

ADNOTARE	5
ANNOTATION	6
АННОТАЦИЯ	7
LISTA TABELELOR	8
LISTA FIGURILOR	10
LISTA ABREVIERILOR	12
INTRODUCERE	14
1. CARACTERISTICA GENERALĂ A SPECIILOR GENULUI <i>HYPERICUM</i> L.	23
1.1. Încadrarea sistematică a genului <i>Hypericum</i>	23
1.2. Caracteristicile macro- și microscopice ale speciilor genului <i>Hypericum</i>	25
1.2.1. Caracteristica morfologică a speciilor genului <i>Hypericum</i>	25
1.2.2. Particularitățile anatomice ale speciilor genului <i>Hypericum</i>	27
1.3. Compoziția chimică a speciilor genului <i>Hypericum</i>	32
1.3.1. Acumularea și localizarea compușilor chimici	33
1.3.2. Compoziția chimică a uleiului volatil din speciile genului <i>Hypericum</i>	37
1.4. Acțiunea farmacologică a principiilor active	39
1.5. Utilizarea în medicină a produselor extractive de <i>H. perforatum</i>	42
1.6. Sinteza capitolului 1	44
2. ANALIZA CHIMICĂ A PRODUSELOR VEGETALE DIN SPECIILE GENULUI <i>HYPERICUM</i>	46
2.1. Obținerea produselor vegetale	46
2.2. Analiza calitativă a speciilor genului <i>Hypericum</i>	50
2.3. Analiza cantitativă a compușilor chimici din speciile genului <i>Hypericum</i>	56
2.4. Pierderea prin uscare a produselor vegetale	64
2.5. Sinteza capitolului 2	65
3. OBȚINEREA ȘI STUDIUL CHIMIC AL PRODUSELOR EXTRACTIVE DIN SPECIA <i>HYPERICUM PERFORATUM</i>	67
3.1. Obținerea și analiza chimică a uleiului volatil din speciile genului <i>Hypericum</i>	67
3.2. Obținerea extractelor uscate din produsele vegetale ale speciei <i>H. perforatum</i>	76
3.3. Analiza chimică a extractelor uscate obținute din flori și părți aeriene ale speciei <i>H. perforatum</i>	80
3.4. Optimizarea metodei de obținere a extractelor uscate	92
3.5. Validarea metodei de dozare a flavonoidelor în extractele uscate	97
3.6. Standardizarea extractelor uscate	102
3.7. Sinteza capitolului 3	109
4. CERCETĂRI FARMACOLOGICE ALE EXTRACTELOR USCATE ȘI ALE ULEIULUI VOLATIL DIN <i>H. PERFORATUM</i>	112
4.1. Studiul activității antioxidante a extractelor uscate, obținute din <i>Hyperici herba</i> și <i>Hyperici flores</i>	112
4.2. Testarea acțiunii antiinflamatoare <i>in vivo</i>	116
4.3. Studiul activității antibacteriene și antifungice ale extractelor uscate din părți aeriene și flori de <i>H. perforatum</i>	119

4.4. Studiul activității antibacteriene și antifungice ale uleiului volatil din părți aeriene de <i>H. perforatum</i>	121
4.5. Studiul toxicității acute a extractelor uscate	123
4.5.1. Testarea toxicității acute a extractelor uscate de <i>H. perforatum</i> la administrarea intragastrală și intraperitoneală șoarecilor	124
4.5.2. Testarea toxicității acute a extractelor uscate de <i>H. perforatum</i> , în administrarea intragastrală șobolanilor	128
4.6. Sinteza capitolului 4	129
CONCLUZII GENERALE	131
RECOMANDĂRI PRACTICE	133
BIBLIOGRAFIE	134
ANEXE	153
Anexa 1. Analiza chimică a produselor vegetale	153
Anexa 2. Analiza chimică a produselor extractive	160
Anexa 3. Validarea metodei spectrofotometrice de dozare a totalului de flavonoide în extracte uscate	172
Anexa 4. Activități farmacologice a produselor extractive	175
Anexa 5. Proiectul de monografie farmaceutică a produsului vegetal „Flori de sunătoare – <i>Hyperici flores</i> ”	178
Anexa 6. Proiectul de monografie farmaceutică a extractului uscat din flori de sunătoare – <i>Hyperici perforati flores extractum siccum</i>	187
Anexa 7. Actele de implementare a inovațiilor	192
Anexa 8. Certificatele de inovator	195
Anexa 9. Certificatele de înregistrare a obiectelor dreptului de autor și a drepturilor conexe	199
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	205
CV-UL AUTORULUI	206

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, 133 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 macro- și microscopică a speciilor g. *Hypericum* din flora Republicii Moldova (RM); studiu chimic comparativ a 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 g. *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 g. *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. Aprofundarea cunoștințelor referitoare la: particularitățile macro- și 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, 133 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 the 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 Documentation (RAD) 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 result. 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 Centre of Medicines and the Scientific-Practical Center of Medicinal Plants „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, 133 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: макро- и микроскопический анализ видов р. *Hypericum* флоры Республики Молдова (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 р. *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. Фитохимический скрининг видов р. *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. Углубление знаний об: секреторных структурах видов р. *Hypericum* флоры РМ, их отличии по химическому составу, принципах выделения химических соединений, химическом анализе растительного сырья и экстрактов; об 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. 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.

LISTA TABELELOR

Tabelul 1.1. Încadrarea sistematică a genului <i>Hypericum</i>	23
Tabelul 1.2. Speciile genului <i>Hypericum</i> din flora europeană	24
Tabelul 1.3. Structurile secretoare în elementele florale la 5 specii ale genului <i>Hypericum</i> ..	30
Tabelul 1.4. Structurile secretoare în frunze și tulpini la 5 specii ale genului <i>Hypericum</i>	32
Tabelul 1.5. Compușii chimici din specia <i>H. perforatum</i>	33
Tabelul 2.1. Valorile Rf și culoarea fluorescenței a compușilor chimici de pe cromstogramele soluțiilor extractive din părțile aeriene a speciilor genului <i>Hypericum</i>	53
Tabelul 2.2. Totalul de flavonoide (%) în produsele vegetale analizate analizate la 4 specii de <i>Hypericum</i>	57
Tabelul 2.3. Conținutul total de flavonoide și de derivați de antracen în <i>Hyperici herba</i> , în funcție de faza fenologică	59
Tabelul 2.4. Conținutul total de flavonoide și de derivați de antracen în <i>Hyperici herba</i> , în funcție de locul colectării	59
Tabelul 2.5. Concentrațiile unor compuși chimici, în părțile aeriene ale speciilor genului <i>Hypericum</i> , determinate prin metoda HPLC	60
Tabelul 2.6. Conținutul (%) a unor flavonoide în produsul vegetal <i>Hyperici herba</i>	62
Tabelul 2.7. Totalul de flavonoide, determinat prin metoda HPLC, în <i>Hyperici flores</i>	64
Tabelul 2.8. Pierdere prin uscare a produselor vegetale	64
Tabelul 3.1. Compoziția chimică a uleiului volatil din părțile aeriene ale speciilor genului <i>Hypericum</i>	71
Tabelul 3.2. Compușii chimici identificați în uleiul volatil din părțile aeriene de <i>H. perforatum</i> , produse proaspete	73
Tabelul 3.3. Compoziția chimică a uleiului volatil din flori de <i>H. perforatum</i>	75
Tabelul 3.4. Randamentul și pierdere prin uscare a extractelor uscate obținute din produsele vegetale de <i>H. perforatum</i>	80
Tabelul 3.5. Totalul de polifenoli, flavonoide și derivați de antracen în extractele uscate obținute din <i>Hyperici herba</i> cu etanol în concentrații 40-90%	85
Tabelul 3.6. Totalul de polifenoli, flavonoide și derivați de antracen în extractele uscate obținute din produsele vegetale de <i>H. perforatum</i> prin metoda de macerare	86
Tabelul 3.7. Concentrația (%) unor flavonoide în extractele uscate obținute din <i>Hyperici herba</i> prin repercolare	90
Tabelul 3.8. Concentrația (%) unor flavonoide în extractele uscate din <i>Hyperici herba</i> și <i>Hyperici flores</i> obținute prin metoda de macerare	91
Tabelul 3.9. Autenticitatea extractelor uscate din <i>Hyperici flores</i>	93
Tabelul 3.10. Caracteristicile cantitative ale procesului de obținere a extractului uscat din <i>Hyperici flores</i>	94
Tabelul 3.11. Conținutul comparativ al totalului de flavonoide în extractele uscate din <i>Hyperici flores</i> în funcție de ordinea ciclului și timpul per extracție	95
Tabelul 3.12. Conținutul total de polifenoli în extractele uscate din <i>Hyperici flores</i> în funcție de ordinea și timpul per extracție	96
Tabelul 3.13. Aspectul spoturilor și valorile Rf a compușilor chimici identificați	97

Tabelul 3.14. Evaluarea repetabilității metodei spectrofotometrice UV-VIS de dozare a totalului de flavonoide în extractele uscate din <i>Hyperici herba</i> și <i>Hyperici flores</i>	100
Tabelul 3.15. Evaluarea preciziei intermediare metodei spectrofotometrice UV-VIS de dozare a totalului de flavonoide în extractele uscate din <i>Hyperici herba</i> și <i>Hyperici flores</i>	100
Tabelul 3.16. Determinarea exactității metodei spectrofotometrice UV-VIS de dozare a totalului de flavonoide în extractul uscat din <i>Hyperici flores</i>	101
Tabelul 3.17. Pierderea prin uscare a extractelor uscate de <i>H. perforatum</i>	103
Tabelul 3.18. Concentrația de metale grele în extractele uscate de <i>H. perforatum</i>	104
Tabelul 3.19. Parametri de calitate (descriere) ai extractelor uscate păstrate în condiții obișnuite	105
Tabelul 3.20. Parametri de calitate (descriere) ai extractelor uscate păstrate la temperatura de +40°C	105
Tabelul 3.21. Conținutul total de flavonoide în extractele uscate din <i>Hyperici flores</i> și <i>Hyperici herba</i> păstrate la temperatura de +25±2°C pe termen lung	107
Tabelul 3.22. Conținutul total de flavonoide în extractele uscate din <i>Hyperici flores</i> și <i>Hyperici herba</i> păstrate la temperatura de +40°C	107
Tabelul 3.23. Cenușa totală și cenușa insolubilă în acid clorhidric de 10% din produsele vegetale și din cele extractive de <i>H. perforatum</i>	109
Tabelul 4.1. Activitatea antioxidantă a extractelor uscate din <i>Hyperici herba</i> și <i>Hyperici flores</i> , determinată prin metodele DPPH și ABTS	115
Tabelul 4.2. Acțiunea antiinflamatoare a extractelor uscate din <i>Hyperici flores</i> și <i>Hyperici herba</i> asupra edemului indus de histamină	119
Tabelul 4.3. Activitatea antibacteriană a extractelor uscate obținute din <i>Hyperici herba</i> și <i>Hyperici flores</i>	120
Tabelul 4.4. Activitatea antifungică a extractelor uscate obținute din <i>Hyperici herba</i> și <i>Hyperici flores</i>	121
Tabelul 4.5. Activitatea antibacteriană a uleiului volatil din <i>Hyperici herba</i>	122
Tabelul 4.6. Activitatea antifungică a uleiului volatil din <i>Hyperici herba</i>	123
Tabelul 4.7. Toxicitatea acută a extractelor uscate din <i>Hyperici herba</i> și <i>Hyperici flores</i> la administrarea intragastrală șoarecilor	125
Tabelul 4.8. Clasa de toxicitate acută a extractelor uscate din <i>Hyperici herba</i> și <i>Hyperici flores</i> determinată la administrare intragastrală șoarecilor	126
Tabelul 4.9. Toxicitatea acută a extractelor uscate din <i>Hyperici herba</i> și <i>Hyperici flores</i> la administrarea intraperitoneală șoarecilor	127
Tabelul 4.10. Determinarea toxicității acute la administrarea intragastrală a extractelor uscate din <i>Hyperici herba</i> și <i>Hyperici flores</i> șobolanilor	128
Tabelul 4.11. Clasa de toxicitate acută a extractelor uscate din <i>Hyperici herba</i> și <i>Hyperici flores</i> determinată la administrare intragastrală șobolanilor	129

LISTA FIGURILOR

Fig. 1.1. Caracteristicile macroscopice ale speciei <i>H. perforatum</i>	25
Fig. 1.2. Caracteristicile macroscopice ale speciei <i>H. elegans</i>	26
Fig. 1.3. Caracteristicile macroscopice ale speciei <i>H. hirsutum</i>	26
Fig. 1.4. Caracteristicile macroscopice ale speciei <i>H. tetrapterum</i>	27
Fig. 1.5. Caracteristicile macroscopice ale speciei <i>H. montanum</i>	27
Fig.1.6. Anatomia buzunarelor translucide și a canalelor secretoare din <i>H. perforatum</i>	29
Fig. 1.7. Buzunar translucid (A) și glandă neagră (B) în secțiunea transversală a frunzei ..	30
Fig. 1.8. Naftodiantronele	40
Fig. 2.1. Structuri secretoare ale frunzelor speciilor din genul <i>Hypericum</i>	47
Fig. 2.2. Structuri secretoare ale separelor speciilor din genul <i>Hypericum</i>	48
Fig. 2.3. Structuri secretoare ale petalelor speciilor din genul <i>Hypericum</i>	49
Fig. 2.4. Cromatograma pe strat subțire a extractelor hidroetanolicе din părțile aeriene a speciilor de <i>Hypericum</i>	52
Fig. 2.5. Cromatograma pe strat subțire a extractelor hidroetanolicе din părțile aeriene a speciei <i>H. perforatum</i> în diferite faze de vegetație și zone geografice	54
Fig. 2.6. Cromatogramele HPLC ale extractelor hidroetanolicе din patru specii ale genului <i>Hypericum</i>	55
Fig. 2.7. Cromatograma HPLC a soluției formate din amestecul de substanțe-standard	61
Fig. 2.8. Cromatograma HPLC a extractelor hidroetanolicе (70%) din părțile aeriene de <i>H. perforatum</i> , colectate din flora spontană (A) și din flora cultivată (B)	62
Fig. 2.9. Cromatogramele HPLC a substanțelor de referință: rutozidă (A), hiperozidă (B) și a extractului hidroalcoolic (80%) din <i>Hyperici flores</i> (C)	63
Fig. 3.1. Aparatul de extracție al uleiurilor volatile prin hidrodistilare	67
Fig. 3.2. Gaz-cromatograma uleiului volatil din părțile aeriene de <i>H. perforatum</i>	69
Fig. 3.3. Gaz-cromatograma uleiului volatil din părțile aeriene de <i>H. elegans</i>	69
Fig. 3.4. Gaz-cromatograma uleiului volatil din părțile aeriene de <i>H. tetrapterum</i>	70
Fig. 3.5. Gaz-cromatograma uleiului volatil din părțile aeriene de <i>H. hirsutum</i>	70
Fig. 3.6. Compușii chimici comuni ai uleiului volatil din părțile aeriene ale speciilor genului <i>Hypericum</i>	72
Fig. 3.7. Conținutul (%) comparativ al compușilor majori în uleiul volatil din <i>Hyperici herba</i>	74
Fig. 3.8. Gaz-cromatograma uleiului volatil din flori de <i>H. perforatum</i>	75
Fig. 3.9. Procesului tehnologic de obținere al extractelor uscate	76
Fig. 3.10. Schema de repercolare cu fracționarea produsului vegetal în părți egale cu ciclu neterminat	77
Fig. 3.11. Cromatograma pe strat subțire a soluțiilor extractive, obținute cu etanol de diverse concentrații, din primul rând de percolatoare.....	78
Fig. 3.12. Cromatograma pe strat subțire a soluțiilor extractive, obținute cu etanol de diverse concentrații, din al doilea rând de percolatoare	78
Fig. 3.13. Cromatograma pe strat subțire a soluțiilor extractive, obținute cu etanol de diverse concentrații, din al treilea rând de percolatoare	78

Fig. 3.14. Identificarea cromatografică a catehinelor în soluțiile hidroetanolicе cu soluție de vanilină de 1%	81
Fig. 3.15. Identificarea cromatografică pe strat subțire a catehinelor în soluțiile apoase ale extractelor uscate de <i>H. perforatum</i> cu soluție de FeCl ₃ de 1%	82
Fig. 3.16. Curba de calibrare a soluției-standard de acid galic	83
Fig. 3.17. Cromatograma HPLC a unui amestec din 5 substanțe standard din grupul flavonoidelor	87
Fig. 3.18. Cromatogramele HPLC ale extractelor uscate din <i>Hyperici herba</i> , obținute prin metoda de repercolare cu fracționarea produsului vegetal în părți egale cu ciclu neterminat	88
Fig. 3.19. Cromatogramele HPLC pentru analiza calitativă și cantitativă a unor flavonoide în extractele uscate, obținute din <i>Hyperici herba</i> prin metoda de macerare cu agitare	89
Fig. 3.20. Cromatogramele HPLC pentru analiza calitativă și cantitativă a unor flavonoide în extractele uscate, obținute din <i>Hyperici flores</i> prin metoda de macerare cu agitare.....	89
Fig. 3.21. Cromatogramele pe strat subțire în lumina UV (366 nm): durata unui ciclu de extracție de 60 de minute (A) și de 15 minute (B)	96
Fig. 3.22. Dependența absorbantei de concentrația extractului uscat obținut din <i>Hyperici herba</i>	98
Fig. 3.23. Dependența absorbantei de concentrația extractului uscat obținut din <i>Hyperici flores</i>	99
Fig. 3.24. Extractele uscate din flori (A) și din părți aeriene (B)	103
Fig. 3.25. Identificarea compușilor fenolici în extractele uscate din <i>Hyperici flores</i> și din <i>Hyperici herba</i> , păstrate la temperatura de +40 °C, 42 de luni	106
Fig. 4.1. Reacția DPPH• a radicalului liber cu un antioxidant (RH)	112
Fig. 4.2. Reacția de formare a cation-radicalului ABTS ^{•+}	113
Fig. 4.3. Curba de etalonare pentru Trolox la decolorarea cation-radicalului ABTS ^{•+}	114
Fig. 4.4. Administrarea soluțiilor de diclofenac de sodiu (A), extract uscat polifenolic (B), histamină (C)	117
Fig. 4.5. Lăbuțele posterioare ale șobolanului: sănătoasă (stânga), inflamată (dreapta); suprafața exterioară (A), suprafața plantară (B)	118

LISTA ABREVIERILOR

Abs	– absorbanta
ADP	– adenzindifosfat
AMDM	– Agenția Medicamentului și Dispozitivelor Medicale
AO	– acțiune antioxidantă
ATC	– <i>Acute Toxic Class Method</i>
CI	– 95% confidence interval means / intervalul de încredere 95%
CMI	– concentrația minimă de inhibiție
CMB	– concentrația minimă bactericidă
CMF	– concentrația minimă fungică
conc.	– concentrat
CSS	– cromatografie pe strat subțire
CȘM	– Centrul Științific al Medicamentului
CȘPDPM	– Centrul Științifico-Practic în Domeniul Plantelor Medicinale
DAN	– Documentația Analitică de Normare
DA	– dopamină
DMT	– doza maximă tolerată
DPPH	– difenilpicrilhidrazil
EDTA	– acid etilendiaminotetraacetic
FM	– faza mobilă
FR, ed. a X-a	– <i>Farmacopeea Română</i> , ediția a X-a
FS	– <i>Farmacopeea de Stat a Federației Ruse</i> , ediția a XIV-a
FST	– <i>forced swimming test</i> / test de înot forțat
g.	– genul
GABA	– acid gamma-aminobutiric
GC	– cromatografie de gaze
GC-MS	– cromatografie gazoasă-spectrometrie de masă
HPLC	– <i>high-performance liquid chromatography</i> / cromatografie de lichide de înaltă performanță
5-HT	– serotonină
IC ₅₀	– concentrația inhibitoare, 50%
IQR	– interquartile range / abaterea intercuartilă
LMA	– limitele maxime admisibile

$\bar{X}$	– valoarea medie
MAO	– monoaminooxidaza
Me	– mediana
MG	– metale grele
NE	– norepinefrină
NEU	– difenil-boriloxietilamină (reactiv)
OCDE	– Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică
PA	– părți aeriene
Ph. Eur.	– Pharmacopoeia Europaea/ <i>Farmacopeea Europeană</i>
PV	– produs vegetal
Rf	– factorul de retenție
RM	– Republica Moldova
rpm	– rotații per minut
RSD	– deviație-standard relativă
SD	– deviație-standard
SPSS	– Statistical Package for Social Sciences (programul de statistică)
TE	– trolox echivalent
tR	– timpul de retenție
TEAC	– <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> / capacitate antioxidantă, exprimată în trolox echivalent

INTRODUCERE

Actualitatea. Practica utilizării plantelor și preparatelor de origine vegetală pentru tratamentul diferitor afecțiuni datează din vremuri străvechi. Medicina tradițională implică utilizarea plantelor medicinale și este omniprezentă în țările în curs de dezvoltare; în timp ce, în țările dezvoltate, se utilizează pe larg în medicina complementară și cea alternativă, în baza medicamentelor de origine vegetală. Multiple cercetări științifice demonstrează eficacitatea medicinei complementare și a celei alternative în tratarea tulburărilor fizice și psihice. Așadar, plantele medicinale sunt obiectul de studiu al științelor farmaceutice contemporane. Fitopreparatele sunt produse farmaceutice cu o serie de avantaje: toxicitate redusă și eficiență sporită; gamă largă de acțiuni terapeutice; efect asupra tuturor organelor și sistemelor organismului; efecte secundare (adverse) reduse; cost relativ mai mic comparativ cu preparatele sintetice; posibilitatea de automedicație [1].

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”. Eficacitatea și indicațiile de utilizare a *H. perforatum* au fost bine documentate de către numeroși oameni de știință, începând cu Galenus, urmat de Dioscorides, Plinius, Hippocrates, Paracelsus, etc. Se regăsește între plantele lui Gerard (1597, botanist englez) și ale lui Whithering (1796). Gerard face referire la o alifie din *H. perforatum*, utilizată în tratarea rănilor. Dintre primele aplicații farmaceutice a *H. perforatum* în Europa (după secolul al XVI-lea), considerată cea mai eficientă a fost aplicația uleiului obținut prin distilare, folosită în terapia rănilor și a vânătăilor. *Hyperici oleum*, datorită eficienței sale, a fost inclus în prima farmacopee oficială din Londra. În prezent, această specie este introdusă în diverse farmacopei (*Farmacopeea Europeană*, *Farmacopeea Română*, *Farmacopeea Belarusă*, *Farmacopeea de Stat a Federației Ruse*); de asemenea, în *Cooperarea științifică europeană pentru fitoterapie* (ESCOP), în *Monografiile Organizației Mondiale a Sănătății (OMS)* și *Agenției Europene pentru Medicamente (EMA)* [2, 3].

H. perforatum este originară din Europa, dar pe larg răspândită în zonele temperate ale lumii: Europa, Asia, Australia, Africa de Nord, America de Nord și de Sud [4].

Mulți metaboliți secundari au fost identificați și determinați cantitativ în diferite părți ale plantei. Studiile chimice au identificat grupuri de compuși activi: naftodiantrone (hipericină, pseudohipericină, izohipericină și protohipericină); floroglucinoli (hiperforină, adhiperforină, furohiperforină). Flavonoidele cuprind grupul major de compuși biologic activi în *H. perforatum*. Compușii flavonoidici, identificați până în prezent, includ: flavonoli (kaempferol, cvercitol, miricetină); flavone (luteolină); heterozide flavonoidice (hiperozidă, izocvercetrozida, rutozidă);

biflavone (biapigenină, amentoflavonă); proantocianadine oligomerice. Uleiul volatil a fost determinat în concentrații de 0,05%-0,9% și constă, în special, din mono- și sesquiterpenoide. În afară de compușii chimici menționați, în produsele vegetale de *H. perforatum* se conțin taninuri (3-16%); xantone și acizi fenolici (cafeic, clorogenic și p-cumaric). În plus, sunt prezenți și alți compuși: acizi (nicotinic, miristic, palmitic și stearic), carotenoide, coline, pectine, hidrocarburi [4, 5, 6, 7, 8].

Studiile farmaceutice curente au pus în evidență efecte antidepresive, antioxidante, anticonvulsivante, analgezice, antiinflamatoare, citotoxice și antidiabetice ale compușilor chimici, identificați în *H. perforatum* [8].

În literatura de specialitate, sunt atestate date relevante despre activitatea antibacteriană a compușilor chimici din grupul flavonoidelor versus bacterii gram-pozitive și gram-negative. Sursele bibliografice oferă date privind mecanismul de acțiune a doi compuși principali: kaempferolul și cvercetolul. S-a demonstrat faptul, că cvercetolul crește permeabilitatea membranei citoplasmice a *Streptococcus pyogenes*, ceea ce are o influență inhibitoare asupra acestei bacterii gram-pozitive. A fost observat efectul sinergic al cvercetolului cu antibioticul ceftazidim [9]. Extractele polifenolice din *H. perforatum*, obținute cu diverși solvenți, au demonstrat activitate antibacteriană în raport cu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231 și cu *Candida krusei* ATCC 4243 [10].

Uleiul volatil din specia *H. perforatum* posedă proprietăți antibacteriene care vizează: *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas tolaasii*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, iar activitate antifungică către: *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma viride* [11].

Efectul antidepresiv se datorează celor doi compuși chimici, prezenți în extractele de *H. perforatum*, hipericina și hiperforina, cu o posibilă implicare a altor compuși chimici, cum ar fi flavonoidele, bioflavonoidele, xantonele, proantocianidinele. Numeroase studii clinice au demonstrat eficacitatea extractelor hidroetanolice din părțile aeriene de *H. perforatum*, în reducerea depresiei ușoare. Preparatele din sunătoare produc mai puține efecte adverse, în comparație cu cele sintetice. Efectul antidepresiv al *Hyperici herba* este dovedit experimental pe animale și este demonstrat, că acesta se datorează conținutului de hiperforină, hipericină și de pseudohipericină, care interacționează cu receptorii serotoninergici, noradrenergici, dopaminergici, acidul gamma-aminobutiric (GABA), care inhibă activitatea enzimelor:

monoaminooxidazei (MAO) și a catecol-O-metil transferazei (COMT), cresc numărul sau densitatea receptorilor 5HT2 în cortexul frontal al creierului, manifestându-se benefic în tratarea depresiei [12].

Speciile g. *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, antidepresive, antiinflamatoare, antioxidante, diuretice, antivirale, anticanceroase); interacțiune a compușilor chimici cu preparate sintetice; toxicitate [5, 7, 8, 9, 10, 11].

În flora spontană a RM sunt atestate 5 specii ale g. *Hypericum*: *H. perforatum* L. – specie frecventă, dar cu tendințe de reducere a arealului, crește în abundență în grupuri difuze; *H. elegans* Steph. – specie spontan întâlnită prin poiene și liziere; *H. hirsutum* L. – rareori se întâlnește în plantațiile silvice și în tufărișuri, formează grupuri mici; *H. tetrapterum* Fries. – specie critic periclitată, crește difuz, este ocrotită de stat; *H. montanum* L. – crește în grupuri mici, este ocrotită de stat. Specia *H. perforatum* a fost introdusă în anul 2007, în colecția Centrului Științifico-Practic în Domeniul Plantelor Medicinale a USMF „Nicolae Testemițanu” (CȘPDPM) [6].

Cea mai utilizată specie din g. *Hypericum* în medicina RM este *H. perforatum*. Părțile aeriene de sunătoare sunt utilizate pe larg ca remediu astringent, antibacterian, stomahic și antiinflamator. În rețelele farmaceutice sortimentul de produse fitoterapeutice autorizate cu conținut de produs vegetal sau extracte nu este mare, de asemenea, nu sunt produse fitoterapeutice de origine autohtonă [13].

Reieșind din cele menționate, *H. perforatum* este o plantă cu un conținut bogat de compuși biologic activi și cu un spectru larg de proprietăți biologice.

În pofida acestui fapt, planta este limitat valorificată în aspect medical și de industria farmaceutică din RM. Până în prezent, nu sunt standardizate produsele vegetale și cele extractive din *H. perforatum*, de origine autohtonă, care ulterior ar putea servi drept surse în elaborarea de noi forme farmaceutice. Subiectul valorificării produselor extractive (ulei volatil, extracte uscate cu conținut polifenolic), obținute din produsele vegetale de *H. perforatum* este destul de actual în dezvoltarea farmaceuticii autohtone (aspecte teoretice și practice), ceea ce constituie argumentul forte în realizarea acestei lucrări.

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 RM.

2. Studiul chimic comparativ al speciilor genului *Hypericum* în vederea identificării produsului vegetal cu conținut maxim conținut de compuși fenolici.
3. Izolarea și analiza chimică a uleiului volatil, obținut din produsele vegetale ale speciilor g. *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 extractul 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, 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 g. *Hypericum* în habitatul natural din RM s-a realizat după caracteristicile macroscopice și microscopice, elucidate în sursele bibliografice.

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. X-a.

Identificarea și determinarea cantitativă a compușilor chimici, în produsele vegetale și în cele 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 ciclu neterminat și macerare fracționată cu agitare.

Termenul de valabilitate al extractelor uscate a fost stabilit prin păstrare în timp real, în condiții obișnuite 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[•] și ABTS^{•+}.

Activitatea antibacteriană și antifungică ale uleiului volatil și extractelor uscate, obținute din produsele vegetale de *H. perforatum*, au fost testate prin utilizarea metodei diluărilor în serie, în mediul nutritiv lichid: bulion peptonat din carne de 2%, la pH-ul 7,0. Testul a fost efectuat pe culturi de microorganisme gram-pozitive, gram-negative și pe 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 labeli 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).

Cercetările preclinice și 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, obținute în urma analizei cantitative a produselor vegetale și extractelor uscate, au fost supuse analizei statistice descriptive, ca rezultat au fost obținuți următorii parametri statistici: media ($\bar{X}$), 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, potrivit pentru date ce nu au distribuție normală sau pentru numărul unităților statistice relativ mic. 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 g. *Hypericum* (*H. perforatum* L., *H. elegans* Steph., *H. hirsutum* L., *H. tetrapterum* Fries.) din flora spontană a RM, care a permis identificarea produsului vegetal cu conținut maxim 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-a 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 și identificarea speciei cu cel mai înalt conținut de flavonoide (*H.*

perforatum); în vederea elaborării Documentelor Analitice de Normare a calității pentru produsul vegetal *Hyperici perforati flores* și a extractului uscat – o condiție obligatorie pentru elaborarea de noi produse fitofarmaceutice cu activități: 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 în cele extractive; studiul proprietăților antibacteriene, antifungice, antioxidante și antiinflamatoare ale extractelor uscate, obținute din *Hypericum perforatum*.

Valoarea aplicativă. Rezultatele vor contribui în 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 acțiune antioxidantă, antibacteriană și antiinflamatoare.

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

Aprobarea rezultatelor. Rezultatele studiului au fost relatate la diverse foruri naționale și internaționale:

- 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;
- 4th International Medical Congress for Students and Young Doctors MedEspera, USMF „Nicolae Testemitanu”, 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, RM, 11 noiembrie 2016;
- XXIIIth 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 (PSE) 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: monoautor – 4, în materialele comunicărilor științifice naționale – 8; în materialele comunicărilor științifice internaționale – 2; de asemenea, 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 au fost 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 139 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.

Capitolul 1. Caracteristica generală a speciilor genului *Hypericum* L. În acest capitol sunt sintetizate date bibliografice referitoare la: răspândirea speciilor, care aparțin g. *Hypericum* în toată lumea, inclusiv în RM; caracteristicile de diferențiere morfologică ale speciilor de

Hypericum, similare celor din flora RM (*H. perforatum* L., *H. elegans* Steph., *H. hirsutum* L., *H. tetrapterum* Fries.) și anatomică după formă, culoare, tip și localizare a structurilor secretoare. De asemenea, sunt descrise rezultatele studiilor fitochimice ale speciilor din g. *Hypericum*, realizate prin diferite metode fizico-chimice moderne. Datele analizate denotă diversitatea conținutului chimic al metaboliților secundari, prezenți în diverse părți ale plantelor din g. *Hypericum*. Sunt menționate rezultatele analizelor chimice, efectuate per specia *H. perforatum*, unică regăsită în diverse farmacopei, în comparație cu alte specii din g. *Hypericum*, cu grupuri identice de compuși chimici, cu proprietăți farmacologice demonstrate experimental *in vitro* și *in vivo*. Sunt relatate date bibliografice referitoare la utilizarea produselor extractive, obținute din produsele vegetale de *H. perforatum*, utilizate în medicină drept ingrediente în diverse forme farmaceutice, cu proprietăți antibacteriene, antiinflamatoare, antidepresive, cicatrizante etc.

Capitolul 2. Analiza chimică a produselor vegetale din speciile genului *Hypericum* L.

Acest capitol reprezintă o incursiune în metodologia și în *design*-ul cercetării produselor vegetale a 4 specii de *Hypericum*: *H. perforatum*, *H. elegans*, *H. hirsutum*, *H. tetrapterum*, colectate din flora RM. Este descris procesul de obținere a produselor vegetale (părți aeriene, flori, frunze, tulpini) din 4 specii de *Hypericum*, colectate din flora spontană a RM și din colecția CȘPDPM USMF „Nicolae Testemițanu”. Sunt descrise metodele și rezultatele analizei calitative a produselor vegetale, realizate prin reacții de culoare și de sedimentare, cromatografie pe strat subțire (CSS), cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC). Sunt elucidate metodele spectrofotometrice UV-VIS de dozare a totalului de flavonoide, derivați de antracen și a totalului de polifenoli în produsele vegetale a 4 specii de *Hypericum*, supuse studiului. Prin HPLC, în premieră, s-a efectuat identificarea și dozarea comparativă a derivaților de flavonol (rutozidă, hiperozidă, cvercetrozidă, cverceto) și a biflavonei (I3,I8-biapigenină), în părțile aeriene de *H. perforatum*, colectate din flora spontană a RM și din colecția CȘPDPM.

Capitolul 3. Obținerea și studiul chimic al produselor extractive din specia *Hypericum perforatum*. Capitolul cuprinde informații relevante despre metoda de extragere și despre studiul chimic al uleiului volatil, obținut din produsele vegetale a 4 specii de *Hypericum*, realizat prin GC-SM. Sunt descrise metodele de obținere a extractelor uscate din *Hyperici herba* și *Hyperici flores*, produsele vegetale a speciei *H. perforatum*; parametrii optimizați în metoda de macerare fracționată cu agitare. De asemenea, sunt descrise metodele de identificare a compușilor chimici în extractele uscate analizate; metodele și rezultatele dozării spectrofotometrice UV-VIS a totalului de flavonoide, polifenoli și de derivați de antracen; rezultatele determinării cantitative a flavonoidelor, prin tehnica HPLC: rutozidă, hiperozidă, cvercetrozidă, cverceto și I3,I8-

biapigenină, în extractele uscate obținute din *H. perforatum* (produse vegetale colectate din flora spontană a RM și din colecția CȘPDPM). Sunt elucidate rezultatele determinării gradului de extracție a compușilor fenolici cu etanol în concentrații de 40%-90%. Este validată metoda spectrofotometrică UV-VIS de dozare a totalului de flavonoide și este relevată standardizarea extractelor, obținute din părți aeriene și din flori de *H. perforatum*, însoțită de determinarea stabilității acestora.

Capitolul 4. Cercetările farmacologice referitoare la extractele uscate și la uleiul volatil din *H. perforatum* L. Este prezentată activitatea antioxidantă a extractelor polifenolice din *Hyperici herba* și din *Hyperici flores*, determinată prin 2 metode (DPPH[•], ABTS^{•+}.) și capacitatea de chelare a fierului. Este elucidată activitatea antimicrobiană a uleiului volatil din *Hyperici herba* și a extractelor uscate, obținute din părțile aeriene și din flori, efectuată prin metoda diluărilor în serie în mediul nutritiv lichid: bulion peptonat din carne de 2%, pH-ul 7,0. Culturile de microorganisme investigate au fost gram-pozitive: *Staphylococcus aureus* 209-P, *Enterococcus faecalis* ATCC 25922 și gram-negative: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* HX 19222, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Proprietatea antifungică a uleiului volatil a fost cercetată pe tulpini de: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* și *Penicillium*.

Este demonstrată acțiunea antiinflamatoare a extractelor din produsele vegetale *Hyperici herba* și *Hyperici flores* (colectate din flora spontană a RM și din colecția CȘPDPM), cu prezentarea metodologiei (modelarea cu histamină a edemului labuței posterioare la șobolani). Sunt relevate rezultatele determinării gradului de toxicitate acută, prin administrarea intraperitoneală și intragastrală a extractelor uscate (dizolvate în ser fiziologic), la șoareci și la șobolani.

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

1.1. Încadrarea sistematică a genului *Hypericum*

După Ehrendorfer F. (1991), genul *Hypericum* se încadrează în următorul sistem, prezentat în tabelul 1.1 [14].

Tabelul 1.1. Încadrarea sistematică a genului *Hypericum*

Încadrarea sistematică	Denumirea în limba latină
Regnul	<i>Plantae</i>
Subregnul	<i>Cormobionta</i>
Încrângătura	<i>Magnoliophyta (Angiospermae)</i>
Clasa	<i>Magnoliopsida</i>
Subclasa	<i>Dilleniidae</i>
Ordinul	<i>Theales</i>
Familia	<i>Hypericaceae</i>
Genul	<i>Hypericum</i> L.

Ordinul *Theiales* cuprinde cca 98 de genuri, cu peste 2000 de specii, răspândite preponderent în zonele tropicale și în cele subtropicale. Formele vitale sunt arbori, arbuști și plante erbacee. Ordinul cuprinde 3 familii: Theaceae, Actinidiaceae, Hypericaceae. În RM este atestat 1 gen (*Hypericum* L.) cu 5 specii (*H. perforatum* L., *H. elegans* Steph., *H. hirsutum* L., *H. tetrapterum* Fries., *H. montanum* L.) [15, 16, 17].

Familia *Hypericaceae* cuprinde 9 genuri și circa 500 de specii răspândite în zone tropicale și în cele subtropicale. Include plante erbacee multianuale sau anuale, arbuști, subarbuști. Frunzele dispuse opus sau verticilat cu marginea întreagă fără stipule, cu pungi schizogene, cu conținut colorat sau incolor și canale secretoare. Florile sunt bisexuate, actinomorfe, rar solitare sau grupate în inflorescențe cimoase. Sepalele, în număr de (2) 4-5 (6), se păstrează la fructe; petalele galbene sau roșietice în număr 4-5 (10). Androceul cu stamine numeroase, reunite în 3-5 fascicule sau rar neconcrucate. Gineceul compus din (2) 3-5 carpele, cu ovar superior (1) 3-5 locular. Fructul – capsulă, rar bacă sau drupă [15, 16, 18].

Genul *Hypericum* include aproximativ 484 de specii divizate în 36 secțiuni taxonomice, răspândite la nivel mondial în regiunile temperate, tropicale, subtropicale și în cele montane, cu excepția Antarcticii. Vegetează prin poiene, lunci umede, pe malul lacurilor și râurilor, pe marginea drumurilor, pe stâncării, tufărișuri. Sunt plante erbacee, arbuști, subarbuști, cu frunze întregi fără stipule, cu pungi secretoare negre sau transparente [16].

Caracteristici. Florile în dichazii, dispuse în inflorescențe paniculate sau corimbiforme. Flori din 5 sepale libere sau concrescute la bază, 5 petale libere [15, 18, 19]. Speciile g. *Hypericum* L. din flora Europei sunt prezentate în tabelul 1.2 [18, 20].

Tabelul 1.2. Speciile genului *Hypericum* din flora europeană

Secții	Specii	Răspândirea și habitatul
1. Ascyreia Choisy	<i>H. calycinum</i> L.	Balcani, Turcia. Se cultivă în parcuri și livezi.
2. Hypericum	<i>*H. perforatum</i> L.	Caucaz, Siberia de Vest și Est, Orientul Îndepărtat, Asia Mijlocie și Mică, Scandinavia, Europa Centrală și de Vest, Zona mediteraneană, Iran, Africa, America, Australia. Specie comună pe întreg teritoriul RM. Vegetează prin poiene și liziere, prin fânețe, livezi, ogoare neîngrijite, pe marginea drumurilor.
	<i>*H. tetrapterum</i> Fries.	Caucaz, Scandinavia (sud), Europa de Vest, Zona mediteraneană, Asia Mică, Iran. Vegetează prin poiene, tufărișuri, în pădurile de foioase, pe malurile râurilor, pâraielor. În RM, specie critic periclitată, ocrotită de stat, crește difuz din abundență.
	<i>H. maculatum</i> Cranz.	Scandinavia, Europa Centrală și de Vest, Zona mediteraneană. Vegetează prin poiene și liziere, câmpii, tufărișuri, în pădurile de conifere și mixte.
	<i>*H. elegans</i> Steph.	Caucaz, Siberia de Vest și Est, Balcani, Asia Mică, Carpați, RM. Vegetează prin poiene și liziere, pe pante înierbate, pe stâncării, tufărișuri.
3. Drosocarpium Spash.	<i>H. alpigenum</i> Kit.	Europa Centrală, Zona mediteraneană, Balcani, Carpați. Vegetează pe pajiști montane.
	<i>H. montbretii</i> Spach.	Caucaz, Balcani, Asia Mică. Crește pe pante pietroase, prin poiene și liziere.
4. Oligostema (Boiss.) Stef.	<i>H. humifusum</i> L.	Scandinavia (sud), Europa Centrală și de Vest, Zona mediteraneană, Balcani (nord). Vegetează pe pajiști umede, câmpii, poiene.
5. Hirtella Stef.	<i>H. hyssopifolium</i> Chaix.	Caucaz, Zona mediteraneană. Crește pe aflorimente de calcar, pante pietroase.
	<i>H. lydiu</i> Boiss.	Turcia, Asia Mică, Caucaz. Crește pe pante pietroase, de calcar și pietriș.
	<i>H. apiculatum</i> (N. Robson) Sennik.	Caucaz, Asia Mijlocie, Iran. Crește pe aflorimente de calcar, pante pietroase, pietriș.
	<i>H. elongatum</i> Ledeb.	Caucaz, Siberia de Vest, Asia Mijlocie, Iran. Crește pe pante pietroase, uscate.
6. Taeniocarpium Jaub. et Spash.	<i>H. tauricum</i> R. Keller	Balcani. Crește pe pante pietroase.
	<i>*H. hirsutum</i> L.	Caucaz, Siberia de Vest și Est, Orientul Îndepărtat, Asia Mijlocie, Scandinavia, Europa Centrală și de Vest, Balcani, Iran. Vegetează prin poiene, tufărișuri, în păduri de foioase, rareori se întâlnește în păduri mixte, plantații silvice. În RM formează grupuri mici.
7. Adenosepalum Spach.	<i>*H. montanum</i> L.	Caucaz, Europa Centrală și de Vest, Scandinavia, Zona mediteraneană. Vegetează prin poiene și liziere, tufărișuri, în păduri de foioase. În RM este specie puțin studiată, ocrotită de stat.

Notă: * Speciile g. *Hypericum* L. din flora RM

1.2. Caracteristicile macro- și microscopice ale speciilor genului *Hypericum*

În flora spontană a RM, vegetează 5 specii de *Hypericum* [16, 17, 20]: *H. perforatum* L. (pojarniță, sunătoare perforată) – specie frecventă, dar cu tendințe de reducere a arealului, crește din abundență în grupuri difuze; *H. elegans* (pojarniță, sunătoare elegantă) – specie spontan întâlnită prin poiene și liziere; *H. hirsutum* (pojarniță, sunătoare hirsută) – rareori întâlnită pe plantațiile silvice și tufărișuri, care formează grupuri mici; *H. tetrapterum* (sovârvăriță, pojarniță tetrapteră) – specie critic periclitată, crește difuz, ocrotită de stat; *H. montanum* (pojarniță de munte, sunătoare montană) – crește în grupuri mici, ocrotită de stat [15].

În *Farmacopeea Europeană*, ed. 10, Vol. 1 (2019) și în *Farmacopeea Română*, ed. a X-a (1993), pentru obținerea produsului vegetal *Hyperici herba*, este admisă specia *Hypericum perforatum*. Însă oamenii, din lipsă de experiență, deseori colectează și alte specii ale g. *Hypericum*, care diferă prin anumite caracteristici morfologice și anatomice ale organelor vegetative.

1.2.1. Caracteristica morfologică a speciilor genului *Hypericum*

Caractere macroscopice ale speciei *H. perforatum*. Tulpina glabră, cilindrică, cu două coaste longitudinale. Frunzele ovat-alungite, sesile, obtuze, glabre; cu numeroase pungi secretoare transparente (dispuse pe toată suprafața limbului) și glande negre (situate pe marginea și vârful frunzei). Florile grupate în inflorescențe paniculat corimbifere; corola din sepale îngust-lanceolate, neciliate, cu glande negre rare. Caliciul din petale în număr de 5, de culoare oranj-gălbui, de două ori mai lungi ca sepalele, cu puncte negre (fig. 1.1) [16, 17, 21, 22].

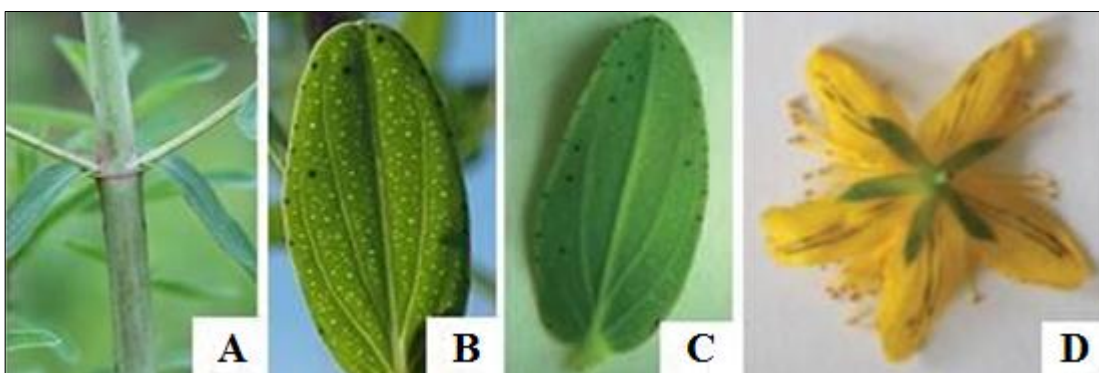


Fig. 1.1. Caracteristicile macroscopice ale speciei *H. perforatum*: tulpină (a), frunză (partea superioară) (b), frunză (partea inferioară) (c), floare (d) [21, 22]

Caractere morfologice ale speciei *H. elegans*. Tulpina glabră, negru-punctată, în jumătatea superioară bimuchiata, muchiile nearipate. Frunzele de 1-4 cm lungime, alungit-lanceolate, semiamplexicaule, cu glande negre și pungi transparente, al căror număr este mai mic,

comparativ cu *H. perforatum*. Florile grupate în inflorescență paniculat-piramidală. Sepalele ovat-lanceolate, ciliate cu glande negre. Corola din petale ovat-lanceolate, galbene cu glande negre pe margine (fig. 1.2) [16, 17, 22].

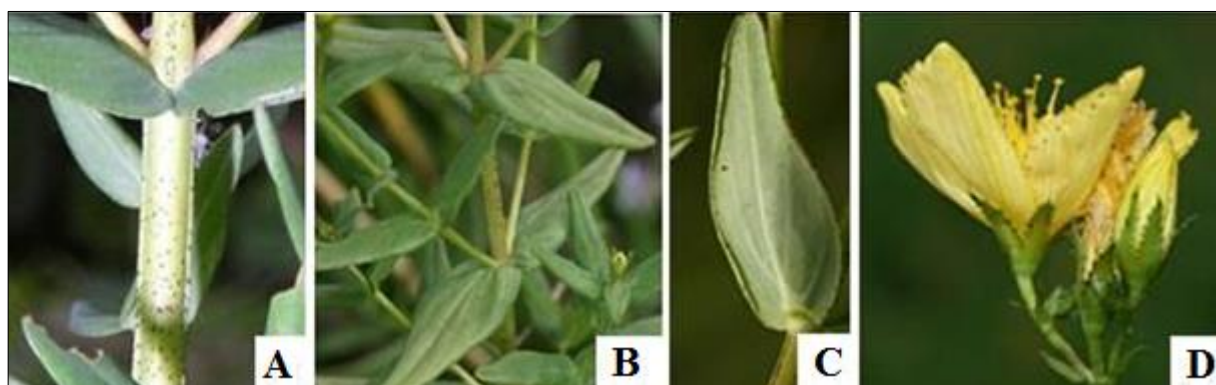


Fig. 1.2. Caracteristicile macroscopice ale speciei *H. elegans*: tulpină (a), frunză (partea superioară) (b), frunză (partea inferioară) (c), floare (d) [https://botany.cz/cs/hypericum-elegans/]

Caractere morfologice ale speciei *H. hirsutum*. Tulpina cilindrică, nearipată, pubescentă. Frunzele oval-alungite, în partea de sus, dens acoperite cu peri moi, proeminente, obtuze, cu pungi transparente, glandele negre lipsesc. Florile grupate în inflorescențe alungit-paniculate; petalele de culoare galben-aurie, pe margini cu puține glande negre; sepalele inegale, îngust lanceolate, pe margine dințate, la vârful cărora sunt glande negre globuloase (fig. 1.3) [17, 18].

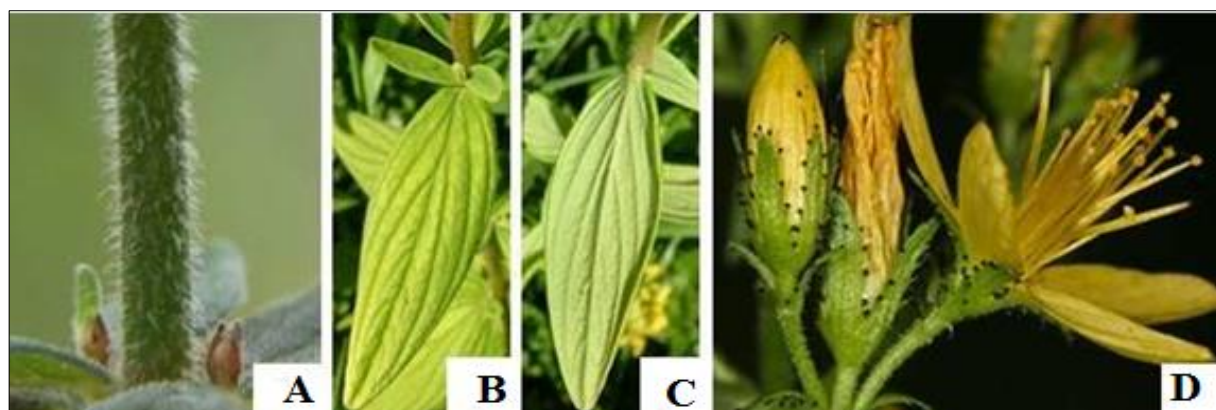


Fig. 1.3. Caracteristicile macroscopice ale speciei *H. hirsutum*: tulpină (a), frunză (partea superioară) (b), frunză (partea inferioară) (c), floare (d) [https://botany.cz/cs/hypericum-hirsutum/]

Caractere morfologice ale speciei *H. tetrapterum*. Tulpina 4-muchiată, muchiile îngust aripate. Frunzele eliptice sau alungit-ovale, obtuze, cu numeroase pungi translucide. Florile grupate în inflorescență paniculat-corimbiferă; bracteele și sepalele lanceolate, acute, fără cili, cu glande negre; petalele de două ori mai lungi decât sepalele, de culoare galben deschis, cu glande negre (fig. 1.4) [17, 18].

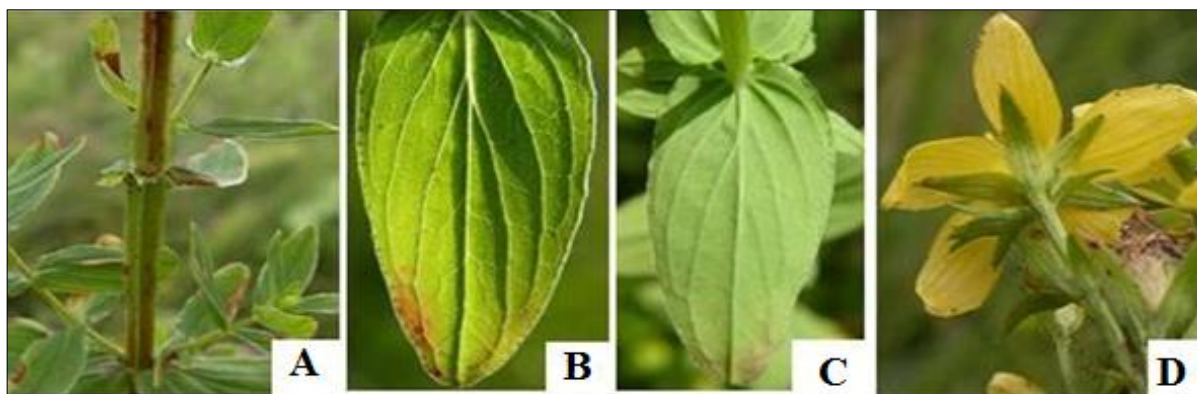


Fig. 1.4. Caracteristicile macroscopice ale speciei *H. tetrapterum*: tulpină (a), frunză (partea superioară) (b), frunză (partea inferioară) (c), floare (d), [https://botany.cz/cs/hypericum-tetrapterum/]

Caractere morfologice ale speciei *H. montanum*. Tulpina fără 2 linii longitudinale proeminente și fără puncte negre. Frunzele de 2-5 cm lungime, oval-alungite sau ovale, obtuze sau acute, cu bază slab amplexicaulă, cu fața inferioară alb-cenușie, din cauza pubescenței fine, pe margine negru punctate. Florile cu inflorescență racemoasă, scurtă, cu densitate redusă; pete de culoare galben pal; sepelele pe margini dințate, aici se găsesc și glande negre (fig. 1.5) [17, 18].

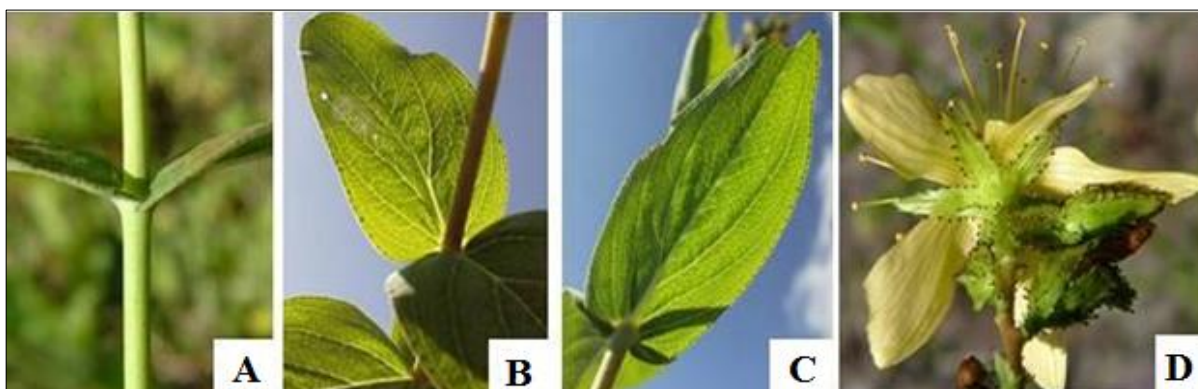


Fig. 1.5. Caracteristicile macroscopice ale speciei *H. montanum*: tulpină (a), frunză (partea superioară) (b), frunză (partea inferioară) (c), floare (d) [https://botany.cz/cs/hypericum-montanum/]

1.2.2. Particularitățile anatomice ale speciilor genului Hypericum

În ultimul timp, a crescut interesul față de reprezentanții g. *Hypericum*, deoarece sunt surse de o mare varietate de compuși biologic activi. Sinteza și acumularea acestora, în special a hipericinei, hiperforinei, uleiului volatil, se desfășoară în structurile secretoare, cunoscute ca noduli negri, glande translucide, canale secretoare. Varietatea structurilor secretoare interne a fost folosită în clasificarea subgenerică. Această diversitate fitochimică a fost cercetată în studii taxonomice și morfologice [23]. Conform datelor bibliografice, nu toate structurile sunt prezente

în speciile de *Hypericum*, prezența și/sau frecvența variind între organele vegetative și cele reproductive. Cercetările recente sunt bazate pe studiul structurilor secretoare și mai puțin pe cele anatomice ale organelor vegetative [23]. În ultimul timp, tot mai multe cercetări au drept scop identificarea noilor caracteristici microscopice de diferențiere a speciilor g. *Hypericum* și completarea cunoștințelor referitoare la structurile secretoare [24, 25, 26, 27, 28].

Caracteristicile microscopice ale speciei *H. perforatum*. În monografia *Hyperici herba* din Farmacopeea Europeană, ed. 10 (2019) și din Farmacopeea Română, ed. X (1993), sunt prezentate caracteristicile microscopice ale frunzei de *H. perforatum*, care sunt incomplete.

Actualmente, sursele bibliografice prezintă informații referitoare la structurile anatomice și la cele secretoare, pentru toate organele vegetative ale speciei *H. perforatum*. Cunoștințele date pot evita colectarea produselor vegetale din alte specii ale g. *Hypericum* [21, 22].

Secțiunea transversală, prin tulpină, are o formă ușor eliptică cu 2 coaste mici, opuse. Epiderma unistratificată, la exterior acoperită cu cuticulă, este urmată de 3 rânduri de colenchim. Scoarța primară este alcătuită din celule parenchimatic, cu pereți nelignificați sau obliterate, în cazul tulpinilor mai bătrâne. Endoderma este formată dintr-un strat de celule lungi, aplatizate. Scoarța primară este delimitată de un cilindru, cu un periciclu unistratificat. Floemul este format din 2-3 rânduri de celule, urmat de cambiu și apoi de xilemul, secundar și primar. Măduva alcătuită din celulele parenchimatic, ocupă a treia parte din tulpină [25, 27].

Kurkin V. *et al.* (2009) au studiat caracteristicile microscopice de diferențiere a frunzei speciei *H. perforatum*, în comparație cu *H. elegans*, *H. hirsutum*, *H. maculatum* Crantz. Celulele epidermei superioare a frunzei sunt cu pereți sinuoși, îngroșați moniliform pronunțat. Pereții epidermei inferioare sunt mai sinuoși, cu multe stomate de tip anomocitic, înconjurate cu 3-4 celule. Dat fiind faptul că mezofilul frunzelor are o structură bifacială, sub epiderma superioară, alcătuită dintr-un strat de celule, se găsește parenchimul palisadic, format, la rândul său, din 1-2 straturi de celule. În continuarea acestuia, spre partea epidermei inferioare, urmează țesutul lacunar. În jurul fasciculelor conducătoare, se găsește colenchimul [27]. În mezofilul frunzei se întâlnesc următoarele tipuri de structuri secretoare: glande negre, punji transparente, canale secretoare de tip A și de tip B [21, 22, 25].

Celulele epidermei petalei sunt cu pereți ondulați și uneori drepti la bază și de-a lungul marginii; sunt alungite, au pereții celulari îngroșați și conțin incluziuni verzui de formă rotunjită și neregulată [29]. Mezofilul petalelor este format din mai multe straturi de celule compact aranjate [27]. Pe suprafața sepalilor se pot observa celulele epidermei cu pereți sinuoși și, mai aproape de bază, uneori pe laturi, cu pereți drepti și cu îngroșare moniliformă [29].

Structurile secretoare de pe petale și sepal sunt numite de către cercetători în mod diferit:

Kurkin V. *et al.* (2009) le numește pungi pigmentate și translucide, Ciccarelli D. *et al.* (2001) se referă la buzunare translucide, glande negre și la 3 tipuri de canale secretoare [21, 24], Curtis J.D. și Lersten N.R. (1990) au oferit date cu privire la noduli negri și la cavități tubulare (incolore și negre) [28].

Studiul efectuat de Ciccarelli D. *et al.* (2001) relatează prezența de structuri secretoare, localizate în organele florale și vegetative ale speciei *H. perforatum*: glande negre, pungi transparente și canale secretoare [24, 28].

Pungile transparente sau „buzunarele” glandulare sunt localizate subepidermal, au formă sferică sau ovală, constau dintr-o cavitate delimitată cu 2 straturi de celule. Stratul intern – din celule aplatizate cu pereți groși, iar cel extern – din celule parenchimatoase cu pereți groși (fig 1.6. A, B; fig. 1.7. A). Canalele secretoare de tip A au lumenul îngust, mărginit de 4 celule poligonale și sunt situate în toate compartimentele florilor (excepție fac staminele), pe frunze, în tulpini (în colenchim și în floem) și în rădăcini (fig. 1.6 C, D, H). Canalele secretoare de tip B sunt cu lumenul larg. Stratul intern este constituit din celule aplatizate, cu pereți subțiri, iar cel extern – din celule parenchimatoase, cu pereți groși. În secțiunea transversală, au aceeași structură similar glandelor translucide, localizate în tulpină. Sunt prezente în petale (fig 1.6 E, F), sepale și în tulpină canale secretoare de tip C, care au lumenul larg, mărginit cu unul sau mai multe straturi de celule cu pereți subțiri și cu unul sau mai multe straturi de celule parenchimatoase. Sunt prezente numai în gineceu [24].

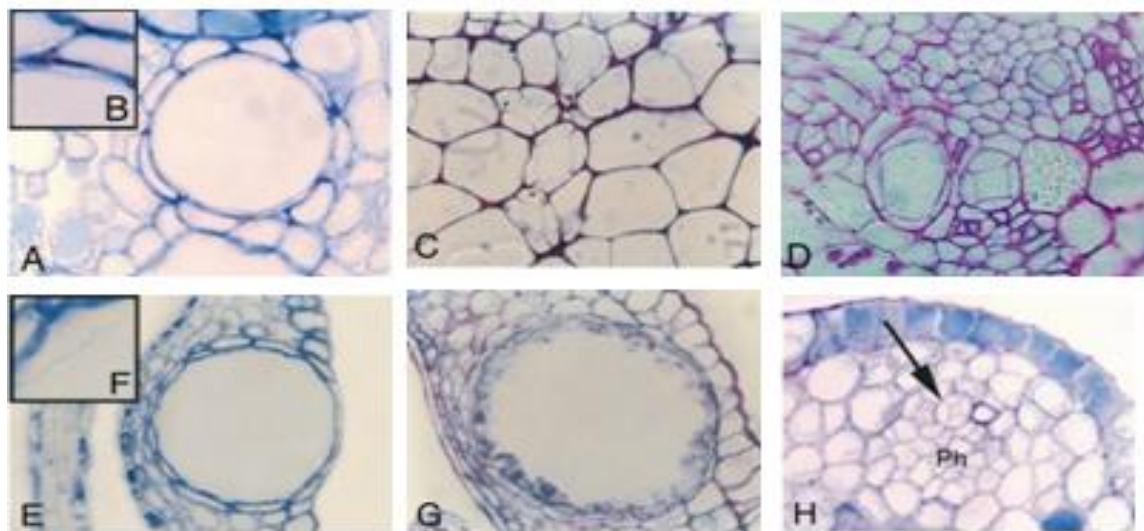


Fig. 1.6. Anatomia buzunarelor translucide și a canalelor secretoare din *H. perforatum*: buzunar translucidă în sepală (A); structura buzunarului translucid, (delimitat cu două straturi de celule (B); canale de tip A în rădăcină (C); canale de tip A în pistil (D); canale de tip B în petală (E); structura detaliată a canalului de tip B (F); canal de tip C în pistil (G); canal de tip A în petală (H) [24]

Glandele negre din toate organele plantei au aceeași modalitate de dezvoltare. În stadiul incipient ele arată ca un mic grup de celule de formă poligonală, iar la maturitate constituie un grup de celule de formă neregulată, mai mari decât cele din jur (fig. 1.7 B) [28].

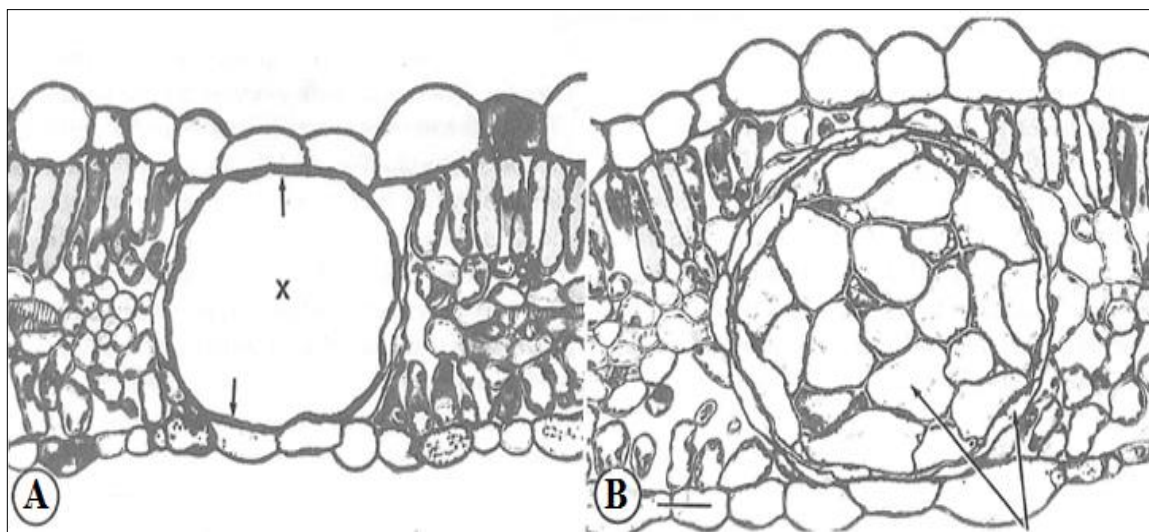
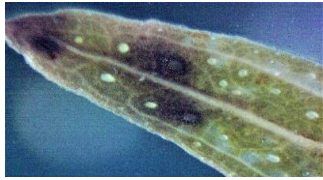
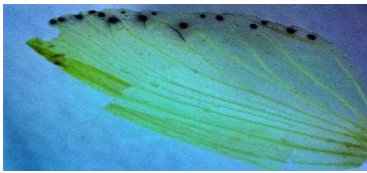


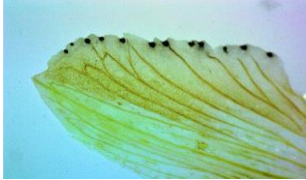
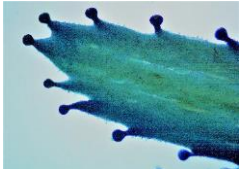
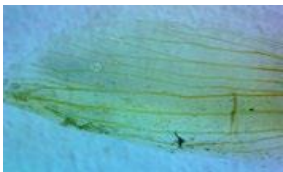
Figura 1.7. Buzunar translucid (A) și glandă neagră (B) în secțiunea transversală a frunzei

Glandele negre conțin un pigment violet-roșietic (antracenderivați), iar pungile transparente sunt cu un conținut incolor (terpenoide) [21, 22, 25, 30].

Tipul și localizarea structurilor secretoare prezente în elementele florale la 5 specii ale g. *Hypericum* sunt prezentate în tabelul 1.3 [31, 32].

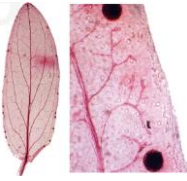
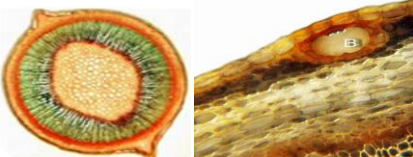
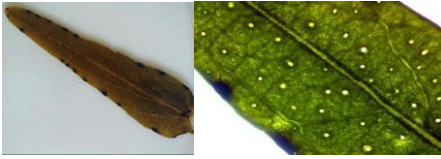
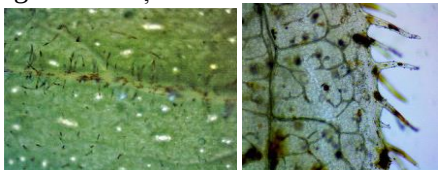
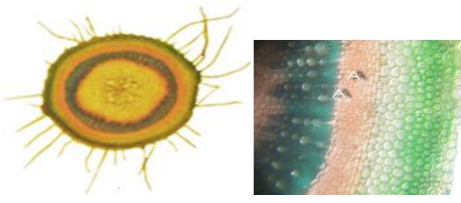
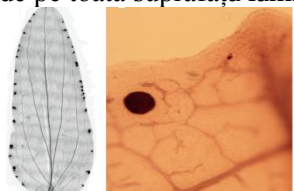
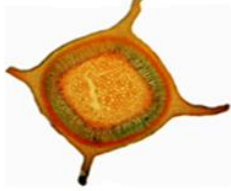
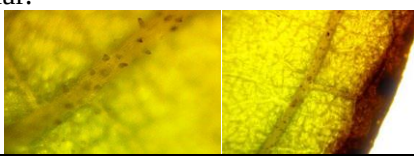
Tabelul 1.3. Structurile secretoare în elementele florale la 5 specii ale genului *Hypericum*

Speciile	Elementele florale			
	Sepale	Petale	Stamine	Pistil
<i>H. perforatum</i>	Predominant de-a lungul marginilor buzunare translucide; canale secretoare între nervuri; rar se găsesc, glande negre, globuloase, ovale sau alungite, care alternează cu nervurile. 	Buzunare translucide distribuite predominant pe vârfuri și de-a lungul marginilor; canalele secretoare distribuite între nervuri; glandele negre, sferice și alungite distribuite predominant pe vârfuri și de-a lungul marginilor, glandele alungite se află între nervuri. 	Fiecare anteră are o glandă sferică neagră. 	Sunt glande negre.

Speciile	Elementele florale			
	Sepale	Petale	Stamine	Pistil
<i>H. elegans</i>	Glande pigmentate de-a lungul marginilor, pe piciorușe lungi; numeroase buzunare translucide între nervuri și glande negre, oval-convexe, rare.	Glande negre, rotunjite, pe marginea petalelor, lipsesc pe suprafață. 		
<i>H. hirsutum</i>	Buzunare translucide și canale secretoare distribuite între nervuri; glande negre, sferice și pedunculate se observă de-a lungul marginilor. 	Buzunare translucide rar distribuite pe vârfuri și de-a lungul marginilor; nu există canale secretoare; pe vârfuri se găsesc 1-4 glande negre, rotunde și pedunculate. 	Nu sunt glande negre.	Nu sunt glande negre.
<i>H. tetrapterum</i>	Buzunare translucide și canale secretoare distribuite între nervuri; glande negre de formă sferică sau alungită, rare, se observă pe vârfuri.	Buzunare translucide rar distribuite predominant pe vârfuri și pe pe margini; canale secretoare distribuite între nervuri; glande negre sferice sau alungite, rar distribuite predominant pe vârfuri.	Fiecare anteră are o glandă sferică neagră.	Nu sunt glande negre.
<i>H. montanum</i>	Pe marginea sepalelor glande negre pe picioruș, glanda în formă de cupă; canale secretorii de-a lungul nervurilor cu un conținut galben. 	Buzunare translucide, ovale sau alungite amplasate rar între nervuri sau absente; sunt prezente glande negre pe margine. 	Antere cu o glandă sferică neagră.	

Speciile din g. *Hypericum* se deosebesc prin prezența/absența, numărul și poziția coastelor longitudinale. Printre caracteristicile tulpinilor speciilor de *Hypericum*, principala diferență este expresia și numărul de coaste de pe internoduri. Tulpina la 5 specii în secțiune transversală este rotundă cu 2 coaste mici la *H. perforatum* și *H. elegans* (tabelul 1.4); fără ele la *H. hirsutum* și *H. montanum*; la *H. tetrapterum* sunt 4 coaste aripate. Tulpina și frunzele la *H. hirsutum* sunt acoperite cu tricomi mono- și bicelulari (tabelul 1.4). Structurile secretoare în frunze și tulpini la 5 specii ale g. *Hypericum* sunt prezentate în tabelul 1.4 [26, 32].

Tabelul 1.4. Structurile secretoare în frunze și tulpini la 5 specii ale genului *Hypericum*

Specia	Frunze	Tulpini
<i>H. perforatum</i>	Pe limbul foliar, de-a lungul marginilor, se disting glande negre. 	Sub epidermă canale de tip B și glande negre, în floemul secundar - canale de tip A. 
<i>H. elegans</i>	Glande negre, ovale, de dimensiuni mari pe marginea limbului; buzunare translucide pe toată suprafața limbului. 	Structuri secretoare numai în floemul exterior. 
<i>H. hirsutum</i>	Dens pubescentă pe întreaga suprafață cu trichomi simpli și papile. Glande negre lipsesc; pe toată suprafața numeroase punji rotunde și translucide. 	Canale de tip A în floemul secundar. 
<i>H. tetrapterum</i>	Pe lamina foliară sunt prezente glande negre de-a lungul marginilor și punji translucide pe toată suprafața laminei. 	Sub epidermă canale de tip B și glande negre, în floemul secundar – canale de tip A. 
<i>H. montanum</i>	Pe ambele părți suprafața este rugoasă din cauza numeroaselor papile; glande negre rotunjite, dens situate pe marginea frunzei; buzunare translucide mici, rotunjite, sunt rare pe marginile limbului foliar. 	Structuri secretoare numai în floemul exterior. 

1.3. Compoziția chimică a speciilor genului *Hypericum*

Sunătoarea este o plantă utilizată din cele mai vechi timpuri pentru proprietățile sale terapeutice. Încă Dioscoride indica utilizarea a 4 tipuri de sunătoare: *Upericon*, *Askuron*, *Androsaimon* și *Koris* [33, 34]. Diversitatea întrebuințării, în medicina științifică și în cea populară,

este determinată de compoziția chimică complexă. Actualmente, produsele fitoterapeutice înregistrate din *Hyperici herba* prezintă extracte alcoolice, cu un conținut de substanțe biologice active: naftodiantroni, floroglucinoli, biflavonoide, xantone, proantocianidine, acizi fenolici, ulei volatil [33, 35]. În mare parte, lucrările științifice sunt dedicate studiului fitochimic al speciei *H. perforatum*. În prezent, sunt atestate tot mai multe relații despre conținutul chimic a altor specii din g. *Hypericum* L. [34, 36, 37].

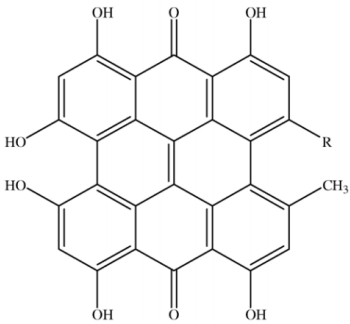
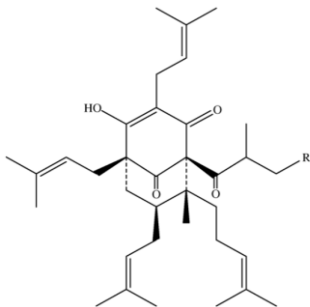
Hipericina a fost inițial izolată din specia *Hypericum perforatum* L. de către Buchner (1830), care a numit-o „hypericum roșu”, iar Cerny în 1911 a redenumit-o în „hipericina” [38].

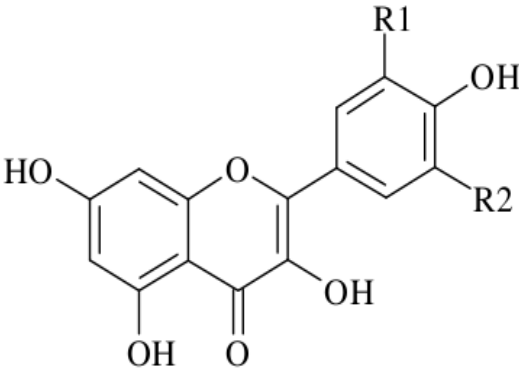
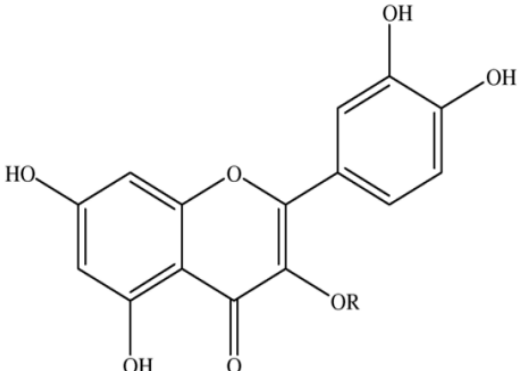
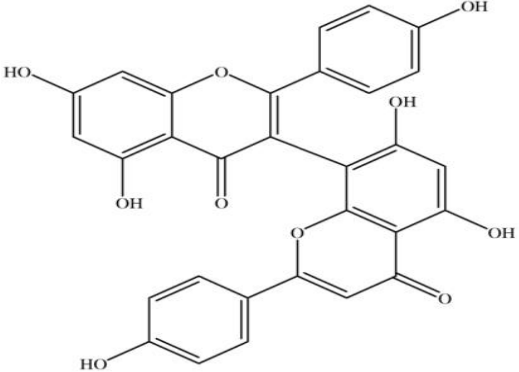
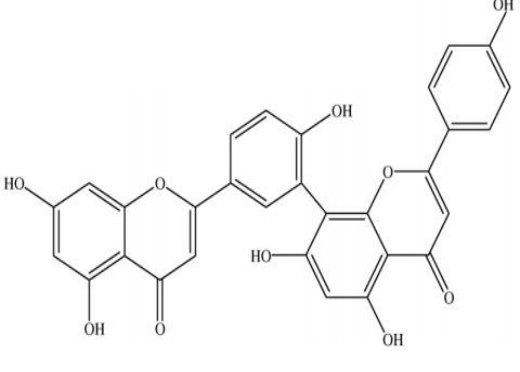
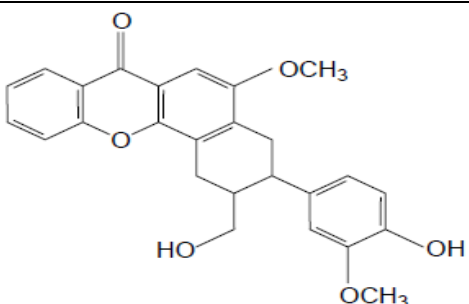
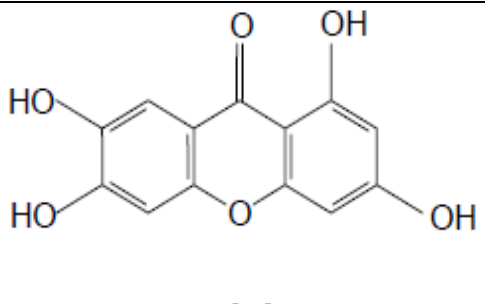
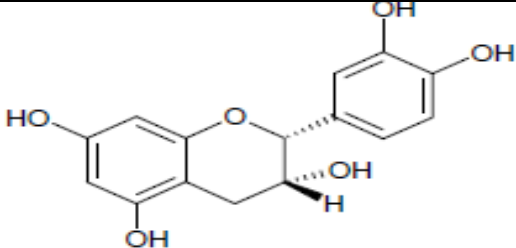
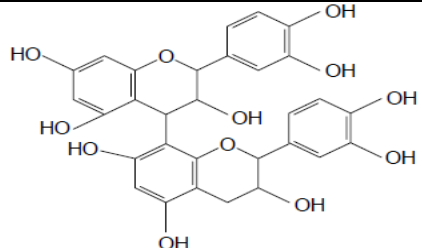
Prezența precursorilor taninurilor condensate (leucocianidina) a fost studiată de către Mihaluc A. în frunze, tulpini, muguri și flori de sunătoare. Cercetătorii Leberton F. și Bușez M. au descoperit leucocianidina în 21 specii de sunătoare. Lucrările științifice, semnate de Șaricova K. și Hazanovici R., vizează conținutul catehinelor. În anul 1915 s-a anunțat despre conținutul flavonoidelor în *H. perforatum*, iar în anul 1918 O’Neillom a izolat cvercetolul. În anul 1956, încep să fie realizate studii sistematice asupra flavonoidelor din sunătoare [34]. Acizii fenolici sunt reprezentați de acizii cafeic și clorogenic, descoperiți în 1960 în *H. perforatum*. Hiperforina, o substanță cu acțiune antibiotică puternică, a fost izolată din *H. perforatum* și a fost studiată de către savanții ruși în perioada anilor 1971-1975. Primul, care a menționat hiperforina, a fost Gurevich A. (1971), iar Bîstrov N. (1975) și Brontz T. (1982) au stabilit structura acesteia [34, 35, 38].

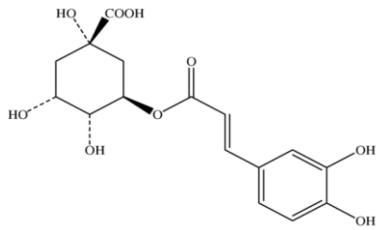
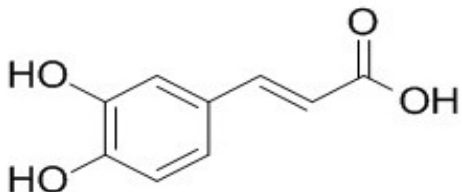
1.3.1. Acumularea și localizarea compușilor chimici

Cercetările chimice care au avut în vizor produsul vegetal *Hyperici herba* au constatat prezența unui șir de substanțe biologice active: naftodiantrone (hipericină, pseudohipericină), floroglucinoli (hiperforină, adhiperforină), flavonoide, substanțe tanante, procianidine, xantone, pectine (tabelul 1.5) [39, 40, 41].

Tabelul 1.5. Compușii chimici din specia *H. perforatum* [42, 43]

Naftodiantrone	Floroglucinoli
 Hipericina R = CH₃ Pseudohipericina R = CH₂OH	 Hiperforina R = H Adhiperforina R = CH₃

Flavonoide	
 Kemferol R1 = H; R2 = H Cvercetol R1 = H; R2 = OH Miricetol R1 = OH; R2 = OH	 Rutozida R = Glucoza-Ramnoza Hiperozida R = Calactoza Izocvercitrozida R = Glucoza Cvercitrozida R = Ramnoza
Biflavone	
 I3, II8-biapigenina	 I3', II8-biapigenina (amentoflavona)
Xantone	
 kielcorina	 1,3,6,7,-tetrahidroxixantona
Procianidine	
 (+)-Catehina	 Procianidina B2

Acizi fenolici	
 Acid clorogenic	 Acid cafeic

Standardizarea produsului vegetal, conform Documentațiilor Analitice de Normare, se efectuează pe conținutul total al derivaților de antracen, exprimat în echivalentul de hipericină. Conform prevederilor stipulate în *Farmacopeea Britanică* „totalul hipericinelor” trebuie să fie în extracte de 0,10-0,15%; în părțile aeriene după *Farmacopeea Europeană* ed. 6 (2008) – nu mai puțin de 0,08%, iar după *Farmacopeea Statelor Unite ale Americii* – nu mai puțin de 0,2%. *Farmacopeea Europeană* ed. 7 (2010) recomandă un conținut de hipericină în extractele uscate din *H. perforatum* de 0,1-0,3% [38].

Cele mai importante substanțe secundare se regăsesc în structurile secretoare ale speciilor g. *Hypericum* [44]. Zobayed S.M.A. *et al.* au publicat date referitoare la biosinteza hipericinei și a pseudohipericinei în glandele negre, localizate în diferite organe vegetale ale speciei *H. perforatum*. Dânșii au demonstrat, că producerea hipericinei și a pseudohipericinei, în țesuturile secretoare ale florii, este de 5-8 ori mai mare în comparație cu cele ale frunzei. Concentrația de hipericină și de pseudohipericină, în diferite organe, depinde de numărul de glande negre și nu de localizarea acestora în plantă [45].

Sursele bibliografice relatează prezența conținutului de naftodiantrone în părțile florii: conținutul de hipericină – în petale (0,033%), sepale (0,007%), stamine (0,099%) și conținutul de pseudohipericină – în petale (0,175%), sepale (0,337%) [46].

Variația concentrației de hipericină în *H. perforatum* depinde de condițiile de mediu, faza de vegetație, raportul între părțile componente ale plantei (flori, frunze, tulpini) în produsul vegetal, timpul de colectare, condițiile de uscare și de păstrare. Cercetările fitochimice au demonstrat un conținut de hipericină în *Hyperici herba* variat: în Lituania – de la 0,23 mg/g până la 1,24 mg/g, în recalcul la produsul vegetal uscat; în Germania – de la 0,69 mg/g până la 0,85 mg/g; în Austria – între 0,032-0,090%; în Statele Unite ale Americii – între 0,0003-0,125% [44]. Gîtea D. *et al.* au determinat concentrația de hipericine totale în părțile aeriene ale speciilor de *Hypericum* din flora României: *H. perforatum* – 0,163 g%; *H. maculatum* Crantz *ssp. immaculatum* – 0,211 g%; *H. maculatum* Crantz *ssp. typicum* – 0,496 g%; *H. tetrapterum* L. – 0,189 g%; *H. hirsutum* – 0,096 g% [47]. Pravdivțeva O. *et al.* au dozat totalul de antracenderivați, exprimat în hipericină în diferite

organe vegetative ale *H. perforatum*: flori (0,81%), fructe (0,084%), tulpini (0,091%), frunze (0,262%), părți lignificate ale tulpinii (0,01%), rizomi cu rădăcini (0,025%) și în părți aeriene (0,506%) [48]. Kitanov G. M. (2001) a comunicat prezența hipericinei și a pseudohipericinei în 27 din cele 36 de specii de *Hypericum* cercetate. Cantitatea variază de la 0,0009% în *H. empetrifolium* până la 0,512%, în *H. boissieri* [49].

Soelberg J. *et al.* au prezentat biosinteza hiperforinei în țesuturile secretoare, care se desfășoară mai mult în glandele translucide și mai puțin – în cele pigmentate. Biosinteza hiperforinei are loc în celulele secretoare parenchimotoase, care delimitează cavitatea glandelor translucide [50]. S-a observat faptul, că hiperforina este sintetizată abundant în flori de *H. perforatum* (în special în pistiluri), fructe și frunze. În părțile florale, localizarea hiperforinei și a adhiperforinei se atestă în petale (1,795%), sepale (2,255%), pistil (7,105%) [34]. Conținutul hiperforinei în bobocii floriali este de 6,9%, în fructele imature – de 8,5%, în frunze – de 1,5% [40, 51].

Prin HPLC/MS a fost determinată concentrația hiperforinei în părțile aeriene ale speciilor de *Hypericum* din flora județului Bihor, România, care constituie: *H. perforatum* (7,89%), *H. maculatum* (0,077%), *H. tetrapterum* (0,103%) și *H. hirsutum* (0,67%) [36].

Studiul efectuat de Smelcerovic A. *et al.* a demonstrat un conținut sporit de hiperforină (mg/g produs uscat) în *H. perforatum* (3,55 mg/g), *H. tetrapterum* (0,25 mg/g), *H. maculatum* (0,18 mg/g); mai redus în *H. hirsutum* (0,05 mg/g) și *H. olimpicum* (0,02 mg/g), pentru probele colectate din flora spontană a Serbiei [52]. Alți autori au raportat conținut de 5,46 mg/g în produsul vegetal de *H. perforatum* din Turcia; 14,55-24,26 mg/g în părțile aeriene înflorite în masă de *H. perforatum* din flora spontană a Italiei [36], din flora spontană a Indiei – 1,66-4,62 mg/g, 91,6-107,5 mg/g în părțile aeriene înflorite în masă de *H. perforatum* cultivate în Slovacia, 0,9-6,4 mg/g în bobocii floriali ai sp. *H. perforatum* cultivată în Elveția [53].

Dintre metaboliți secundari majori din speciile g. *Hypericum*, fac parte și flavonoidele (2-4%). Acest grup cuprinde heterozide (hiperozidă, cvercetrozidă, isocvercetrozidă, rutozidă) și agliconi liberi (cvercitol, kemferol, miricetol), biflavonoide (amentoflavonă, biapigenină) (tabelul 1.5) [39, 53, 54, 55]. Conținutul de flavonoide s-a dovedit a fi mai mare în vârfurile înflorite ale plantei; mai mic – în frunze, tulpini și în boboci floriali [56]. Repčák M. *et al.* (1997) au studiat localizarea și cantitatea metaboliților secundari în florile de *H. perforatum*. Rutozida este prezentă în petale (0,544%), sepale (1,588%), stamine (0,370%), pistil (0,647); hiperozida și izocvercetrozida – în petale (2,345%), sepale (3,417%), stamine (2,345%), pistil (1,676%); cvercitolul – în petale (1,905%), sepale (3,598%), stamine (2,171%), pistil (1,613%); cvercitrinozida este prezentă în toate părțile florii, dar în cantități mai mici [46]. Zimina L. *et al.* (2013), prin tehnica HPLC, au dozat conținutul de flavonoide în părțile aeriene de *H. perforatum*.

Flavonozida dominantă a fost hiperozida (2,5%), urmată de rutozidă (1,05%); cvercetolul a fost depistat în cantitate de 0,4%, iar biapigenina – de 1,05% [57].

Biapigenina a fost izolată, pentru prima dată în 1986, din bobocii florali și din florile de *H. perforatum*. Conținutul ei crește pe parcursul dezvoltării bobocilor florali; după ce florile se deschid - conținutul scade. S-a constatat faptul, că biapigenina este localizată în polen, odată cu dezvoltarea plantelor se pierde [54]. În părțile aeriene conținutul acesteia reprezintă 1,05% [57].

Un alt grup de compuși chimici sunt xantonele, identificate la câteva specii de *Hypericum* [58]. În sursele bibliografice s-a raportat un conținut de kielcorină de 0,01% în rădăcini și urme de 1,3,6,7,-tetrahidroxixantonă – în frunze și în tulpini de *H. perforatum* (tabelul 1.5) [58, 59].

Procianidinele se consideră dimeri, trimeri, tetrameri și polimeri ale catehinei și ale epicatehinei, al căror conținut în *Hyperici herba* (produs vegetal uscat) este aproximativ de 12%. Indicele cantitativ cel mai înalt este înregistrat în faza de înflorire [57]. Pe lângă aceasta, în *Hyperici herba* a fost izolat dimerul – procianidina B2 [58].

Din părțile aeriene de *H. perforatum* au fost izolate 6,2% de polizaharide, formate din rămășițe ale acizilor glucuronici și din monozaharide: arabinoză, galactoză, glucoză, ramnoză, xiloză, manoză [41].

1.3.2. Compoziția chimică a uleiului volatil din speciile genului *Hypericum*

Ciccarelli D. *et al.* (2001) au efectuat un studiu histochimic al structurilor secretoare a sp. *H. perforatum* și au demonstrat, că uleiul volatil se conține în glandele translucide și în canalele secretoare. Uleiul volatil a fost identificat cu reagentul Nadi în glandele translucide din frunze; în canalele secretoare de tip A din pistil, de tip B din petale, sepale, pistil și de tip C din pistil [24]. Este demonstrată prezența glandelor translucide și a canalelor secretoare în speciile *H. hirsutum*, *H. tetrapterum* [25]. Din structurile secretoare, la specia *H. elegans* Steph. ex Willd., s-au găsit noduli interni în mezofilul frunzelor, al petalelor și în muchiile tulpinilor [27].

Cercetările anterioare au demonstrat un randament al uleiului volatil, extras din părțile aeriene de *H. perforatum*, colectate în Turcia (0,19%), Italia (0,07%), Grecia (0,28%), Serbia (0,08%), Uzbekistan (0,1%), care variază considerabil [60, 61, 62, 63, 64]. Randamentul uleiului volatil din speciile g. *Hypericum* variază în funcție de faza fenologică de dezvoltare: vegetativă (0,07%), butonizare (0,082), înflorire (0,092%), fructificare (0,058%) [65]. Cantitatea de ulei volatil diferă în funcție de arealul de răspândire. De exemplu, randamentul uleiului volatil din părțile aeriene ale speciei *H. perforatum*, colectate în diferite localități din sud-estul Franței, este de 0,03-0,12% [66], din flora Tadjikistanului – de 0,1-0,4% [67], la diferite populații din Kosovo – de 0,04-0,26% [68], din Serbia – de 0,03-0,93%, din Turcia – de 0,04-0,5% [69]. În organele

vegetative, de asemenea, s-a atestat o variație a cantității de ulei volatil: în frunze – 0,33%, în flori – 0,12%, în tulpini – s-au înregistrat urme de ulei volatil [28].

Compoziția chimică a uleiului volatil din specia *H. perforatum*, în opinia savanților, se deosebește calitativ și cantitativ. Componentii majori ai uleiului volatil separat din *H. perforatum*, din flora sud-estului Franței sunt: cariofilen oxid, β -cariofilen, spathulenol, β -funebren, γ -muurolen, (E)- β -farnesen și cariofilladienol [66]; din flora Tadjikistanului – germacren D (13,7%), α -pinen (5,1%), cariofilen, n-dodecanol (4,5%) [67], cariofilen oxid (4,2%), biciclogermacren (3,8%) și spatulenol (3,4%); din flora Italiei - (E)-cariofilen (21,6-23,0%) și germacren D (19,5-20,8%) [61]. În uleiul volatil obținut din *H. perforatum* din Serbia au fost identificați 134 de componente, ceea ce constituie 98,7% din totalul de compuși, principalii fiind: germacren D (18,6%), (E)-cariofilen (11,2%), 2-metiloctan (9,5%), α -pinen (6,5%), biciclogermacren (5,0%) și (E)- β -ocimen (4,6%) [70]. Datele raportate din Turcia, India arată că α -pinenul (5,1-67,3%) este componentul principal al uleiului din *H. perforatum* [71]. Hajdari A. et al. (2014) au determinat compușii principali comuni pentru uleiul volatil din produsul vegetal *Hyperici herba*, colectat în cinci localități din Kosovo, și anume: 2-metil-octan (1,1-15,5%), α -pinen (3,7-36,5%), β -cariofilen (1,2-12,4%), cariofilen oxid (3,3-17,7%) și n-tetradecanol (3,6-10,4%) [68]. Un grup de cercetători au determinat compoziția chimică a uleiului volatil din frunze și din flori prelevate din 11 probe de *H. perforatum*, dintre care 9 au fost crescute spontan și 2 cultivate în flora Lituaniei. Un conținut mai sporit de componente majori (β -cariofilen, cariofilen oxid) a fost depistat în uleiuri volatile din frunze; iar o cantitate mai mare de spatulenol, viridiflorol, caratol și tetradecanol – în probele din flori [71].

Puține surse bibliografice oferă date despre conținutul și compoziția chimică a uleiului volatil, extras din speciile *H. elegans*, *H. hirsutum* și *H. tetrapterum*. Specia *H. elegans*, colectată din flora spontană a sud-estului Serbiei în faza de înflorire, conține 0,08% ulei volatil (în părțile aeriene proaspăt colectate), conținând componentii majori: undecan (31,9%), α -pinen (16,7%) și nonan (6,1%). Considerabil variază conținutul de ulei volatil în organele vegetative (produse uscate) ale *H. elegans*, colectate în estul Poloniei: în flori se conține 0,05%, în frunze – 0,20%, în tulpini s-au depistat urme de ulei volatil. Componentii majori identificați în uleiul volatil din flori sunt: 2-metiloctan (15,23%), α -terpineol (2,08%), α -humulen (1,09%), terpenen-4-ol (1,09%), β -pinen (1,23%), sabinen (1,17%); în uleiul din frunze: 2-metiloctan (12,33%), β -cariofilen (9,73%), α -pinen (2,92%), α -terpineol (1,45%), sabinen (1,42%), γ -terpen (1,11%), o-cimen (1,08%) [72].

Componentii majori identificați în uleiul volatil de *H. tetrapterum* din Grecia sunt: α -copaen (11,3%); α -longipinen (9,7%), cariofilen oxid (8,9%), n-undecan (7,4%). În uleiul volatil de *H. tetrapterum* provenit din Italia, sunt aceiași 2 componente majori: α -copaen (12,7%) și α -

longipinen (8,1%). Conținutul de ulei volatil la *H. tetrapterum* din Grecia este de 0,2%, din Centrul Italiei – de 0,1% [62, 69].

În flora spontană a Franței, *H. hirsutum* sintetizează și acumulează în uleiul volatil alți componenți majori: n-nonan (52%) și n-undecan 30%, iar plantele colectate în Serbia – trei componenți majori: nonan (24,8%), undecan (13,3%) și cariofilen oxid (5,6%) [58]. În mostrele din Italia Centrală, componenții majori ai acestei specii sunt: (E,E)- α -farnesen (7,0-13,8%) și E- β -farnesen (7,2-9,4%) [61].

Fluctuația conținutului de ulei volatil în *H. hirsutum* depinde de: faza vegetativă, starea produsului vegetal (proaspăt sau uscat), zona geografică și altitudinea răspândirii. Astfel, în părțile aeriene (produs proaspăt) din flora Franței, conținutul este de 0,14%; în părțile aeriene uscate, colectate din flora Serbiei – de 0,02%; în părțile aeriene, colectate din Centrul Italiei la diferite altitudini, este de 0,05-0,06% [61, 69].

1.4. Acțiunea farmacologică a principiilor active

În prezent, specia *H. perforatum* este una dintre cele mai utilizate plante medicinale în lume [72]. Planta are o gamă largă de întrebuințări în medicina populară: în tratarea rănilor de piele, eczemelor, arsurilor, răcelii obișnuite, migrenei, bolilor tractului digestiv, depresiei ușoare și celei moderate. Actualmente, *H. perforatum* prezintă un mare interes grație efectelor sale antidepresive. Datorită compoziției sale chimice, planta posedă diferite proprietăți farmacologice: antifungice, antibacteriene, antivirale, anticonvulsive, antiinflamatoare, analgezice și fotosensibilizante [73, 74, 75, 76].

Extraktele hidroetanolicе, obținute din părțile aeriene de *H. perforatum*, conțin șase grupuri majore de compuși chimici: naftodiantrone, floroglucinoli, flavonoide, biflavone, compuși fenilpropanici, proantocianidine. De asemenea, în produsul vegetal proaspăt și uscat de *H. perforatum*, se conțin substanțe tanante și cantități mici de xantone, ulei volatil și aminoacizi [58, 77].

Naftodiantrone. Necâtând la faptul, că prima izolare a naftodiantronelor (hipericinei și pseudohipericinei) din *H. perforatum* a fost la începutul secolului XX, până în prezent acest grup rămâne a fi cel mai de perspectivă dintre polifenoli, deoarece compușii chimici au diverse proprietăți biologice [77]. Conținutul derivaților de naftodiantronă în *H. perforatum* variază între 0,05 - 0,30%. Planta, de asemenea, conține ciclopseudohipericină, protopseudohipericină și protohipericină (fig. 1.8) [51]. Acești compuși au fost identificați în segmentele înflorite ale plantei și sunt localizați mai mult în pungile pigmentate. Protohipericina și protopseudohipericina sunt considerate precursori ai hipericinei și ai pseudohipericinei, care respectiv, se obțin după expunerea la lumină. Este binecunoscut faptul, că pseudohipericina poate fi transformată în ciclopseudohipericină.

Protohipericina, protopseudohipericina și ciclopseudohipericina sunt determinate în concentrații mai mici și sunt incluse în termenul analitic „hipericine totale” sau „totalul de naftodiantrone”. Conținutul de pseudohipericină (0,03-0,34%) este mai mare de la două până la patru ori decât cel al hipericinei (0,03-0,09%) [78].

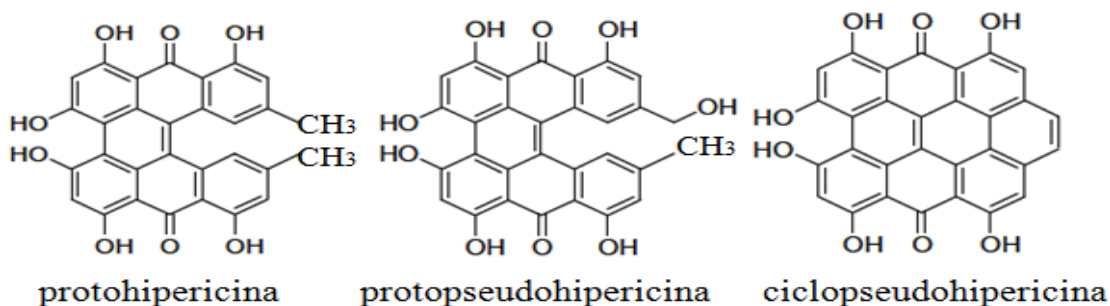


Fig. 1.8. Naftodiantronele

Hipericina și derivații ei sunt studiați pentru proprietățile antitumorale, antivirale și antidepresive. Trebuie remarcat că hipericina este unul dintre cei mai puternici agenți naturali fotodinamici. Proprietățile fotodinamice prooxidante ale hipericinei au fost folosite pentru tratarea cancerului. Hipericina, în asociere cu lumina, eficient induce apoptoza și necroza celulelor canceroase [78]. Cercetările efectuate în ultimii ani *in vitro* au demonstrat că hipericina inhibă citomegalovirusul uman și capacitatea absorbantivă a virusului febrei aftoase [78]. Hipericina manifestă o activitate semnificativă antidepresivă, prin inhibarea enzimei MAO [58, 79, 80]. Majoritatea preparatelor antidepresive generează creșterea disponibilității sinaptice a noradrenalinei și a serotoninei sau inhibă recaptarea monoaminelor. Anterior, a fost demonstrat efectul inhibitor al extractului din *H. perforatum* asupra absorbției sinaptozomale a monoaminelor [80].

Feyzioğlu B. *et al.* au studiat efectul antibacterian al hipericinei. Studiul a fost efectuat în două condiții diferite: expunerea la lumina naturală și la întuneric. Concentrația de hipericină de 64 mg/ml a inhibat creșterea *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 și *S. epidermidis* ATCC 12228 la întuneric [81].

Floroglucinoli. Derivații de floroglucinol sunt pe larg răspândiți în g. *Hypericum*. Doi compuși înrudiți sunt identificați în *H. perforatum*: hiperforina (2,0-4,5%) și adhiperforina (0,2-1,9%), ce conțin o grupare suplimentară de metil. Acești compuși se găsesc doar în părțile reproductive (în flori aproximativ 2%, în fructele imature – 4,5%, în fructele mature – 4,4%) [58, 75].

S-a demonstrat *in vitro* că hiperforina inhibă sau modulează mai multe sisteme de neurotransmițătoare [58]. Mecanismul activității antidepresive se manifestă prin inhibarea recaptării sinaptice a neurotransmițătorilor. Acțiunea antidepresivă a hiperforinei a fost

demonstrată pe diferite modele de depresie la animalele de laborator (FST – *forced swimming test*, TST – *tail suspension test*, *learned helplessness test*). Este un inhibitor puternic în captarea de serotonină (5-HT), dopamină (DA), norepinefrină (NE) și de GABA. Hiperforina nu inhibă MAO-A și MAO-B [12, 82].

Kurkin V. *et al.* au demonstrat acțiunea antidepresivă a hipericinei și a hiperforinei, pentru ultima a fost demonstrată și acțiunea neurotropică [75, 76].

Silva B. *et al.* (2005) au dovedit faptul că hipericinele și hiperforinele nu au influențat semnificativ proprietățile antioxidante ale extractului etanolic din *H. perforatum* [83].

Flavonoide. Pentru a demonstra proprietățile antidepresive ale compușilor individuali sau ale produselor extractive din plante medicinale, cercetătorii crează diferite modele de disperare comportamentală: testul înotului forțat (FST), testul de suspendare a șoarecelui de coadă (TST) [82]. Totalul de flavonoide din *H. perforatum*, în funcție de doză, reduc timpul de imobilitate a șoarecilor în FST [82]. Nöldner M. *et al.* au extras o serie de flavonoide din *H. perforatum* L., cum ar fi hiperozida, izocvercetrozida și 3-O-glucuronida cvercetolului; toți compușii au demonstrat o activitate antidepresivă vizibilă [84]. Acțiunea antidepresivă a hiperozidei a fost demonstrată și de către cercetătorii din Federația Rusă [75]. Sunt atestate surse bibliografice care pun în discuție proprietatea antidepresivă a rutozidei și a izoramnetolului din *Hypericum monogynum* L. [76]. În literatura de specialitate sunt date referitoare la influența flavonoidelor asupra aminelor biogene (neurotransmițători monoaminici – NE, 5-HT și DA). Flavonoidele exercită efectul antidepresiv, prin creșterea conținutului de bioamine, imobilizând astfel reabsorbția lor din partea sinaptozomilor și blochează activitatea MAO [84].

Unele flavonoide, precum hiperozida, cvercetrozida, izocvercetrozida și amentoflavona pot provoca un efect sedativ, care implică benzodiazepinele și agoniștii receptorilor GABA [79]. Silva B. *et al.* (2008) au studiat efectele compușilor fenolici, prezenți în *H. perforatum*, asupra excitotoxicității neuronale și disfuncției mitocondriale. Cvercetolul, kaempferolul și biapigenina au redus semnificativ moartea neuronilor, cauzată de acidul cainic (cainat) și de acidul N-metil-D-aspartic. Acțiunea neuroprotectoare a fost corelată cu prevenirea dereglării calciului întârziat și cu menținerea potențialului electric transmembranar al mitocondriilor. Kaempferolul, în asociere cu cvercetolul și cu biapigenina, reduc peroxidarea lipidelor mitocondriale și pierderea potențialului electric transmembranar, cauzat de stresul oxidativ indus de adenzindifosfat (ADP) și fier. Activitatea neuroprotectoare a kaempferolului este mediată prin efectul antioxidant [83].

Biflavone. Biflavonele sunt un grup de flavone dimere rar identificate în regnul vegetal. Trei compuși din acest grup: 3',8'-biapigenina (0,1-0,5%), amentoflavona și 6',8''-dicvercetolul au fost identificate în *H. perforatum* [85]. Cu toate acestea, s-a demonstrat *in vitro* că amentoflavona

se leagă cu receptorii benzodiazepinici ai creierului, dar nu penetrează bariera hematoencefalică. Anterior, a fost raportat faptul că unele biflavonoide (inclusiv amentoflavona) manifestă efect inhibitor asupra activității fosfolipazei A2 din grupul II. S-a constatat că amentoflavona inhibă ciclooxygenaza din epidermă, fără a afecta lipoxigenaza (rezultate obținute în urma cercetărilor efectuate pe porcușor de Guineea). Activitățile antiinflamatoare și analgezică ale amentoflavonei au fost confirmate la administrarea intraperitoneală, prin diminuarea edemului urechii la șoareci indus cu ulei de croton. De asemenea, s-a demonstrat o activitate antiinflamatoare semnificativă la inducerea edemului lăbuței șobolanului cu caragenan ($ED_{50} = 42 \text{ mg/kg}$), comparativ cu efectul antiinflamator al prednisolonului (35 mg/kg) și cu cel al indometacinei (10 mg/kg). Totodată, amentoflavona nu a prezentat o activitate inhibitoare semnificativă în artrita cronică indusă la șobolani, dar a manifestat o activitate analgezică evidentă în testul crampelor induse cu acid acetic ($ED_{50}=9,6 \text{ mg/kg}$), în comparație cu efectul antiinflamator al indometacinei ($3,8 \text{ mg/kg}$) [58].

A fost demonstrată acțiunea antidepresivă și cea anxiolitică ale biapigeninei [75, 76].

Taninuri și procianidine. Conținutul de taninuri, în produsul vegetal proaspăt de *H. perforatum*, este de circa 15%. Substanțele tanante din sunătoare sunt procianidine oligomerice. Sursele bibliografice arată că a fost izolată și caracterizată procianidina dimerică B2 (tabelul 1.5). De asemenea, au fost identificați: procianidina dimerică suplimentară, doi trimeri și o procianidină tetramerică, catehina și epicatehina. Proantocianidinele manifestă activități antimicrobiene și antivirale. Dar nu există date bibliografice referitoare la efectul antidepresiv al procianidinelor [86].

Xantonele au fost detectate în toată planta la mai multe specii ale genului *Hypericum*. În *H. perforatum* se conțin 1,3,6,7-tetrahidroxixantona și kielcorina C la o concentrație de aproximativ 0,01% [58]. Xantonele identificate în părțile aeriene de *H. perforatum* au demonstrat acțiune antidepresivă [87].

1.5. Utilizarea în medicină a produselor extractive de *H. perforatum*

Sunătoarea este una dintre cele mai studiate plante medicale în ultimele două decenii, interesul fiind axat pe potențialul său antidepresiv natural. Cu toate acestea, utilizările tradiționale au fost caracterizate de la început, prin aplicații externe sub formă de uleiuri și de tincturi. Una dintre primele mențiuni cunoscute ale sunătoarei ca plantă medicinală se găsește în *Naturalis Historiae* de Pliniu cel Bătrân (23-79 d. Hr.), lucrare în care este specificat tratamentul pentru arsuri, dar și cel intern, diuretic și astringent în diaree [88]. Studiul compoziției chimice și al efectelor farmacologice, pe care le dețin componentele din sunătoare, sunt la ordinea de zi începând cu anii 1940 până în prezent în așa țări ca Bulgaria, Germania, Federația Rusă, Uzbekistan, Kazahstan, Ucraina. Compoziția chimică a sunătoarei a fost studiată în complexitate;

au fost identificate mai mult de 80 de substanțe din grupurile de compuși biologic activi, cu diferite efecte farmacoterapeutice, în diferite părți ale plantei [89].

În literatura populară și în cea științifică sunt enumerate mai multe aplicații externe ale sunătoarei, care au la bază experiența medicinei populare: răni, arsuri solare, traumatisme contondente, ulcere, varice, hemoroizi, mialgie, reumatism, lumbago, crampe, decubitus și cicatrici cheloide. [88]. Intern, în medicina populară planta este administrată în tratament de tulburări depresive, anxietate, bronșite, astm, ulcer, gastrite, diaree, dureri de cap, gută și reumatism. Decoctul din rădăcini de sunătoare se folosește în tratamentul tuberculozei osoase, al dizenteriei și în calitate de remediu antihelmintic; florile sunt utilizate în tratamentul tulburărilor gastrointestinale și al icterului. Din cele mai vechi timpuri, specia *H. perforatum* are o întrebuințare largă în medicina populară, în tratamentul „celor nouăzeci și nouă de boli” [90].

Cu toate acestea, preparatele tradiționale și, în special, uleiul din flori de sunătoare, obținut prin macerarea în ulei de măsline a inflorescențelor, culese în ziua de naștere a Sfântului Ioan Botezătorul (24 iunie) și apoi expuse la soare, timp de 2-3 săptămâni, rămâne unul dintre cele mai populare remedii în Europa în tratamentele topice ale ulcerelor și ale arsurilor [91]. Uleiul de sunătoare este folosit, în mod tradițional, în tratarea tulburărilor digestive și al ulcerului stomacal [92]. Maceratul uleios, obținut din flori de *H. perforatum* (*Oleum Hyperici*), este utilizat pe scară largă ca remediu tradițional în tratamentul ulcerelor și al arsurilor cutanate în Bosnia, Herțegovina, Serbia, Kosovo, Turcia [93].

În ultimii 20 de ani, extractele alcoolice standardizate (etanol 60% sau metanol 80%) au devenit tot mai populare în Europa și în SUA, fiind administrate în tratamentul tulburărilor depresive ușoare până la moderate. Acțiunea antiinflamatoare a produselor vegetale și a preparatelor fitoterapeutice din sunătoare se datorează prezenței de flavonozide, ulei volatil și de substanțe tanante, iar derivații antracenului determină acțiunea fotosensibilizantă [94]. Flavonoidele – cvercetolul și hiperozida, sunt componenți activi în tinctură de sunătoare, responsabile de efectul antihipnotic [94]. Tinctura din sunătoare stimulează sistemul nervos central prin acțiunea sa neurotropă. Extractul uscat din părțile aeriene de sunătoare posedă acțiune diuretică [95]. A fost dovedit științific că tinctura și extractul uscat din sunătoare determină acțiune antidepressivă și anxiolitică [75, 76]. Mai multe studii au demonstrat acțiunea antioxidantă a extractelor polifenolice din *H. perforatum*, prin captarea radicalilor liberi, peroxidarea lipidelor și prin capacitatea lor de chelare a fierului [73, 88, 96].

În multe țări din Uniunea Europeană produsele din sunătoare au statut de medicamente tradiționale, de origine vegetală, utilizate în tratamentul stării de spirit scăzute și al depresiei ușoare

până la moderate. În Germania produsele din *H. perforatum* sunt autorizate ca medicamente, iar în SUA sunt clasificate drept suplimente alimentare [97, 98].

În medicina veterinară extractul uscat și tinctura de *H. perforatum* sunt utilizate drept remedii antihelmintice [99].

Reacția de fotosensibilizare a hipericinelor determină toxicitatea preparatelor din sunătoare, prin sporirea sensibilității la lumina solară, provocând fotodermatoză, fenomene dispeptice, constipație. Preparatele din sunătoare sunt contraindicate în sarcină, alăptare, hipertensiune arterială, ulcer peptic, constipație de natură neurogenă și de natură endocrină. Este contraindicată administrarea acestora concomitent cu inhibitori ai monoaminooxidazei și cu medicamente din clasa inhibitorilor selectivi ai recaptării serotoninei [89].

1.6. Sinteza capitoului 1

Din surse bibliografice este binecunoscut faptul că g. *Hypericum* include aproximativ 484 de specii, divizate în 36 de secțiuni taxonomice, răspândite la nivel mondial, în regiunile temperate, tropicale, subtropicale și montane, cu excepția Antarcticii.

Diverse lucrări științifice oferă date referitoare la caracteristicile diferențiate macro- și microscopice ale speciilor g. *Hipericum*, răspândite în flora spontană a RM: *H. perforatum*, *H. elegans*, *H. hirsutum*, *H. tetrapterum*, *H. montanum*.

Cea mai importantă caracteristică de diagnosticare a produselor vegetale ale speciilor din genul *Hypericum* este localizarea, forma și culoarea structurilor secretoare, care acumulează metaboliți secundari valoroși. Cel mai mult structurile secretoare din speciile de *Hypericum* sunt concentrate în sepale, petale și frunze. Sunt diferite structuri secretoare cunoscute sub numele de noduli negri (glande negre), glande translucide și canale secretoare, importante pentru recunoașterea speciilor din genul *Hypericum*. Dintre toate organele analizate la 5 specii, diferența dintre ele este mai pronunțată în cazul structurilor secretoare ale sepalelor.

În funcție de structura anatomică a tulpinii, 5 specii studiate pot fi diferențiate în funcție de numărul, poziția și dimensiunea coastelor longitudinale.

Majoritatea lucrărilor științifice vizează studiul fitochimic al speciei *H. perforatum*. Actualmente sunt atestate tot mai multe date referitoare la compoziția chimică a altor specii de *Hypericum*. Variabilitatea proprietăților farmacologice ale speciilor din g. *Hypericum* se datorează metaboliților secundari: floroglucinoli (hiperforină, adhiperforină), naftodiantroni (hipericină, pseudohipericină), flavonoide (hiperozidă, rutozidă, cvercetrozida, cvercetol, kaempferol și biflavonă – biapigenină), acizi fenilpropanici (cafeic, clorogenic, ferulic), ulei volatil, taninuri,

xantone etc. Concentrația lor în țesuturile vegetale variază în funcție de: faza fenologică, organul vegetativ, arealul de răspândire și condițiile climatice.

Sursele bibliografice relatează fenomenul de biosinteză a hipericinei și a pseudohipericinei în pungile colorate, localizate în diferite organe vegetale ale speciei *H. perforatum*. Conținutul hipericinei, în părțile aeriene de *H. perforatum*, variază în funcție de arealul de răspândire și condiții climatice.

În literatura de specialitate, sunt prezentate rezultatele unui studiu histochimic al structurilor secretoare din specia *H. perforatum*, care a demonstrat că uleiul volatil se conține în glandele translucide și în canalele secretoare. Randamentul uleiului volatil din speciile g. *Hypericum* variază în funcție de faza fenologică de dezvoltare a plantei.

Despre utilizarea frecventă în medicina populară a sunătoarei, de asemenea, se relatează în multiple surse bibliografice, îndeosebi în ceea ce privește tratarea rănilor, eczemelor, arsurilor, răcelii obișnuite, migrenei, bolilor tractului digestiv.

H. perforatum prezintă un mare interes în medicină pentru activitatea antidepresivă în tratamentul depresiei ușoare și moderate. Datorită compoziției chimice, planta posedă diverse proprietăți farmacologice demonstrate *in vitro* și *in vivo*: antifungice, antibacteriene, antivirale, anticonvulsive, antiinflamatoare, analgezice și efect fotodinamic.

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, raionul Dondușeni; *H. hirsutum* și *H. tetrapterum* în Rezervația naturală „Codrii”, raionul Strășeni. Pentru studiul compușilor chimici au fost colectate părțile aeriene ale speciei *H. perforatum*, în diferite faze fenologice (început de butonizare, butonizare, început de înflorire, înflorire în masă, fructificare) și zone geografice (colina satului Nimoreni, raionul Ialoveni; pădurea satului Tîrnova, raionul Dondușeni; pădurea satului Lopățica, raionul Cahul). Au fost colectate părțile aeriene de *H. perforatum* din colecția CȘPDPM USMF „Nicolae Testemițanu”. După recoltare și sortare (îndepărtarea impurităților vegetale), produsele vegetale au fost supuse procesului de uscare, efectuat pe cale naturală, la umbră, în încăperi bine aerisite, apoi produsele vegetale au fost păstrate în saci de hârtie, în loc uscat, ferit de lumină și de umiditate.

Determinarea identității acestor specii a fost efectuată prin examinarea macro- și microscopică a produselor vegetale colectate. Identificarea macroscopică a speciilor g. *Hypericum* a fost efectuată în funcție de caracteristicile morfologice, descrise în subcapitolul 1.2, utilizând determinatoarele de plante [16, 17, 21, 22, 23, 25, 100] în comparație cu plantele herbarizate și păstrate în colecțiile herbarelor Grădinii Botanice Naționale (Institut) „Al. Ciubotaru” și a Rezervației științifice „Codrii”. Analiza microscopică a fost realizată cu ajutorul microscopului optic binocular „Micros” (model MC 50 XP, Austria) la Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică din cadrul USMF „Nicolae Testemițanu”, care a permis evidențierea localizării structurilor secretoare (forma și conținutul lor).

Plantele speciilor analizate dezvoltă frunze simple, întregi, sesile, dar de forme diferite: *H. perforatum* are frunze ovat-alungite, obtuze, glabre; *H. elegans* – ovat-lanceolate; *H. hirsutum* – ovat sau ovat-alungite, dens pubescente pe întreaga suprafață; *H. tetrapterum* – obtuze de formă eliptică sau alungit-ovată.

Caracterele distinctive pentru frunzele speciilor g. *Hypericum* 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 sau pe toată suprafața); frecvența (dense sau rare) (fig. 2.1).

Analiza microscopică a frunzei de *H. perforatum* a permis identificarea glandelor negre cu conținut de antracenderivați, de formă ovală, localizate pe apexul și marginea limbului (fig 2.1 A,

B), și buzunarelor translucide, mici, dens distribuite pe toată suprafața limbului foliar (fig. 2.1 C).

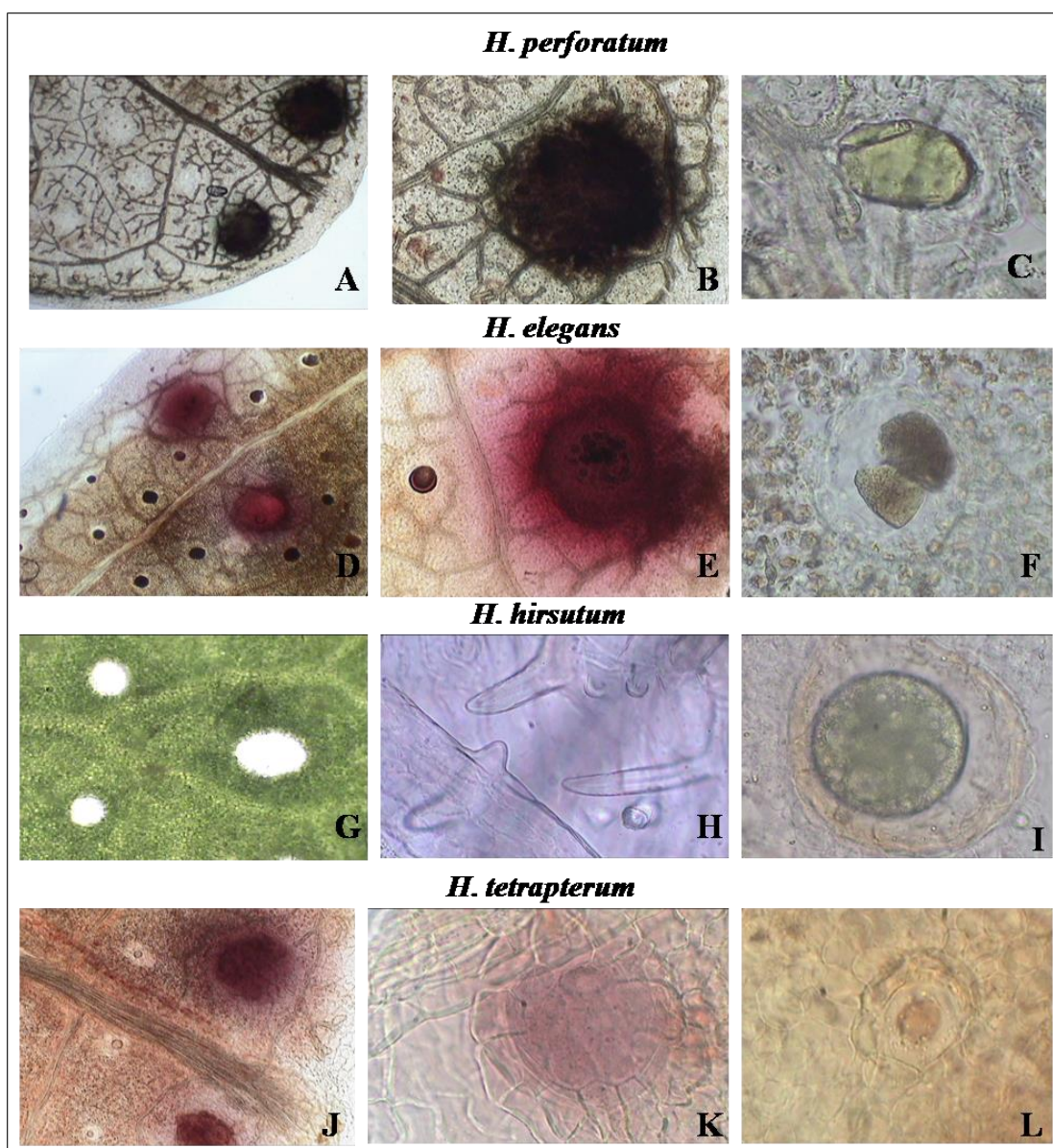


Fig. 2.1. Structuri secretoare ale frunzelor speciilor din genul *Hypericum*: *H. perforatum* (A, x4; B, x10; C, x40); *H. elegans* (D, x4; E, x10; F, x40); *H. hirsutum* (G, x4; H, x40; I, x40); *H. tetrapterum* (J, x4; K, x40; L, x40)

Specia *H. elegans* se caracterizează prin prezența pe limbul frunzei a ambelor tipuri de structuri secretoare de formă sferică. Glandele negre au fost identificate pe marginea limbului (fig. 2.1 D, E), iar buzunarele translucide mici, dense au fost prezente pe toată suprafața frunzei (fig. 2.1 F). Specia *H. hirsutum* s-a evidențiat anatomic prin: prezența pe ambele suprafețe ale frunzei a tricomiali unicelulari, denși și a papilelor (fig. 2.1 H); lipsa glandelor negre, prezența buzunarelor translucide rotunde, mici, vizualizate pe toată suprafața limbului foliar (fig 2.1 G, I). Specia *H. tetrapterum* se cracterizează prin prezența glandelor negre pe marginea și pe apexul frunzelor (fig. 2.1 J, K) și cu buzunare translucide pe toată suprafața limbului (fig. 2.1 L).

Structurile secretoare de pe sepalele florilor, de asemenea, au rol diagnostic în determinarea speciilor (fig. 2.2). Sepalele la sp. *H. perforatum* sunt alungit-lanceolate, cu glande negre ovale pe apexul limbului (fig. 2.2 A), dar rare pe margini (fig. 2.2 B); buzunarele translucide de formă alungită și canalele secretoare cu un conținut galben au fost identificate între nervuri pe toată suprafața (fig. 2.2 B, C).

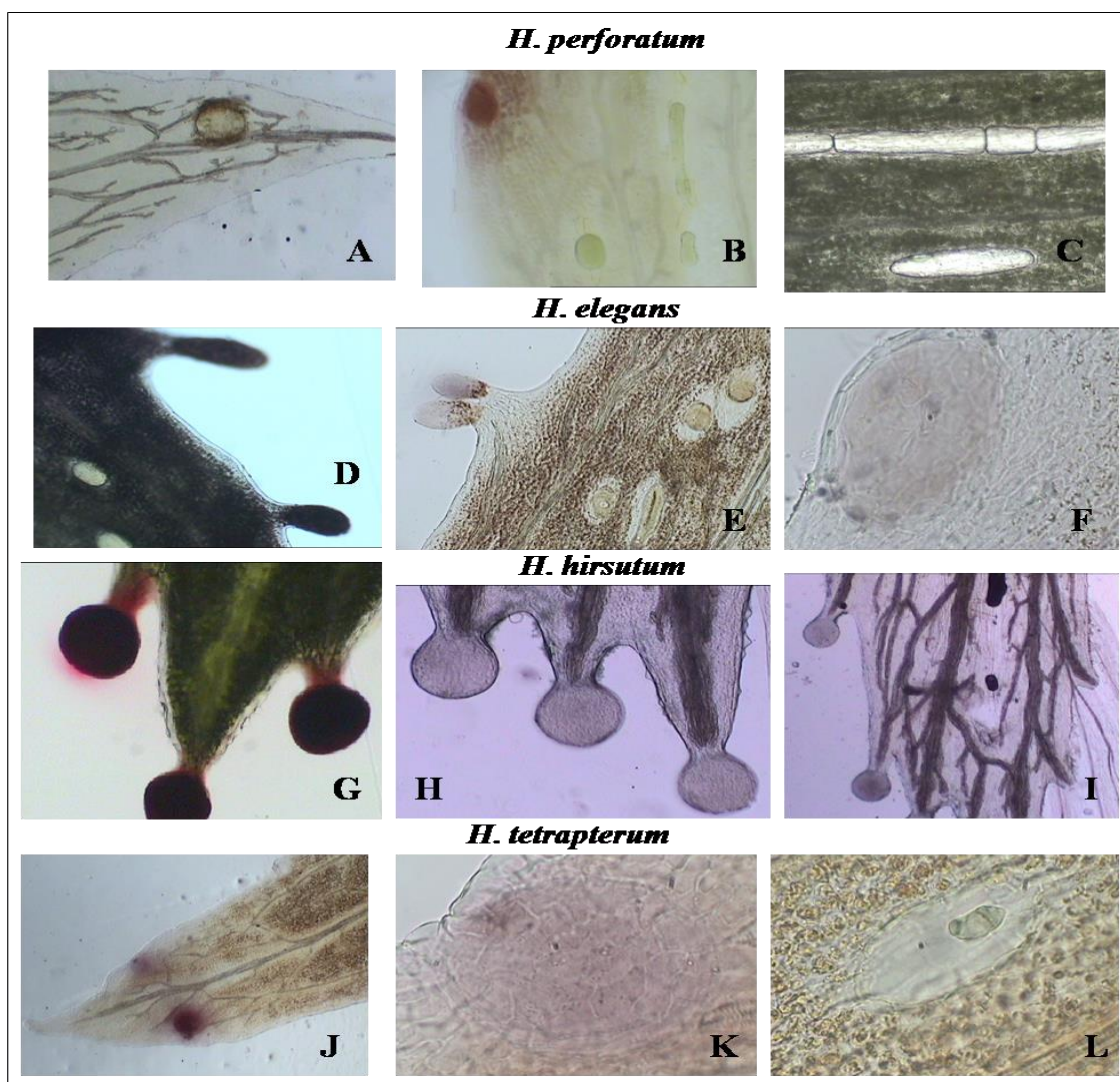


Fig. 2.2. Structuri secretoare ale sepalelor speciilor din genul *Hypericum*: *H. perforatum* (A, x10; B, x4; C, x10); *H. elegans* (D, x4; E, x10; F, x40); *H. hirsutum* (G, x40; H, x40; I, x40); *H. tetrapterum* (J, x10; K, x40; L, x40)

Structurile distinctive ale sp. *H. elegans* sunt glandele negre ovale, pe picioruș lung, cu aspect curbat, situate pe marginea și vârful sepalelor (fig 2.2 D, E), pe margini sunt, de asemenea, localizate și glande negre, oval-convexe (fig 2.2 F); buzunarele translucide de formă oval-alungită se găsesc pe toată suprafața sepalelor (fig. 2.2 E). Specia *H. hirsutum* se caracterizează prin prezența glandelor negre, sferice, pe piciorușe scurte de-a lungul marginii și a apexului (fig. 2.2 G, H; I). La specia *H. tetrapterum* glandele negre sferice sau oval-alungite predominant se observă

la vârfuri, mai rar pe margini (fig. 2.2 J), iar buzunarele translucide de formă ovală sunt distribuite între nervuri pe întreaga suprafață (fig. 2.2 L).

La toate speciile studiate petalele sunt libere, galben-aurii, inegale, alungit-eliptice, tăiate oblic la vârf. Localizarea, forma și culoarea structurilor secretoare corelează cu specia g. *Hypericum* (fig. 2.3).

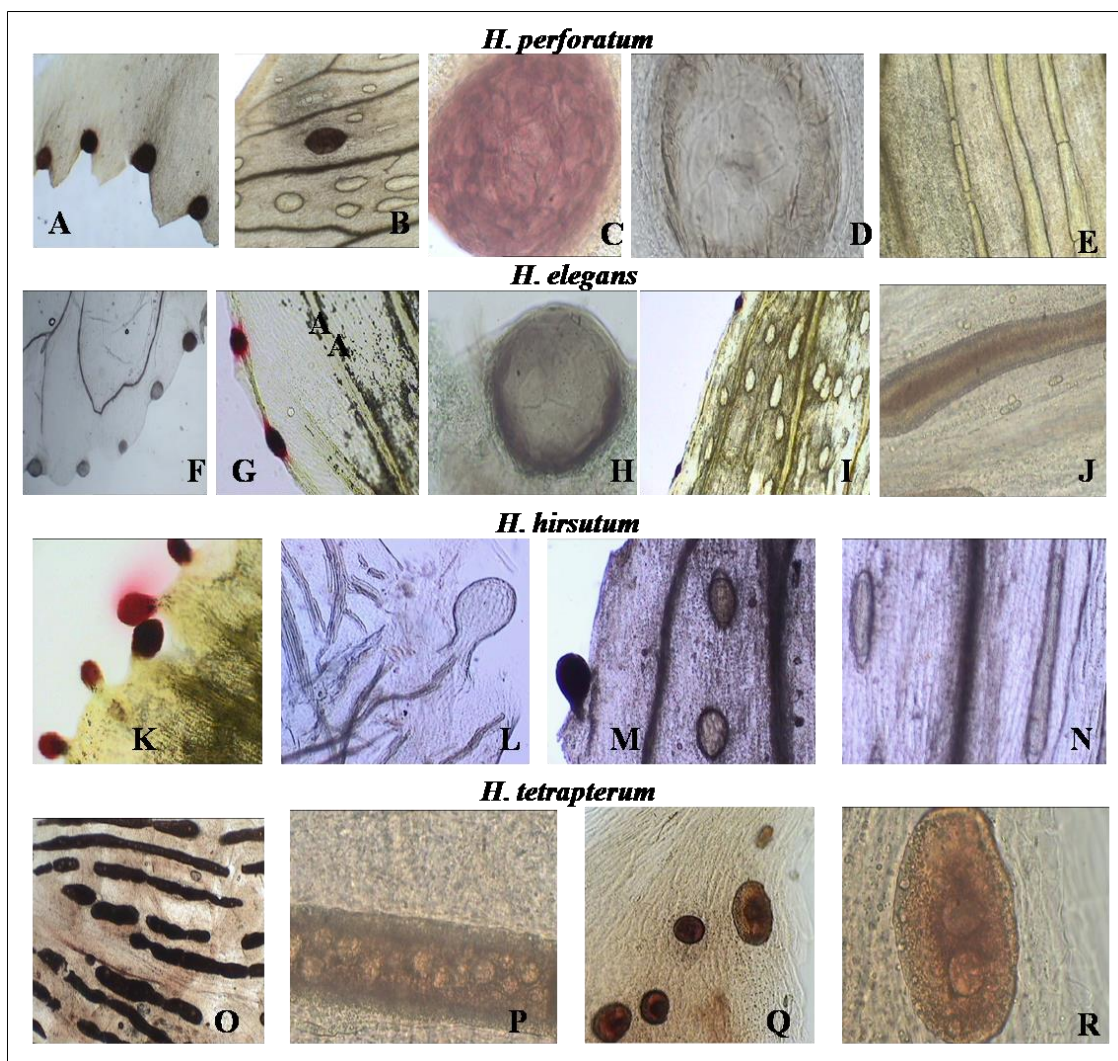


Fig. 2.3. Structuri secretoare ale petalelor speciilor din genul *Hypericum*: *H. perforatum* (A, x4; B, x4; C, x40; D, x40; E, x10); *H. elegans* (F, x4; G, x4; H, x40; I, x4; J, x10); *H. hirsutum* (K, x4; L, x10; M, x10, N, x10); *H. tetrapterum* (J, x10; O, x4; P, x40; Q, x10, R, x40)

Pentru sp. *H. perforatum* și *H. elegans* sunt caracteristice glande negre sferiforme, localizate pe marginea oblică a petalelor (fig. 2.3 A, C, F, H), iar la *H. elegans* și de formă ovală, rar localizate pe marginea petalei la bază (fig.2.3 G). La ambele specii, buzunarele translucide ovale sau alungite sunt localizate între nervuri (fig. 2.3 B, D, I), de asemenea, sunt menționate și canalelele secretoare (fig. 2.3 E, J). Specia *H. hirsutum* se deosebește anatomic prin prezența glandelor negre de formă ovală, cu un picioruș scurt pe marginea petalelor (fig. 2.3 K, L, M) și a

buzunarelor translucide, alungite pe toată suprafața (fig. 2.3 M, N). Canalele secretoare (fig. 2.3 O, P) sunt menționate pe partea superioară a petalelor, buzunarele de formă ovală cu conținut galben s-au observat doar la baza petalelor la sp. *H. tetrapterum* (fig. 2.3 Q, R).

Sunt importante caracteristicile tulpinilor pentru identificarea speciilor studiate: *H. perforatum* și *H. elegans* – forma circulară cu 2 coaste laterale, suprafața glabră; *H. hirsutum* – forma circulară, fără coaste longitudinale, pubescentă; *H. tetrapterum* – tetramuchiata, cu 4 coaste longitudinale, suprafața glabră.

Astfel, *screening*-ul rezultatelor studiului microscopic la 4 specii de *Hypericum* din flora spontană a RM a permis evidențierea indicilor microscopici cu rol de identificare a speciilor: particularitățile structurilor secretoare (tipul – glande, buzunare și canale secretoare, distribuția și frecvența pe frunze și elemente florale); numărul de coaste pe tulpini și modul de aranjare; 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 Române*, ed. X și a *Farmacopeei Europene* (Ph. Eur.). Solvenții cu grad „pentru cromatografie” (acetonitril, acid acetic glacial, metanol), substanțele de referință, utilizate pentru analize chimice prin metoda de cromatografie pe strat subțire (CSS) și prin metoda de cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC) au fost procurate de la Sigma-Aldrich (rutozida, izocvercetrozida, cvercitolul, apigenina-7-glicozida, I3, II8–biapigenina, acidul clorogenic, acidul cafeic, hipericina, hiperforina), HWI pharma services GmbH (hiperozida) și Ph. Eur. Referens standard (cvercetrozida).

Reacții de identificare. Identificarea diferitor grupuri de compuși chimici s-a efectuat în părțile aeriene de *H. perforatum*., *H. elegans*., *H. hirsutum* și *H. tetrapterum*.

Identificarea substanțelor tanante. Prepararea probelor de analizat: 1,0 g produs vegetal mărunțit se extrage cu 100 ml de apă purificată, pe baie de apă, timp de 20-30 de minute și se filtrează prin vată. Infuzia obținută se folosește la efectuarea reacțiilor calitative [101, 102].

1. La 2-3 ml de soluție de analizat se adaugă 4-5 picături de soluție de alaun de fier și amoniu. Culoarea negru-verzuie denotă prezența substanțelor tanante condensate.
2. La 1 ml de soluție de analizat se adaugă 2 ml de acid acetic de 10% și 1 ml acetat de plumb 10%. În prezența substanțelor tanante hidrolizabile se formează un precipitat. În cazul respectiv, precipitatul nu s-a format, dar după ce s-au adăugat 5 picături de soluție de alaun de fier și amoniu de 1% și 0,1 g de acetat de plumb, s-a obținut o colorație negru-verzuie, care a dovedit prezența substanțelor tanante condensate.

3. La 2 ml de soluție de analizat se adaugă câteva cristale de NaNO_2 și 2 picături de HCl 0,1 M. Absența colorației cafenii denotă prezența substanțelor tanante condensate.

Rezultatele reacțiilor au demonstrat prezența substanțelor tanante condensate în părțile aeriene din cele 4 specii de *Hypericum* analizate.

Identificarea saponozidelor. Pentru identificarea saponozidelor se pregătește o infuzie 1:10 la baia de apă timp de 10 min.

Reacția de formare a spumei. Se iau 2 eprubete, în una se adaugă 5 ml de soluție de HCl 0,1 M, iar în a doua – 5 ml de NaOH 0,1 M. În ambele eprubete se adaugă câte 2-3 picături de infuzie și se agită energic [96, 97]. După adăugarea extractelor din părțile aeriene de *H. perforatum*, *H. elegans*, *H. tetrapterum* s-a format o spumă egală ca volum și stabilă, ce indică prezența saponozidelor triterpenice, iar în eprubetele în care s-a adăugat infuzie din *H. hirsutum* nu s-a observat spumă, fapt care relevă lipsa saponozidelor.

Identificarea alcaloizilor. Prepararea probelor de analizat: 1,0 g de produs vegetal mărunțit se plasează într-un balon de 100 ml, se adaugă 25 ml de HCl 1% și se încălzește timp de 5 minute la baia de apă clocotindă. După răcire extractul se trece printr-un filtru de hârtie [101].

Extractul se plasează în eprubete, câte 1 ml per eprubetă și se adaugă atent, în picături, reactivile. În prezența alcaloizilor ar trebui să se formeze: precipitat de culoare roșie-portocalie, cu reactivul *Dragendorff*; precipitat brun, cu reactivul *Wagner-Bouchardat*; cu soluție de tanin – precipitat amorf, albui sau gălbui; cu soluții de acizi: fosfomolibdenic – precipitat gălbui, care își schimbă culoarea în albastru sau în verde, fosfowolframic – precipitat albui, picric – precipitat galben. Însă toate reacțiile au fost negative, ceea ce indică absența alcaloizilor în speciile studiate de *Hypericum*.

Analiza cromatografică pe strat subțire

Prin intermediul analizei cromatografice pe strat subțire (CSS) s-a demonstrat prezența flavonoidelor, hipericinei și a acizilor fenilpropanici în părțile aeriene ale speciilor de *Hypericum*.

Pregătirea soluției de analizat. 1,0 g de produs vegetal (probă exactă) mărunțit, trecut prin sita, cu orificiile de 1 mm, se plasează într-un balon cu dop rodat de 100 ml, se adaugă 50 ml de alcool etilic de 70%. Balonul se cântărește, apoi se încălzește la fierbere pe baia de apă, la reflux timp de 90 de minute; apoi balonul iar se cântărește și se adaugă alcool etilic până la masa inițială. Extractul se filtrează și se răcește timp de 30 de minute (soluție extractivă) [101, 102, 103].

Soluția de referință: soluții de 0,1% de rutozidă, cvercetol, hiperozidă, acid clorogenic și de hipericină. **Faza staționară:** plăci de silicagel F_{254} . **Faza mobilă 1:** acid formic anhidru: apă: acetat de etil (6:9:90). Migrare – 10 cm. **Faza mobilă 2:** acetat de etil: acid formic: apă (85:10:15).

Migrare – 9,6 cm. Uscarea plăcilor: 100-105 °C, timp de 10 minute. *Detecție*: se pulverizează placa cu o soluție de 10 g/l reactiv NEU (difenil-boriloxietilamină) în metanol și apoi cu o soluție de 50 g/l de polietilenglicol 4000 (PEG) în metanol. După 30 de minute se examinează placa în lumina UV la 366 nm [37, 104, 105].

Plăcile cromatografice au fost analizate vizual în lumina vizibilă și în lumina UV 366 nm. Identificarea compușilor chimici s-a realizat în două sisteme de separare: faza mobilă 1 și faza mobilă 2 (tabelul 2.1). Pe plăcile cromatografice sunt prezente trei tipuri de spoturi: fluorescență galben-portocalie corespunzătoare flavonelor, fluorescență albastră – compușilor fenilpropanici și de culoare roșie, caracteristică hipericinelor (fig. 2.4).

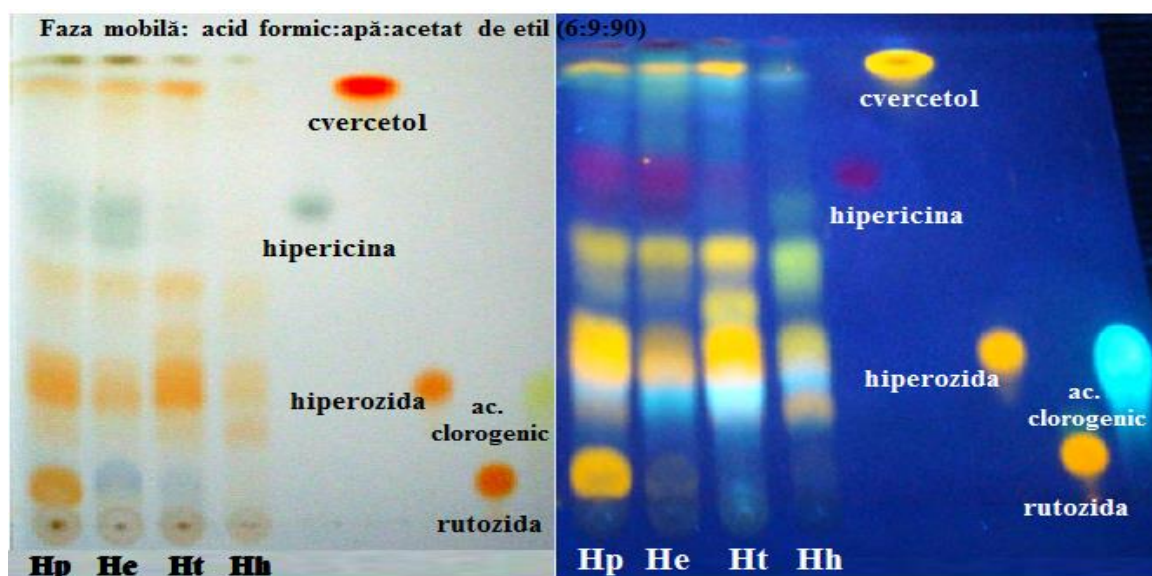


Fig. 2.4. Cromatograma pe strat subțire a extractelor hidroetanolic din părțile aeriene a speciilor de *Hypericum*: *H. perforatum* (Hp), *H. elegans* (He); *H. tetrapterum* (Ht), *H. hirsutum* (Hh)

Intensitatea spoturilor și valorile R_f-urilor sunt caracteristicile esențiale (tabelul 2.1), care stau la baza identificării de diferențe între speciile de *Hypericum* analizate. Rutozida cu spot de culoare galbenă 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 rutozidei. Spotul de culoare portocalie corespunzător hiperozidei 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. Acidul clorogenic, având fluorescență albastră, este atestat în toate plantele supuse studiului, dar cu o intensitate mai mică la *H. perforatum*. Hipericina este prezentă în toate speciile studiate, având o fluorescență roșie. Mai intense sunt spoturile la *H. perforatum*, *H. elegans*, *H. tetrapterum*. Spotul roșu cu R_f = 0,79, situat mai jos de hipericină este caracteristic pseudohipericinei (fig. 2.4).

Tabelul 2.1. Valorile Rf și culoarea fluorescenței a compușilor chimici de pe cromatogramele soluțiilor extractive din părțile aeriene a speciilor genului *Hypericum*

Soluțiile etanolice din părțile aeriene ale speciilor de <i>Hypericum</i>	Rf	Rf	Culoarea spoturilor după dezvoltare		Compusul chimic identificat
	faza mobilă 1	faza mobilă 2	Fluorescența spotului, în lumina UV 366 nm	Culoarea spotului, în lumina vizibilă	
<i>H. perforatum</i>	0,69	0,91	roșie	gri-albăstră	Hipericina
	0,94	0,96	galbenă	oranj	Cvercitol
	0,29	0,50	galbenă	oranj	Hiperozida
	0,08	0,21	galbenă	oranj	Rutozida
	0,24	0,44	albastră deschisă	galben verzuie	Acid clorogenic
<i>H. elegans</i>	0,67	0,89	roșie	gri-albăstră	Hipericina
	0,94	0,97	galbenă	oranj	Cvercitol
	0,29	0,49	galbenă	oranj	Hiperozida
	0,08	0,20	galbenă	oranj	Rutozida
	0,23	0,42	albastră deschisă	galben verzuie	Acid clorogenic
<i>H. tetrapterum</i>	0,67	0,89	roșie	gri-albăstră	Hipericina
	0,94	0,97	galbenă	oranj	Cvercitol
	0,29	0,49	galbenă	oranj	Hiperozida
	0,23	0,41	albastră deschisă	galben verzuie	Acid clorogenic
<i>H. hirsutum</i>	0,67	0,89	roșie	gri-albăstră	Hipericina
	0,94	0,97	galbenă	oranj	Cvercitol
	0,29	0,49	galbenă	oranj	Hiperozida
	0,23	0,41	albastră deschisă	galben verzuie	Acid clorogenic

Pentru identificarea compușilor fenolici au fost analizate soluțiile hidroetanolicе 70% din produsele vegetale (*Hyperici herba*) de *H. perforatum*, colectate în diferite perioade de dezvoltare și din diferite zone geografice: început de butonizare (1); butonizare (2); început de înflorire (3); înflorire în masă (4); început de fructificare (5); fructificare (6); sfârșitul fructificării (7); PV *Hyperici herba*, colectat la nord (8) și la sud (9). Au fost folosite următoarele substanțe de referință, toate procurate de la Sigma-Aldrich: rutozida (10), hiperozida (11), izocvercetrozida (12), cvercetrozida (13), cvercitolul (14), apigenina-7-glicozida (15), acidul clorogenic (16), acidul cafeic (17), hipericina (18). După dezvoltare placa cromatografică a fost vizualizată la lumina zilei (A) și la UV la 366 nm (B) (fig. 2.5).

De remarcat faptul că toți compușii de referință, luați în studiu, au fost identificați în soluțiile extractive din PV *Hyperici herba*, cu excepția apigenina-7-glicozidei (Rf = 0,58), care nu s-a regăsit în probele analizate (fig. 2.5).

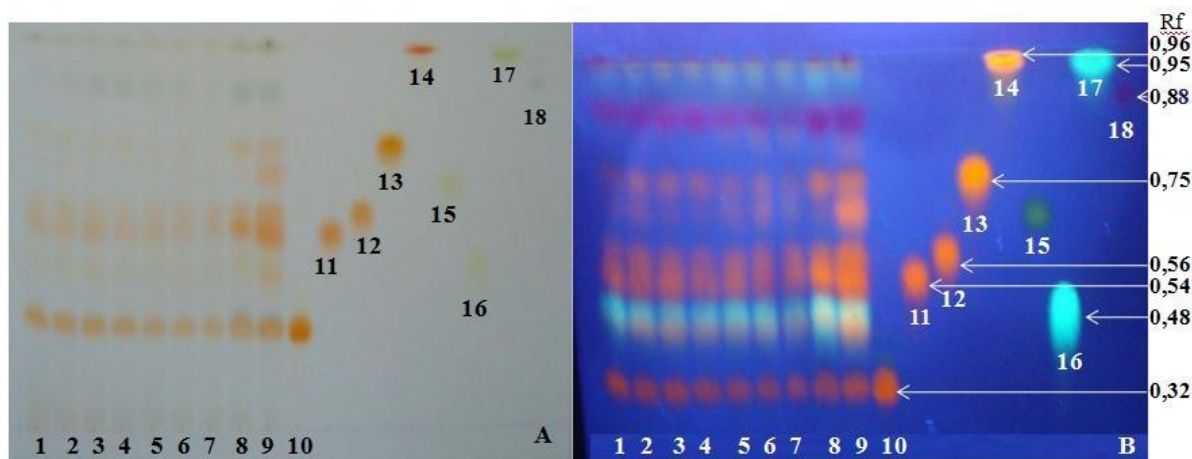


Fig. 2.5. Cromatograma pe strat subțire a extractelor hidroetanolicе din părțile aeriene a speciei *H. perforatum* în diferite faze de vegetație și zone geografice

Analiza prin metoda de cromatografie de lichide de înaltă performanță

Pentru identificarea compușilor fenolici în extractele etanolicе din părțile aeriene de *H. perforatum*, *H. elegans*, *H. hirsutum*, *H. tetrapterum*, colectate în faza de înflorire în masă, a fost folosită și metoda de cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC). Studiile au fost efectuate în cadrul Centrului Științific al Medicamentului USMF „Nicolae Testemițanu”.

Prepararea probelor de analizat. Câte 0,5 g de produs vegetal mărunțit, de la fiecare specie s-a extras cu 50 ml de soluție de acid citric de 0,2%, în alcool etilic de 80%, pe baia de apă, la temperatura de $60 \pm 2^\circ\text{C}$, timp de 45 de minute, agitând periodic. Soluțiile extractive s-au filtrat printr-un tampon de vată, într-un balon cotat, cu o capacitate de 100 ml. Aceleași acțiuni de extracție au fost aplicate repetat pentru produsele respective. Extracția sumară se răcește până la temperatura de 20°C și se completează până la volumul de 100 ml cu un extragent pur. Alicota se centrifughează timp de 5 minute, la 3000-4000 rpm. Câte 10 μl de probă și de soluție-standard se injectează în sistemul cromatografic. Toate operațiunile de preparare a probelor trebuie efectuate în încăperi întunecate pentru a preveni oxidarea hiperforinei sub influența luminii [106].

A fost folosit sistemul cromatografic din seria *Jasco LC-2000*, echipat cu două pompe, amestecator dinamic de presiune înaltă, injector manual, termostat de coloane și detector UV-VIS, cu un șir de diode (DAD). Separarea cromatografică s-a realizat pe coloana analitică, cu faza inversă *Kromasil 100-5-C4*, 4,6 x 100 mm. Faza mobilă folosită a fost formată din doi componenți: A – acetonitril, B – soluție KH_2PO_4 0,1 M + H_3PO_4 0,02 M și a fost pompată cu viteza volumetrică 1,5 ml/min. Compoziția pentru hiperforină și pentru adhiperforină: 85% A în B (regim isocratic). Soluția de etalonare conține 80 mg/l de hiperforină în faza mobilă. Pentru alți componenți s-a folosit următorul gradient: 5-32% A în B, 0-8 minute; 32-73% A în B, 8-10 minute; 73% A în B, 10-13 minute. Apoi coloana se echilibrează timp de 5 minute cu faza inițială (5% A în B), înainte

de a injecta proba următoare. Soluția de etalonare conține 20 mg/l de hipericină și câte 40 mg/l de acid clorogenic, hiperozidă și de apigenină, în amestec acetonitril:apă (1:1) [106].

Produsele extractive din speciile genului *Hypericum* conțin un ansamblu de compuși chimici din diverse grupuri. De aceea, în scopul asigurării selectivității necesare, detecția a fost efectuată la diferite lungimi de undă. Identificarea compușilor chimici s-a efectuat după spectrele UV și prin compararea timpilor de retenție (tR) a lor cu standardele analizate în aceleași condiții experimentale. 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 floroglucinol a fost efectuată la o lungime de undă de 274 nm (fig. A1.1). 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 (fig. A1.2).

În urma analizei calitative, s-a demonstrat prezența acidului clorogenic (tR≈4,4 min) și a biapigeninei (tR≈10,74 min), în extractele hidroetanolice din patru specii de *Hypericum*, incluse în studiu. Detecția acestor compuși s-a efectuat la o lungime de undă de 328 nm (fig. 2.6) [107].

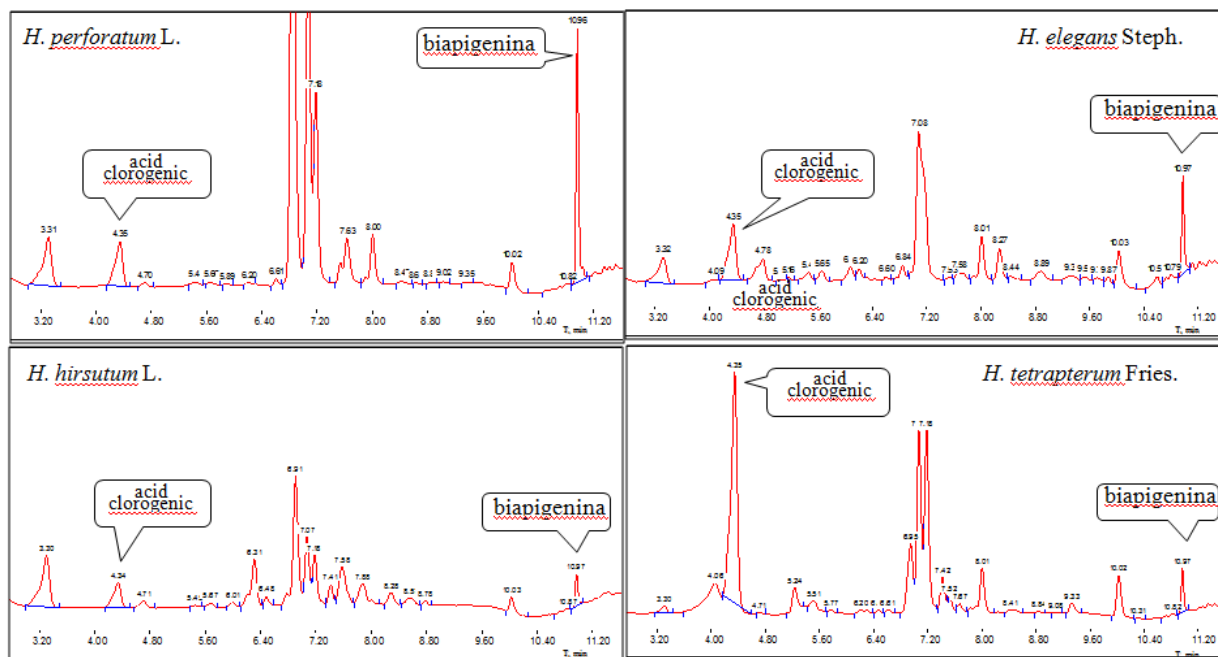


Fig. 2.6. Cromatogramele HPLC ale extractelor hidroetanolice din patru specii genului *Hypericum*

La lungimea de undă de 360 nm au fost detectați compuși ce fac parte din grupul flavonozidelor: rutozida (tR≈6,84 min), hiperozida (tR≈7,07 min), izocvercetrozida (tR≈7,18 min) (fig. A1.3).

2.3. Analiza cantitativă a compușilor chimici din speciile 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) [108]. De asemenea, prin utilizarea acestei metode, a fost efectuat studiul dinamicii acumulării acestor compuși în specia *H. perforatum* L., în funcție de faza fenologică și de zona geografică. Dozarea flavonoidelor din produsele vegetale este bazată pe formarea de complecși colorați în galben cu clorură de aluminiu. Măsurările absorbantei au fost efectuate la spectrofotometrul UV-VIS Agilent-8453 în cadrul CȘM USMF „Nicolae Testemițanu”.

Determinarea spectrofotometrică a totalului de flavonoide și a derivaților de antracen în produsele vegetale ale speciilor g. *Hypericum*

Dozarea spectrofotometrică a flavonoidelor. 1,0 g de produs vegetal (probă exactă) mărunțit, trecut prin sita, cu orificiile de 1 mm, se plasează într-un balon cu dop rodat de 100 ml, apoi se adaugă 50 ml de alcool etilic de 70%. Balonul se cântărește, extragerea se face la baie de apă timp de 90 de minute la reflux. După aceasta balonul se cântărește din nou și, la necesitate, se adaugă alcool etilic până la masa inițială, apoi soluția extractivă se filtrează.

Prepararea soluției de analizat: 1 ml de soluție extractivă se transferă într-un balon cotat de 50 ml, se adaugă 2 ml soluție alcoolică de AlCl_3 3% și se suplinește cu alcool etilic de 95% (soluția de analizat A). Soluția de referință se pregătește în felul următor: 1 ml de soluție extractivă se transferă într-un balon cotat de 50 ml, se adaugă 2-3 picături de soluție de acid acetic și se completează cu alcool etilic de 95% până la cotă (soluția de referință A).

Concomitent, se determină absorbanta soluției de rutozidă (substanță standard). 0,025 g (probă exactă) de rutozidă se transferă într-un balon cotat de 50 ml și se dizolvă în 30 ml de alcool etilic de 70 %, se încălzește pe baie de apă până la dizolvare. Apoi se răcorește și se aduce până la cotă cu alcool etilic de 70% (soluția de analizat A a rutozidei). Soluția A de rutozidă (1 ml) se transferă într-un balon cotat de 25 ml, se adaugă soluție alcoolică de AlCl_3 3% (1 ml) și se aduce până la cotă cu alcool etilic de 95% (soluția de analizat B a rutozidei). Soluția de referință a rutozidei: 1 ml de soluție A de rutozidă se transferă într-un balon cotat de 25 ml, se adaugă 1 picătură de soluție de acid acetic și se aduce până la cotă cu alcool etilic de 95% (soluția de referință B a rutozidei) [108, 109].

Absorbanta soluțiilor analizate se măsoară la lungimea de undă de 412 nm, peste 40 de minute după prepararea soluțiilor [103, 104].

Totalul de flavonoide (X), exprimat în % echivalent rutozidă, se calculează după formula:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 1 \cdot 50 \cdot 25 \cdot (100 - w)}, \text{ în care:} \quad (2.1)$$

X – cantitatea de flavonoide, %;

A – absorbanta soluției de analizat;

A_0 – absorbanta soluției de referință;

m_0 – masa rutozidei, g;

m – masa produsului vegetal, g;

w – pierderea în masă, la uscare, %.

Rezultatele dozării spectrofotometrice a totalului de flavonoide în produsele vegetale ale speciilor g. *Hypericum* sunt prezentate în tabelul 2.2. Spectrele de absorbție UV-VIS a compușilor complecși de culoare galbenă (formați între flavonoide din extractele hidroetanolicе și clorura de aluminiu) sunt prezentate în Anexa 1 (fig. A1.4 – 1.8).

Rezultatele obținute denotă faptul că totalul de flavonoide (%) este înalt în părțile aeriene (Mediana = 5,58; IQR = 0,01) și în flori la specia *H. perforatum* (Mediana = 8,22; IQR = 0,19). Cel mai înalt conținut de flavonoide în frunze este înregistrat la specia *H. tetrapterum* (Mediana = 8,57; IQR = 0,54), iar în tulpini, la toate speciile, totalul de flavonoide este cel mai mic (tabelul 2.2, tabelul A1.1).

Tabelul 2.2. Totalul de flavonoide (%) în produsele vegetale analizate la 4 specii de *Hypericum*

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)
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)

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

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 $p = 0,002$).

Dozarea totalului derivaților de antracen, în diverse produse vegetale, s-a efectuat prin intermediul tehnicii spectrofotometrice UV/VIS, elaborată de către Pravdivțeva O. *et al.* (2008) [107, 110, 111].

Prepararea soluției extractive. 1,0 g de produs vegetal (probă exactă) mărunțit, trecut prin sită cu orificii de 1 mm, se plasează într-un balon cu dop rodat de 100 ml, se adaugă 50 ml de alcool etilic de 70%. Balonul se cântărește, apoi se fierbe pe baia de apă timp de 90 de minute, la

reflux. După aceasta balonul iar se cântărește și se adaugă alcool etilic până la masa inițială. Extractul se filtrează și se răcorește timp de 30 de minute.

Prepararea soluției de analizat: 5 ml soluție extractivă din produsele vegetale studiate se transferă într-un balon cotat de 50 ml și se completează cu alcool etilic până la cotă. Soluția de referință este alcoolul etilic. Absorbanța soluțiilor analizate se măsoară la lungimea de undă de 591 nm (fig. A1.9-1.12) [111].

Concentrația derivaților de antracen (%), în recalcul la hipericină în produsul vegetal absolut uscat, se calculează conform formulei 2.2:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{718 \cdot m \cdot 5 \cdot (100 - w)}, \text{ în care:} \quad (2.2)$$

X – concentrația derivaților de antracen, %;

A – absorbanța soluției de analizat;

718 – absorbanța specifică a soluției de hipericină, 1%;

m – masa produsului vegetal, g;

w – pierderea în masă, la uscare, %.

Totalul derivaților de antracen (%), în recalcul la hipericină, este mai înalt în părți aeriene de *H. elegans* (Mediana = 0,37; IQR = 0,005), urmat de *H. perforatum* (Mediana = 0,22; IQR = 0,005), *H. tetrapterum* (Mediana = 0,17; IQR = 0,005), *H. hirsutum* (Mediana = 0,06; IQR = 0,003). Concentrația acestui grup de compuși chimici în flori este mai mare la sp. *H. perforatum* (Mediana = 0,58; IQR = 0,004), urmată de *H. elegans* (Mediana = 0,53; IQR = 0,005), *H. tetrapterum* (Mediana = 0,35; IQR = 0,008), *H. hirsutum* (Mediana = 0,08; IQR = 0,002). În frunze concentrația derivaților de antracen este mai joasă comparativ cu produse vegetale menționate mai sus: *H. perforatum* – Mediana = 0,26; IQR = 0,006, *H. elegans* – Mediana = 0,21; IQR = 0,004, *H. tetrapterum* – Mediana = 0,21; IQR = 0,007, *H. hirsutum* – Mediana = 0,14; IQR = 0,007. Totalul derivaților de antracen în tulpini este cel mai jos: *H. perforatum* – Mediana = 0,036; IQR = 0,001, *H. elegans* – Mediana = 0,032; IQR = 0,001, *H. tetrapterum* – Mediana = 0,035; IQR = 0,001, *H. hirsutum* – Mediana = 0,015; IQR = 0,004 (fig. A2.6-2.9, tabelul A1.2).

Au fost determinate concentrațiile totalului de flavonoide și derivaților de antracen în părțile aeriene de *H. perforatum*, în dependență de faza de dezvoltare și zona geografică de colectare.

Conținutul de flavonoide (%) în părțile aeriene de *H. perforatum* depinde de faza de dezvoltare. Conținutul maxim este la începutul înfloririi (Mediana = 6,10; IQR = 0,057) (tabelul

2.4). Totalul derivaților de antracen (%), exprimat în echivalentul hipericinei, în *Hyperici herba* este maxim în faza începutului de înflorire (Mediana = 0,29; IQR = 0,005) (tabelul 2.3)

Tabelul 2.3. Conținutul total de flavonoide și derivați de antracen în *Hyperici herba*, în funcție de faza fenologică

Fazele de dezvoltare a speciei <i>H. perforatum</i>	Totalul de flavonoide, exprimat în % în echivalentul rutozidei, Me (IQR)	Totalul derivaților, de antracen exprimat în % în echivalentul hipericinei, Me (IQR)
Butonizare	5,848 (0,050)	0,263 (0,006)
Începutul înfloririi	6,103 (0,057)	0,285 (0,005)
Înflorire în masă	5,786 (0,030)	0,268 (0,003)
Începutul fructificării	4,872 (0,005)	0,195 (0,007)
Fructificare	4,872 (0,005)	0,125 (0,001)

Notă: diferența totalului de flavonoide ($p = 0,000166$) și a totalului derivaților de antracen ($p = 0,000122$) în produsele analizate este statistic semnificativă

Datele experimentale au demonstrat o concentrație mai mică a totalului de flavonoide în părțile aeriene colectate la nordul țării și un conținut mai înalt pentru produsele colectate la sudul țării (tabelul 2.4, tabelul A1.3).

Tabelul 2.4. Conținutul total de flavonoide și derivați de antracen în *Hyperici herba*, în funcție de locul colectării

Zona geografică de creștere a sp. <i>H. perforatum</i>	Totalul de flavonoide (%), exprimat în echivalentul rutozidei, Me (IQR)	Totalul derivaților de antracen (%), exprimat în echivalentul hipericinei, Me (IQR)
Nord (s. Tîrnova, Dondușeni)	4,33 (0,082)	0,32 (0,002)
Centru (s. Nimoreni, Ialoveni)	5,78 (0,324)	0,27 (0,004)
Sud (s. Lopățica, Cahul)	8,45 (0,117)	0,22 (0,008)

Notă: diferențele totalului de flavonoide și a totalului derivaților de antracen ($p = 0,002$) în produsele analizate sunt statistic semnificative

În funcție de zona geografică, totalul de antracenderivați (%) este maxim în părțile aeriene de *H. perforatum*, răspândit în partea de nord al țării, iar totalul de antracenderivați în părțile aeriene colectate la sud a fost cel mai scăzut.

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

Condițiile metodei de dozare HPLC a compușilor fenolici (rutozida, hiperozida, izocvercetrozida, biapigenina, acidul clorogenic), naftodiantronelor (hipericina, pseudohipericina), floriglucinolilor (hiperforina, adhiperforina), în părțile aeriene ale speciilor *H. perforatum*, *H. elegans*, *H. hirsutum*, *H. tetrapterum* sunt prezentate în subcapitolul 2.2 [101]. Conținutul compușilor chimici în părțile aeriene la 4 specii ale g. *Hypericum* din flora spontană este prezentat în tabelul 2.5.

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*), totalul de acizi hidroxicinamici este mai mare în părțile aeriene de *H. tetrapterum* (10,7 mg/g). Rezultatele obținute denotă următoarele: conținutul de compuși chimici din diverse grupe este mai înalt în produsul vegetal de *H. perforatum*, fiind urmat de *H. tetrapterum* și de alte specii, supuse studiului (tabelul 2.5).

Tabelul 2.5. Concentrațiile unor compuși chimici, în părțile aeriene ale speciilor genului *Hypericum*, determinate prin metoda HPLC

Compușii chimici	Speciile genului <i>Hypericum</i>			
	<i>H. perforatum</i>	<i>H. elegans</i>	<i>H. hirsutum</i>	<i>H. tetrapterum</i>
Conținutul de compuși chimici, mg/g				
Hipericina	0,87	1,34	0,073	0,286
Pseudohipericina	1,19	1,53	0,018	0,340
Hiperforina + Adhiperforina (exprimat în echivalentul hipericinei)	27,9	–	–	–
Rutozida	16,6	3,41	3,39	3,61
Hiperozida	8,36	3,47	1,80	7,38
Izocvercitrözida	4,27	1,27	1,20	6,86
Totalul de heterozide flavonolice, exprimat în echivalentul hiperozidei	30,3	5,92	10,9	21,1
Totalul acizilor hidroxicinamici, exprimat în echivalentul acidului clorogenic)	2,21	1,82	1,90	10,7

Rezultatele au confirmat faptul că în produsul vegetal *Hyperici herba*, colectat de la sp. *H. perforatum*, conținutul de flavonoide este mai mare decât în părțile aeriene ale *H. elegans*, *H. hirsutum*, *H. tetrapterum*. Această stare de lucruri a impus necesitatea de a analiza, calitativ și cantitativ, flavonoidele în părțile aeriene ale sp. *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 satului Nimoreni.

Metoda de analiză HPLC implementată în studiu a fost preluată din surse bibliografice și ajustată la condițiile de lucru [112, 113, 114]. Pentru identificarea și determinarea calitativă a flavonoidelor s-a utilizat cromatograful de lichide de model *Agilent Technologies*, seria 1200, termostatul TCC G13116A, seria DE 63063824, detectorul DAD G 1315B, seria DE 43603042, injectorul manual P/N 7725i, degazatorul G 1322A, seria YP 62359783. Analiza s-a realizat în următoarele condiții de lucru: coloană analitică Zorbax Eclipse XBD – C 8, 250 mm x 4.6 mm, 5 μm; precoloana de același tip; faza mobilă - acetonitril:apă (30:70), cu adăugarea acidului acetic

glacial 1%; debitul 1 ml/min; temperatura +40°C; volumul de injectare 20 µl; detecția – ultraviolet 360 nm. Substanțele standard utilizate în cercetare au fost: rutozida, hiperozida, cvercetrozida, cvercetol, I3, II8-biapigenina.

Pregătirea probelor de analizat. 1,0 g (masă exactă) de produs vegetal *Hyperici herba*, mărunțit, trecut prin sita cu orificiile de 1 mm, se plasează într-un balon cu dop rodat de 100 ml, după care se adaugă 40 ml de alcool etilic de 70%. Balonul se cântărește, apoi se fierbe pe baia de apă, timp de 60 de minute, la reflux. Apoi balonul se cântărește și se suplimentează cu alcool etilic, până la masa inițială. Extractul se filtrează și se răcorește timp de 30 de minute (soluție extractivă). Din extractul obținut s-au luat 5 ml și s-au transferat într-un balon cotat de 10 ml; volumul a fost adus până la cotă cu alcool etilic de 70%. Ulterior, soluția de analizat s-a trecut printr-o membrană filtrantă cu dimensiunea porilor de 0,45 µm [112, 113, 114].

Identificarea derivaților de flavonol s-a efectuat prin compararea timpului de retenție a substanțelor standard și a compușilor din proba de analizat (fig. 2.7, fig. 2.8).

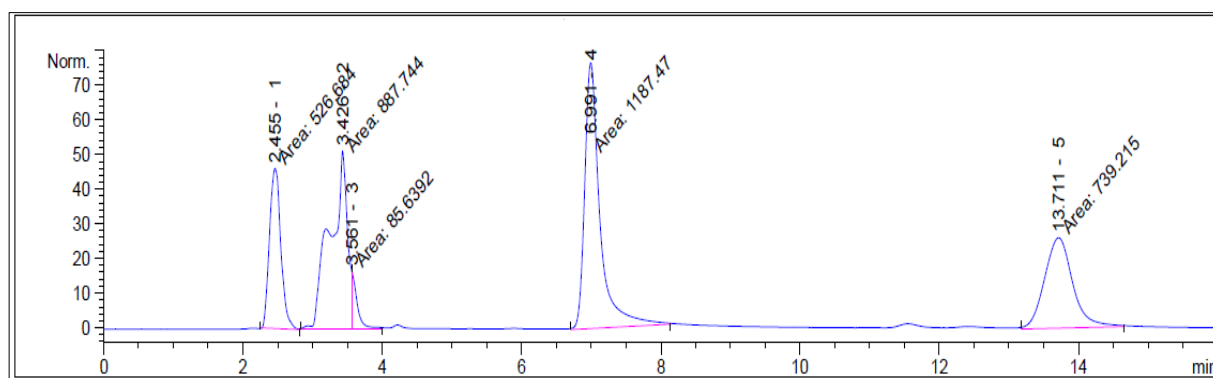


Fig. 2.7. Cromatograma HPLC a soluției formate din amestec de substanțe-standard: rutozidă (1), hiperozidă (2), cvercetrozidă (3), cvercetol (4), I3, II8-biapigenină (5)

Analiza cantitativă a flavonoidelor s-a realizat prin compararea ariei picurilor de compuși chimici din extractele respective cu ariile picurilor substanțelor de referință: rutozida (1), hiperozida (2), cvercetrozida (3), cvercetolul (4), I3, II8-biapigenina (5) (fig. 2.7, fig. 2.8). Conținutul de flavonoide (X, %) în părțile aeriene de *H. perforatum*, în raport la produs vegetal absolut uscat și la substanță standard, s-a calculat conform formulei 2.3:

$$X = \frac{S_x * m_{st} * 2,5 * 40 * 10 * 100 * 100}{S_{st} * 25 * 25 * m_{pr} * 5 * 100 * (100 - W)}, \text{ în care:} \quad (2.3)$$

S_x – aria picului flavonoidului determinat pe cromatograma probei de analizat;

S_{st} – aria picului flavonoidului pe cromatograma soluției standard;

m_{st} – masa substanței de referință, g;

m_{pr} – masa produsului vegetal, g;

W – pierderea prin uscare, %.

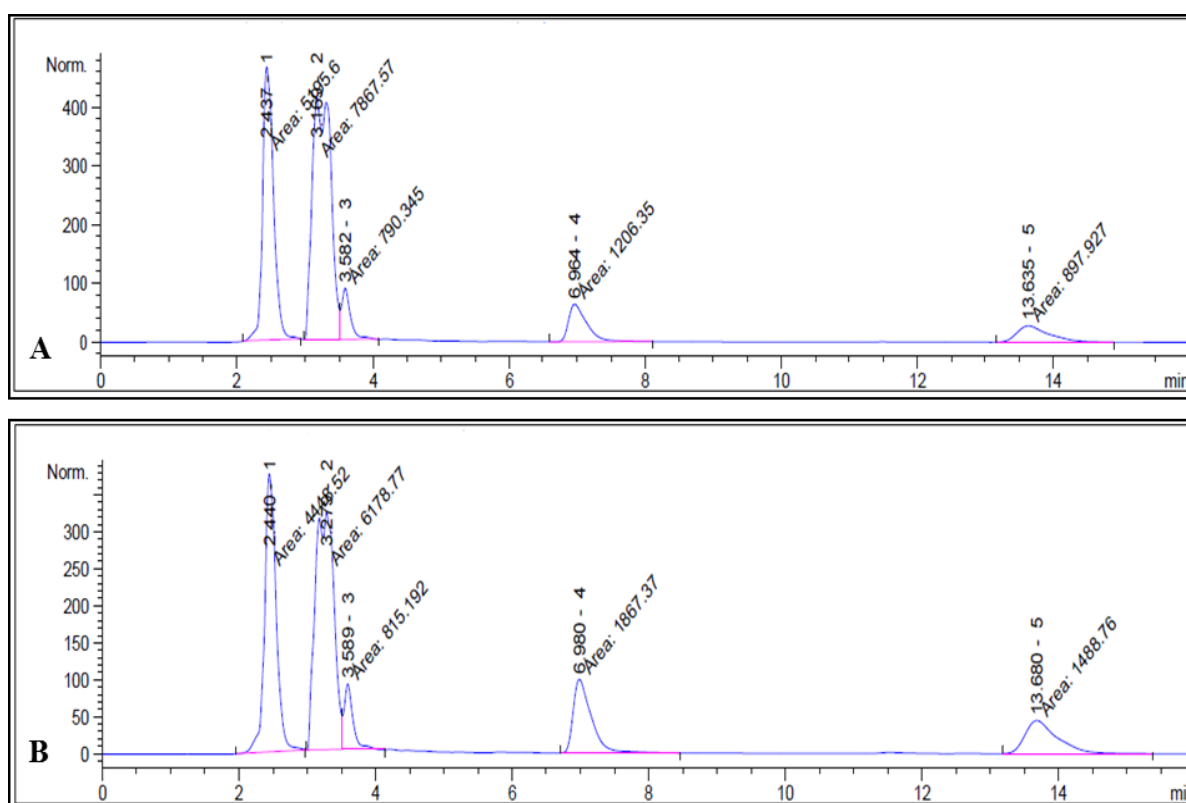


Fig. 2.8. Cromatograma HPLC a extractelor hidroetanolicе (70%) din părțile aeriene de *H. perforatum*, colectate din flora spontană (A) și colecția CSPDPM (B)

Rezultatele determinării cantitative sunt redată în tabelul 2.6 și tabelul A1.4.

Tabelul 2.6. Conținutul (%) a unor flavonoide în produsul vegetal *Hyperici herba*

Produsul vegetal <i>Hyperici herba</i>	Concentrația (%) compușilor chimici, Me (IQR)				
	Rutozida	Hipeozida	Cvercetrozida	Cvercetol	I3,II8-biapigenina
PV din flora spontană	2,01 (0,081)	0,95 (0,036)	0,50 (0,089)	0,16 (0,009)	0,17 (0,020)
PV din colecția CSPDPM	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 ($p = 0,0209$), hipeozidă ($p = 0,0209$), cvercetol ($p = 0,0201$) și I3,II8-biapigenină ($p = 0,0209$), iar pentru cvercetrozidă – o diferență statistic nesemnificativă ($p = 0,248$), ce denotă că conținutul acestui compus în produsele analizate se deosebește puțin.

Substanța majoră în ambele produse este rutozida, fiind urmată de: hipeozidă, cvercetrozidă, I3, II8-biapigenină, cvercetol. Concentrațiile de rutozidă (Mediana = 2,01; IQR = 0,081) și de hipeozidă (Mediana = 0,95; IQR = 0,036) s-au dovedit a fi mai înalte în *H. perforatum* din flora spontană în comparație cu *H. perforatum* cultivată (Mediana = 1,76; IQR = 0,041 și

Mediana = 0,76; IQR = 0,015, respectiv), iar conținutul de cvercitol (Mediana = 0,25; IQR = 0,001) și de I3, II8-biapigenină (Mediana = 0,28; IQR = 0,034) a fost mai mare în produsul vegetal din colecția CȘPDPM. Conținutul de cvercetrozidă în ambele produse vegetale nu a fost semnificativ diferit (Mediana = 0,498; IQR 0,089 și Mediana = 0,54; IQR = 0,055).

Conținutul total de flavonoide în florile de *H. perforatum*

Conținutul total de flavonoide în florile de *H. perforatum* a fost determinat în cadrul CȘM al USMF „Nicolae Testemițanu”, utilizând metoda HPLC, elaborată de către colaboratorii acestui centru. Pentru cercetare s-a utilizat cromatograful de lichide Shimadzu LC-20AD, coloana Phenomenex C-18, 150x4,6 mm, 5 μm, prevăzută cu o precoloană de același tip, de 5 mm lungime. Faza mobilă izocratică a fost formată din: 90% metanol și 10% apă purificată; introdusă în coloana cu un debit de 1 ml/minut, volumul de injectare de 20 μl, cu detecția UV de 280 nm. Pentru studiu a fost utilizat extractul hidroetanolic (80%), obținut din flori de *H. perforatum*, colectate în faza de înflorire în masă. Au fost utilizate soluțiile standard de referință: hiperozida, rutozida, luteolina, cvercitolul, I3, II8-biapigenina. Probele de analizat au fost pregătite prin metoda menționată mai sus, utilizând ca solvent alcoolul etilic 80% [112, 113, 114].

Valorile timpului de retenție a picurilor, de pe cromatogramele probei analizate, au fost mai aproape de timpul de retenție a substanțelor de referință – rutozida și hiperozida (fig. 2.9).

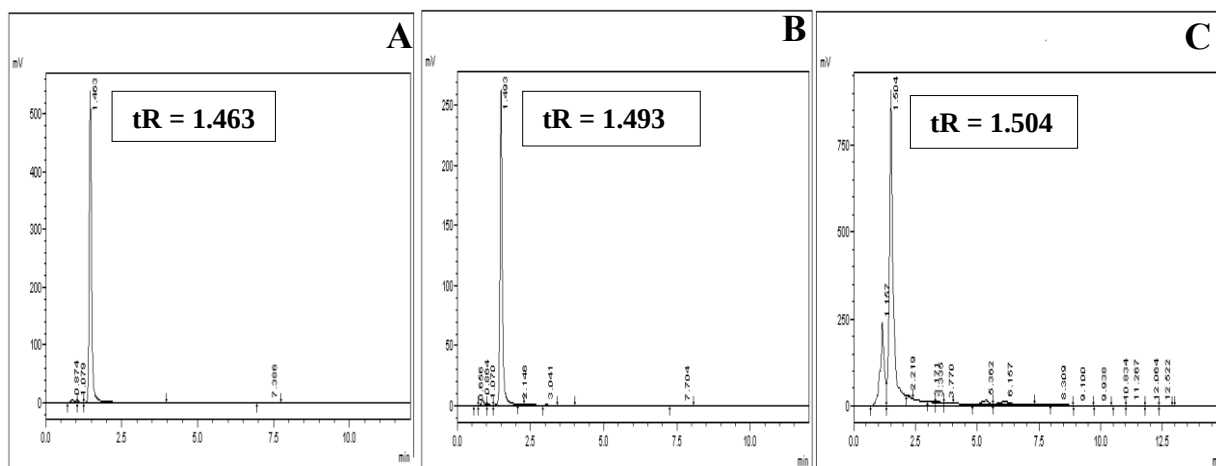


Fig. 2.9. Cromatogramele HPLC ale substanțelor de referință: rutozidă (A), hiperozidă (B) și a extractului hidroetanolic (80%) din *Hyperici flores* (C)

Conținutul total de flavonoide (X, %) în flori de *H. perforatum*, în raport la produs vegetal absolut uscat și la substanță standard, s-a calculat conform formulei 2.4:

$$X = \frac{S_x \cdot m_{st} \cdot 40 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{S_{st} \cdot 25 \cdot m_{pr} \cdot 5 \cdot (100 - W)}, \text{ în care:} \quad (2.4)$$

S_x – aria picului flavonoidului determinat pe cromatograma probei de analizat;

S_{st} – aria picului rutozidei/hiperozidei pe cromatograma soluției standard;

m_{st} – masa substanței standard, g;

m_{pr} – masa produsului vegetal, g;

W – pierderea prin uscare, %.

Dozarea totalului de flavonoide (%) în PV *Hyperici flores*, s-a efectuat în recalcul la rutozidă (Mediana = 14,67; IQR = 0,135) și la hiperozidă (Mediana = 8,77; IQR = 0,080). Conținutul total de flavonoide în florile de *H. perforatum* este semnificativ mai mare în recalcul la rutozidă (tabelul 2.7).

Tabelul 2.7. Totalul de flavonoide, determinat prin metoda HPLC, în *Hyperici flores*

Parametrii statistici		Totalul (%) de flavonoide, în echivalentul hiperozidei	Totalul (%) de flavonoide, în echivalentul rutozidei
$\bar{X}$		8,787	14,683
95% CI	Limita de jos	8,741	14,603
	Limita de sus	8,832	14,763
SD		0,043	0,075
Me		8,772	14,668
IQR		0,080	0,135
Xmin; Xmax		8,739; 8,850	14,594; 14,799

2.4. Pierderea prin uscare a produselor vegetale

Pentru recalcularea conținutului de substanțe active (totalul de flavonoide, derivați de antracen, ulei volatil) s-a determinat gradul de umiditate a produsului vegetal. Cercetările au fost efectuate în cadrul Laboratorului de fitochimie al Catedrei de farmacognozie și botanică farmaceutică din cadrul USMF „Nicolae Testemițanu”. Produsele vegetale mărunțite (1,0 g) s-au introdus în fiole, uscate și cântărite în prealabil. Fiolele cu produse (deschise) s-au menținut în etuvă 3 ore la 105°C, apoi s-au închis cu capac, s-au răcit în exicator și s-au cântărit. S-a continuat uscarea timp de 1 oră, apoi a urmat răcirea în exicator și cântărirea până la masa constantă a probelor [101]. Gradul de umiditate a produsului vegetal X (%) s-a calculat după formula:

$$X = \frac{(m - m_1) * 100}{m}, \text{ în care:} \quad (2.5)$$

m – masa produsului vegetal, înainte de uscare, g;

m_1 – masa produsului vegetal, după uscare, g.

Pierderea prin uscare a produselor vegetale este prezentată în tabelul 2.8.

Tabelul 2.8. Pierderea prin uscare a produselor vegetale

Denumirea speciilor	Produse vegetale	X, %		
		Proba 1	Proba 2	Valoarea medie
<i>H. perforatum</i>	Părți aeriene	8,57	8,59	8,58
<i>H. elegans</i>	Părți aeriene	8,97	8,82	8,89
<i>H. hirsutum</i>	Părți aeriene	9,28	9,27	9,27
<i>H. tetrapterum</i>	Părți aeriene	9,80	8,64	9,22

2.5. Sinteza capitolului 2

Au fost identificate microscopice structurile secretoare din elementele florale și frunze a 4 specii de sunătoare. Acestea stau la baza determinării corecte a speciilor din genul *Hypericum* (*H. perforatum*, *H. elegans*, *H. hirsutum*, *H. tetrapterum*) din flora RM. Structurile secretoare se deosebesc după tip (glande, pungi, canale), formă (sférică, alungită, ovală), culoare (roșie-purpurie, incoloră, galbenă) și localizare. Cele mai importante caracteristici de identificare sunt structurile secretoare ale separelor, iar cele morfologice sunt forma, pubescența și numărul de coaste longitudinale pe tulpini.

A fost realizat *screening*-ul fitochimic a 4 specii din genul *Hypericum* din flora spontană, cu scopul determinării produsului vegetal cu cel mai înalt conținut de compuși fenolici. În acest scop, s-a efectuat analiza comparativă calitativă și cantitativă a diferitor organe ale plantelor studiate.

Analiza calitativă prin CSS a demonstrat prezența compușilor fenolici și a hipericinei în părțile aeriene ale speciilor supuse studiului (*H. perforatum*, *H. elegans*, *H. tetrapterum*, *H. hirsutum*). Analiza HPLC a demonstrat prezența derivaților flavonolului (rutozida, hiperozida, cvercetrozida, cvercetolul) și a biflavonei (I3,I18-biapigenina) în toate PV studiate.

Analiza cantitativă prin metoda spectrofotometrică UV-VIS, denotă că totalul de flavonoide variază în speciile de *Hypericum*: părțile aeriene Mediana = 2,94-5,68 %; flori Mediana = 2,99-8,22%; frunze Mediana = 5,76-8,58%, tulpini Mediana = 1,43-1,543%. Totalul de antracenderivați (%), în recalcul la hipericină, este maxim în părțile aeriene la specia *H. elegans* (Mediana = 0,37%; IQR = 0,005); în flori – la *H. perforatum* (Mediana = 0,58%; IQR = 0,004); în frunze – la *H. elegans* (Mediana = 0,26%; IQR = 0,006). Totalul de antracenderivați (%), în recalcul la hipericină, în părțile aeriene de *H. perforatum* în funcție de faza fenologică, este maxim la începutul de înflorire (Mediana = 0,29%; IQR = 0,005). În funcție de zona geografică, totalul de antracenderivați este maxim în părțile aeriene de *H. perforatum* din zona de nord (Mediana = 0,32%; IQR = 0,002).

Analiza cantitativă prin metoda HPLC, a demonstrat că totalul de antracenderivați, 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). Conținutul total de flavonoide variază de la 30,3 mg/g (*H. perforatum*) până la 5,92 mg/g (*H. elegans*). Totalul de acizi hidroxicinamici este mai mare în părțile aeriene de *H. tetrapterum* (10,7 mg/g). Rezultatele obținute denotă următoarele: conținutul de compuși chimici, din diverse grupuri, este mai înalt în produsul vegetal de *H. perforatum*, fiind urmat de *H. tetrapterum* și de alte specii supuse studiului.

În urma *screening*-ului fitochimic al plantelor studiate s-a constatat, că cel mai mare conținut de compuși chimici din grupul flavonoidelor era în florile de *H. perforatum*, care au și devenit obiectul de studiu.

Rezultatele cercetărilor caracteristicilor macroscopice și microscopice ale florilor de *H. perforatum*; rezultatele analizei calitative (reacțiile de identificare, metoda de CSS, metoda HPLC) și dozării spectrofotometrice a totalului de flavonoide în produs vegetal *Hyperici perforati flores* au stat la baza elaborării Proiectului de monografie farmaceutică a produsului vegetal „Flori de sunătoare – *Hyperici perforati flores*” (Anexa 5).

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*

Specia *H. perforatum* L. se caracterizează prin prezența diferitor tipuri de structuri secretoare: glande translucide sau cavități, noduli negri și trei tipuri de canale secretoare (A, B, C). Uleiul volatil se sintetizează și se acumulează în glandele translucide și în canalele secretoare, localizate în frunze, petale, sepale și în pistil [24]. Frecvența și diversitatea acestor structuri este o dovadă a activității secretoare intense a speciei. Este demonstrată prezența glandelor translucide și a canalelor secretoare, de asemenea, în speciile *H. hirsutum*, *H. tetrapterum* [25]. Puține surse bibliografice pun la dispoziție date referitoare la conținutul și la compoziția chimică a uleiului volatil din speciile *H. elegans*, *H. hirsutum* și *H. tetrapterum*.

În prezent, este actual de analizat randamentul și compoziția chimică a uleiului volatil, izolat din părțile aeriene în faza de înflorire a speciilor *H. perforatum*, *H. elegans*, *H. hirsutum* și *H. tetrapterum*, colectate din flora spontană a RM.

Extracția și analiza compoziției chimice a uleiurilor volatile din părțile aeriene a speciilor genului *Hypericum*

Extracția uleiului volatil, din produsele vegetale uscate și proaspete, s-a efectuat prin hidrodistilare în aparatul prezentat în figura 3.1 A. Metoda este descrisă în *Farmacopeea Republicii Belarus* (metoda B) și *Farmacopeea de Stat* ed. XIV (metoda 1) [115, 116].

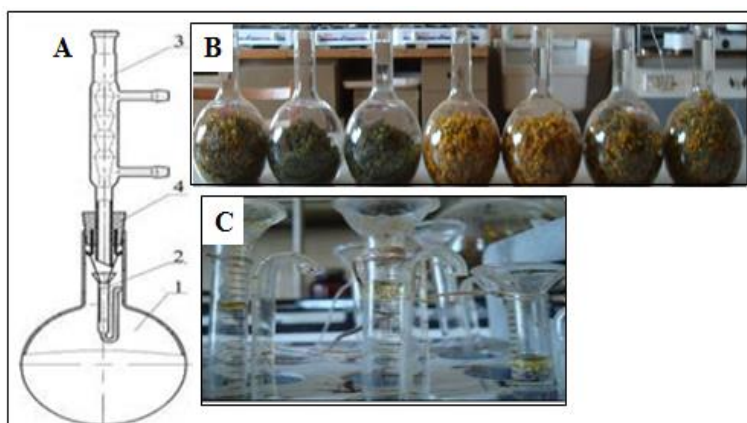


Fig. 3.1. Aparatul de extracție al uleiurilor volatile prin hidrodistilare (A): balon (1), recipient gradat (2); refrigerent (3), dop (4); baloane cu produse vegetale (B); recipiente gradate cu ulei volatil (C)

Procesul constă în introducerea directă a produsului vegetal mărunțit, împreună cu apa, în baloane de distilare, care se încălzesc pe foc direct, iar amestecul de vapori de ulei și de apă se colectează, prin condensare în refrigerent, în vasul florentin (recipientul Ghinsberg). Uleiul se

colectează în partea gradată a recipientului, iar apa prin partea îngustă se scurge înapoi în balon [115, 116]. Probele analizate (100 g) s-au introdus în baloanele de distilare de 1000 ml, în combinație cu 200 ml de apă distilată (fig. 3.1 B). Din momentul fierberii, amestecul a fost supus distilării timp de 3 ore [115]. Mostrele de ulei volatil (fig. 3.1 C) au fost deshidratate cu Na₂SO₄ anhidru și s-au păstrat la rece, la +4°C [115, 116, 117, 118]. Probele de ulei volatil s-au obținut în Laboratorul Plante Aromatice și Medicinale din cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecția Plantelor.

După terminarea distilării și după răcire, volumul stratului de ulei volatil și conținutul lui procentual (**X**) se calculează în baza formulei:

$$X = \frac{V \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - w)}, \text{ în care:} \quad (3.1)$$

V – volumul uleiului volatil, ml;

m – masa produsului vegetal, g;

w – pierderea în masă, la uscare, %.

În urma cercetărilor s-a constatat că toate speciile de *Hypericum* evaluate produc și acumulează uleiul volatil în părțile aeriene, conținutul căruia variază. Cel mai ridicat nivel de ulei volatil a fost atestat la *H. perforatum* (0,26%), urmat de *H. elegans* (0,15%), *H. tetrapterum* (0,13%), iar la *H. hirsutum* acest indice a fost cel mai scăzut (0,094%). De asemenea, s-a atestat o diferență și la nivel de culoare a uleiului volatil: din *H. perforatum* – alb-gălbuie, din *H. elegans* – gălbuie, iar din *H. tetrapterum* și *H. hirsutum* – galbenă.

Analiza cantitativă și calitativă a uleiurilor volatile s-a efectuat prin cromatografie gazoasă – spectrometrie de masă (GC-MS), realizată cu aparatul Agilent Technologies, tip 7890 GC system, MS Agilent Technologies, tip 5975 C Mass Selective Detector; coloana HP 5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm (5% fenilmetilsiloxan). Separarea s-a realizat în următoarele condiții cromatografice: temperatura injectorului – de 250°C; temperatura detectorului – de 280°C; regim de temperatură – de 250°C (10 grade/min) până la 280°C (constant 5,5 min); faza mobilă – heliu, debit – 1 ml/min; volum injectat – 0,1 μl de ulei volatil. Analiza datelor cromatografice a fost realizată prin intermediul sistemului SOFTWARE de identificare și deconvoluție spectrală automată a spectrelor de masă AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution & Identification System*), produs de NIST [116, 117]. Analiza chimică a uleiurilor volatile s-a efectuat în Laboratorul Chimia Compușilor Naturali și Biologic Activi al Institutului de Chimie.

În uleiul volatil din specia *H. perforatum* s-au constatat 74 de componenți (fig. 3.2), dintre care 33 au fost identificați și determinați cantitativ (tabelul 3.1). Totalul acestora constituie

71,277%, inclusiv: cariofilen (12,175%), α -pinen (8,574%), oxid de cariofilen (12,119%) [118, 119].

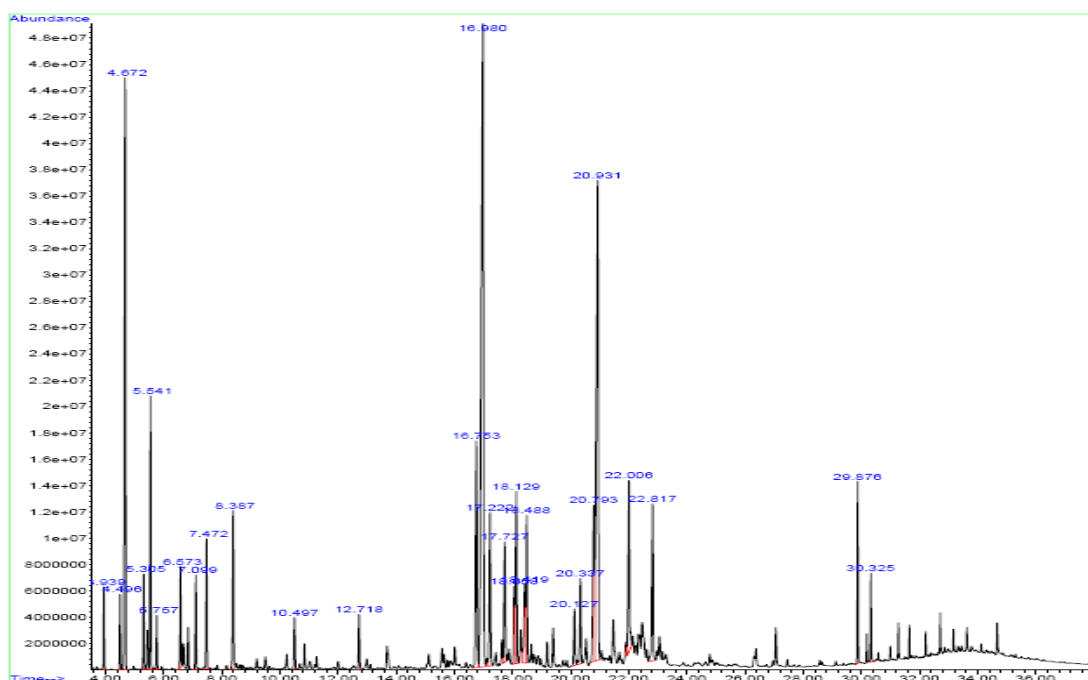


Fig. 3.2. Gaz-cromatograma uleiului volatil din părțile aeriene de *H. perforatum*

Cercetările întreprinse au demonstrat faptul că în uleiul volatil de *H. elegans*, sunt prezenți 49 de componenți (fig. 3.3), 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 α -pinen (4,779%) (tabelul 3.1).

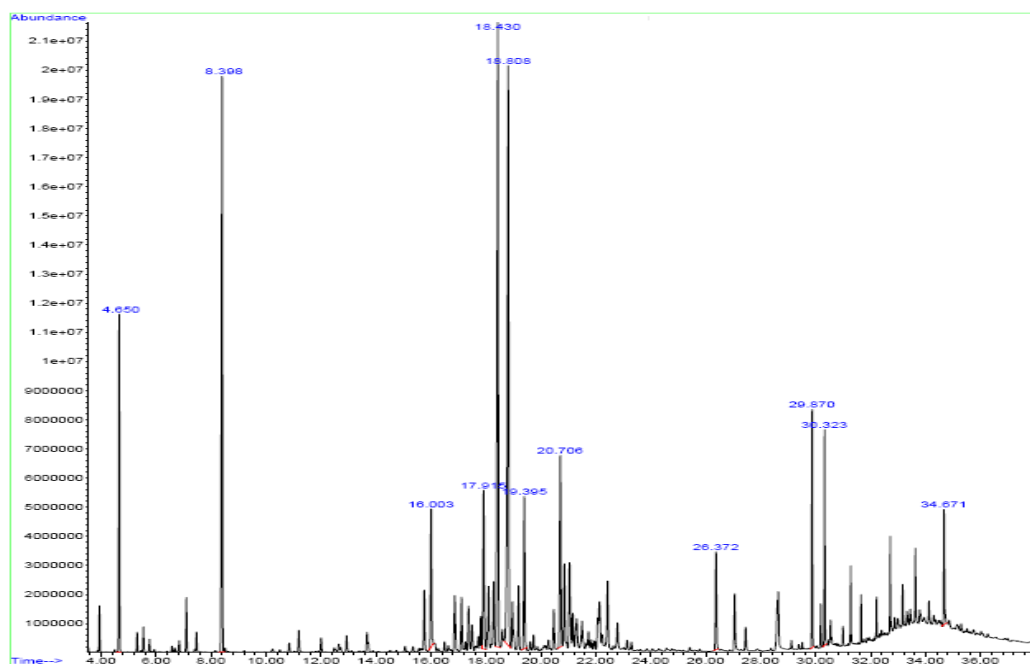


Fig. 3.3. Gaz-cromatograma uleiului volatil din părțile aeriene de *H. elegans*

În uleiul volatil de *H. tetrapterum* s-au constatat 56 de componenți (fig. 3.4). Dintre aceștia, au fost identificați 22, componenții majori fiind următorii: copaen (9,271%), α -longipinen (8,489%), δ -cadinen (6,423%) (tabelul 3.1).

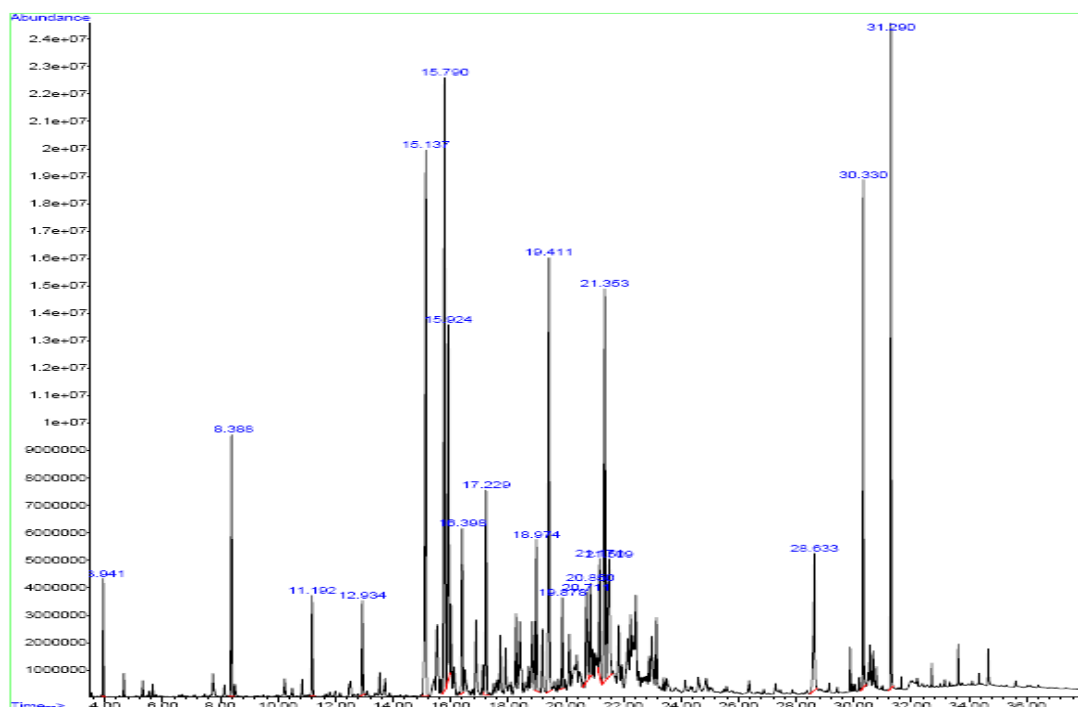


Fig. 3.4. Gaz-cromatograma uleiului volatil din părțile aeriene de *H. tetrapterum*

Specia *H. hirsutum* în uleiul volatil conține 24 de componenți, dintre care au fost identificați 9, ce constituie 33,964% (fig. 3.5, tabelul 3.1). Componenții majori identificați în uleiul volatil al acestei specii sunt: oxid de cariofilen (10,435%), fitol (6,056%) și α -cariofilen (5,086%).

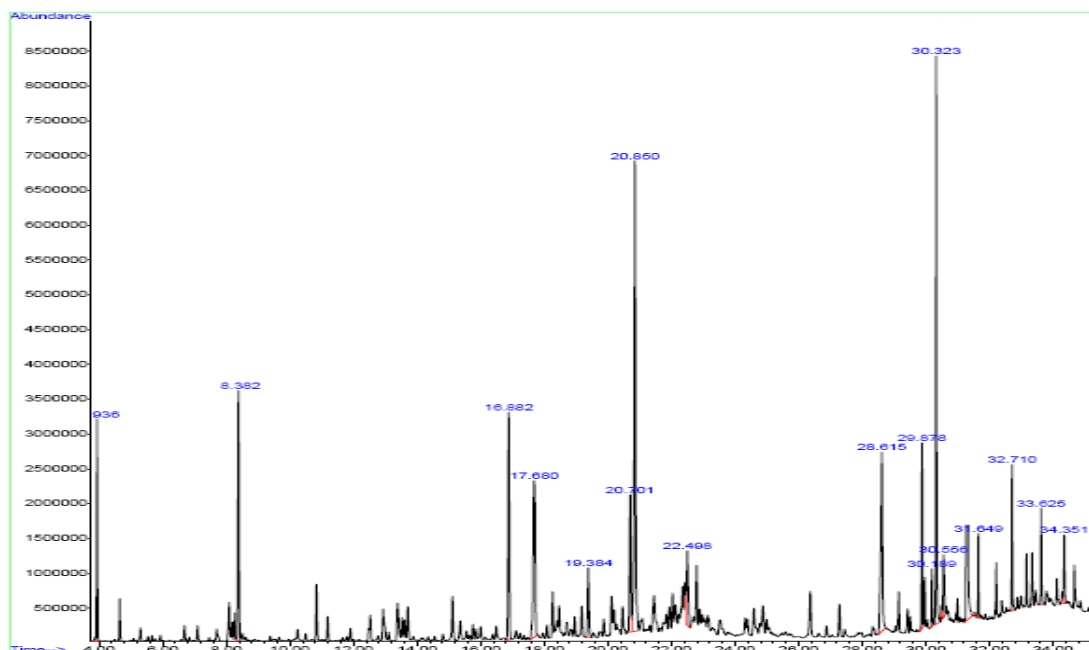


Fig. 3.5. Gaz-cromatograma uleiului volatil din părțile aeriene de *H. hirsutum*

**Tabelul 3.1. Compoziția chimică a uleiului volatil din părțile aeriene ale speciilor
genului *Hypericum***

Timpul de retenție, min	Compușii chimici	Concentrația (%) componentilor în ulei volatil			
		<i>H. perforatum</i>	<i>H. elegans</i>	<i>H. tetrapterum</i>	<i>H. hirsutum</i>
3,941	Nonan	0,782	0,574	1,036	2,743
4,496	α -Felandren	0,81			
4,672	α -Pinen	8,574	4,779	0,232	
5,305	3-Metilnonan	1,055			
5,440	Sabinen	0,443			
5,541	β -Pinen	3,216	0,378		
5,757	β -Mircen	0,589			
6,573	p-Cimen	1,218			
6,676	Limonen	0,389			
7,097	2-Metildecen	1,576	0,837		
7,744	cis-Linalool oxid			0,193	
8,387	Undecan	2,096	10,262	3,157	4,279
10,497	Terpinen-4-ol	0,675			
10,839	α -Terpineol	0,319			
11,192	Decanal			1,213	
12,718	Acid nonanoic	0,722			
12,981	1-Decanol	0,19		1,207	
13,536	2-Undecanon			0,282	
13,682	Tridecan	0,513			
15,116	α -Longipinen	0,316			
15,137	1-Undecanol			1,574	
15,525	α -Longipinen			8,489	
15,755	Copaen		1,21	9,271	
16,499	Dodecanal			0,412	
16,753	β -Cedren	4,155			
16,989	β -Cariofilen	12,175	1,294	1,351	
17,635	(+)-Longiciclen	0,407		2,912	
17,727	α -Cariofilen	2,09		0,820	5,086
17,881	Hexadecan	0,242	0,642		
18,129	1-Dodecanol	2,735	1,472		
18,488	Aromadendren	2,158	13,990	0,718	
18,808	g-Gurjunen		14,532		
19,396	δ -Cadinen	0,651	3,047	6,423	1,492
20,337	Nerolidol	1,378	0,840		
20,931	Cariofilen oxid	12,119		1,676	10,435
23,051	α -Bisabolol	0,428		1,036	
24,786	Benzyl benzoat	0,137			
27,059	1-Tetradecanol	0,569	1,072		
29,876	Tunbergol	1,762	3,101	0,433	2,409
30,186	Heneicozan	0,266	0,528		0,762
30,325	Fitol	0,842	2,593	4,501	6,056
32,213	Tetracozan		0,436	0,318	0,702
Totalul (%) compușilor identificați		71,277	61,587	47,224	33,964
Numărul de compuși chimici identificați		33	18	21	9

Compararea rezultatelor analizei cantitative și calitative a uleiului volatil, extras din speciile *H. perforatum*, *H. elegans*, *H. tetrapterum*, *H. hirsutum* din flora spontană a RM ne permite să concludem, că toate aceste specii conțin în concentrații diferite – nonan, undecan, δ -cadinen, tunbergol, fitol, β -cariofilen, oxid de cariofilen, aromadendren, α -pinen (fig. 3.6).

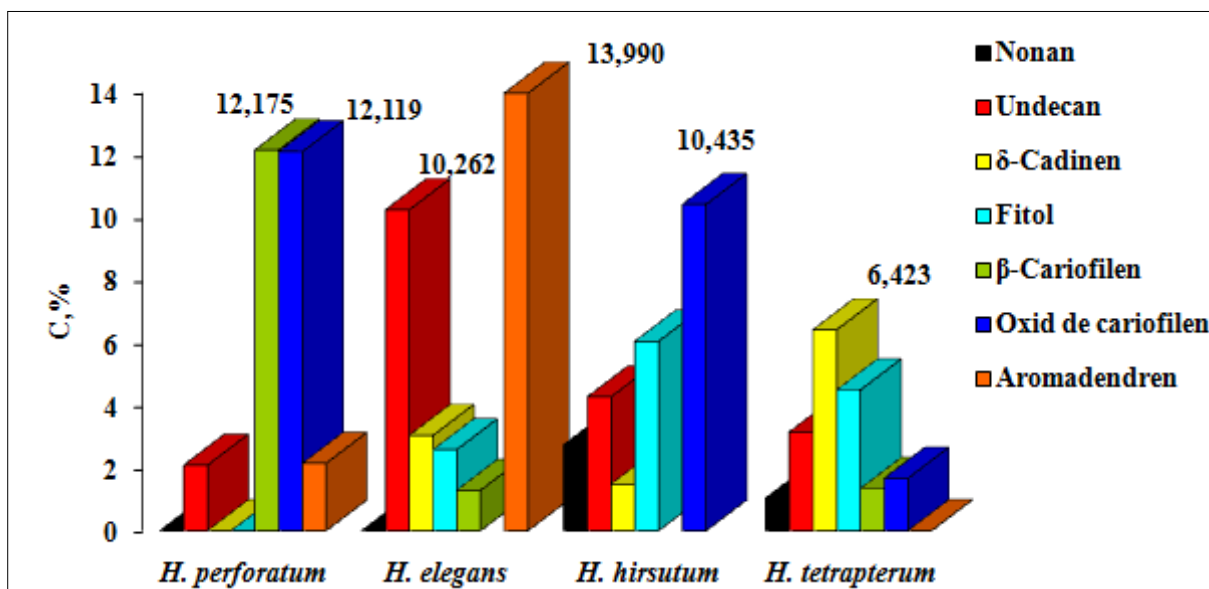


Fig. 3.6. Compuși chimici comuni ai uleiului volatil din părțile aeriene ale speciilor din genul *Hypericum*

Diferențele sunt înregistrate în funcție de componenții majori prezenți în uleiul volatil extras din 4 specii. În uleiul volatil de *H. perforatum* componenții majori, după cum s-a menționat anterior, sunt: β -cariofilen (12,175%), cariofilen oxid (12,119%) și α -pinen (8,574%); în uleiul de *H. elegans* – g-gurjunen (14,532%), aromadendren (13,990%), undecan (10,262%); în uleiul de *H. tetrapterum* – dodecanal (9,271%), α -longipinen (8,489%), iar în uleiul de *H. hirsutum* – cariofilen oxid (10,435%) și fitol (6,056%) (fig. 3.6).

Rezultatele obținute au evidențiat diferențele dintre speciile din genul *Hypericum* din flora RM în privința randamentului și compoziției chimice a uleiului volatil.

De asemenea, s-a dozat conținutul de ulei volatil în părțile aeriene proaspete ale speciei *H. perforatum* colectate din flora spontană (0,265%) și din colecția CȘPDPM (0,204%). Prin intermediul metodei GC-MS, în uleiul volatil din *Hyperici herba* din flora spontană s-au constatat 96 de compuși chimici (fig. A2.1), 32 dintre care au fost identificați în sumă de 82,26%. Compuși majori identificați sunt: β -cariofilenul (18,391%), germacrenul D (15,546%), α -pinenul (12,470%), β -cis-ocimenul (7,116%). Analiza GC-MS a uleiului volatil din produs vegetal cultivat a identificat 31 de compuși chimici din cei 78 determinați (fig. A2.2), componenții majori fiind: germacrenul D (35,777%), β -cariofilenul (24,751%), biciclogermacrenul (5,635%) (tabelul 3.2).

Tabelul 3.2. Compușii chimici identificați în uleiul volatil din părțile aeriene de *H. perforatum*, produse proaspete

Timpul de retenție, min	Compușii chimici	Conținutul (%) al compușilor chimici în ulei volatil	
		Produs vegetal din flora spontană	Produs vegetal din colecția CȘPDPM
3,935	Nonan	1,756	0,250
4,490	α -Felandren	0,747	0,113
4,647	α -Pinen	12,470	1,574
5,298	3-Metilnonan	1,002	0,166
5,435	β -Felandren	0,623	0,110
5,530	β -Pinen	3,177	0,546
5,752	β -Mircen	1,167	0,156
6,383	α -Terpinen	0,280	0,045
6,566	o-Cimen	0,397	0,093
6,834	β -trans-Ocimen	2,522	0,254
7,095	β -cis-Ocimen	7,116	0,894
7,393	g-Terpinen	0,661	0,121
7,462	Decan, 2-metil	1,241	0,212
8,370	Undecan	0,502	0,127
8,508	Nonanal	0,037	–
10,496	(-)-Terpinen-4-ol	0,499	0,365
10,836	α -Terpeniol	0,184	0,098
12,708	Hexdecan	0,250	0,090
15,116	α -Longipinen	0,106	0,189
15,630	Ylangen	0,138	0,160
15,746	Copaen	0,137	0,131
16,492	Tridecanal	–	0,102
16,759	β-Cedren	3,144	1,228
16,995	β-Cariofilen	18,391	24,751
17,620	α -Himacalen	0,240	0,268
17,734	α -Cariofilen	1,580	2,556
18,078	Ciclododecan	0,744	2,167
18,428	Germacren D	15,546	35,777
18,628	β -Farnezen	1,027	0,520
18,769	Biciclogermacren	3,644	5,635
18,954	α -Farnezen	0,936	1,481
19,382	δ -Cadinen	1,466	1,239
20,254	Dodecanoic acid	0,534	–
Numărul compușilor identificați		32	31
Totalul compușilor identificați, %		82,26	81,42

Rezultatele relevă faptul că uleiurile volatile, obținute din părțile aeriene proaspete de *H. perforatum*, crescute spontan și cultivate, se deosebesc prin: conținut în produs vegetal și compoziție chimică (calitativă și cantitativă) a compușilor majori (tabelul 3.2).

Analiză comparativă a conținutului procentual al principalilor compuși din uleiurile volatile, izolate din părțile aeriene de *H. perforatum* (produs vegetal proaspăt și uscat), a demonstrat prezența în cantități mari a β -cariofilenului și α -pinenului. Pe lângă aceasta, germacrenul D se conține în cantități mari în uleiul volatil din produs vegetal proaspăt, iar oxidul de cariofilen – în uleiul volatil din produs vegetal uscat (fig. 3.7).

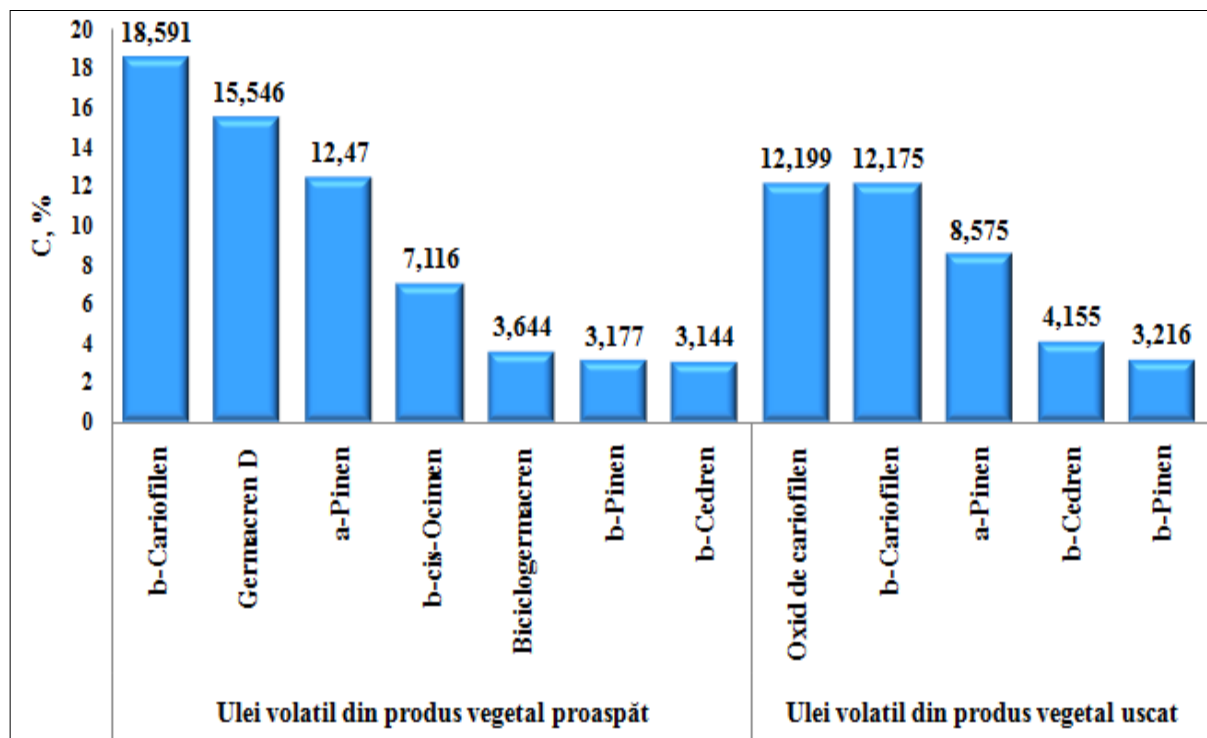


Fig. 3.7. Conținutul (%) comparativ al compușilor majori în uleiul volatil din *Hyperici herba*

Putem constata că uleiurile volatile din *Hyperici herba* sunt o sursă de germacren D cu proprietăți insecticide [120] și de cariofilene (β -cariofilen, oxid de cariofelen) cu efecte antibacteriene, antioxidante, antiinflamatoare [121, 122].

Analiza chimică a uleiului volatil din florile speciei *H. perforatum*

Produsul vegetal *Hyperici flores* după uscare a fost supus hidrodistilării, utilizând metoda descrisă anterior. S-a determinat conținutul de ulei volatil în flori de 0,23% (în recalcul la produsul vegetal absolut uscat), de culoare alb-gălbuie. În uleiul volatil s-au constatat 75 de componenți, dintre care 26 au fost identificați (fig. 3.8). Compușii majori sunt: β -cariofilen (26,82%), oxid de cariofilen (13,286%), α -pinen (8,747%), α -cariofilen (3,707%).

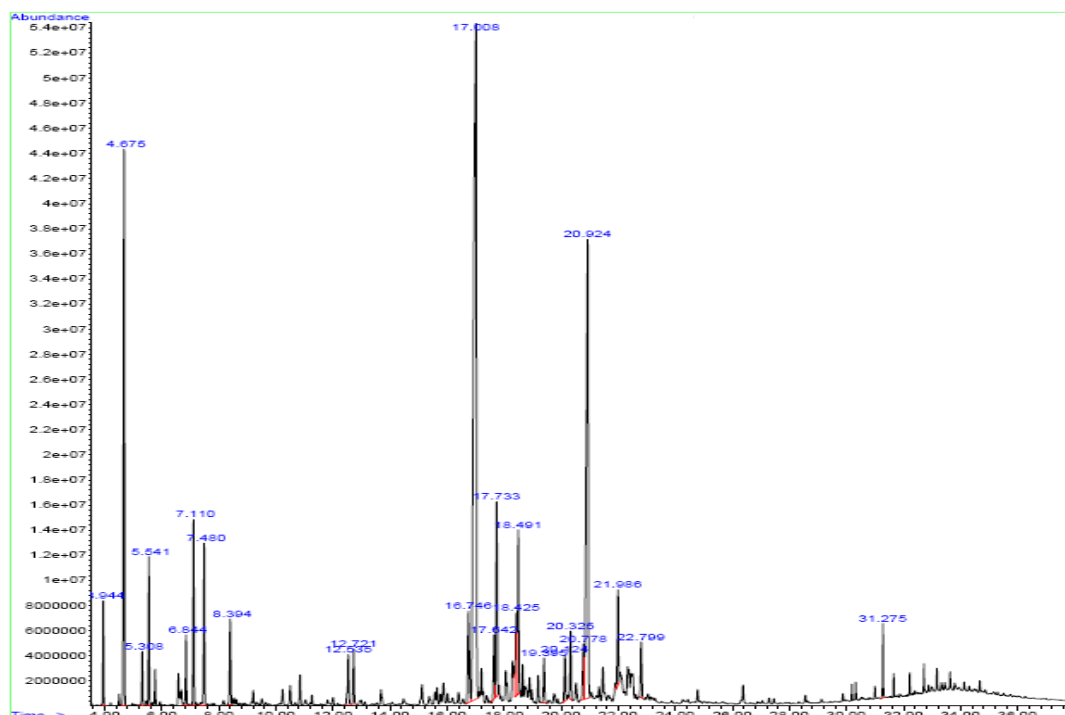


Fig. 3.8. Gaz-gromatograma uleiului volatil din flori de *H. perforatum*

Conținutul total al compușilor identificați este de 65,456% (tabelul 3.3).

Tabelul 3.3. Compoziția chimică a uleiului volatil din flori de *H. perforatum*

Nr	Compușii chimici	Timpul de retenție (min)	Conținutul, %	Nr.	Compușii chimici	Timpul de retenție (min)	Conținutul, %
1	Nonan	3,944	1,113	14	1-Nonanol	13,680	0,263
2	α -Felandren	4,500	0,142	15	1-Undecanol	14,631	0,213
3	α -Pinen	4,675	8,747	16	α -Longipinen	15,117	0,444
4	3-Metilnonan	5,308	0,66	17	Acid n-decanoic	15,760	0,159
5	β -Pinen	5,541	1,896	18	β -Cariofilen	17,008	26,82
6	β -Mircen	5,761	0,478	19	α -Cariofilen	17,733	3,707
7	p-Cimen	6,576	0,43	20	Hexadecan	17,811	0,872
8	Limonen	6,678	0,248	21	δ -Cadinen	19,395	0,816
9	2-Metildecen	7,110	2,482	22	Cariofilen oxid	20,924	13,286
10	Undecan	8,394	1,406	23	Heneicozan	30,185	0,170
11	Terpinen-4-ol	10,230	0,294	24	Fitol	30,320	0,207
12	α -Terpineol	10,497	0,442	25	Sclareol	31,275	0,789
13	2-Undecanon	10,841	0,317	26	Tetracozan	32,213	0,175
Totalul, %			65.456				

Conținutul de β -cariofilen în uleiul volatil al florilor (26,82%) este de două ori mai mare decât cel din uleiul volatil al părților aeriene (produs vegetal uscat). Putem confirma, că uleiul volatil din flori poate intra în compoziția unor forme farmaceutice cu efecte antibacteriene și antiinflamatoare [121, 122].

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

Extractele uscate (*Extracta sicca*) – preparate solide obținute prin evaporarea solventului utilizat la prepararea lor, au o pierdere prin uscare sau un conținut în apă de cel puțin 5% [123]. Fluxul tehnologic de obținere a extractelor uscate este prezentat în figura 3.9.

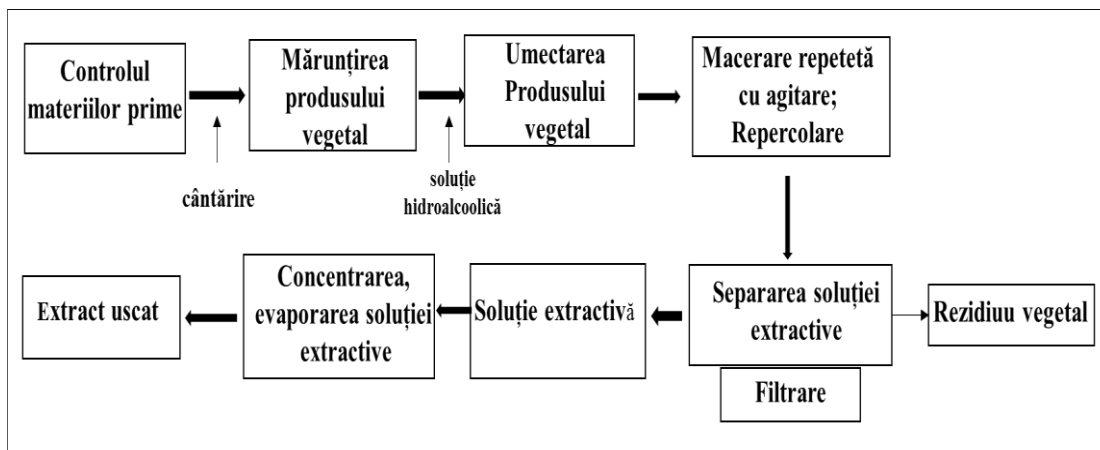


Fig. 3.9. Procesul tehnologic de obținere al extractelor uscate

Părțile aeriene de sunătoare s-au colectat în faza de înflorire din flora spontană și din colecția CȘPDPM a USMF „Nicolae Testemițanu”. Florile, frunzele și tulpinile s-au prelevat de la plante din flora spontană. Produsele vegetale s-au uscat în mod natural, s-au mărunțit și trecut prin sită cu orificii de 3 mm. În calitate de solvent s-a utilizat alcoolul etilic de diferite concentrații. Pentru evaporarea solventului din soluțiile extractive s-a utilizat evaporatorul rotativ *Laborota 4011–digital*.

Obținerea soluțiilor extractive din *Hyperici herba* prin repercolare, cu fracționarea produsului vegetal în părți egale cu ciclu neterminat

Pentru determinarea gradului de extracție a compușilor fenolici cu alcool etilic de diferite concentrații (40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%), a fost folosită metoda de repercolare cu fracționarea produsului vegetal (*Hyperici herba*) în părți egale cu ciclu neterminat (fig 3.10).

Pentru fiecare concentrație de etanol s-au folosit câte trei percolatoare și s-au cântărit a câte 10,0 g de părți aeriene uscate de *H. perforatum*. Produsul vegetal pentru primul percolator a fost umectat cu 10 ml de etanol cu o concentrație corespunzătoare; peste 6 ore produsul umectat s-a introdus în primul percolator și s-a macerat timp de 24 de ore cu 20 ml extragent. Din primul percolator s-au obținut 80% din lichidul extractiv în raport cu masa produsului vegetal (8 ml), după care s-a continuat percolarea și s-au obținut trei porțiuni de lichid extractiv mai diluate. Prima porțiune de lichid extractiv (egală cu masa produsului) de 10 ml a fost folosită pentru umectarea produsului din al doilea percolator; a doua porțiune de lichid extractiv s-a folosit pentru macerare, iar a treia – la extracție până la obținerea a 10 ml produs finit (100%) din al doilea percolator. A

treia porțiune de lichid extractiv, mai diluat din al doilea percolator, a fost folosită pentru umectarea, macerarea, percolarea produsului vegetal din al treilea percolator. Repercolarea s-a efectuat până la obținerea soluțiilor extractive incolore din fiecare percolator [123, 124, 125, 126].

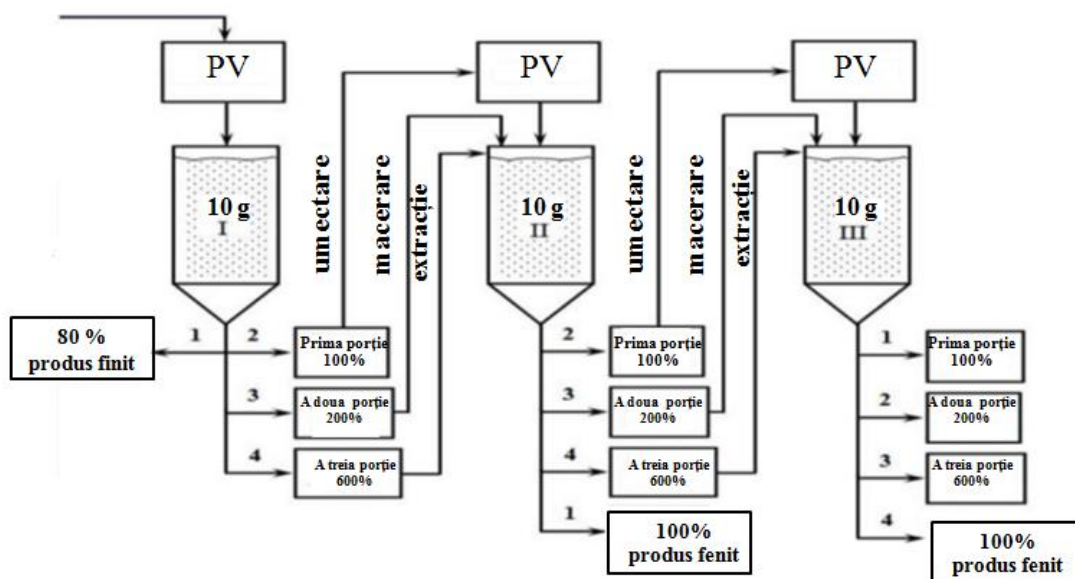


Fig. 3.10. Schema de repercolare cu fracționarea produsului vegetal în părți egale cu ciclu neterminat

Analiza calitativă a soluțiilor extractive (produs semifinit) prin CSS

Până la reunirea extractelor obținute din trei percolatoare, s-a efectuat analiza calitativă prin CSS, care a confirmat epuizarea completă a compușilor chimici din produsele vegetale din primul, al doilea și al treilea rând de percolatoare. Prin această metodă s-a comparat compoziția chimică a primei (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) și a ultimei (1', 2', 3', 4', 5', 6', 7') porțiuni de extracte hidroetanolicе de diverse concentrații (fig. 3.11, fig. 3.12, fig. 3.13) [98, 99]. Distanța de migrare a fost de 8,8 cm. În studiu s-au utilizat următoarele substanțe de referință: rutozida (Ru), hiperozida (Hi), izocvercetrozida (Icvt), cvercetolul (Cv), acidul clorogenic (A. cl.), acidul cafeic (A. c.), hipericina (H) (fig. 3.11, 3.12, 3.13). Toate substanțele de referință au fost procurate de la Sigma-Aldrich.

După dezvoltare, placa cromatografică a fost vizualizată la lumina zilei și la lumina UV 366 nm. În primele soluții extractive colectate din primul rând de percolatoare s-au identificat: rutozida ($R_f = 0,22$), hiperozida ($R_f = 0,42$), izocvercetrozida ($R_f = 0,56$), cvercetolul ($R_f = 0,94$), acidul clorogenic ($R_f = 0,37$), acidul cafeic ($R_f = 0,92$), hipericina ($R_f = 0,75$).

Cu alcool etilic de 70% s-au obținut soluțiile extractive din *Hyperici herba*, produs vegetal colectat din flora spontană (4, 4') și din colecția CȘPDPM (5, 5') (fig. 3.11).

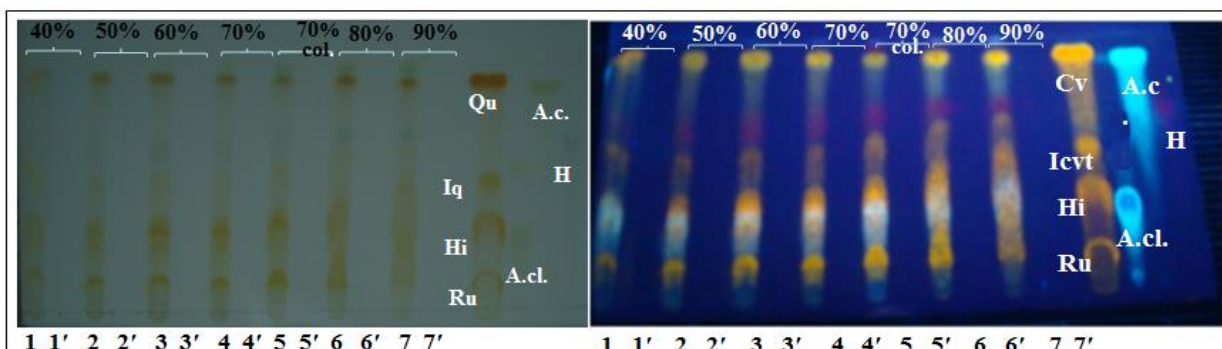


Fig. 3.11. Cromatograma pe strat subțire a soluțiilor extractive, obținute cu etanol de diverse concentrații, din primul rând de percolatoare

În același mod au fost analizate soluțiile hidroetanolicе (40-90%) din al doilea (fig. 3.4) și din al treilea rând (fig. 3.12) de percolatoare. Drept rezultat, în primele extracte etanolice (40-90%) colectate din al doilea rând de percolatoare, de asemenea, s-au identificat: rutozida ($R_f = 0,19$), hiperozida ($R_f = 0,322$), cevercetolul ($R_f = 0,95$), acidul cafeic ($R_f = 0,93$), acidul clorogenic ($R_f = 0,39$), hipericina ($R_f = 0,78$).

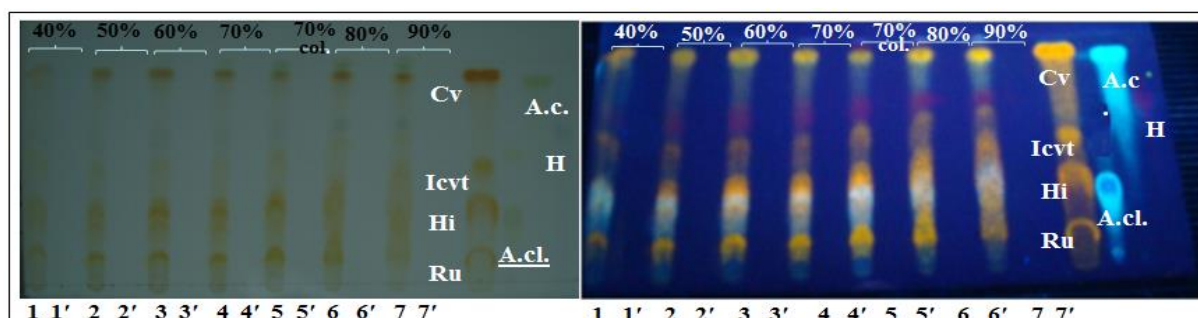


Fig. 3.12. Cromatograma pe strat subțire a soluțiilor extractive, obținute cu etanol de diverse concentrații, din al doilea rând de percolatoare

În urma analizei calitative a primelor extracte hidroetanolicе (40-90%) din al treilea rând de percolatoare s-au identificat: hiperozida ($R_f = 0,42$), rutozida ($R_f = 0,22$), izocvercetrozida ($R_f = 0,44$), cvercetrozida ($R_f = 0,56$), cvercetolul ($R_f = 0,94$), acidul clorogenic ($R_f = 0,37$), acidul cafeic ($R_f = 0,92$), hipericina ($R_f = 0,75$) (fig. 3.13).

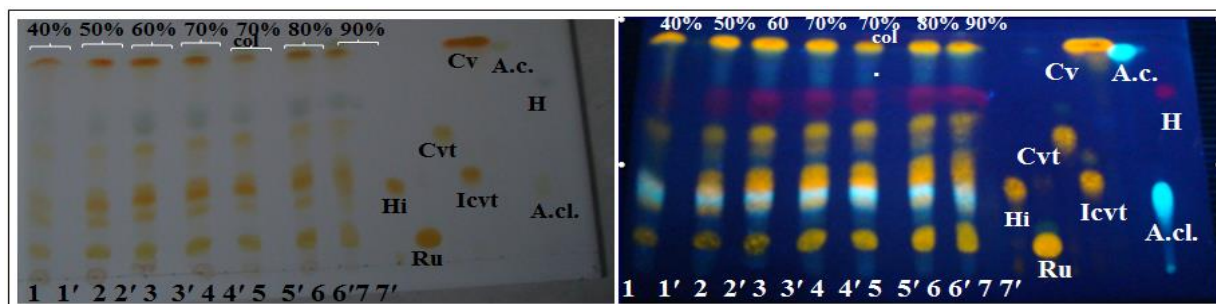


Fig. 3.13. Cromatograma pe strat subțire a soluțiilor extractive, obținute cu etanol de diverse concentrații, din al treilea rând de percolatoare

În rezultatul analizei CSS la lumina zilei și în UV, prin compararea Rf-urilor spoturilor obținute cu cele ale substanțelor de referință, putem constata prezența rutozidei, hiperozidei, izocvercetrozidei, cvercitolului, acidului clorogenic, acidului cafeic, hipericinei în primele porțiuni de soluții extractive (produs finit) în toate probele obținute. În ultimile extracte, obținute din *Hyperici herba* cu etanol (40-90%) din primul, al doilea și din al treilea rând de percolatoare nu s-a identificat niciun compus chimic, ce demonstrează epuizarea completă a produsului vegetal.

Extracția prin această metodă a durat 52 de zile. Soluțiile extractive pentru fiecare solvent s-au reunit. Purificarea soluțiilor extractive, pentru îndepărtarea substanțelor de balast (rășini, pectine etc.), s-a efectuat prin termoprecipitare (păstrarea la temperatura până la +8°C timp de 8 ore. Filtrarea soluțiilor extractive pentru îndepărtarea impurităților mecanice și a sedimentului s-a realizat prin hârtia de filtru la vid. Având în vedere prezența unor compuși termolabili, concentrarea s-a realizat prin evaporare sub vid la temperatura de +40°C. Extractele uscate din părțile aeriene de *H. perforatum*, obținute la extragerea cu etanol de diverse concentrații, după caracterele organoleptice au prezentat pulberi amorfe, higroscopice de culoare brună și brun-roșiatică, cu un miros specific balsamic.

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. 5,0 g de produs vegetal s-au tratat cu 8 porțiuni a câte 100 ml de alcool etilic de 70%. Fiecare extracție a durat 1 oră, cu separarea lichidului extractiv de reziduu vegetal. Agitarea a fost efectuată cu un agitator magnetic. Frațiunile soluțiilor extractive au fost reunite. Extractul s-a păstrat la rece timp de 8 ore, apoi s-a filtrat și s-a efectuat evaporarea solventului [126, 127].

Analiza calitativă a ultimelor fracții (produse semifinite) a fost efectuată cu ajutorul unor reacții de culoare și precipitare până a fi reunite cu toate fracțiunile din fiecare produs vegetal. Pentru identificarea flavonoidelor s-a efectuat reacția cianidolului și reacția cu soluția de acetat de plumb [101], rezultatele fiind negative pentru toate probele analizate. Pentru identificarea substanțelor tanante s-au realizat reacțiile cu soluție de gelatină 1% și cu soluție de alaun de fier și amoniu, rezultatele fiind negative [101]. Lipsa efectului analitic, în urma analizei calitative, indică despre epuizarea maximală a produselor vegetale analizate.

Randamentul extractelor uscate și pierderea prin uscare

Randamentul extractelor a fost calculat în raport cu produsul vegetal uscat.

Determinarea pierderii prin uscare s-a efectuat în etuvă după metoda descrisă în *FR*, ed a X-a, capitolul IX. C.15. S-au utilizat fiole de cântărire, aduse la o masă constantă. Fiolele cu câte

1,0 g de extract uscat, se țin în etuvă la 105⁰C timp de 3 ore, se răcesc în exicator și se cântăresc; procedura de uscare continuă până la atingerea unei mase constante (tabelul 3.4).

Tabelul 3.4. Randamentul și pierderea prin uscare a extractelor uscate, obținute din produsele vegetale de *H. perforatum*

Extractele uscate	Randamentul extractului, %	Pierderea prin uscare, %
Obținute prin metoda de repercolare din <i>Hyperici herba</i>		
Etanol de 40%	23.3	3,8
Etanol de 50%	33.3	3,7
Etanol de 60%	43.6	3,3
Etanol de 70%	34	3,2
Etanol de 80%	34.8	3,7
Etanol de 90%	33	3,6
Etanol de 70%, PV din colecția CȘPDPM	34	3,5
Obținute prin metoda de repercolare din diverse produse vegetale		
Extractul din flori	50,54	2,7
Extractul din frunze	44,26	2,8
Extractul din tulpini	14,5	3,35
Extractul din părți aeriene, flora spontană	45,16	3,65
Extractul din părți aeriene, colecția CȘPDPM	42,66	2,55

Rezultatele confirmă faptul că macerarea fracționată cu agitare a fost mai eficientă pentru extragerea principiilor active din produsele vegetale de *H. perforatum*. Rezultatele obținute stau la baza optimizării metodei de extracție și de obținere a extractelor uscate de sunătoare, descrisă în capitolul următor.

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

Toate substanțele de referință, pentru studiul chimic calitativ (metoda de CSS) și cantitativ (metode spectrofotometrice, HPLC) a extractelor uscate au fost procurate de la Sigma-Aldrich.

Analiza calitativă a extractelor uscate prin reacții de identificare și prin CSS

Substanțele tanante s-au identificat prin reacții de culoare și sedimentare în extractele uscate, obținute din părți aeriene prin metoda de repercolare (cu alcool etilic în concentrații de 40-90%) și prin macerare (cu alcool etilic de 70%) din părți aeriene (PA), flori (FL), frunze (FR), tulpini (TU) de *H. perforatum*.

Probele de analizat (1mg/ml) s-au pregătit prin dizolvarea extractelor analizate în alcool etilic 70% și în apă [101, 102] .

S-au realizat reacțiile cu soluție de gelatină 1% și cu soluție de alaun de fier și amoniu. După adăugarea soluției de gelatină de 1%, în toate soluțiile analizate a apărut o opalescență, cu o intensitate mai mare în soluțiile hidroetanolicе . Opalescență mai puțin pronunțată s-a observat în ambele soluții (hidroalcoolică și apoasă) ale extractului din tulpini (fig. A2.3, fig. A2.4).

Cu alaun de fier și amoniu extractele analizate s-au colorat în verde-negru, ce denotă prezența substanțelor tanante condensate. În toate soluțiile alcoolice culoarea este mai intensă, spre deosebire de soluțiile apoase (fig. A2.3, fig. A2.4).

Prezența compușilor catehici, în extractele examinate, s-a demonstrat prin metoda de CSS [101, 102, 128, 129].

Prepararea soluțiilor hidroetanolicе de analizat: 0,025 g (probă exactă) de extracte uscate s-au amestecat cu 20 ml de alcool etilic de 70%/apă și s-au ținut pe baia de apă, la temperatura de 60°C până la dizolvarea completă; după răcire, soluțiile s-au adus până la cotă, în baloane de 25 ml cu alcool etilic de 70%/apă și s-au filtrat. *Soluția substanței de referință:* soluția 0,1% de (+)-hidrat de catehină (CA) în etanol. *Faza mobilă:* n-butanol:acid acetic:apă (40:12:28). *Faza staționară:* plăci cromatografice de silicagel, cu indicator fluorescent F₂₅₄ „Sigma-Aldrich” de 20x20 cm. *Aplicare:* 10μl sub formă de cerc. *Migrare:* 10,5 cm. *Uscarea plăcilor:* 100-105°C, timp de 10 minute. *Detecție:* s-a pulverizat placa cu soluție de 1% de vanilină în HCl concentrat. Catehinele apar în formă de spoturi roșii sau portocalii [129].

Catehinele au fost identificate după colorarea în roșu a spoturilor ($R_f = 0,47$ și 0,48), pe cromatograma soluțiilor hidroetanolicе, cu soluție de vanilină de 1% în HCl conc. (fig. 3.14).

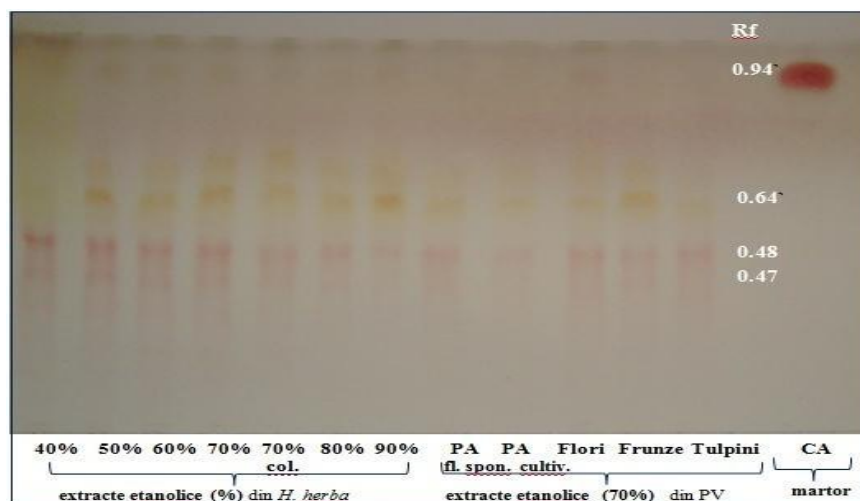


Fig. 3.14. Identificarea cromatografică a catehinelor în soluțiile hidroetanolicе cu soluție de vanilină de 1%

De rând cu extractele examinate pe linia de start a plăcii cromatografice s-au aplicat în calitate de substanțe de referință soluțiile de 0,1 % (+)-hidrat de catehină (CA) și de acid galic (GA) și de 0,001% de hipericină (HI). Faza mobilă, aplicarea soluțiilor analizate, migrarea fazei mobile și uscarea plăcilor s-au efectuat similar soluțiilor hidroetanolicе. Detecția s-a efectuat cu soluție de FeCl₃ de 1% [130]. Revelarea catehinelor s-a realizat prin vizualizarea cromatogramelor

în lumină vizibilă și UV la 360 nm, prin pulverizarea cu soluție de FeCl_3 1%, catehinele apar ca spoturi de culoare verde sau albastră (fig. 3.15) [129].

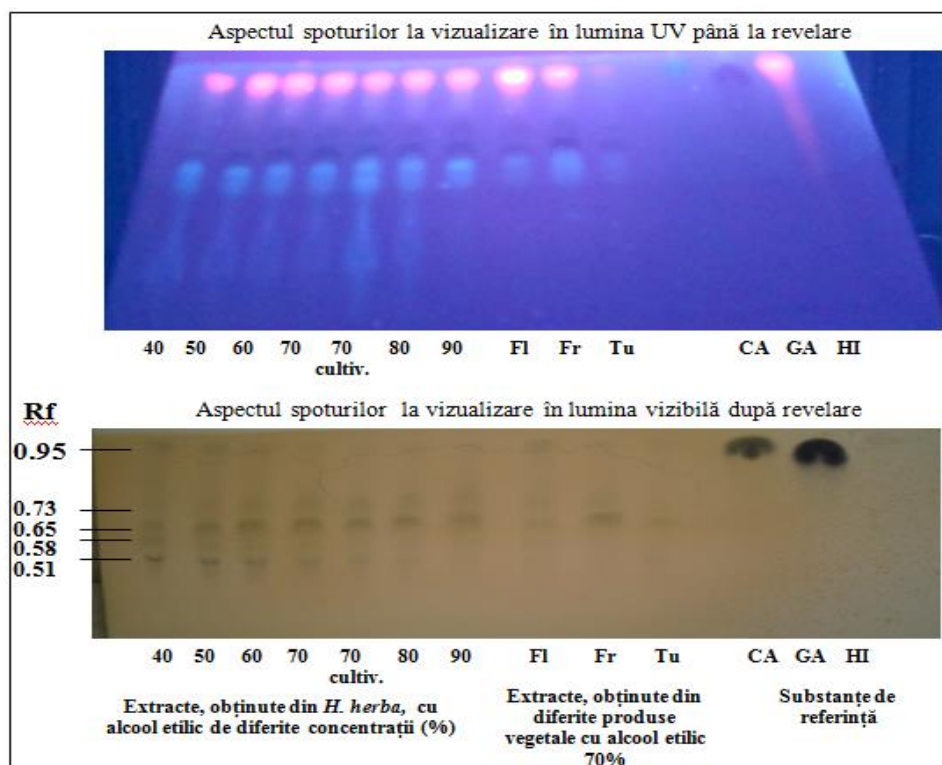


Fig. 3.15. Identificarea cromatografică pe strat subțire a catehinelor în soluțiile apoase ale extractelor uscate de *H. perforatum* cu soluție de FeCl_3 de 1%

Pe cromatograma soluțiilor apoase la nivel de $R_f = 0,51$ s-au depistat spoturi colorate cu FeCl_3 de 1% în albastru (fig. 3.15). Analiza efectuată denotă prezența substanțelor tanante condensate (polimeri de origine catehinică) în soluțiile alcoolice și în cele apoase.

După pulverizarea plăcilor cu soluții de vanilină de 1% în HCl conc. și FeCl_3 de 1%, pe ambele cromatograme, la nivel de substanță de referință (+)-hidrat de catehină ($R_f = 0,94-0,95$), spoturile nu s-au colorat în roșu sau albastru, fapt ce indică prezența unui compus dintr-un alt grup chimic. La lumina UV 360 nm culoarea spoturilor la nivel de $R_f = 0,94-0,95$ a fost roșie, ce a corespuns substanței de referință – hipericinei (fig. 3.15).

Analiza cantitativă a extractelor uscate prin utilizarea metodelor spectrofotometrice UV-VIS

În extractele analizate (obținute prin metoda de repercolare și macerare) au fost determinate prin spectrofotometrie UV-VIS totalul de polifenoli, flavonoide și derivați de antracen [131, 132, 133, 134].

Rezultatele obținute au fost prelucrate cu ajutorul statisticii descriptive, iar pentru evaluarea comparativă a rezultatelor s-a aplicat testul neparametric *Kruskal-Wallis*.

Dozarea spectrofotometrică UV-VIS a totalului de polifenoli

Conținutul total de polifenoli, în extractele uscate de *Hyperici herba*, a fost determinat prin metoda spectrofotometrică cu reactivul *Folin-Ciocalteu* (CHEM-LAB): 0,05 g de extract uscat (1mg/ml) s-a dizolvat în 20 ml de alcool etilic de 70% și s-a adus până la 50 ml (soluția A). La 0,5 ml de soluție A s-a adăugat 2,5 ml de reactiv *Folin-Ciocalteu* (1:10), 5 ml de apă purificată și peste 1 minut, după agitare, s-au adăugat 8 ml de soluție de Na_2CO_3 de 20%. Amestecul s-a lăsat pentru 2 ore la temperatura camerei. Gradul de absorbanță a amestecului s-a determinat la spectrofotometrul *Metertech* UV/VIS SP 8001, la lungime de undă de 760 nm [131, 132]. Totalul de compuși fenolici a fost exprimat în mg echivalent acid galic (GAE)/g extract uscat. Curba de calibrare a fost construită pentru concentrațiile de acid galic cuprinse între 0,02-0,2 mg/ml, respectând modalitatea de lucru folosită în prelucrarea probelor; coeficientul de corelație fiind $R^2=0,9989$, iar ecuația de regresie – $y=0,223x + 0,003$ (fig. 3.16) [133, 134].

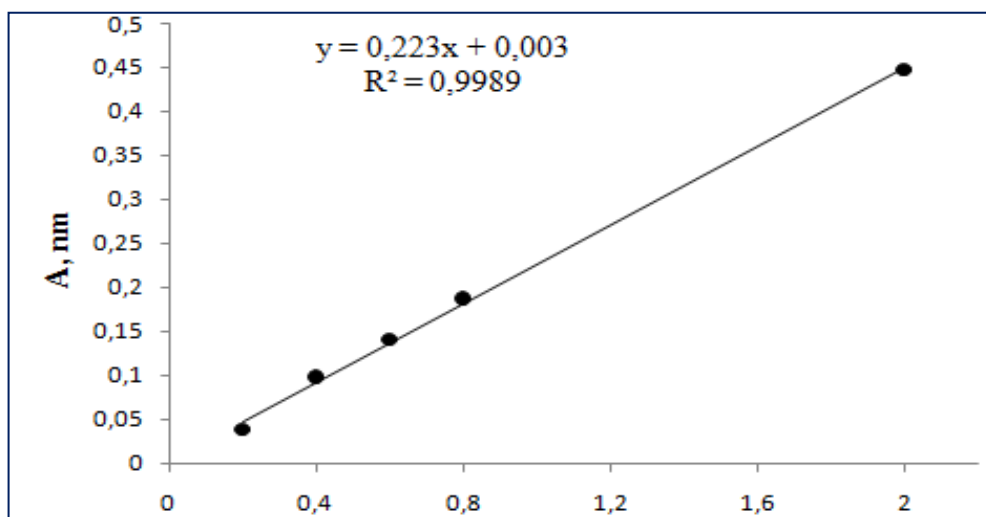


Fig. 3.16. Curba de calibrare a soluției standard de acid galic

Dozarea spectrofotometrică UV-VIS a totalului de flavonoide

Determinarea cantitativă a flavonoidelor s-a efectuat după metoda din *Farmacopeea Republicii Belarus*, monografia *Hyperici herba*, bazată pe proprietatea flavonelor de a forma chelați cu clorura de aluminiu (culoare galbenă intensă). Metoda, cu unele modificări, a fost adaptată pentru dozarea totalului de flavonoide în extracte uscate [104].

Probele de analizat se pregătesc din 0,01 g de extract uscat (masă exactă), care se transferă într-un balon cotelat 10 ml, apoi se adaugă 5 ml de etanol de 70%; soluția obținută se aduce până la cotă, cu același solvent (soluția A). Soluțiile de analizat și de compensare se pregătesc similar metodei descrise în subcapitolul 2.3 [104]. Conținutul procentual al totalului de flavonoide, exprimat în rutozidă, s-a calculat după formula 3.2 [104, 110]:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot (100 - w)}, \text{ în care:} \quad (3.2)$$

A – absorbanța soluției de analizat;

A₀ – absorbanța soluției de rutozidă;

m – masa extractului uscat luat în lucru, g;

m₀ – masa rutozidei, g;

w – pierderea în masă, la uscare, a extractului uscat, %.

Dozarea spectrofotometrică UV-VIS a totalului de derivați de antracen

Analiza cantitativă a derivaților de antracen în extractele studiate s-a efectuat după tehnica preluată din surse bibliografice, aplicată în analiza tincturii și preparatelor cu conținut de extract de sunătoare (Helarium® Hypericum, Deprim, Negrustin) cu unele modificări [133].

Prepararea probei de analizat: 0,05 g (probă exactă) de extract uscat se plasează într-un balon cotat, cu o capacitate de 25 ml; se adaugă 20 ml de alcool etilic de 70% și se dizolvă prin încălzire pe baie de apă. După dizolvarea completă soluția se răcește și se aduce până la cotă cu același solvent. Soluția obținută se trece prin hârtie de filtru (linie roșie). Soluția de comparare a fost alcoolul etilic de 96%. Măsurarea absorbanței s-a efectuat la o lungime de undă de 591 nm [125, 133]. Conținutul procentual al derivaților de antracen în recalcul la hipericină, în extractul absolut uscat, s-a calculat în baza formulei 3.3:

$$X = \frac{A \cdot 25}{718 \cdot m}, \text{ în care:} \quad (3.3)$$

A – absorbanța soluției analizate;

718 – absorbția specifică a soluției de hipericină, 1%;

m – masa probei, g.

Prin acest studiu s-a identificat gradul de extracție a totalului de polifenoli, utilizând în calitate de solvent alcoolul etilic de diverse concentrații. S-a constatat faptul că totalul polifenolic (exprimat în echivalentul acidului galic, %) se extrage la maximum cu alcoolul etilic de 60% (Mediana = 10,69; IQR = 1,00) (tabelul 3.5).

Totalul de flavonoide (%) exprimat în rutozidă este cel mai înalt în extractul obținut din *Hyperici herba* cu etanol 80% (Mediana = 18,53; IQR = 0,08). Conținutul total de flavonoide (%) în extractul uscat obținut cu etanol de 70 % din PV *Hyperici herba*, prelevat din colecția CȘPDPM, este egal cu Mediana = 12,37; IQR = 1,00, iar din produsul vegetal colectat din flora spontană este egal cu Mediana = 15,54; IQR = 0,111 (tabelul 3.5, tabelul A2.1).

Conținutul (%) cel mai înalt de antracenderivați, exprimat în hipericină, s-a depistat în extractul din *Hyperici herba* (Mediana = 0,258; IQR = 0,022) obținut cu alcool etilic de 70% și

cel mai scăzut – în extractul obținut cu etanol de 40% (Mediana = 0,414; IQR = 0,004) (tabelul 3.4). În extractul obținut cu etanol de 70% din *Hyperici herba*, prelevat din colecția CȘPDPM, totalul de antraceni este egal cu Mediana = 0,343; IQR = 0,010 (tabelul 3.5, tabelul A2.1).

Tabelul 3.5. 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	Totalul de polifenoli (%), exprimat în acid galic, Me (IQR)	Totalul de flavonoide (%), exprimat în rutozidă, Me (IQR)	Totalul derivaților de antracen (%), 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% (colecția)	8,73 (4,89)	12,37 (1,00)	0,34 (0,01)
P	< 0,001	< 0,0001	< 0,0001

Notă: n/a- analiza nu a fost efectuată

Evaluarea comparativă a datelor, în urma analizei cantitative a extractelor uscate, a demonstrat semnificație statistică ($p < 0,001$), ceea ce permite de a considera, că concentrația alcoolului etilic joacă un rol important în extracția compușilor chimici din produsele vegetale de sunătoare.

Totalul de polifenoli (Mediana = 8,73; IQR = 4,89), flavonoide (Mediana = 12,37; IQR = 1,00) și derivați ai antracenului (Mediana = 0,34; IQR = 0,01) în extractul uscat, obținut din *Hyperici herba* cu etanol de 70% (PV din colecție), a fost mai jos comparativ cu extractul din PV din flora spontană (tabelul 3.5).

Au fost determinate concentrațiile optime de alcool etilic pentru extragerea maximală din *Hyperici herba*, din flora spontană a totalului de polifenoli (60%), a totalului de flavonoide (80%) și a totalului de derivați ai antracenului (70%).

Aplicând metoda de macerare fracționată, cu agitare, polifenolii (mg echivalent acidului galic/g extract uscat) au fost extrași, la maximum, din flori (Mediana = 150,95; IQR = 1,35), apoi din frunze (Mediana = 115,11; IQR = 1,035), părți aeriene (Mediana = 10818; IQR = 2,77) și din tulpini (Mediana = 33,51; IQR = 0,26) [117]. În extractul uscat obținut din *Hyperici herba*, din colecția CȘPDPM, totalul de polifenoli (Mediana = 108,33; IQR = 6,94) este aproape identic cu cel din flora spontană (tabelul 3.6, tabelul A2.2).

Cel mai înalt conținut de flavonoide (%) a fost determinat în extractul din flori (Mediana = 14,47; IQR = 0,24), iar cel mai mic – în extractul din tulpini (Mediana = 5,07; IQR = 0,377). În extractul uscat din părțile aeriene cultivate, conținutul de flavonoide este mai mare (Mediana =

12,65; IQR = 0,49), în comparație cu extractul din *Hyperici herba*, din flora spontană (Mediana = 10,60; IQR = 0,75) (tabelul 3.6, tabelul A2.2).

În extractele uscate, obținute cu etanol de 70% din diferite organe ale plantei, cea mai mare cantitate de derivați de antracen (%) se conține în flori (Mediana = 0,839; IQR = 0,022), apoi în frunze (Mediana = 0,269; IQR = 0,004); în extractul uscat din tulpini se atestă cel mai mic conținut (Mediana = 0,036; IQR = 0,001). În extractul uscat din părți aeriene cultivate conținutul de derivați de antracen (%) este mai mare (Mediana = 0,437; IQR = 0,007), comparativ cu extractul uscat din părți aeriene colectate din flora spontană (Mediana = 0,289; IQR = 0,011) (tabelul 3.6, tabelul A2.2).

Tabelul 3.6. Totalul de polifenoli, flavonoide și derivați de antracen în extractele uscate obținute din produsele vegetale de *H. perforatum* prin metoda de macerare

Produsele vegetale	Totalul de polifenoli (%), exprimat în acid galic, Me (IQR)	Totalul de flavonoide (%), exprimat în rutozidă, Me (IQR)	Totalul derivaților de antracen (%), exprimat în hipericină, Me (IQR)
Părți aeriene (colecția CȘPDPM)	10,832 (6,94)	12,65 (0,49)	0,437 (0,007)
Părți aeriene (flora spontană)	10,825 (2,77)	10,60 (0,75)	0,289 (0,011)
Flori (flora spontană)	15,091 (0,84)	14,47 (0,24)	0,845 (0,022)
Frunze (flora spontană)	11,511 (1,03)	13,32 (0,30)	0,269 (0,004)
Tulpini (flora spontană)	3,348 (0,16)	5,070 (0,37)	0,036 (0,01)

Rezultatele prezentate în tabelul 3.5 denotă, că extractul uscat cu cel mai înalt conținut de polifenoli, flavonoide și derivați de antracen, a fost obținut din PV *Hyperici flores*.

Aplicarea testului *Kruskal-Wallis* a evidențiat diferențe statistic semnificative a rezultatelor dozării totalului de polifenoli ($p = 0,000025$), de flavonoide ($p = 0,000013$) și de derivați ai antracenului ($p = 1,3164E-8$), ce permite să concludem, că organul plantei influențează acumularea compușilor chimici.

Determinarea cantitativă a flavonoidelor prin utilizarea metodei HPLC

Pentru analiza cantitativă a flavonoidelor prin HPLC s-au utilizat șapte extracte uscate, a căror scheme de obținere sunt descrise în subcapitolul 3.1. S-au analizat trei probe de extracte obținute prin metoda de repercolare din *Hyperici herba*, dintre care două extracte s-au obținut din PV din flora spontană cu alcool etilic de 70% și de 80%, iar din PV din colecția CȘPDPM – numai cu alcool etilic de 70%. Patru probe de extracte uscate au fost obținute prin metoda de macerare din *Hyperici herba*, din care compușii chimici s-au extras cu etanol de 70%, iar din *Hyperici flores*

– cu etanol de 80%. Ambele PV s-au colectat din flora spontană și din colecția CȘPDPM USMF „Nicolae Testemițanu”.

Extracțele uscate au fost analizate prin metoda HPLC identică cu cea aplicată în analiza produselor vegetale (descrisă în subsubcapitolul 2.3) cu utilizarea substanțelor-standard: rutozida, hiperozida, cvercetrozida, cvercetolul, I3, II8-biapigenina (fig. 3.17, tabelul A2.3) [114].

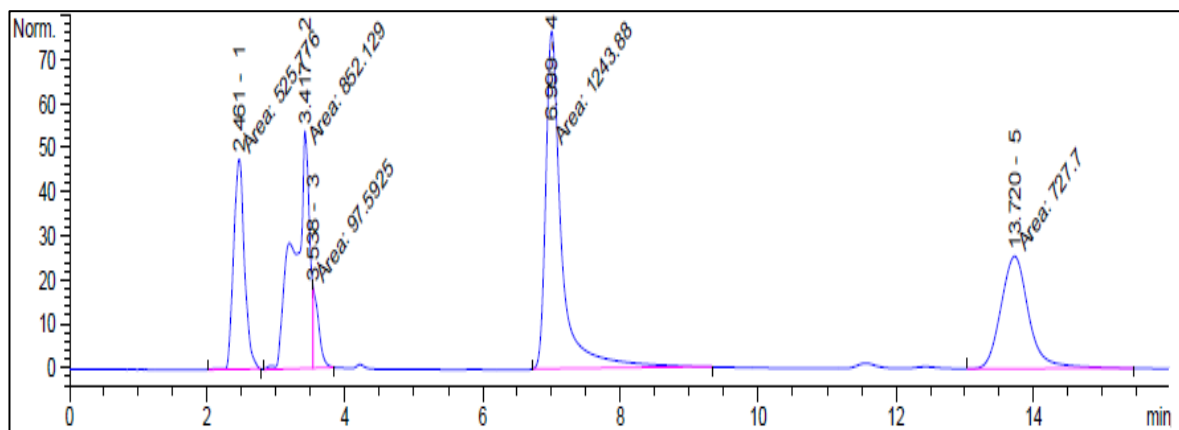


Fig. 3.17. Cromatograma HPLC a unui amestec din 5 substanțe standard din grupul flavonoidelor

Soluțiile extractelor analizate s-au pregătit în concentrații de 2 mg/ml, utilizând ca solvent alcool etilic de 70% și de 80%. Soluțiile analizate au fost filtrate prin membranele de filtru, cu o dimensiune a porilor de 0,45 μm. Conținutul de flavonoide (X, %) în extracțele uscate s-a calculat după formula 3.4:

$$X = \frac{S_x \cdot m_{st} \cdot 2,5 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{S_{st} \cdot 25 \cdot 25 \cdot m_{pr} \cdot 100 \cdot (100 - W)}, \text{ în care:} \quad (3.4)$$

S_x – aria picului flavonoidului determinat pe cromatograma probei de analizat;

S_{st} – aria picului flavonoidului pe cromatograma soluției standard;

m_{st} – masa substanței de referință, g ;

m_{pr} – masa extractului uscat, g;

W – pierderea prin uscare, %.

Identificarea s-a realizat prin compararea timpului de retenție a unor flavonoide din extracțele analizate cu cele ale substanțelor standard: rutozida (picul 1), hiperozida (picul 2), cvercetrozida (picul 3), cvercetolul (picul 4), I3,II8-biapigenina (picul 5) (fig. 3.17, tabelul A2.3, tabelul A2.4).

În figura 3.18 sunt prezentate cromatogramele HPLC a extractelor uscate din *Hyperici herba*, obținute prin metoda de repercolare. Pentru analiză au fost luate următoarele probe: extractul uscat obținut cu etanol de 80% din produsul vegetal, colectat din flora spontană (A);

extractul obținut cu etanol de 70% din produsul vegetal, colectat din flora spontană (B); extractul obținut cu etanol de 70% din produsul vegetal, colecția CȘPDPM (C) (tabelul A2.3).

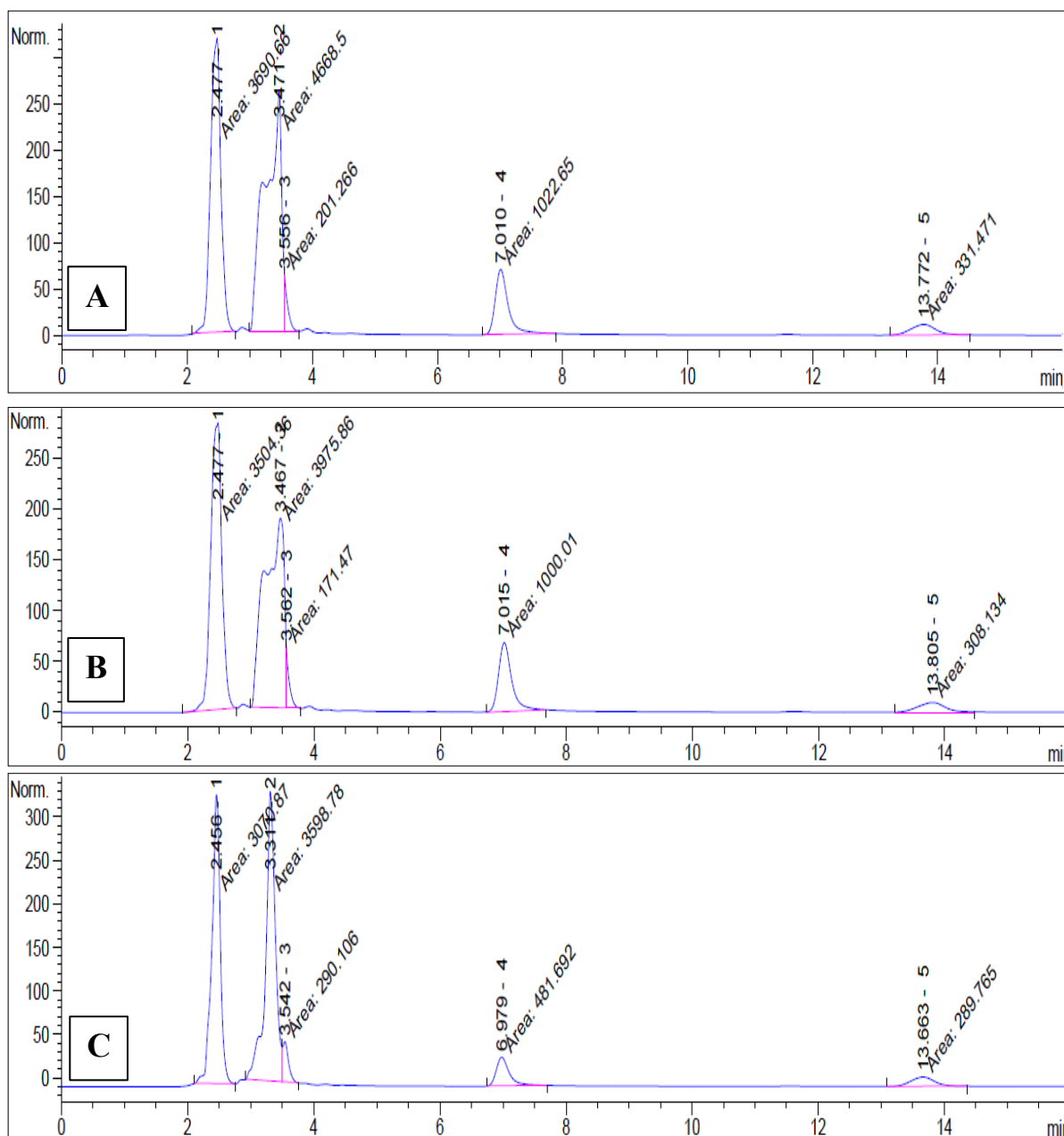


Fig. 3.18. Cromatogramele HPLC ale extractelor uscate din Hyperici herba, obținute prin metoda de repercolare cu fracționarea produsului vegetal în părți egale cu ciclu neterminat

În figura 3.19 sunt prezentate cromatogramele HPLC ale extractelor uscate obținute din părțile aeriene, colectate din flora spontană (A) și colecția CȘPDPM (B), utilizând metoda de macerare fracționată, cu agitare.

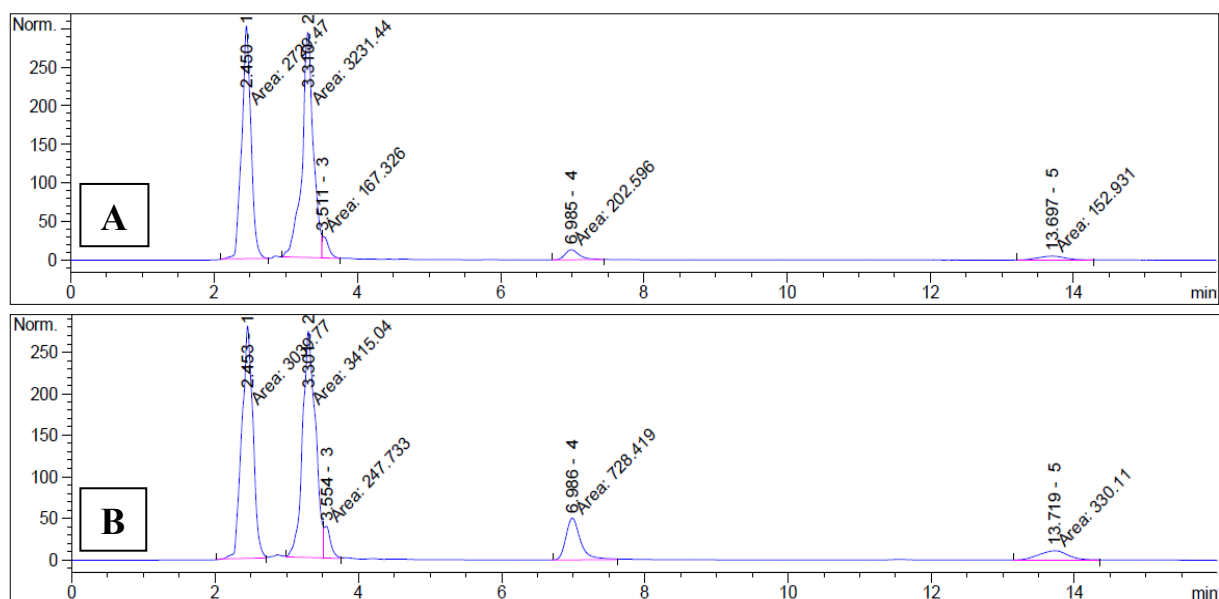


Fig. 3.19. Cromatogramele HPLC pentru analiza calitativă și cantitativă a unor flavonoide în extractele uscate obținute din *Hyperici herba* prin metoda de macerare cu agitare

Cromatogramele HPLC ale extractelor uscate, obținute prin macerare fracționată cu agitare din *Hyperici flores*, colectate din flora spontană (A) și colecția CȘPDPCM (B) sunt prezentate în figura 3.20 (tabelul A2.4).

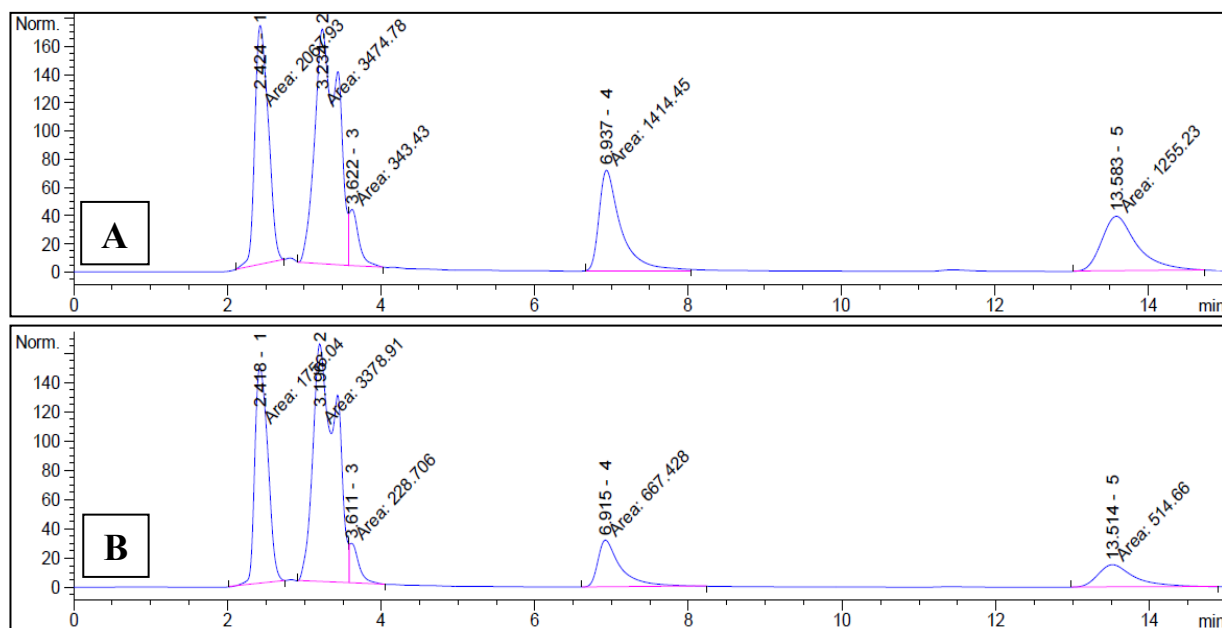


Fig. 3.20. Cromatogramele HPLC pentru analiza calitativă și cantitativă a unor flavonoide în extractele uscate, obținute din *Hyperici flores* prin metoda de macerare cu agitare

Analiza calitativă prin metoda HPLC a flavonoidelor menționate mai sus a demonstrat prezența acestora în extractele analizate, indiferent de proveniența produselor vegetale (flora spontană sau colecție CȘPDPCM). Concentrația flavonoidelor identificate s-a calculat după

compararea ariilor picurilor compușilor chimici în extracte, cu ariile picurilor substanțelor standard (fig. 3.17-3.20, tabelul A2.3, tabelul A2.4).

În tabelul 3.7 și tabelul A2.5 sunt prezentate valorile concentrațiilor flavonoidelor identificate în extractele uscate, obținute din *Hyperici herba* (PV din flora spontană și cultivată) prin metoda de repercolare cu alcool etilic de 70% și 80%. Rezultatele obținute denotă despre o cantitate de flavonoide mai semnificativă în extractul uscat din *Hyperici herba* din flora spontană, folosind ca solvent alcoolul etilic de 80%. S-a demonstrat, de asemenea, un conținut de flavonoide (rutozidă, hiperozidă, cvercitol, I3, II8 – biapigenină) sporit în extractul, obținut cu alcool etilic de 70% din *Hyperici herba* din flora spontană, iar cvercetrozida se conține mai mult în extractul din PV din colecție. În trei extracte obținute prin repercolare compusul major este rutozida, a cărei cantitate (%) variază de la Mediana = 7,18 până la Mediana = 8,70, iar concentrația de I3,II8-biapigenină este cea mai joasă. Concentrația cea mai ridicată de hiperozidă s-a constatat în extractul uscat obținut cu alcool etilic de 80% din *Hyperici herba* (Mediana = 3,41; IQR = 0,018), colectate din flora spontană, urmat de extractul obținut cu alcool etilic de 70% din același produs vegetal (Mediana = 2,88; IQR = 0,100); iar în proba obținută cu etanol de 70%, din părțile aeriene din colecție, conținutul a fost mai mic (Mediana = 2,55; IQR = 0,030). Concentrația cea mai ridicată de cvercitol s-a determinat în extractele uscate, obținute cu alcool etilic de 80% și de 70% din părțile aeriene din flora spontană (Mediana = 0,899; IQR = 0,099 și, respectiv, Mediana = 0,823; IQR = 0,018), iar în extractul uscat din PV *Hyperici herba* cultivat conținutul de cvercitol a fost mai mic (0,39%). Concentrația I3,II8-biapigeninei în extractele analizate s-a dovedit a fi aproape identică.

Tabelul 3.7. Concentrația (%) unor flavonoide în extractele uscate obținute din *Hyperici herba* prin repercolare

Extractele uscate analizate	Concentrația (%) compușilor chimici, Me (IQR)				
	Rutozida	Hiperozida	Cvercetrozida	Cvercitol	I3,II8-biapigenina
PV din flora spontană, solvent – alcool etilic 80%	8,70 (0,0,128)	3,41 (0,018)	0,85 (0,033)	0,93 (0,10)	0,40 (0,032)
PV din flora spontană, solvent – alcool etilic 70%	8,24 (0,086)	2,88 (0,100)	0,75 (0,055)	0,83 (0,018)	0,37 (0,031)
PV din colecție, solvent – alcool etilic 70%	7,18 (0,064)	2,55 (0,030)	1,28 (0,079)	0,39 (0,012)	0,35 (0,022)

Analiza HPLC a fost aplicată și în cadrul studiului comparativ cu diferite extracte de sunătoare, obținute prin metoda de macerare fracționată cu agitare din părți aeriene și din flori, folosind în calitate de solvent alcoolul etilic de 70% și de 80% (tabelul 3.8). Datele cuprinse în tabelul 3.8 relevă că compusul chimic predominant din 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 PV *Hyperici herba*, comparativ cu extractele din *Hyperici flores*. Concentrația de hiperozidă, urmată de concentrația de cvercetrozidă, de cvercetol și de 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* [135].

Tabelul 3.8. Concentrația (%) unor flavonoide în extractele uscate din *Hyperici herba* și *Hyperici flores*, obținute prin metoda de macerare

Extractele uscate analizate	Concentrația (%) compușilor chimici, Me (IQR)				
	Rutozida	Hiperozida	Cvercetrozida	Cvercetol	I3,II8-biapigenina
<i>Hyperici herba</i> din 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> din 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> din 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> din colecția CȘPDPM	4,24 (0,094)	2,51 (0,059)	0,95 (0,079)	0,57 (0,031)	0,62 (0,015)

Aplicarea testului *Kruskal-Wallis* a evidențiat diferențe statistic semnificative a conținutului (%) rutozidei ($p = 0,000002$), hiperozidei ($p = 0,000007$), cvercetrozidei ($p = 0,000002$), cvercetolului ($p = 0,000002$) și a I3,II8-biapigenininei ($p = 0,00001$) în extractele obținute prin macerare, ce permite a considera concentrația compușilor chimici dependentă de organul plantei în care se acumulează și de locul răspândirii speciei.

În toate probele analizate, indiferent de metoda de obținere și de PV, compusul chimic principal este rutozida (Mediana = 4,24-8,69%, $p < 0,05$), urmată de hiperozidă (Mediana = 2,32-3,41%, $p < 0,05$). Rezultatele analizelor HPLC au confirmat faptul că flavonoidele se extrag maxim cu alcool etilic de 80%. Această stare de lucruri este dovedită prin compararea conținutului de compuși analizați în extractele din *Hyperici herba*, obținute prin metoda de repercolare cu alcool etilic de 80% și de 70%. Concentrația de rutozidă și cea de hiperozidă, în extractele din *Hyperici herba* (flora spontană și cultivată), obținute prin macerare cu alcool etilic de 70% este nesemnificativ mai mică, comparativ cu extractele obținute prin repercolare. Aceste rezultate denotă faptul că metoda de macerare este eficientă în obținerea produselor extractive din *H. perforatum*, fiind de scurtă durată (durata de extracție – 5 ore) în comparație cu metoda de repercolare (durata de extracție – 52 de zile). În toate probele studiate au fost determinate în concentrații rindiferite: cvercetrozida, cvercitolul și I3,II8-biapigenina. Conținutul maxim de

cvercetrozidă în extractele din părțile aeriene a fost identificat în proba obținută prin macerare din PV din colecție (Mediana = 1,09; IQR = 0,077). Concentrația de cvercetol, în extractele uscate din *Hyperici herba* a fost mai joasă, în comparație cu rutozida, hiperozida și cvercetrozida (tabelul A2.5, tabelul A2.6). Concentrația de I3,II8-biapigenină, indiferent de metodă și de concentrația de alcool, este aproape identică în toate extractele din părțile aeriene obținute prin repercolare.

Concentrația de flavonoide este absolut diferită în probele obținute prin macerare din flori, conținutul de rutozidă și de hiperozidă s-a dovedit a fi mai mic decât în părțile aeriene. Compușii chimici cvercetrozida, cvercetolul și I3,II8-biapigenina au arătat un conținut mai înalt comparativ cu extractele uscate din *Hyperici herba*.

Acest studiu a demonstrat că florile de sunătoare pot fi servi ca sursă de I3,II8-biapigenină, cu efecte antidepresive și anxiolitice [75, 76].

3.4. Optimizarea metodei de obținere a extractelor uscate

Obținerea extractelor uscate este foarte avantajoasă din punct de vedere al utilizării raționale a produselor vegetale, deoarece randamentul de extragere a compușilor biologic activi este la maxim, ceea ce determină proprietăți farmacoterapeutice marcante [136].

Rezultatele descrise în subcapitolul 3.2 au demonstrat prezența diverselor grupuri de compuși fenolici (antracenderivați, flavonoide, acizi fenolici) în părțile aeriene și în florile de sunătoare care, conform datelor din literatura de specialitate, se extrag maxim cu alcool etilic. Rezultatele cercetărilor menționate în subcapitolul 3.2, dovedesc faptul că extragentul optim în extragerea maximă a compușilor fenolici din *Hyperici herba* este etanolul de 80%. În același subcapitol este descrisă metoda de obținere a extractelor uscate în condiții de laborator – metoda de macerare fracționată cu agitare - care s-a dovedit a fi mai rapidă și mai eficientă comparativ cu metoda de repercolare cu fracționarea produsului vegetal în părți egale în ciclu neterminat.

Reieșind din cele relatate anterior, s-au determinat condițiile optime de extragere a compușilor bioactivi din flori de sunătoare: numărul de extracții, timpul per extracție, raportul între produsul vegetal și extragent. În acest scop, au fost luate patru probe de *Hyperici flores* a câte 10,0 g, la care s-a adăugat soluție hidroalcoolică 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 (tabelul 3.9). Perioada de timp necesară per ciclu de extracție la 4 probe supuse studiului a variat: proba I – 60 de minute, proba II – 45 de minute, proba III – 30 de minute, proba IV – 15 minute. Agitarea a fost efectuată cu agitator magnetic la temperatura camerei. Soluțiile extractive din fiecare ciclu s-au păstrat în frigider 5-6 ore la temperatura de +5°C, apoi s-a efectuat filtrarea la vid. Înlăturarea solventului pentru concentrarea soluțiilor extractive s-a realizat la

temperatura de +40°C la evaporatorul rotativ *Laborota 4011–digital*. Autenticitatea (culoarea, mirosul, gustul) produselor extractive obținute este prezentată în tabelul 3.9 și în figura A2.5 [136].

Tabelul 3.9. Autenticitatea extractelor uscate din *Hyperici flores*

Nr. ciclului de extracție	Numărul probei, timpul unui ciclu de extracție, culoarea extractelor uscate				Mirosul	Gustul
	I 60 min	II 45 min	III 30 min	IV 15 min		
I	purpurie	purpurie	purpurie	purpurie	specific, plăcut	amar, astringent
II	bordo-roșiatică	bordo-roșiatică	brun-roșiatică	bordo-roșiatică		
III	bordo-închisă	verde-brună	verde-brună	bordo-închisă		
IV	brun-închisă	cafeniu-închisă	cafeniu-închisă	bordo		
V	cafeniu-închisă	cafeniu-închisă	brună	bordo-închisă		

Pentru a calcula eficiența extractivă a metodei date s-a determinat cantitatea (%) substanțelor extractive din *Hyperici flores*. S-a efectuat dozarea substanțelor extractive din flori uscate de *H. perforatum* prin tehnica descrisă în FS, ed. XIV, MF 1.5.3.0006.15 și FR, ed. a X-a. A fost determinat randamentul substanțelor extractive în 1,0 g de produs vegetal uscat (44,72%).

Pentru a calcula eficiența extracției, a fost determinat randamentul compușilor chimici, extrași din *Hyperici flores*, separat pentru fiecare ciclu de extracție (tabelul 3.10). Randamentul procentual al extractului uscat raportat la masa produsului vegetal absolut uscat (Y, %), s-a calculat în baza formulei 3.5 [137, 138]:

$$Y = \frac{X * 100}{m}, \text{ unde:} \quad (3.5)$$

X – masa reziduului uscat, obținut per ciclu de extracție, g;

m – masa produsului vegetal, absolut uscat, g.

Eficacitatea extracției S (%) substanțelor solubile în soluția hidroalcoolică 80% (tabelul 3.10) s-a calculat în baza formulei 3.6 [137, 138]:

$$S = \frac{Y * 100}{E}, \text{ unde:} \quad (3.6)$$

Y – randamentul extractului uscat în recalcul la produs vegetal absolut uscat, %;

E – cantitatea procentuală a substanțelor extractive din produsul vegetal, %.

În rezultatul experimentului au fost stabiliți unii parametri ai procesului de extracție a substanțelor extractive din PV *Hyperici flores*. Întrucât influența timpului asupra randamentului extracției este unul dintre cei mai importanți parametri, au fost folosite perioade diferite de timp (15, 30, 45, 60 de minute) per ciclu de extracție (tabelul 3.10).

**Tabelul 3.10. Caracteristicile cantitative în procesul de obținere a extractului uscat
din *Hyperici flores***

Nr. d/o a ciclului de extracție	Timpul per ciclu de extracție, 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	2,05	22,10	49,42
II	0,92	9,53	21,31	0,83	8,88	19,68	0,96	10,28	22,99	0,81	8,88	19,86
III	0,40	4,40	9,83	0,34	3,70	8,25	0,31	3,29	7,40	0,40	4,38	9,79
IV	0,22	2,3	5,14	0,24	2,57	5,75	0,18	1,96	4,38	0,25	2,73	6,10
V	0,13	1,46	3,26	0,13	1,39	3,11	0,16	1,74	3,89	0,19	2,10	4,69
VI	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,16	1,72	3,85
Totalul	3,96	42,61	94,05	3,90	41,94	93,59	3,91	41,98	93,98	3,86	41,91	93,71

Notă: „–” – nu a fost determinat

Extracția s-a realizat până la obținerea soluțiilor extractive incolore, inclusiv până la decolorarea produsului vegetal. Extragerea compușilor chimici din probele I-III s-a efectuat în cinci cicluri cu perioada de extracție a unei fracții de 60, 45, 30 de minute, respectiv; iar a IV-a probă a fost extrasă de șase ori, cu o durată de timp per ciclu de 15 minute. În al cincilea ciclu a fost atestată cea mai mică masă de extract uscat, în proba cu o durată de timp per extracție de 60 de minute. S-a remarcat o eficacitate mai mare de extragere a substanțelor solubile în proba I comparativ cu alte probe. Masa totală și randamentul total în extractele uscate au fost determinate prin însumarea masei și a randamentului pentru probele I-III extrase în cinci cicluri și pentru proba IV extrasă în șase cicluri. Rezultatele prezentate în tabelul 3.10 indică o masă totală și un randament total în extractele obținute din probele I-III, care nu diferă semnificativ comparativ cu proba IV, la care ambii parametri (masa totală și randamentul total) sunt mai mici, în pofida faptului că extracția s-a efectuat în șase cicluri. Masa totală, randamentul total și eficacitatea extracției substanțelor solubile în alcool etilic de 80% au fost mai mari în proba I cu durata de extracție per ciclu de 60 de minute.

Pentru a demonstra gradul înalt de eficacitate, în extracția compușilor chimici prin macerare fracționată cu agitare cu durata per ciclu de 60 de minute, s-a efectuat determinarea cantitativă a totalului flavonoidelor și polifenolilor în toate extractele sus menționate.

Conținutul total al flavonoidelor din extractele uscate, în funcție de ordinea și de timpul unui ciclu de extracție

Concentrația flavonoidelor în probele analizate, s-a calculat cu ajutorul curbei de calibrare stabilite în aceleași condiții cu soluția probă. Tehnica de preparare este descrisă în subcapitolul 3.3. Curba de calibrare a rutozidei a fost realizată în intervalul concentrațiilor 0,001-0,006 mg/ml.

Gradul de absorbantă s-a citit peste 40 de minute la o lungime de undă de 412 nm. Conținutul total de flavonoide a fost calculat prin intermediul ecuației de regresie a curbei de calibrare: $y = 23,429 + 0,0013x$, $R^2 = 0,9992$. Rezultatele sunt incluse în tabelul 3.11, iar statistica descriptivă a rezultatelor este prezentată în tabelul A2.7.

Tabelul 3.11. Conținutul comparativ al totalului de flavonoide în extractele uscate din *Hyperici flores* în funcție de ordinea ciclului și timpul per extracție

Nr d/o al ciclului de extracție	Timpul de extracție a unui ciclu, min			
	Proba I – 60	Proba II – 45	Proba III – 30	Proba IV – 15
	Totalul de flavonoide, mg-echivalent rutozidei/g masă uscată, Me; IQR			
I	32,44; 2,08	32,45; 1,98	30,02; 1,28	25,63; 3,64
II	13,29; 0,51	11,53; 0,89	12,58; 0,49	9,27; 0,84
III	5,76; 0,24	4,13; 0,23	3,15; 0,46	5,17; 0,09
IV	2,47; 0,24	3,15; 0,22	2,10; 0,12	3,20; 0,20
V	1,16; 0,09	1,16; 0,06	1,67; 0,18	2,57; 0,09
Suma medianelor, mg/g	55,35	52,42	49,52	45,84

Prin acest studiu s-au dovedit următoarele: flavonoidele se extrag la maximum din PV *Hyperici flores* prin metoda de macerare fracționată cu agitare, cu durata de extracție per ciclu de 60 de minute. Practic, au fost optimizate unele condiții de extragere (concentrația de extragent, numărul de extracții și durata per extracție) a compușilor chimici din florile de sunătoare. S-a demonstrat faptul că masa extractelor, de la prima extracție până la a cincea, se micșorează treptat în toate 4 probe; respectiv, totalul de flavonoide se micșorează, de la prima până la a cincea extracție. Valoarea maximă a conținutului total de polifenoli (Mediana = 55,35 mg/g) în urma a cinci extracții a fost la proba I.

Conținutul total de polifenoli din extractele uscate, în funcție de ordinea și de timpul unui ciclu de extracție

În acest experiment conținutul total de polifenoli în probele analizate a fost determinat prin tehnica descrisă în subcapitolul 3.3 cu anumite ajustări. Soluțiile de analizat au fost aduse până la cotă cu apă distilată în baloane cotate de 25 ml. Totalul de polifenoli în extractele analizate s-a exprimat în echivalentul acidului galic (mg/ml) și s-a calculat cu ajutorul curbei de calibrare a substanței standard (acid galic) stabilite în aceleași condiții cu soluția probă. S-a pregătit soluția-stoc (1mg/ml) din care s-au efectuat diluții în concentrații 0,001-0,006 mg/ml. Absorbanta fiecărei soluții s-a citit la lungimea de undă de 760 nm [131, 139]. Rezultatele s-au calculat în baza ecuației de regresie: $y = 88,486x + 0,0211$, $R^2 = 0,9990$.

Rezultatele cercetării sunt incluse în tabelul 3.12; acestea reprezintă Mediana și abaterea intercuartilă a nouă măsurători; statistica descriptivă a rezultatelor dozării totalului de polifenoli

în extractele uscate din *Hyperici flores* în funcție de ordinea ciclului și durată unei extracții este prezentată în tabelul A2.8.

Tabelul 3.12. Conținutul total de polifenoli în extractele uscate din *Hyperici flores* în funcție de ordinea și timpul per extracție

Nr d/o al ciclului de extracție	Timpul de extracție a unui ciclu, min			
	Proba I – 60	Proba II – 45	Proba III – 30	Proba IV – 15
	Totalul de polifenoli, mg-echivalent acidului clorogenic/g masă uscată, Me; IQR			
I	57,16; 2,21	57,40; 2,44	56,77; 1,22	54,08; 7,75
II	22,29; 1,18	19,51; 0,45	24,62; 0,47	19,69; 1,34
III	11,29; 0,32	7,96; 0,35	6,69; 0,53	10,81; 0,15
IV	5,43; 0,52	6,69; 0,45	4,79; 0,40	6,94; 0,25
V	3,87; 0,12	3,21; 0,94	3,75; 0,01	5,51; 0,25
Totalul, mg/g	100,04	94,77	96,62	97,03

Totalul polifenolic sumativ s-a dovedit a fi maxim (Mediana = 100,04; IQR = 0,12) în produsul extractiv cu timpul de extracție per ciclu de 60 de minute.

Analiza calitativă prin cromatografie pe strat subțire a compușilor fenolici

Analiza calitativă a produselor extractive, din prima și din a patra probă s-a efectuat prin CSS [104, 140]. Soluțiile de analizat ale extractelor uscate s-au pregătit în concentrații de 2 mg/ml. Au fost analizate probele cu o durată per ciclu de extracție de 60 de minute (fig. 3.21 A) și cu o durată per ciclu de 15 minute (fig. 3.21 B). Ordinea ciclurilor este indicată pe cromatogramele cu cifrele 1, 2, 3, 4, 5. Au fost utilizate următoarele substanțe de referință: rutozidă (6), hiperozidă (7), luteolină (8), izocvercetrozida (9), cvercetrozida (10), cvercetol (11), apigenină (12), apigenin-7-glucozidă (13), amentoflavonă (14), biapigenină (15), acid clorogenic(16), acid cafeic (17) și hipericină (18) (fig. 3.21).

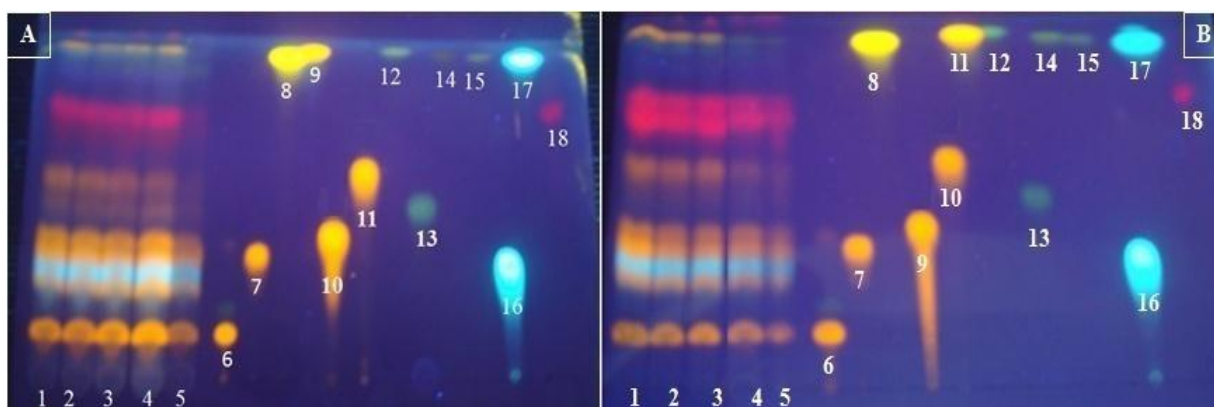


Fig. 3.21. Cromatogramele pe strat subțire în lumina UV (366 nm): durata unui ciclu de extracție de 60 de minute (A) și de 15 minute (B)

În urma examinării cromatogramelor, la ambele probe analizate, s-a observat că intensitatea culorii spoturilor substanțelor chimice a fost mai slabă în extractele din al cincilea

ciclu de extracție, ce denotă despre conținutul mai scăzut al compușilor chimici.

Prin intermediul CSS, în extractele uscate din *Hyperici flores* se disting trei clase de compuși chimici: flavonozidele, hipericinele și acizii fenolici. Culoarea spoturilor, valorile Rf a substanțelor de referință și ale compușilor chimici identificați în extractele analizate sunt prezentate în tabelul 3.13.

Tabelul 3.13. Aspectul spoturilor și Rf a compușilor chimici identificați

Substanțele de referință	Culoarea spoturilor	Rf, cm	
		durata de extracție 60 de minute	durata de extracție 15 minute
Rutozida (Sigma-Aldrich)	portocalie	0,202	0,21
Hiperozida (Sigma-Aldrich)	portocalie	0,404	0,42
Luteolina (Sigma-Aldrich)	galbenă	0,94	0,94
Izocvercetrozida (Sigma-Aldrich)	portocalie	0,45	0,46
Cvercetrozida (EDQM)	portocalie	0,61	0,62
Cvercetolul (Sigma-Aldrich)	portocalie	0,96	0,95
Apigenina (Sigma-Aldrich)	verzuie	0,97	0,96
Apigenina-7-O- β -D-glucozida (Sigma-Aldrich)	verzuie	0,52	0,52
Amentoflavona (Sigma-Aldrich)	verzuie	0,95	0,944
I3,I18-biapigenina (Sigma-Aldrich)	verzuie	0,947	0,95
Acidul clorogenic (Sigma-Aldrich)	albastră	0,38	0,38
Acidul cafeic (Sigma-Aldrich)	albastră	0,94	0,94
Hipericina (Sigma-Aldrich)	roșie	0,78	0,78

Utilizând metoda spectrofotometrică, descrisă în subcapitolul 2.3, a fost dozat totalul de flavonoide (în echivalentul rutozidei) în produsele vegetale *Hyperici herba* și *Hyperici flores* înainte de extracție și după epuizare cu 5 porțiuni de alcool etilic de 80%, cu o durată de obținere per fracțiune de 1 oră. În urma cercetării s-a constatat micșorarea conținutului flavonoidelor în PV *Hyperici flores* de la 5,91% (înainte de extracție) până la 0,378% (după extracție); în PV *Hyperici herba* conținutul total de flavonoide s-a redus de la 4,91 % până la 0,293%.

Astfel, s-au stabilit unii 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 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 și ajustată în procedura de analiză a extractelor uscate din flori și din părți aeriene de *H. perforatum*. Autorii (Kurchin, 2008) au optimizat metoda farmaceutică de analiză a produsului vegetal *Hyperici herba* [133].

Tehnica de lucru. Au fost pregătite probele de analizat din extractele uscate din flori și din părți aeriene în concentrație 1mg/ml cu alcool etilic de 70% (soluția de analizat A). Tehnicile de preparare a soluției de analizat (soluția de analizat B), a soluției de referință și a soluției standard de rutozidă sunt descrise în subcapitolul 2.3 [133]. S-a construit curba de calibrare a rutozidei cu următoarea ecuație a dreptei de regresie $Y = 23,857 - 0,0017X$, $R^2 = 0,9998$. Concentrația (mg/g masă uscată) totalului de flavonoide, în extractele uscate, s-a calculat după formula 3.7 [133, 137, 141, 142, 143].

$$C = \frac{X \cdot V}{m}, \text{ în care:} \quad (3.7)$$

C – conținutul total de flavonoide, mg echivalent rutozidei/g extract uscat;

X – concentrația de rutozidă, determinată din curba de calibrare, mg/ml;

V – volumul extractului, ml;

m – masa extractului uscat, g.

Liniaritate. Liniaritatea unui procedeu de analiză constă în capacitatea sa de a conduce, în interiorul unui interval dat, la rezultate direct proporționale concentrației substanței de analizat, dintr-un anumit eșantion. Altfel spus, intensitatea semnalului analitic variază direct proporțional concentrației într-un domeniu limitat [144, 145].

S-a determinat absorbanta 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 la lungimea de undă 412 nm [143, 146]. Au fost trasate câte trei curbe de etalonare ale celor trei eșantioane de soluții analizate (fig. 3.22, tabelul A3.1), iar valorile înregistrate au fost supuse prelucrării statistice, utilizând metoda celor mai mici pătrate, obținându-se ecuația regresiei liniare $y = 0,10783 + 0,0029x$; coeficientul de corelație – (r_{xy}) 0,9997; coeficientul de regresie – (R^2) 0,9995 (tabelul A3.2). Metoda este considerată liniară dacă R^2 nu este mai mic de 0,98 [147, 148].

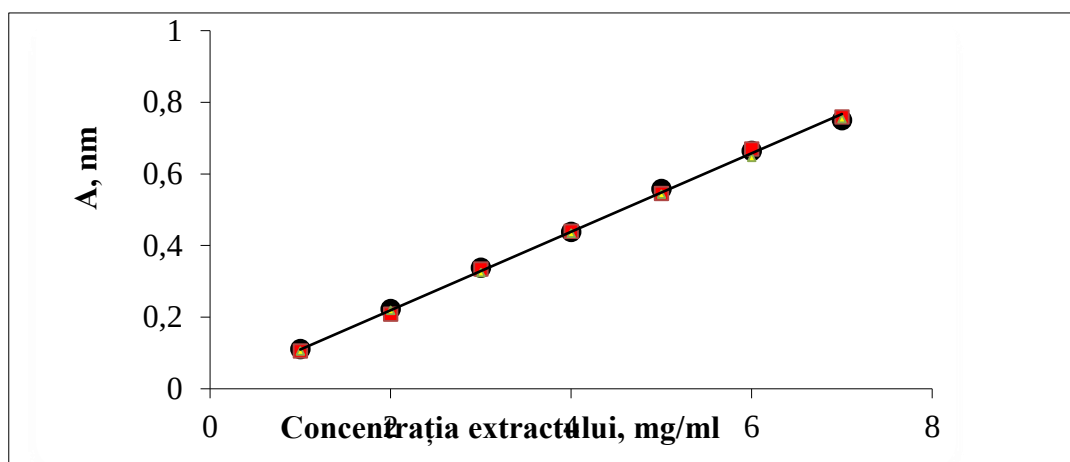


Fig. 3.22. Dependența absorbanței de concentrația extractului uscat obținut din *Hyperici herba*

Din extractul uscat de flori, a fost pregătită soluția stoc, cu o concentrație de 10 mg/ml (solventul utilizat – soluția hidroalcoolică 70%), s-au luat 0,7 ml, 0,8 ml, 0,9 ml, 1 ml, 1,1 ml, 1,2 ml, 1,5 ml și s-au introdus în baloane cotate de 10 ml, ulterior suplinate până la cotă cu alcool etilic de 70%. Au fost preparate soluții cu concentrația de 0,028; 0,032; 0,036; 0,040; 0,044; 0,048; 0,060 mg/ml; s-a determinat absorbanta soluțiilor la 412 nm. Cercetările au fost efectuate în triplicat, fiind trasate trei curbe de etalonare ale celor trei determinări (fig. 3.23). Ecuația regresiei liniare a fost calculată prin metoda celor mai mici pătrate (tabelul A3.3).

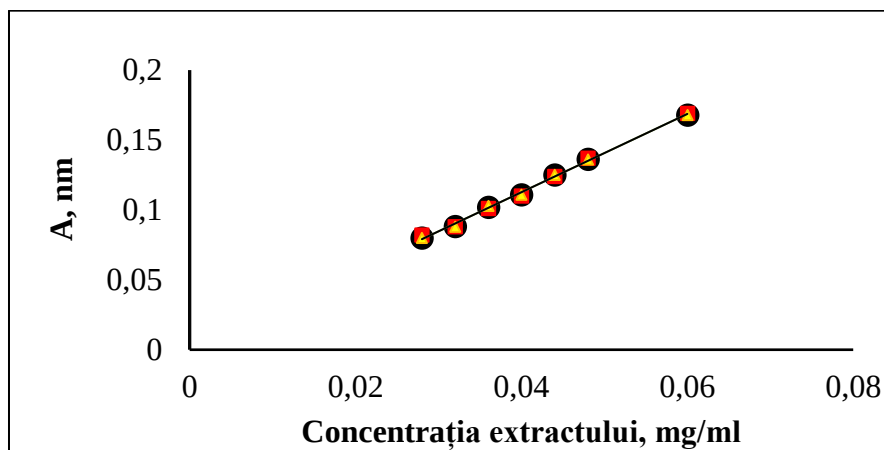


Fig. 3.23. Dependenta absorbantei de concentratia extractului uscat obtinut din *Hyperici flores*

Ecuația regresiei liniare pentru dozarea totalului de flavonoide în extracte uscate este: $y = 2,8056x + 0,0058$, $R^2 = 0,9969$ (tabelul A3.4).

Precizia. Scopul procedurii a fost demonstrarea faptului că aplicabilitatea repetată a metodei pentru aceeași probă generează rezultate similare, deoarece proba este supusă analizei în cadrul aceleiași sesiuni experimentale. Procedura este cunoscută și sub denumirea de *Repetabilitate* [145]. 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 și sunt prezentate în tabelul 3.14. Conținutul total al flavonoidelor din probele testate a fost calculat prin ecuația de regresie a curbei de etalonare pentru rutozidă ($y = 23,857x - 0,0017$, $R^2 = 0,9998$). Condiția de admisibilitate prevede faptul că o metodă poate fi considerată reproductivă, dacă $RSD \leq 2$ [149, 150]. Datele relevate în tabelul 3.14 arată că pentru extractele uscate analizate această condiție a fost acoperită, ce indică precizia metodei.

Tabelul 3.14. Evaluarea repetabilității a metodei spectrofotometrice UV-VIS de dozare a totalului de flavonoide în extractele uscate din *Hyperici herba* și *Hyperici flores*

Extract uscat din <i>Hyperici herba</i> (5 mg/ml)			Extract uscat din <i>Hyperici flores</i> (1 mg/ml)		
Abs, nm	mg/g masă uscată	Media 35,025; SD 0,640; RSD 1,83%	Abs, nm	mg/g masă uscată	Media 49,914; SD 0,721; RSD 1,44%
0,553	35,416		0,111	49,767	
0,558	35,660		0,109	48,884	
0,538	34,385		0,113	50,650	
0,540	34,513		0,113	50,650	
0,539	34,449		0,112	50,209	
0,559	35,724		0,110	49,326	

Pentru stabilirea preciziei metodei validate a fost determinată și precizia intermediară (reproductibilitate intermediară) [151]. Soluții independente de extracte uscate, din părți aeriene (5 mg/ml) și din flori (1 mg/ml) au fost analizate de către doi cercetători în același laborator, dar în zile diferite, pentru fiecare dintre acestea efectuându-se câte șase determinări. Valorile statistice determinate prin intermediul programului SPSS versiunea 24 sunt prezentate în tabelul 3.15 și în tabelul A3.5.

Tabelul 3.15. Evaluarea preciziei intermediare a metodei spectrofotometrice UV-VIS de dozare a totalului de flavonoide în extractele uscate din *Hyperici herba* și *Hyperici flores*

Cercetătorul Parametrii statistici	Extractul uscat din <i>Hyperici herba</i> (5mg/ml)		Extractul uscat din <i>Hyperici flores</i> (1 mg/ml)	
	Ziua I	Ziua a II-a	Ziua I	Ziua a II-a
	C, mg/g extract uscat	C, mg/g extract uscat	C, mg/g extract uscat	C, mg/g extract uscat
Analiticul I	36,297	35,087	51,092	49,767
	35,851	35,150	50,209	50,209
	35,660	36,106	50,650	50,650
	35,787	35,341	50,209	51,092
	35,723	36,297	51,092	50,650
	35,914	35,194	51,092	50,209
M, mg/g extract uscat	35,872	35,529	50,724	50,429
SD	0,226	0,530	0,434	0,463
RSD, %	0,630	1,419	0,855	0,918
P	0,229		0,277	
Analiticul II	35,023	35,372	49,326	50,209
	34,513	35,341	49,326	49,326
	35,533	34,813	50,209	50,650
	34,768	34,895	50,209	49,326
	35,277	35,150	49,767	49,767
	34,895	35,023	49,767	49,767
M, mg/g extract uscat	35,001	35,099	49,767	49,840
SD	0,364	0,230	0,394	0,516
RSD, %	1,039	0,655	0,791	1,035
P	0,520		0,867	

Conținutul total al flavonoidelor în probele testate a fost calculat prin ecuația de regresie a graficului de etalonare pentru rutozidă indicat anterior. Valorile RSD atestate la probele analizate nu depășesc 2%, variind de la 0,63% până la 1,42%. Din aceasta rezultă că procedura de determinare cantitativă a totalului de flavonoide în extractele uscate, obținute din diferite PV de sunătoare acoperă cerința de precizie în condițiile de reproductibilitate intermediară. Rezultatele obținute nu diferă statistic semnificativ, valorile P (tabelul 3.15) sunt mai mari decât nivelul de semnificație $p < 0,05$, ce denotă reproductibilitatea metodei.

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 [152, 153]. 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 (substanța standard), ce corespunde la 80%, 100% și 120% din concentrația inițială a rutozidei în soluția stoc [154, 155, 156]. Au fost efectuate câte trei determinări pentru fiecare concentrație. Criteriul acceptabilității este procentul mediu al randamentului de recuperare. Valoarea medie a acestui indicator trebuie să fie în limita de $100 \pm 5\%$, iar eroarea relativă a rezultatului mediu în metodele spectrofotometrice nu trebuie să depășească 2% [149]. Concentrația substanțelor active din probele de exactitate a fost determinată cu ajutorul curbei de etalonare a rutozidei, iar randamentul de regăsire a fost stabilit prin intermediul formulei de calcul 3.6.

Randamentul de regăsire R (%) s-a determinat după formula 3.8 [145]:

$$R = \frac{C_{\text{exp}}}{C_{\text{teor}}} * 100 \%, \text{ unde} \quad (3.8)$$

C_{exp} – valorile experimentale, mg/ml;

C_{teor} – valorile teoretice, mg/ml.

Rezultatele procedurii de stabilire a exactității metodei spectrofotometrice de determinare a totalului de flavonoide, din extractul uscat obținut din flori de *H. perforatum*, sunt prezentate în tabelul 3.16.

Tabelul 3.16. Determinarea exactității metodei spectrofotometrice UV-VIS de dozare a totalului de flavonoide în extractul uscat din *Hyperici flores*

Concentrația totalului de flavonoide în soluția analizată, mg/ml	Cantitatea de substanță standard adăugată, mg/ml	Concentrația teoretică, mg/ml	Concentrația calculată, mg/ml	Randamentul de regăsire, %	Prelucrarea statistică a rezultatelor
0,0055	0,016	0,0215	0,0212	98,60	R, % =100,42 S²=2,3690
0,0055	0,016	0,0215	0,0214	99,53	

0,0055	0,016	0,0215	0,0220	102,32	S = 1,5391 $\Delta X = 1,1830$ CV,% = 1,5327
0,0055	0,020	0,0255	0,0250	98,04	
0,0055	0,020	0,0255	0,0260	101,96	
0,0055	0,020	0,0255	0,0254	99,61	
0,0055	0,024	0,0295	0,0297	100,68	
0,0055	0,024	0,0295	0,0300	101,69	
0,0055	0,024	0,0295	0,0301	101,35	

Concentrația probelor de exactitate s-a determinat cu ajutorul graficului de etalonare a rutozidei. Soluția stoc a substanței standard a fost pregătită prin dizolvarea a 0,025 mg de rutozidă în 50 ml alcool etilic de 70%, apoi prin diluții au fost pregătite soluțiile de analizat ale rutozidei, în concentrații de 0,02, 0,036, 0,04 și de 0,044 mg/ml. 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%).

Metoda spectrofotometrică UV-VIS de dozare a totalului de flavonoide, în extractele uscate din *Hyperici herba* și din *Hyperici flores* (validată în conformitate cu următorii indicatori: liniaritate, precizie (repetabilitate, reproductibilitate intermediară), exactitate acoperă toate condițiile necesare și poate fi folosită în scopurile propuse.

3.6. Standardizarea extractelor uscate

Cercetările au fost efectuate în cadrul Catedrei de farmacognozie și botanică farmaceutică a USMF „Nicolae Testemițanu” și în cadrul Laboratorului de Elaborare, analiză, standardizare și controlul medicamentelor din cadrul CȘM al USMF „Nicolae Testemițanu”. Pentru standardizarea extractelor uscate din *Hyperici flores* și *Hyperici herba* au fost selectați următorii parametri de standardizare: descriere, identificare, dozare, pierdere prin uscare și stabilitate.

Descriere. Descrierea extractelor uscate din flori (*Hyperici perforati flores extractum siccum*) și din părți aeriene (*Hyperici perforati herba extractum siccum*), obținute prin metoda de macerare fracționată (subcapitolul 3.5) s-a realizat conform prevederilor *Farmacopeei Europene*, ed. 9.0, monografia farmaceutică *Extracta* din *Farmacopeea Română*, ed. a X-a și din *Farmacopeea de Stat a Federației Ruse*, ed. a XIV-a.

Extractul uscat din flori reprezintă o pulbere brun-purpurie, higroscopică, cu un miros balsamic, plăcut și cu un gust amar, astringent; extractul uscat din părțile aeriene – o pulbere brună, higroscopică, cu un miros balsamic, plăcut și cu un gust astringent (fig. 3.24).

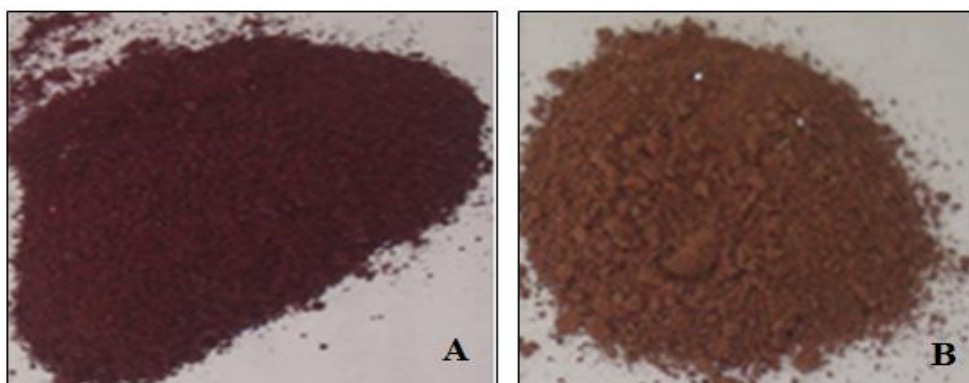


Fig. 3.24. Extractele uscate din flori (A) și din părți aeriene (B)

Identificare. Parametrul de calitate - identificarea compușilor biologic activi în extractele de *H. perforatum* - a fost cercetat prin intermediul reacțiilor calitative și al CSS, tehnicile de lucru fiind explicate în subcapitolele 3.2 și 3.3.

Dozare. Metoda de dozare spectrofotometrică a totalului de flavonoide, în extractele supuse experimentului este descrisă în subcapitolul 3.5. Conținutul procentual al totalului de flavonoide, recalculate în rutozidă, s-a efectuat în baza formulei 3.6.

Pierdere prin uscare. Testul *Pierdere în masă prin uscare* s-a efectuat în etuvă, utilizând metoda descrisă în *FR*, ed. a X-a, capitolul al IX-lea. C.15. Rezultatele experimentului sunt prezentate în tabelul 3.17.

Tabelul 3.17. Pierdere prin uscare a extractelor uscate de *H. perforatum*

Denumirea probei analizate	Pierdere prin uscare, %				M±SD
	Proba 1	Proba 2	Proba 3	Proba 4	
Extractul uscat din flori	3,55	3,56	3,53	3,83	3,62±0,142
Extractul uscat din părți aeriene	3,90	3,68	3,61	3,54	3,68±0,155

Datele experimentale din tabel relevă faptul că pierdere prin uscare a extractelor uscate nu depășește 5%.

Determinarea metalelor grele. Conținutul de metale grele (MG) în 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. Prepararea probelor a implicat calcinarea uscată și extragerea metalelor grele din cenușă cu acizi [157, 158, 159, 160].

Obținerea cenușii. În creuzetul de porțelan, cântărit în prealabil, se introduce 1,0 g de probă de analizat (cântărită cu precizie), distribuind uniform pe partea de jos a creuzetului. Apoi creuzetul cu extract se încălzește la o temperatură de 100-105°C timp de 1 oră, apoi se

carbonizează prin calcinarea uscată, în cuptorul cu mufă la o temperatură de 600°C timp de 30 de minute; se obține un reziduu alb-cenușiu fără urme de cărbune. După carbonizare probele sunt mineralizate cu acizi [157, 158, 160].

Extragerea metalelor grele din cenușă cu acizi. Cenușa din creuzetul de porțelan se umezește cu câteva picături de apă distilată, se adaugă 15 ml de acid azotic diluat (1:1) și se acoperă cu o sticlă de ceas și se încălzește până la fierbere la baie cu apă timp de 30 de minute. Conținutul creuzetului se filtrează într-un balon cotat de 50 ml printr-un filtru cu pori mici spălat în prealabil cu HNO₃ diluat. Creuzetul și filtrul se spală cu apă distilată de câteva ori. Soluția se completează până la cotă. Conținutul balonului se lasă timp de 24 de ore pentru sedimentare, apoi soluția se folosește pentru analiză. În același mod se pregătește proba de control, din care se exclude extractul uscat. Metoda se bazează pe principiul absorbției spectral-selective a radiației din atomii elementului determinat folosind atomizarea cu flacără. Capacitatea de absorbție a vaporilor atomici este direct proporțională concentrației unui element chimic din sistemul de atomizare [157]. Prin această metodă a fost determinată concentrația de Ni, Pb și de Cd în extractele din flori și din părți aeriene de *H. perforatum*. Conținutul de MG în probe se calculează în baza formulei 3.9 [157]:

$$X = \frac{V \cdot (A_1 - A_2)}{m} \cdot K, \text{ în care:} \quad (3.9)$$

X – concentrația de MG în proba analizată, mln⁻¹;

V – volumul soluției de cenușă, cm³;

A₁ – concentrația de metal în soluția de cenușă mg/dm³;

A₀ – concentrația de metal în proba de control, mg/dm³;

m – masa extractului uscat, g;

K – coeficientul de reducere a masei, este egal cu 1.

Conținutul de MG în extractele uscate, obținute prin macerare fracționată, cu agitare din PV *Hyperici herba* și *Hyperici flores* sunt prezentate în tabelul 3.18.

Tabelul 3.18. Concentrația de metale grele în extractele uscate de *H. perforatum*

Nr. d/o	Denumirea probelor analizate	Denumirea parametrilor și unitatea de măsură, mg/kg			Cenușa totală, %	Cenușa insolubilă în soluție de HCl de 10%
		Ni	Pb	Cd		
1.	Extract uscat din <i>Hyperici flores</i>	5,88	< 0,5	0,18	-	-
2.	Extract uscat din <i>Hyperici herba</i>	< 2,0	< 0,5	< 0,09	4,3	-

În ambele extracte, concentrația de Ni, Pb, Cd nu a depășit limitele maxime admisibile (LMA) față de normele indicate în FS, ed. a XIV-a, 1.5.3.0009.15 (Cd – 1 mg/kg, Pb – 6 mg/kg)

și în *FR*, ed. a X-a, p. 420 (cel mult 4%).

Stabilitatea și termenul de valabilitate. Stabilitatea și termenul de valabilitate ale extractelor uscate au fost determinate în timp real, la temperatura de $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$, la umiditatea relativă de $60\pm 5\%$ și în condiții accelerate (temperatura de $+40\pm 2^{\circ}\text{C}$). Determinările s-au efectuat pentru 3 serii din fiecare extract, păstrate în recipiente din sticlă întunecată, bine închise și depozitate în loc ferit de lumină. Testarea indicelui de stabilitate a extractelor polifenolice din sunătoare, pe termen lung, în condiții normale de temperatură și de umiditate relativă, s-a făcut la fiecare 3 luni în primul an de testare, și la fiecare 6 luni în cel de-al doilea an de testare. Testarea indicelui de stabilitate a produselor extractive, în condiții accelerate, s-a efectuat pe o perioadă de 368 de zile. Extractele uscate din părți aeriene și din flori au fost examinate după următorii parametri de calitate: descriere, identificare și dozare [161, 162].

Determinarea aspectului s-a realizat în conformitate cu prevederile monografiei *Extracta* din *FR*, ed. a X-a. În decursul perioadei de testare (36 de luni) a extractelor uscate, păstrate în trei serii la o temperatură de $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ și de $+40\pm 2^{\circ}\text{C}$, nu s-au atestat modificări la nivel de culoare, miros și gust; iar în a 42-a lună s-a modificat culoarea extractelor testate. Rezultatele experimentului sunt prezentate în tabelul 3.19 și în tabelul 3.20.

Tabelul 3.19. Parametri de calitate (descriere) ai extractelor uscate păstrate în condiții obișnuite

Data	Peri- oada de testare (luni)	Extractul uscat din <i>H. flores</i>			Data	Extractul uscat din <i>H. herba</i>		
		Seria 01	Seria 02	Seria 03		Seria 01	Seria 02	Seria 03
		Descrie- re	Descrie- re	Descrie- re		Descrie- re	Descrie- re	Descrie- re
10.06.15	0	Corespun.	Corespun.	Corespun.	12.06.15	Corespun.	Corespun.	Corespun.
10.09.15	3	Corespun.	Corespun.	Corespun.	12.09.15	Corespun.	Corespun.	Corespun.
12.12.15	6	Corespun.	Corespun.	Corespun.	12.12.15	Corespun.	Corespun.	Corespun.
14.03.16	9	Corespun.	Corespun.	Corespun.	15.03.16	Corespun.	Corespun.	Corespun.
11.06.16	12	Corespun.	Corespun.	Corespun.	15.06.16	Corespun.	Corespun.	Corespun.
11.12.16	18	Corespun.	Corespun.	Corespun.	15.12.16	Corespun.	Corespun.	Corespun.
12.06.17	24	Corespun.	Corespun.	Corespun.	15.06.17	Corespun.	Corespun.	Corespun.
12.12.17	30	Corespun.	Corespun.	Corespun.	15.12.17	Corespun.	Corespun.	Corespun.
12.06.18	36	Corespun.	Corespun.	Corespun.	15.06.18	Corespun.	Corespun.	Corespun.

Tabelul 3.20. Parametri de calitate (descriere) ai extractelor uscate păstrate la temperatura de $+40^{\circ}\text{C}$

Data	Peri- oada de testare (luni)	Extractul uscat din <i>H. flores</i>			Data	Extractul uscat din <i>H. herba</i>		
		Seria 01	Seria 02	Seria 03		Seria 01	Seria 02	Seria 03
		Descrie- re	Descrie- re	Descrie- re		Descrie- re	Descrie- re	Descrie- re
10.06.15	0	Corespun.	Corespun.	Corespun.	12.06.15	Corespun.	Corespun.	Corespun.
02.07.15	3	Corespun.	Corespun.	Corespun.	04.07.15	Corespun.	Corespun.	Corespun.
25.07.15	3	Corespun.	Corespun.	Corespun.	27.07.15	Corespun.	Corespun.	Corespun.

17.08.15	9	Corespun.	Corespun.	Corespun.	19.08.15	Corespun.	Corespun.	Corespun.
09.09.15	12	Corespun.	Corespun.	Corespun.	11.09.15	Corespun.	Corespun.	Corespun.
25.10.15	18	Corespun.	Corespun.	Corespun.	27.10.15	Corespun.	Corespun.	Corespun.
10.12.15	24	Corespun.	Corespun.	Corespun.	12.12.15	Corespun.	Corespun.	Corespun.
25.01.16	30	Corespun.	Corespun.	Corespun.	27.01.16	Corespun.	Corespun.	Corespun.
04.04.16	36	Corespun.	Corespun.	Corespun.	02.04.16	Corespun.	Corespun.	Corespun.

Identificarea compușilor chimici. Identificarea compușilor activi din diverse grupuri chimice (flavonoide, derivați de antracen, acizi fenolici) în probele supuse studiului (păstrate în condiții normale și de stres timp de 42 de luni) s-a efectuat prin cromatografia în strat subțire, după tehnica descrisă în *Farmacopeea Europeană 6.2, 2008* și *Farmacopeea Republicii Belarus*, în monografia *Hyperici herba*.

A fost realizată analiza calitativă prin CSS, în condițiile experimentale indicate în subcapitolul 3.5, a extractelor uscate păstrate în trei serii la temperatura de +40 °C timp de 42 de luni. În figura 3.25 sunt prezentate cromatogramele extractelor uscate din *Hyperici flores* (seria 01- Hf01, seria 02 – Hf02, seria 03 – Hf03) și *Hyperici herba* (seria 01- Hh01, seria 02 – Hh02, seria 03 – Hh03) și substanțele de referință (rutozida – 1, cvercitolul – 2; hiperozida – 3, luteolina – 4, izocvercetrozida – 5, cvercetrozida – 6, acidul clorogenic – 7, acidul cafeic – 8, hipericina – 9). Distanța de migrare a fost de 9,5 cm. La 10 minute după dezvoltare placa s-a examinat în lumină UV ($\lambda = 366 \text{ nm}$).

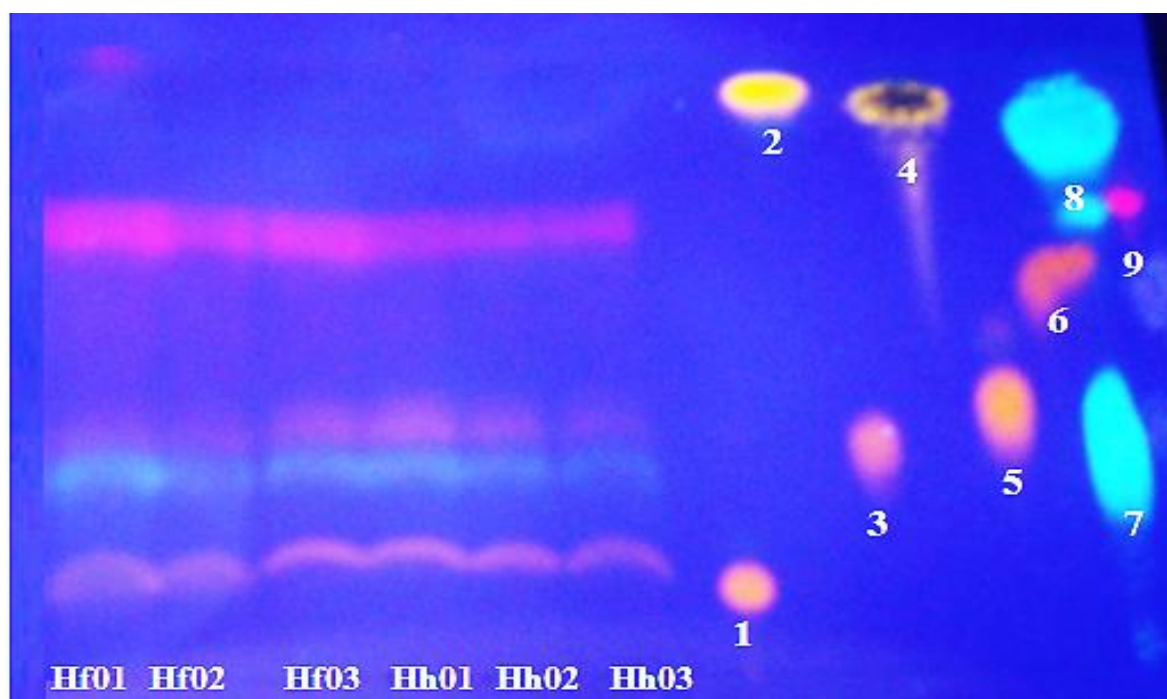


Fig. 3.25. Identificarea compușilor fenolici în extractele uscate din *Hyperici flores* și din *Hyperici herba* , păstrate la temperatura de +40 °C, 42 de luni

În urma examinării cromatogramelor extractelor uscate păstrate 42 luni la temperatura de +40°C au fost identificate: rutozida ($R_f = 0,77$), hiperozida ($R_f = 0,41$), izocvercetrozida ($R_f =$

0,47), acidul clorogenic ($R_f = 0,43$) și hipericina ($R_f = 0,77$).

Dozarea totalului de flavonoide. Rezultatele procedurii de dozare a totalului de flavonoide în extractele din *Hyperici herba* și *Hyperici flores*, păstrate în trei serii, în condiții normale pe termen lung, la temperatura de $+25 \pm 2^\circ\text{C}$ și la temperatura de $+40^\circ\text{C}$, sunt prezentate în tabelele 3.21 și 3.22.

Tabelul 3.21. Conținutul total de flavonoide în extractele uscate din *Hyperici flores* și *Hyperici herba*, păstrate la temperatura de $+25 \pm 2^\circ\text{C}$ pe termen lung

Perioada de testare, luni	Conținutul de flavonoide, exprimat în rutozidă, % $\pm$ SD		
	Seria 01	Seria 02	Seria 03
Extractul uscat din flori			
0	14,328 $\pm$ 0,124	14,369 $\pm$ 0,072	14,370 $\pm$ 0,143
3	14,287 $\pm$ 0,071	14,205 $\pm$ 0,124	14,282 $\pm$ 0,071
6	14,246 $\pm$ 0,071	14,164 $\pm$ 0,072	14,246 $\pm$ 0,071
9	14,205 $\pm$ 0,124	14,122 $\pm$ 0,072	14,123 $\pm$ 0,143
12	14,122 $\pm$ 0,072	14,040 $\pm$ 0,189	14,040 $\pm$ 0,072
18	13,956 $\pm$ 0,124	13,958 $\pm$ 0,124	13,999 $\pm$ 0,071
24	13,875 $\pm$ 0,072	13,917 $\pm$ 0,072	13,834 $\pm$ 0,124
30	13,587 $\pm$ 0,124	13,875 $\pm$ 0,072	13,587 $\pm$ 0,124
36	13,505 $\pm$ 0,071	13,669 $\pm$ 0,072	13,546 $\pm$ 0,257
42	12,460 $\pm$ 0,071	12,393 $\pm$ 0,143	12,269 $\pm$ 0,188
Extractul uscat din părți aeriene			
0	13,678 $\pm$ 0,071	13,637 $\pm$ 0,071	13,636 $\pm$ 0,143
3	13,595 $\pm$ 0,124	13,554 $\pm$ 0,072	13,595 $\pm$ 0,124
6	13,553 $\pm$ 0,143	13,544 $\pm$ 0,189	13,513 $\pm$ 0,143
9	13,513 $\pm$ 0,072	13,513 $\pm$ 0,072	13,431 $\pm$ 0,143
12	13,472 $\pm$ 0,124	13,430 $\pm$ 0,071	13,389 $\pm$ 0,071
18	13,431 $\pm$ 0,143	13,389 $\pm$ 0,071	13,307 $\pm$ 0,071
24	13,307 $\pm$ 0,071	13,348 $\pm$ 0,123	13,266 $\pm$ 0,071
30	13,183 $\pm$ 0,189	13,266 $\pm$ 0,071	13,181 $\pm$ 0,076
36	13,142 $\pm$ 0,143	13,139 $\pm$ 0,190	13,098 $\pm$ 0,124
42	11,911 $\pm$ 0,189	11,906 $\pm$ 0,433	11,988 $\pm$ 0,123

Tabelul 3.22. Conținutul total de flavonoide în extractele uscate din *Hyperici flores* și *Hyperici herba*, păstrate la temperatura de $+40^\circ\text{C}$

Perioada de testare, luni	Conținutul de flavonoide, exprimat în rutozidă, % $\pm$ SD		
	Seria 01	Seria 02	Seria 03
Extractul uscat din flori			
0	14,585 $\pm$ 0,125	14,654 $\pm$ 0,073	14,669 $\pm$ 0,192
3	14,528 $\pm$ 0,073	14,627 $\pm$ 0,192	14,561 $\pm$ 0,113
6	14,527 $\pm$ 0,191	14,569 $\pm$ 0,072	14,486 $\pm$ 0,126
9	14,501 $\pm$ 0,143	14,543 $\pm$ 0,190	14,419 $\pm$ 0,072
12	14,442 $\pm$ 0,190	14,483 $\pm$ 0,125	14,401 $\pm$ 0,072
18	14,413 $\pm$ 0,143	14,400 $\pm$ 0,071	14,359 $\pm$ 0,072
24	14,277 $\pm$ 0,071	14,318 $\pm$ 0,124	14,277 $\pm$ 0,071
30	14,236 $\pm$ 0,071	14,154 $\pm$ 0,071	14,113 $\pm$ 0,142
36	14,154 $\pm$ 0,071	14,113 $\pm$ 0,071	14,072 $\pm$ 0,123
42	12,466 $\pm$ 0,215	12,632 $\pm$ 0,893	12,130 $\pm$ 0,806

Perioada de testare, luni	Conținutul de flavonoide, exprimat în rutozidă, % ± SD		
	Seria 01	Seria 02	Seria 03
Extractul uscat din părți aeriene			
0	13,840±0,124	13,963±0,124	13,882±0,143
3	13,799±0,071	13,882±0,142	13,881±0,072
6	13,758±0,071	13,840±0,142	13,758±0,142
9	13,676±0,142	13,717±0,123	13,715±0,123
12	13,594±0,124	13,635±0,071	13,593±0,214
18	13,553±0,072	13,511±0,188	13,411±0,072
24	13,470±0,124	13,429±0,189	13,338±0,071
30	13,429±0,071	13,346±0,124	13,305±0,072
36	13,346±0,124	13,304±0,144	13,264±0,072
42	12,110±0,327	12,193±0,188	12,028±0,257

Datele cuprinse în tabele denotă faptul că termenul de valabilitate pentru *Hyperici perforati herba extractum siccum* și pentru *Hyperici perforati flores extractum siccum* este de 36 de luni, conform FS, ed. a XIV-a, 1.1.0009.18, conținutul totalului de flavonoide, în această perioadă, nu a scăzut sub 5%.

Indici numerici pentru extractele uscate

Conținutul de fier. Determinarea limitei de fier în extractele uscate, obținute din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* a fost efectuată, prin intermediul metodei descrise în monografiile *Extracta* și IX.C.13 a FR, ed. a X-a (Controlul limitei de fer). În extractele analizate conținutul de fier nu a depășit limita cel mult de 0,04%.

Cenușa totală. Cercetarea indicilor numerici *Cenușa totală* și *Cenușa insolubilă în sol. HCl 10%* a fost realizată pentru *Hyperici herba*, *Hyperici flores* și pentru extractele uscate obținute ale lor. Cercetarea a fost efectuată conform cerințelor stipulate în monografia 2.4.1.6 *Cenușa totală* din *Farmacopeea Belorusă* ed. I, 2006 și în monografia 1.2.2.2.0013.15 din FS, ed. a XIV-a, 2018. Pentru studiu, s-au luat câte 2 g de extract uscat și câte 3 g de produs vegetal; cercetările s-au efectuat în 2 repetări. Tehnica de lucru în obținerea cenușii este identic descrisă în procedura de determinare a metalelor grele (subcapitolul 3.6) [159, 160].

Conținutul de cenușă totală (%) se calculează în baza formulei 3.10:

$$X = (m_1 * 100) / m_2, \text{ în care:} \quad (3.10)$$

m_1 – masa cenușii, g;

m_2 – masa produsului vegetal/extractului uscat, g.

Cenușa insolubilă în acid clorhidric de 10%. Cenușa obținută prin calcinarea probei (temperatura de 600 °C) se pune într-un creuzet de porțelan în volum de 50 ml și se dizolvă în 25 ml HCl de 10%. Creuzetul se acoperă cu o sticlă de ceas și se încălzește pe baia de apă timp de 15 minute. Suspensia obținută se trece prin hârtie de filtru cu o porozitate fină care la calcinare nu lasă cenușă. Filtrul se spală cu apă distilată fierbinte până la obținerea reacției neutre (se identifică

cu indicator universal). Filtrul cu reziduu insolubil în HCl se introduce din nou în creuzet, se calcinează la temperatura de 600 °C, se răcește în exicator și apoi se cântărește [160].

Conținutul procentual de cenușă insolubilă în acid clorhidric de 10% în produsele vegetale și în extractele uscate de *H. perforatum* se calculează după formula 3.11:

$$X = (m_1 - m) * 100 / m_2, \text{ în care:} \quad (3.11)$$

m_1 – masa cenușii totale, g;

m – masa cenușii insolubile în HCl 10%, g;

m_2 – masa probei de analizat, g.

Testul *Cenușa insolubilă în acid clorhidric de 10%* s-a efectuat în baza metodei descrise în FS, ed. a XIV-a, monografia 1.5.3.0005.15. Rezultatele cercetării sunt prezentate în tabelul 3.23.

Tabelul 3.23. Cenușa totală și cenușa insolubilă în acid clorhidric de 10% din produsele vegetale și extracte uscate de *H. perforatum*

Denumirea probei analizate	Cenușa totală, %	Cenușa insolubilă în acid clorhidric de 10%, %
Produsul vegetal – <i>Hyperici herba</i>	3,64	-
Produsul vegetal – <i>Hyperici flores</i>	11,34	0,95
Extractul uscat din <i>Hyperici herba</i>	11,56	-
Extractul uscat din <i>Hyperici flores</i>	8,23	-

3.7. Sinteza capitolului 3

Specia *H. perforatum* se caracterizează printr-un conținut maxim de ulei volatil – 0,26% (produs uscat). În speciile *H. elegans* și *H. tetrapterum* se conține 0,15% (produs uscat), respectiv 0,13% (produs uscat) ulei volatil, iar *H. hirsutum* se deosebește printr-un conținut minim de ulei volatil – 0,094% (produs uscat). Compușii majori ai uleiului volatil separat din speciile analizate sunt diferiți: *H. perforatum* – β -cariofilen (12,175%), oxid de cariofilen (12,119%) și α -pinen (8,574%); *H. elegans* – g-gurjunen (13,99%), aromadendren (13,99%), undecan (10,262%); *H. tetrapterum* – dodecanal (9,271%), α -longipinen (8,489%); *H. hirsutum*. – oxid de cariofilen (10,435%), fitol (6,056%). Componentii comuni ai uleiului volatil de *H. perforatum*, *H. elegans*, *H. tetrapterum* și *H. hirsutum* sunt: nonanul, undecanul, cadinenul, tunbergolul și fitolul, în concentrații diferite.

A fost efectuată analiza comparativă a compoziției chimice a uleiurilor volatile izolate din *Hyperici herba* (produs vegetal proaspăt și uscat), care a demonstrat prezența în cantități mari a β -cariofilenului, α -pinenului și germacrenului D. S-a determinat conținut înalt de germacren D în uleiul volatil din produs vegetal proaspăt, iar oxidul de cariofilen – în uleiul volatil din produs vegetal uscat. Uleiurile volatile cu conținut înalt de acești compuși chimici posedă activitate

antibacteriană față de *S. aureus*, *B. cereus* și *E.coli* [120, 121, 122].

S-a stabilit gradul de extracție a compușilor fenolici din PV *Hyperici herba* prin metoda de repercolare cu fracționarea produsului vegetal în părți egale în ciclu neterminat cu alcool etilic de diverse concentrații (40-90%). A fost determinată concentrația optimă a alcoolului etilic cu care se extrag maximal compușii chimici de natură fenolică din produsele vegetale de sunătoare: totalul de polifenoli cu alcool etilic de 60%, totalul de flavonoide cu alcool etilic de 80% și totalul derivaților de antracen – de 70%.

S-au obținut extracte uscate din părți aeriene, flori, frunze, tulpini de *H. perforatum*, prin metoda de macerare fracționată cu agitare; iar prin metoda de repercolare cu fracționarea produsului vegetal în părți egale în ciclu neterminat au fost obținute extracte uscate din PV *Hyperici herba*, colectate din flora spontană și din colecția CȘPDPM USMF „Nicolae Testemițanu”.

Identificarea substanțelor tanante, flavonoidelor, acizilor fenolici și derivaților de antracen în extractele analizate s-a efectuat prin reacții calitative, CSS și prin HPLC. Analiza calitativă comparativă a demonstrat prezența în extractele uscate din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* a flavonoidelor: rutozidă, hiperozidă, cvercetrozidă, cvercetol, I3,II8-biapigenină.

Determinarea totalului de polifenoli și de flavonoide s-a realizat prin metoda spectrofotometrică. Prin metoda HPLC au fost determinați cantitativ compușii chimici din grupul flavonoidelor: rutozida, hiperozida, cvercetrozida, cvercetolul și I3,II8-biapigenina în extractele uscate obținute din *Hyperici herba* și *Hyperici flores*, produsele vegetale colectate din flora spontană și din colecția CȘPDPM.

Prin HPLC a fost determinat conținutul înalt de I3,II8-biapigenină în extractele din flori comparativ cu extractele din părți aeriene. Datele bibliografice relatează că acest biflavonoid are efecte antidepresiv și anxiolitic [75, 76].

Rezultatele cercetărilor au stat la baza elaborării metodei optime de extracție a compușilor fenolici și standardizării extractelor uscate din *Hyperici herba* și *Hyperici flores*: identificarea compușilor fenolici prin reacții calitative, prin metoda de CSS, dozarea spectrofotometrică UV-VIS a totalului de flavonoide.

În vederea obținerii randamentului maxim de extragere a principiilor active din PV *Hyperici flores* au fost stabilite câteva condiții optime de lucru ale metodei de macerare fracționată cu agitare: raportul dintre produsul vegetal și extragent (1:20), numărul de extracții repetate (5) și durata de timp per extracție (60 de minute).

A fost efectuată validarea metodei spectrofotometrice de dozare a totalului de flavonoide în extractele uscate, obținute din flori și din părți aeriene de *H. perforatum*. S-a dovedit, prin

determinarea liniarității, exactității și a preciziei, că metoda este corectă și poate fi folosită în determinarea cantitativă a totalului de flavonoide, recalculate la rutozidă, în extractele uscate.

A fost efectuată standardizarea produselor extractive de *H. perforatum* (*Hyperici perforati herba extractum siccum* și *Hyperici perforati flores extractum siccum*), prin examinarea următorilor indici de calitate: descrierea extractelor, identificarea compușilor chimici, conținutului de alcool, conținutului de metale grele, conținutului de fier și dozarea totalului de flavonoide.

S-a determinat termenul de valabilitate pentru extractele uscate, obținute din flori și din părți aeriene. Studiile au fost realizate pe câte 3 serii de fiecare extract, ambalate în recipiente din sticlă întunecată, bine închise și depozitate la loc ferit de lumină, în condiții obișnuite (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umiditatea relativă de $60\pm 5\%$) și în termostat, la temperatura de $+40^{\circ}\text{C}$. Extractele au fost testate după următorii parametri de calitate: descriere, identificare și dozare. Ambele extracte au fost stabile pentru o perioadă de 36 de luni.

S-au stabilit indicii numerici pentru extractele din *H. perforatum*: pierderea prin uscare, limita de fier și de metale grele, cenușa totală și cenușa insolubilă în acid clorhidric de 10%.

Toate rezultatele obținute: optimizarea metodei de preparare a extractelor uscate prin macerare fracționată cu agitare; analiza calitativă prin reacții de identificare și prin CSS; validarea metodei spectrofotometrice de dozare a totalului de flavonoide; determinarea termenului de valabilitate a extractului uscat din *Hyperici flores*, valorile indicilor numerici, au stat la baza elaborării Proiectului de monografie farmacopeică pentru produsul farmaceutic *Hyperici perforati flores extractum siccum* (Anexa 6).

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*. Testarea activității antioxidante a extractelor uscate, obținute din produsele vegetale menționate, s-a efectuat la Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică, cu sprijinul Proiectului instituțional *Studiul biologic și fitochimic al plantelor medicinale cu acțiune antioxidantă, antiinflamatoare și hepatoprotectoare*, 15.817.04.35A. Astfel, evaluarea activității antioxidante a extractelor s-a efectuat utilizând metodele de captare a radicalului organic DPPH $\cdot$ și de decolorare a cation-radicalului ABTS $^{+\cdot}$; a fost determinată capacitatea de chelare a Fe $^{2+}$.

Determinarea activității antioxidante prin reacția cu radicalul DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Metoda DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) este o metodă spectrofotometrică, pe larg utilizată în testarea abilităților compușilor chimici de a îndepărta radicalii liberi sau a capacității lor de a dona hidrogenul. Molecula 2,2-difenil-1-picrilhidrazil este caracterizată drept un radical liber stabil în virtutea delocalizării electronului de rezervă asupra moleculei, astfel încât molecula nu dimerizează. În situația în care soluția de DPPH interacționează cu un antioxidant (RH) care poate dona un atom de hidrogen, se obține forma redusă DPPH-H de culoare galbenă (fig. 4.1) [163]. Reacția implică o schimbare de culoare de la purpuriu la galben [164].

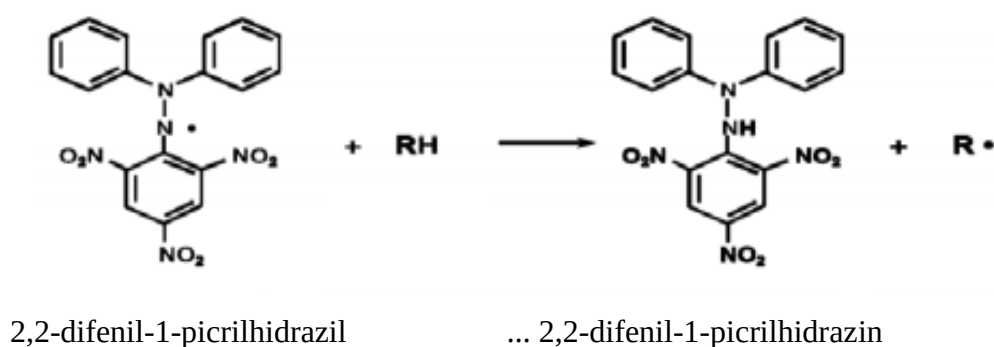


Fig. 4.1. Reacția DPPH $\cdot$ radicalului liber cu un antioxidant (RH) [165]

Tehnica de lucru. Soluția-stoc de DPPH (Sigma-Aldrich) a fost pregătită diluând 20 mg de DPPH într-un balon cotat de 100 ml, cu alcool etilic de 96% și a fost păstrată la temperatura de +4°C.

Pregătirea soluției de lucru: 5 ml de soluție stoc de DPPH s-au transferat într-un balon

cotat de 50 ml și s-au diluat până la cotă cu alcool etilic de 96%.

Pregătirea soluțiilor de analizat. S-au pregătit soluțiile stoc (1 mg/ml) din extracte uscate în alcool etilic de 80%. Din soluția stoc a extractului obținut din flori s-au preparat mai multe soluții cu concentrațiile de: 20; 15; 10; 7,5; 5,4 μl/ml, iar din soluția stoc a extractului din părțile aeriene – cu concentrațiile de: 40; 30; 20; 15; 10, 7,5; 5 μl/ml.

Pregătirea probelor de analizat: la 0,75 ml de extracte hidroetanolicе, cu concentrații diferite, a fost adăugată soluția etanolică (1,5 ml) de DPPH• (20 mg/l); amestecul a fost agitat și plasat la întuneric timp de 30 de minute. Apoi a fost măsurată absorbanta la lungimea de undă 517 nm, folosind drept soluție de referință amestecul din 1,5 ml alcool etilic de 96 % la care s-au adăugat 0,75 ml soluție de analizat. Pentru pregătirea probei de control, 1,5 ml de soluție DPPH a fost amestecat cu 0,75 ml alcool etilic de 80%, folosind drept soluție de referință alcool etilic de 96%. În calitate de antioxidant standard a fost folosit Trolox (Acros Organics, Denmark) în intervalul de concentrații de 1-7,5 μg/ml, și a fost obținută curba de calibrare: $R^2=0,9724$; $y=8,326+8,1555 F$ [166, 167, 168, 169, 170].

Capacitatea de captare a radicalului DPPH (AO%) a fost calculată după formula 4.1:

$$AO\% = \frac{(A_{cont.} - A_{extr.})}{A_{cont.}} * 100, \text{ unde:} \quad (4.1)$$

$A_{cont.}$ – absorbanta soluției DPPH• fără extract;

$A_{extr.}$ – absorbanta extractului testat.

Determinarea activității antioxidante prin reacția cu radical-cationul ABTS^{•+}

Metoda TEAC (*Trolox Equivalents Antioxidant Capacity*) se bazează pe abilitatea antioxidantilor de a anihila radicalul cationic ABTS^{•+} și de a reduce, la formă neutră, ABTS (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolină-6-acid sulfonic). Radicalul ABTS^{•+} este generat prin oxidarea ABTS cu persulfat de potasiu și este redus prin adăugare de atomii de hidrogen [163]. Reducerea ABTS^{•+} de către donatorul de hidrogen antioxidant, este măsurată prin scăderea absorbției la lungimea de undă de 734 nm. În timpul acestei reacții cation-radicalul (ABTS^{•+}) de culoare albastră-verzuie se transformă în forma sa neutră, incoloră ABTS (fig. 4.2) [171].

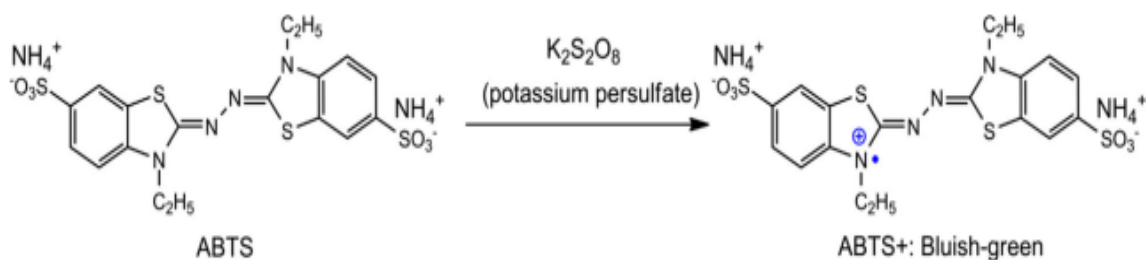


Fig. 4.2. Reacția de formare a cation-radicalului ABTS^{•+} [171]

În calitate de antioxidant standard poate fi utilizat Troloxul (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-acid carboxilic) – analogul vitaminei E, solubil în apă. Rezultatele sunt exprimate prin capacitatea antioxidantă echivalentă cu Trolox (TEAC) [171, 172].

Tehnica de lucru. S-a obținut soluția stoc de ABTS cu o concentrație de 2 mM (0,011 g de sare de ABTS (Alfa Aesar GmbH & KG) au fost dizolvate în 10 ml de apă distilată), de culoare albastră-verzuie. Soluția de persulfat de potasiu cu o concentrație de 70 mM a fost obținută prin dizolvarea a 0,0946 g de $K_2S_2O_8$ (Merck) în 5 ml de apă purificată. Ulterior, radical-cationul ABTS s-a obținut prin reacția a 10 ml de soluție stoc de ABTS (2 mM) și a 0,1 ml de persulfat de potasiu (70 mM). Pentru formarea radicalului amestecul s-a plasat la întuneric la temperatura camerei timp de 16 ore. Înainte de efectuarea analizelor, soluția obținută a fost diluată în alcool etilic de 96% până la o absorbantă de $0,700 \pm 0,020$ la $\lambda = 734$ nm. Soluția de lucru s-a preparat din 1 ml soluție de $ABTS^{*+}$ și 24 ml alcool etilic. Amestecul de reacție a conținut 0,3 ml de extract (1 mg/ml) și 2,7 ml de soluție $ABTS^{*+}$. Reacția de reducere a decurs la temperatura camerei, timp de 6 minute, iar procentul de inhibiție s-a calculat după formula 4.2:

$$\% \text{Inhibiție} = [(Abs_0 - Abs_t) / Abs_0] * 100, \text{ unde:} \quad (4.2)$$

Abs_0 – absorbanta soluției $ABTS^{*+}$;

Abs_t – absorbanta probelor analizate.

Concomitent, s-a pregătit soluția stoc a substanței standard Trolox în concentrație de 25 mM (0,062 g s-au dizolvat în 10 ml de alcool etilic), din care au fost preparate soluții, cu concentrații diferite (2,5-30 μ M) pentru obținerea curbei de etalonare. Valoarea coeficientului TEAC a fost exprimată în μ M Trolox/g probă de analizat. Rezultatele au fost exprimate în mmol Trolox echivalent (μ M TE/g) și au fost calculate, utilizând curba de etalonare cu Trolox (0-30 μ M; $R^2 = 0,9600$; $y = 3,0133x + 12,112$) (fig. 4.3) [173].

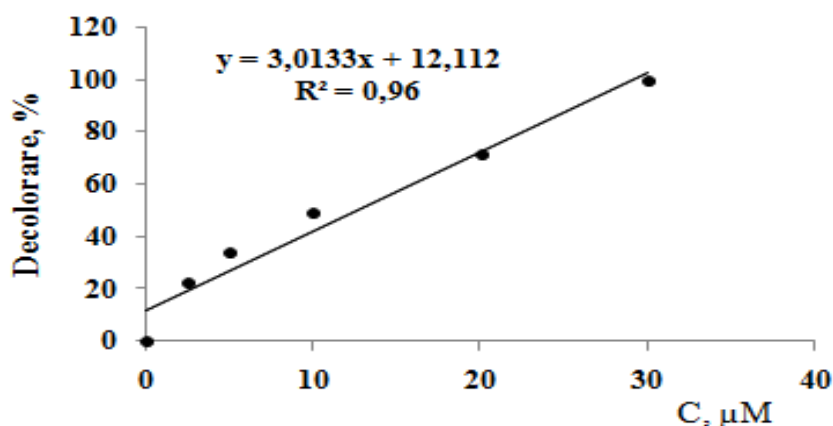


Fig. 4.3. Curba de etalonare pentru Trolox la decolorarea cation-radicalului $ABTS^{*+}$

Toate măsurătorile au fost efectuate în triplicat, rezultatele fiind reprezentate în tabelul 4.1

prin Me și IQR (tabelul A4.1, tabelul A4.2). Activitatea antioxidantă a fost exprimată în echivalent Trolox $\mu\text{g/ml}$. Valorile obținute denotă o capacitate de inhibare a radicalului liber DPPH $\cdot$ la ambele extracte ca fiind una bună, dar totuși mai mare în cazul extractului uscat din flori, fapt datorat conținutului sporit de flavonoide, comparativ cu extractul din părți aeriene (tabelul 4.1). Prin aplicarea testului neparametric *Kruskal-Wallis* H s-a determinat valoarea $p < 0,05$, ce semnifică existența diferenței statistice semnificative între activitatea antioxidantă determinată prin metoda DPPH a extractelor analizate și a substanței de referință (Trolox) ($\chi^2 = 22,20$, $df = 2$, $p = 0,000011$).

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

Probe de analizat	DPPH, IC ₅₀ $\mu\text{g/ml}$, Me (IQR)	ABTS, $\mu\text{M TE/g}$ 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 (1,130)	28,80 (0,16)	66,49 (2,68)
Trolox	4,18 (1,810)	-	-

Notă: mg RU/g extract uscat – totalul de flavonoide mg, exprimat în echivalentul rutozidei/g extract uscat

Testul ABTS a demonstrat faptul că extractul polifenolic din flori posedă o activitate antioxidantă puțin mai mare comparativ cu extractul din părți aeriene (tabelul 4.1). Conform testului neparametric Spearman ($p = 0,787$), a fost demonstrată o corelație directă între activitatea extractelor uscate de a reduce cation-radicalul ABTS $^{++}$ și concentrația de flavonoide. Testul ABTS a demonstrat faptul că extractul uscat din flori de sunătoare posedă o activitate antioxidantă mai puternică ($p = 0,000344$), în comparație cu extractul din părțile aeriene.

Capacitatea de chelare a ionilor de fier de către extractele uscate

Fierul reprezintă un element esențial în derularea mai multor procese biologice umane. Totuși, fierul deține proprietăți controversate: cu ușurință acceptă, dar și donează electroni, convertindu-se într-o formă feroasă, cu un grad de solubilitate mai înalt, și într-o formă ferică insolubilă, deținând un rol important în transferul de electroni și în transportul de oxigen, precum și în sinteza adenozinei trifosfat și a acidului dezoxiribonucleic. Cu toate acestea, fierul poate cataliza formarea oxigenului reactiv prin reacții redox. Reacțiile *Fenton* și *Haber-Weiss* ale H_2O_2 cu Fe^{2+} generează radicali hidroxilici care induc stresul oxidativ și sunt responsabili de deteriorarea lipidelor, proteinelor și a ADN-ului. De menționat faptul, că aceste procese sunt asociate bolilor inflamatoare, degenerative și a cancerului [174].

Metoda se bazează pe chelarea ionilor feroși în prezența extractelor vegetale. Ferozina poate forma cantitativ complexe cu Fe^{2+} . Prezența extractului vegetal dereglează formarea

complexului, ce induce diminuarea culorii purpurii a acestuia. Măsurarea gradului de atenuare a culorii permite estimarea activității de chelare a metalului cu ajutorul chelatorilor existenți în extractele vegetale [175].

Tehnica de lucru. Capacitatea de chelare a fierului în prezența compușilor chimici din extractele uscate, obținute din părți aeriene și din flori de *H. perforatum*, a fost determinată prin metoda descrisă de către Dinis T. *et al.* (1994) cu mici ajustări [175]. 0,05 ml de soluție FeCl₃ 2 mM (Alfa Aesar GmbH & KG) s-au adăugat la 60 μl de soluție probă (10 mg/ml). Reacția a fost inițiată prin adăugarea a 200 μl de soluție de ferozină (Acros Organics, Austria) de 5 mM. Amestecul s-a agitat bine și s-a lăsat în repaus de 10 minute, la temperatura camerei. Absorbanța soluției s-a determinat la 562 nm. Procentul de inhibiție al complexului ferozină-Fe²⁺ s-a calculat în baza formulei 4.3:

$$\% \text{ Inhibiție} = \frac{(A_0 - A_s)}{A_0} * 100, \text{ unde:} \quad (4.3)$$

A₀ – absorbanța soluției de control;

A_s – absorbanța soluțiilor din extractele analizate/substanței standard.

În calitate de substanță standard s-a utilizat EDTA (HiMedia Laboratories Pvt, Ltd.), un agent chelator care captează ionii metalici. Rezultatele studiului sunt exprimate în Me și IQR (n=9). Acestea au fost evaluate prin statistica descriptivă (tabelul A4.3) și testul neparametric *Kruskal-Wallis H*. Diferențele au fost considerate statistic semnificative (p = 0,000009).

Acest studiu a demonstrat o capacitate de chelare a fierului (%) pentru ambele extracte de sunătoare ca fiind una mai redusă în comparație cu EDTA (99,33%; IQR 1,28). Extractul uscat din flori a fost atestat cu o valoare mai mare (45,98%; IQR 2,98; p = 0,000004) în comparație cu extractul din părți aeriene (35,63%; IQR 3,90; p = 7,9869E-9).

4.2. Testarea acțiunii antiinflamatoare *in vivo*

Extractele uscate au fost obținute din *Hyperici herba* și *Hyperici flores*, colectate din flora spontană și colecția CȘPDPM prin intermediul metodei de macerare fracționată cu agitare, care s-au dizolvat în ser fiziologic de 0,9%, în doză de 100 mg/kg.

Determinarea proprietăților antiinflamatoare ale probelor supuse studiului a fost efectuată în Laboratorul „Ecofiziologie umană și animală” din cadrul Universității de Stat din Moldova. Investigațiile preclinice și toxico-farmacologice au fost aprobate de Comitetul de Etică al Cercetării, USMF „Nicolae Testemițanu”, proces-verbal nr. 29 din 24.03.2015 (fig. A4.1).

Experimentele, care au vizat activitatea antiinflamatoare a extractelor uscate din flori și părți aeriene de *H. perforatum*, au fost efectuate *in vivo* pe 35 de șobolani albi, masculi și femele, cu masa cuprinsă între 170-190 g. 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, a serului fiziologic de 0,9% și a substanței de referință (soluție de diclofenac de sodiu de 50 mg/kg) (fig. 4.4).

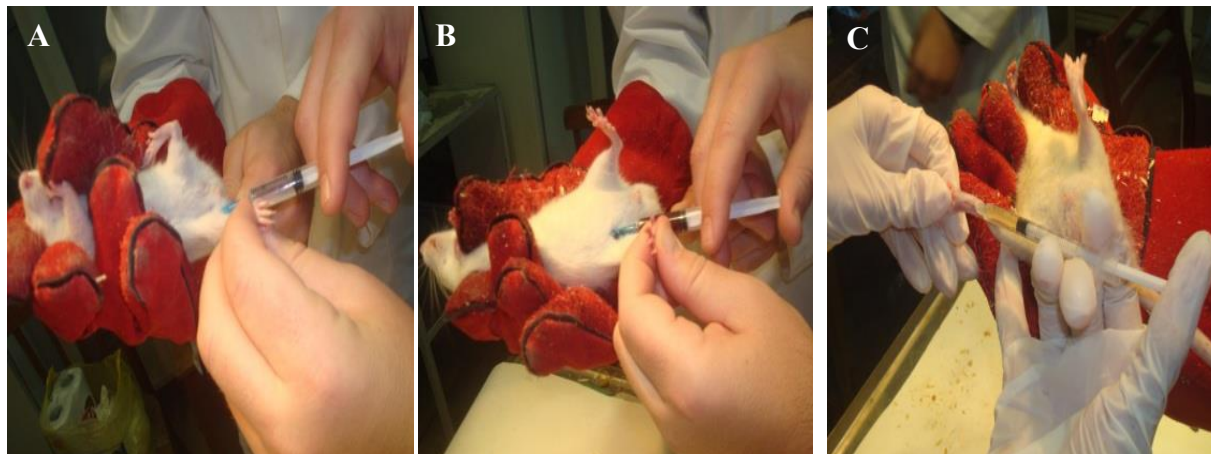


Fig. 4.4. Administrarea soluțiilor de diclofenac de sodiu (A), extract polifenolic (B), histamină (C)

Animalele au fost distribuite a câte 5 în 7 loturi [176, 177, 178, 179]:

1. lotul-martor – administrarea intraplantară a câte 0,1 ml ser fiziologic de 0,9%;
2. lotul de control – introducerea intraperitoneală a câte 1 ml ser fiziologic de 0,9% și intraplantară a câte 0,1 ml soluție histamină de 1%;
3. lotul de referință – introducerea intraperitoneală a câte 1 ml soluție diclofenac de sodiu 50 mg/kg și intraplantară a câte 0,1 ml soluție histamină de 1%;
4. lotul experimental – introducerea intraperitoneală a câte 1 ml soluție extract uscat (100 mg/ml) din *Hyperici herba* (flora spontană) și intraplantară a câte 0,1 ml soluție histamină de 1%;
5. lotul experimental – introducerea intraperitoneală a câte 1 ml soluție extract uscat (100 mg/ml) din *Hyperici flores* (flora spontană) și intraplantară a câte 0,1 ml soluție histamină de 1%;
6. lotul experimental – introducerea intraperitoneală a câte 1 ml soluție extract uscat (100 mg/ml) din *Hyperici herba* (colecția CȘCPM) și intraplantară a câte 0,1 ml soluție histamină de 1%;
7. lotul experimental – introducerea intraperitoneală a câte 1 ml soluție extract uscat (100 mg/ml) din *Hyperici flores* (colecția CȘPDPM) și intraplantară a câte 0,1 ml soluție histamină de 1%.

Extinderea edemului a fost determinată peste 3 ore după introducerea agentului flogogen prin diferența de greutate între membrele sănătoase și cele inflamate (fig. 4.5) măsurată după sacrificarea animalelor sub anestezie eterică.

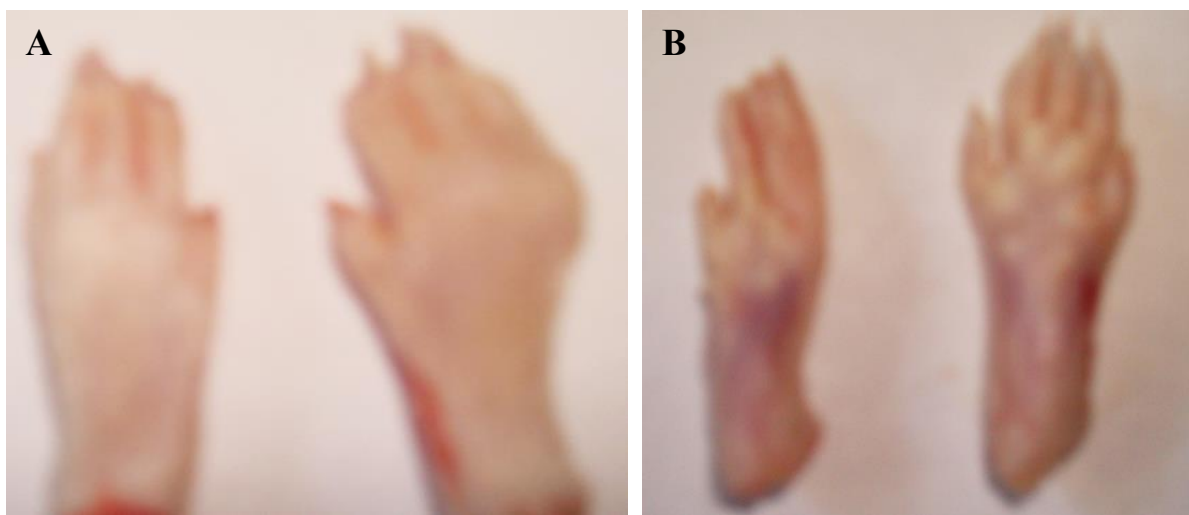


Fig. 4.5. Lăbuțele posterioare ale șobolanului: sănătoasă (stânga), inflamată (dreapta); suprafața exterioară (A), suprafața plantară (B)

Activitatea antiinflamatoare a extractelor analizate, estimată prin scăderea edemului, a fost exprimată în procente, în comparație cu lotul de control. Extinderea inflamației (%) a fost calculată după formula 4.4 [172]:

$$\text{masa lăbuței inflamate} - \text{masa lăbuței sănătoase} / \text{masa lăbuței sănătoase} \quad (4.4)$$

Inhibiția inflamației (%) a fost calculată după formula 4.5 [172, 176]:

$$\frac{\%m_c - \%m_t}{\%m_c} * 100, \text{ în care:} \quad (4.5)$$

$\%m_c$ – extinderea inflamației (%), lotul de control;

$\%m_t$ – extinderea inflamației (%), lotul tratat.

Statistica descriptivă a rezultatelor este prezentată în tabelul A4.4. Datele au fost prelucrate utilizând testul *Anova*, urmat de testul *post-hoc Dunnett* (tabelul 4.2). Rezultatele sunt exprimate prin media și abaterea standard. Analiza *post-hoc* a evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul de control și toate loturile experimentale la examinarea extinderii edemului, și ne semnificative ($p > 0,05$) la examinarea inhibiției edemului, comparând rezultatele loturilor experimentale cu rezultatul lotului de referință.

Lotul de control s-a caracterizat printr-o dezvoltare rapidă a edemului după introducerea agentului flogogen, cu cea mai mare extindere a edemului (44,2%), iar cea mai mică extindere s-a dovedit a fi la animalele din lotul de referință (22,69%), urmată de rezultatele extractelor uscate din *Hyperici herba* (24,68%) și *Hyperici flores* (28,19%), obținute din produsele vegetale colectate din flora spontană. Aceste date au fost mai aproape de rezultatul substanței de referință ($p < 0,05$), comparativ cu extractele obținute din produse vegetale *Hyperici herba* (28,33%) și *Hyperici flores* (28,19%) din colecția CȘPDPM (tabelul 4.2).

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

Loturi experimentale	Masa lăbuței neinflamate, g±SD,	Masa lăbuței inflamate, g±SD	Extinderea edemului, %±SD	Inhibiția edemului, %±SD
1. Lotul-martor – intraplanar 0,1 ml ser fiziologic de 0,9%	0,763±0,05	0,800±0,07	5,34±3,62	—
2. Lotul de control – intraperitoneal 1 ml ser fiziologic de 0,9%; intraplanar 0,1 ml soluție histamină de 1%	0,934±0,04	1,348±0,07	44,20±7,914 p = 2,4272E-8	—
3. Lotul de referință –intraperitoneal 1 ml soluție diclofenac de sodiu de 50 mg/kg; intraplanar 0,1 ml soluție histamină de 1%	0,92±0,06	1,15±0,09	22,15±2,45 p = 0,000003	49,90±5,53
4. Lotul experimental – intraperitoneal 1 ml extract (100 mg/kg) din <i>Hyperici herba</i> (flora spontană); intraplanar 0,1 ml soluție histamină de 1%	1,03±0,08	1,28±0,09	24,68±4,42 p = 0,000292	44,20±10,01 p = 0,785
5. Lotul experimental – intraperitoneal 1 ml extract (100 mg/kg) <i>Hyperici flores</i> (flora spontană); intraplanar 0,1 ml soluție histamină de 1%	0,94±0,14	1,21±0,20	28,19±4,54 p = 0,000021	39,33±9,77 p = 0,313
6. Lotul experimental – intraperitoneal 1 ml extract (100 mg/kg) <i>Hyperici herba</i> (colecția CȘPDPM); intraplanar 0,1 ml soluție histamină de 1%	0,89±0,07	1,148±0,05	28,33±5,59 p = 0,006	35,89±12,64 p = 0,124
7. Lotul experimental – intraperitoneal 1 ml extract (100 mg/kg) din <i>Hyperici flores</i> (colecția CȘPDPM); intraplanar 0,1 ml soluție histamină de 1%	0,95±0,06	1,257±0,04	32,21±4,94 p = 0,000325	27,13±11,19 p = 0,007

Notă: (n= 5) numărul de animale în fiecare lot

Se consideră că acțiunea antiinflamatoare a extractelor uscate de sunătoare se manifestă prin reducerea permeabilității capilarelor și reducerea acțiunii flogogenului (histamină) [176]. Acțiunea antiinflamatoare este asigurată de conținutul sporit de substanțe biologice active în extractele uscate din părți aeriene și din flori de *H. perforatum* (flavonoide, substanțe tanante, acizi fenolici). În literatura de specialitate este binecunoscut faptul că acești compuși chimici posedă efecte antioxidante, antiinflamatoare, scad permeabilitatea capilarelor [177, 178].

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

Activitatea antimicrobiană a extractelor uscate a fost studiată pe bacterii (gram-pozitive, gram-negative) și fungi în Laboratorul de infecții intraspitalicești, USMF „Nicolae Testemițanu”.

Extracțele uscate au fost obținute din produsele vegetale colectate din flora spontană. Studiul activității antibacteriene (bacteriostatice și bactericide) 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). 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.

Probele analizate (10 mg/ml) au fost dizolvate în apă distilată sterilă, cu temperatura de +40°C. Culturile investigate de microorganisme, crescute timp de 24 de ore pe agar peptonat înclinat, au fost spălate cu soluție izotonică de clorură de sodiu și diluate până la nivelul standardului optic de turbiditate cu obținerea inoculatelor ce conțin 1 mln de corpi microbieni într-un 1 ml de mediu. Inoculatele au fost diluate în soluțiile extractelor studiate în raport de 1:1. Ulterior, culturile obținute au fost supuse procesului de termostatare, la temperatura de 37°C timp de 24 de ore. În calitate de lot de control au fost utilizate mediile nutritive, însămânțate cu aceleași tulpini, fără conținutul extractelor cercetate [180, 181, 182, 183].

Evaluarea activității bacteriostatice (CMI) a fost efectuată vizual prin confirmarea lipsei procesului de creștere a microorganismelor în mediul nutritiv lichid. Activitatea bactericidă (CMB) s-a determinat în baza absenței procesului de creștere a microorganismelor, după însămânțarea repetată pe geloză peptonată cu termostatarea ulterioară timp de 24 de ore. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 4.3.

Tabelul 4.3. Activitatea antibacteriană a extractelor uscate obținute din *Hyperici herba* și *Hyperici flores*

Extract uscat analizat	Test-cultură bacteriană, g/ml									
	<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433		<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
Extractul uscat din <i>Hyperici flores</i>	37,5	300	75	300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
Extractul uscat din <i>Hyperici herba</i>	150	300	300	> 300	>300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300

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

Rezultatele cercetării denotă faptul că extractul uscat 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. De asemenea,

activitate bactericidă s-a atestat în raport cu *E. faecalis*, în concentrație de 300 µg/ml, iar în raport cu celelalte test-culturi bacteriene – într-o concentrație mai mare de 300 µg/ml. Extractul uscat 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) [183].

Pe lângă activitatea antibacteriană a fost studiată și activitatea antifungică a extractelor analizate pe tulpinile fungice: *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* și *Penicillium*. Extractele uscate analizate s-au dizolvat în apă distilată sterilă (temperatura +40°C). Inoculatele din culturile de fungi supuse studiului au fost pregătite timp de 5 zile. După amestecarea inoculatelor cu diluții ale extractelor uscate tuburile au fost puse în termostaț la temperatura de 28°C pe parcursul a 7 zile; iar în cazul *C. albicans* – pentru 48 de ore.

Activitatea fungistatică a fost determinată în funcție de lipsa activității de creștere a fungilor, în mediu nutritiv lichid, iar cea fungicidă – în funcție de absența procesului de creștere a fungilor, la o însămânțare repetată pe geloză *Saburo* cu incubare timp de 7 zile (*C. albicans* – timp de 48 de ore). Rezultatele experimentale sunt prezentate în tabelul 4.4.

Tabelul 4.4. Activitatea antifungică a extractelor uscate obținute din *Hyperici herba* și *Hyperici flores*

Extractele analizate	Activitatea antifungică pe tulpini microbiene, g/ml							
	<i>C. albicans</i>		<i>As. niger</i>		<i>As. fumigatus</i>		<i>Penicillium</i>	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
Extractul uscat din <i>Hyperici flores</i>	> 300	> 300	–	–	–	–	–	–
Extractul uscat din <i>Hyperici herba</i>	> 600	>600	> 600	> 600	> 600	> 600	> 600	> 600

Notă: CMI – concentrația minimă de inhibiție; CMF – concentrația minimă fungicidă

Datele obținute relevă următoarele: extractele uscate din părțile aeriene de *H. perforatum* nu posedă proprietăți antifungice în raport cu: *C. albicans*, *As. niger*, *As. fumigatus*, *Penicillium*. Activitatea antifungică a extractului uscat din flori de *H. perforatum* a fost studiată doar față de *C. albicans* ATCC 1023. Extractul analizat a manifestat acțiuni fungistatică și fungicidă în concentrații mai mari de 300 µg/ml.

Datele experimentale au demonstrat faptul că extractul uscat din flori de sunătoare manifestă proprietăți antibacteriene mai înalte, în raport cu bacteriile gram-pozitive și proprietăți antifungice față de *C. albicans*.

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

Uleiul volatil din părțile aeriene de *H. perforatum* a fost obținut prin metoda de hidrodistilare la Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică, USMF „Nicolae Testemițanu” [184, 185].

Studiul activității antibacteriene a uleiului volatil analizat a fost efectuat prin metoda de diluare în serie într-un mediu nutritiv lichid (bulion peptonat din carne de 2%, cu pH = 7,0). În calitate de culturi de referință, au fost folosite microorganismele indicate anterior (subcapitolul 4.3). Inițial uleiul volatil a fost dizolvat în dimetilformamidă, apoi emulsia obținută – în bulion peptonat din carne 1%. Pentru însămânțare a fost folosită cultura de tulpini obținute din microorganismele respective crescute pe geloză de carne în decurs de 18 ore, apoi spălate cu o soluție izotonică de clorură de sodiu. Doza de însămânțare constituie 500 mii de corpi microbieni per 1 ml de mediu (standard optic de turbiditate). În calitate de soluție-control a fost utilizat bulionul din carne însămânțat cu aceleași tulpini, fără conținut de ulei volatil. Tuburile au fost agitate și termostatate la temperatura de +37°C timp de 24 și 48 de ore [170, 171].

Proprietatea antifungică a uleiului volatil a fost cercetată în bulionul *Saburo* pe tulpini de *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* și *Penicillium*. Uleiul volatil a fost dizolvat, inițial, în dimetilformamidă, apoi emulsia obținută a fost diluată în bulionul *Saburo* de 1%. Inoculatele au fost pregătite din culturi de fungi, crescute la 28°C, în mediul lichid *Saburo* timp de câteva zile. După amestecarea inoculatelor cu diluțiile uleiului volatil, tuburile au fost puse în termostat la temperatura +28°C timp de 7 zile, iar pentru *C. albicans* – timp de 48 de ore [180, 181, 186].

Evaluarea activității bacteriostatice (CMI) a fost efectuată vizual în funcție de absența procesului de creștere a microorganismelor în mediul nutritiv lichid. Activitatea bactericidă (CMB) s-a determinat în baza absenței procesului de creștere a microorganismelor, după o însămânțare repetată, pe geloză peptonată, cu o termostatare ulterioară timp de 24 și 48 de ore. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 4.5.

Tabelul 4.5. Activitatea antibacteriană a uleiului volatil din *Hyperici herba*

Proba de analizat	Microorganismele testate, %									
	<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 9433		<i>Escherichia coli</i> ATCC 5922		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 2785		<i>Proteus vulgaris</i> HX 19222	
Uleiul volatil	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
	0,0009	$\frac{0,5}{0,0037}$	0,0009	$\frac{0,125}{0,25}$	$\geq 0,5$	$\geq 0,5$	$\geq 0,5$	$\geq 0,5$	0,5	0,5

Notă: CMI – concentrația minimă de inhibiție; CMB – concentrația minimă fungicidă

Rezultatele obținute au demonstrat faptul că uleiul volatil din *H. perforatum* posedă

activitate bacteriostatică înaltă doar față de microorganismele gram-pozitive: *S. aureus* și *E. faecalis* (CMI constituie 0,0009%); iar față de celelalte culturi bacteriene supuse studiului CMI este mai mare de 0,5% (tabelul 4.2). Activitatea bactericidă a uleiului volatil s-a manifestat în raport cu *S. aureus* și cu *E. faecalis* cu CMI de: 0,5% și 0,125% după 24 de ore de incubație și 0,0037-0,25% după 48 de ore de incubație (tabelul 4.5). Concentrațiile bacteriostatică și bactericidă ale probei de ulei incluse în studiu, față de microorganismele gram-negative (*E. coli* ATCC 25922, *P. vulgaris* HX 19222 și *P. aeruginosa* ATCC 27853), sunt mai mari de 0,5%.

Activitatea fungistatică a fost determinată în funcție de absența procesului de creștere a fungilor în mediul nutritiv lichid, iar activitatea fungicidă a fost demonstrată în funcție de absența procesului de creștere a fungilor, la o însămânțare repetată pe geloză *Saburo* cu o incubare timp de 7 zile, iar pentru *C. albicans* – timp de 48 de ore. Rezultatele experimentale sunt prezentate în tabelul 4.6.

Tabelul 4.6. Activitatea antifungică a uleiului volatil din *Hyperici herba*

Proba de analizat	Concentrația	Microorganismele testate, %							
		<i>C. albicans</i>		<i>As. fumigatus</i>		<i>As. niger</i>		<i>Penicillium</i>	
		CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
Uleiul volatil	1%	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,5%	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,25%	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,125%	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,062%	+	+	+	+	+	+	+	+

Notă: CMI – concentrația minimă de inhibiție; CMF – concentrația minimă fungicidă

În urma studiului, a fost dovedit faptul că uleiul volatil din *Hypericum perforatum* manifestă activitate bacteriostatică înaltă față de microorganismele gram-pozitive, inclusiv în concentrația de 0,0009% față de *S. aureus* 209-P și în concentrația de 0,125% față de *E. faecalis*. Activitatea bactericidă în raport cu *S. aureus* 209-P constituie 0,0037%, iar în raport cu *E. faecalis* – 0,25%. Concentrațiile bacteriostatică și bactericidă ale probei de ulei, incluse în studiu, față de microorganismele gram-negative (*E. coli* ATCC 25922, *P. vulgaris* HX 19222, *P. aeruginosa* ATCC 27853) sunt mai mari de 0,5% [186].

Uleiul volatil din *Hyperici herba* a demonstrat proprietăți antifungice față de toate fungiile, incluse în studiu până la concentrația de 0,5%, 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

A fost determinată toxicitatea acută a 4 extracte uscate obținute din *Hyperici herba* și din *Hyperici flores* (flora spontană și colecția CȘPDPM a USMF „Nicolae Testemițanu”). Acest studiu

s-a realizat în cadrul Laboratorului evaluare preclinică și clinică a medicamentelor al CȘM.

Toxicitatea acută s-a determinat 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) [187, 188, 189]. Studiul a fost efectuat pe: 168 de șoareci de laborator (masculi și femele) cu vârste de 2-3 luni și cu masa de 18-26 g; 54 de șobolani (femele) cu vârsta de 3-4 luni și cu masa de 180-250 g. Animalele au fost menținute în condiții de laborator (cutii standard de masă plastică) pentru aclimatizare. Condițiile de trai (temperatura de +25°C, umiditatea relativă a aerului de 60%) și regimul alimentar pentru animalele de laborator corespundeau cerințelor sanitare și normelor de alimentare; a fost oferit accesul la apă prin autoapeducte. Hrana a fost sistată cu 12 ore înainte de inițierea experimentului și timp de 4 ore după administrarea probelor testate. În dimineața zilei de experiment șoarecii au fost cântăriți și repartizați în loturi omogene a câte 6 masculi și 6 femele în funcție de masa corporală. Șobolanii au fost repartizați în loturi a câte 6 femele [188, 190, 191, 192, 193, 194].

Soluțiile extractelor uscate, testate în doze de 50, 300, 1000, 2000 mg/kg, au fost pregătite în cadrul Catedrei de farmacognozie și botanică farmaceutică. Extractele luate în experiment au fost dizolvate în volum constant cu soluție fiziologică de 0,9%: în 1 ml pentru administrarea enterală și intraperitoneală la șoareci; în 5 ml pentru administrare intragastrală la șobolani. În grupurile de control s-a administrat enteral și intraperitoneal ser fiziologic de 0,9% [192, 194, 195, 196, 197].

Timp de 14 zile s-a monitorizat comportamentul animalelor: consumul de apă și de hrană, activitatea motorie, reacția la excitanți fizici (lumină, zgomot), funcția respiratorie, starea pielii și a mucoaselor. De asemenea, a fost înregistrat timpul de apariție a primelor simptome de intoxicație și decesul animalelor. Tabloul clinic al intoxicației s-a determinat vizual. Pentru efectuarea studiului organelor interne și confirmarea modificărilor obținute în experiment, au fost disecate animalele decedate și cele muribunde (după eutanasiere) [187, 188, 189, 196].

Extractele uscate din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* s-au încadrat în clasele de toxicitate prevăzute de ghidul OECD 423 conform rezultatelor obținute în determinarea toxicității acute *in vivo*. [172, 187, 188, 189, 194, 198].

4.5.1. Testarea toxicității acute a extractelor uscate de H. perforatum la administrarea intragastrală și intraperitoneală la șoareci

Administrarea intragastrală. Extractele uscate au fost administrate șoarecilor enteral, prin gavaj, în doze-test de 300, 1000, 2000 mg/kg, iar extractul uscat din *Hyperici flores* (colecția CȘPDPM) și în doza de 50 mg/kg. În grupul de control s-a administrat 1 ml de soluție fiziologică

de 0,9%. Animalele din grupul de control, pe parcursul studiului, n-au demonstrat modificări de comportament; consumau hrană și apă, erau în mișcare activă. Starea mucoaselor și a învelișului cutanat era în limitele normei, fără schimbări patologice. Mucoasele vizibile erau palide, lucioase, netede, blana animalelor avea un aspect îngrijit, lucios, fără focare de alopecie. Culoarea urinei – galben-deschisă. Glandele mamare ale femelelor, la palpare – fără indurații și fără eliminări; organele genitale masculine – în limitele normei. Deformări sau edeme ale extremităților nu s-au atestat. Toți dinții s-au menținut [198].

Administrarea extractelor în doze de 300, 1000, 2000 mg/kg s-a caracterizat printr-o perioadă de hipodinamie și reducere a reacției la stimuli exogeni. Majoritatea animalelor au revenit la starea inițială pe parcursul primelor 4-24 de ore după administrarea dozei de 300 mg/kg, și a 24-72 de ore după administrarea dozelor de 1000, 2000 mg/kg. La animalele decedate, cărora le-au fost administrate dozele de 300, 1000, 2000 mg/kg s-a constatat inițial o diminuare a activității motorii, cu o reacție redusă, apoi tot mai slabă, la stimuli exogeni, cu dezvoltarea unei stări terminale (*gaspig*), urmată de decesul animalelor în decurs de 1-3 zile. Convulsiile au fost constatate ocazional. Dat fiind faptul că la administrarea dozei de 300 mg/kg a extractului uscat din flori (colecția CȘPDPM) a decedat un singur animal, a fost necesar a introduce proba în doză de 50 mg/kg (tabelul 4.7). În timpul monitorizării, nu s-au constatat modificări de comportament, schimbări vizuale anatomice și nici decesul animalelor.

Tabelul 4.7. Toxicitatea acută a extractelor uscate din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* la administrarea intragastrală șoarecilor

Dozele extractelor uscate, mg/kg	Nr. total de animale (femele)	Extractele uscate din produse vegetale analizate							
		<i>H. herba</i> , flora spontană		<i>H. flores</i> , flora spontană		<i>H. herba</i> , colecția CȘPDPM		<i>H. flores</i> , colecția CȘPDPM	
		Nr. animale decedate	Deces, %	Nr. animale decedate	Deces, %	Nr. animale decedate	Deces, %	Nr. animale decedate	Deces, %
50	6	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-	0
300	6	-	0	-	0	-	0	1	17
1000	6	-	0	-	0	1	17	1	17
2000	6	1	17	1	17	1	17	1	17

Nota: ns – experimental nu s-a efectuat

După administrarea extractelor uscate, în special obținute din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* din colecția CȘPDPM, uneori și a extractelor din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* din flora spontană, la administrarea dozei de 1000 mg/kg, și mai pronunțat, la administrarea dozei de 2000 mg/kg, la animale au fost constatate hipodinamie și reducerea reacției la stimuli exogeni, stare care a revenit la normalitate în 1-3 zile. În lotul de animale, în care s-au administrat extracte din flori

(flora spontană și colecția CȘPDPM), s-a constatat inapetență și diaree pe parcursul primelor 48-72 de ore. În loturile în care au fost administrate extractele uscate din *Hyperici herba* (flora spontană și colecția CȘPDPM) diareea a dispărut pe parcursul a 24 de ore.

Monitorizarea procesului de alimentare nu a pus în evidență modificări semnificative (grupuri supuse studiului versus grup de control). La necropsie, modificări patologice vizibile ale organelor interne (limba, mucoasele cavității bucale, dinții, traheea, esofagul, plămânii, inima, ficatul, rinichii, splina, vezica urinară), în loturile experimentale și în cele de control, nu au fost constatate.

În baza rezultatelor obținute, s-a stabilit LD 0% la administrarea enterală a extractelor uscate, care a constituit pentru probele obținute din părți aeriene (flora spontană și colecția CȘPDPM) 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 (tabelul 4.7). Mortalitatea LD 25%, LD 50%, LD 100% după Kerber nu a fost posibil de stabilit.

La estimarea LD₅₀ conform TG 423: *Acute Toxic Class Method*, s-a stabilit că extractele obținute din *Hyperici herba* și *Hyperici. flores* (flora spontană) posedă clasa 5 de toxicitate (practic netoxic), iar extractele obținute din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* (colecția CȘPDPM) posedă clasa 4 de toxicitate (toxicitate redusă) (tabelul 4.8) [188].

Tabelul 4.8. Clasa de toxicitate acută a extractelor uscate din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* determinată la administrare intragastrală șoarecilor

Extractele uscate analizate	Clasa de toxicitate	LD ₅₀ estimat, mg/kg
<i>Hyperici herba</i> (flora spontană)	5 (practic netoxic)	> 2000-5000
<i>Hyperici flores</i> (flora spontană)	5 (practic netoxic)	> 2000-5000
<i>Hyperici herba</i> (colecția CȘPDPM)	4 (toxicitate redusă)	> 300-2000
<i>Hyperici flores</i> (colecția CȘPDPM)	4 (toxicitate redusă)	> 300-2000

Administrarea intraperitoneală. Soluțiile extractelor analizate au fost introduse șoarecilor, intraperitoneal în volum de 1 ml, în loturi experimentale cu concentrații de 300, 1000, 2000 mg/kg, iar în lotul de control s-a introdus 1 ml de soluție fiziologică de 0,9%.

La administrarea dozei de 300 mg/kg la animale s-a observat hipodinamie cu reducerea reacției la stimuli exogeni. Majoritatea animalelor au revenit la starea normală pe parcursul primelor 4-24 de ore; a decedat un singur animal, căruia s-a administrat extractul din flori din colecția CȘPDPM. Din acest motiv, proba a fost introdusă și în concentrație de 50 mg/kg, animalele fiind supravegheate timp de 14 zile. În perioada cercetată nu s-au constatat modificări de comportament, schimbări vizuale anatomice și nici decesul lor. La administrarea dozei de 1000 mg/ml s-a constatat decesul animalelor în toate loturile experimentale: câte un animal per lot în care

s-au administrat extracte din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* din flora spontană; câte două animale per lot în care s-au administrat extractele obținute din părți aeriene și flori din colecție. La administrarea dozei de 2000 mg/kg s-a constatat decesul animalelor în toate loturile experimentale: un animal per lot în care s-a administrat extractul din *Hyperici herba* din flora spontană și două animale per lot experimental în care s-au introdus extractele din flori din flora spontană și colecție, și părți aeriene din colecție (tabelul 4.9). La animalele decedate după administrarea probelor în doze de 300, 1000, 2000 mg/kg s-a constatat o diminuare a activității motorii, cu o reacție lentă, apoi tot mai slabă la stimulii exogeni, cu dezvoltarea unei stări terminale (*gasp*ing), urmată de decesul lor în decurs de 24-96 de ore; convulsiile au fost constatate ocazional.

Tabelul 4.9. Toxicitatea acută a extractelor uscate din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* la administrarea intraperitoneală șoarecilor

Dozele extractelor uscate, mg/kg	Nr. total de animale (masculi)	Extractele uscate din produse vegetale analizate							
		<i>H. herba</i> , flora spontană		<i>H. flores</i> , flora spontană		<i>H. herba</i> , colecția CȘPDPM		<i>H. flores</i> , colecția CȘPDPM	
		Nr. animale decedate	Deces, %	Nr. animale decedate	Deces, %	Nr. animale decedate	Deces, %	Nr. animale decedate	Deces, %
50	6	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0	0
300	6	0	0	0	0	0	0	1	17
1000	6	1	17	1	17	2	34	2	34
2000	6	1	17	2	34	2	34	2	34

Notă: ns – experimentul nu s-a efectuat

După administrarea extractelor uscate, în special obținute din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* din colecție, uneori și a probelor obținute din flora spontană, la administrarea dozei de 1000 mg/kg, mai pronunțat în doza de 2000 mg/kg, au fost constatate următoarele simptome: hipodinamie și reducerea reacției la stimuli exogeni, stare care a revenit în limitele normei (la nivelul animalelor lotului de control) în 1-3 zile. La necropsia organelor interne ale animalelor decedate și ale lotului de control modificări patologice nu au fost constatate

Datele experimentale denotă faptul că LD 0% a constituit 300 mg/kg la administrarea intraperitoneală a extractelor obținute din PV colectate din flora spontană și părțile aeriene din colecția CȘPDPM, iar 50 mg/kg - la administrarea extractului din flori din colecția CȘPDPM.

S-a stabilit procentul maxim de letalitate la administrarea extractelor uscate analizate: proba *Hyperici herba* (flora spontană) – 17% în doza de 2000 mg/kg; proba *Hyperici flores* (flora spontană) – 34% în doza de 2000 mg/kg; *Hyperici herba* și *Hyperici flores* (colecția CȘPDPM) – 34% în doza de 1000 mg/kg. A fost stabilită LD 25% pentru proba *Hyperici flores* din flora spontană egală cu 1470 mg/kg, la administrare parenterală, iar pentru extractele *Hyperici herba* și

Hyperici flores (colecția CȘPDPM) - egală cu 735 mg/kg. 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 flores* (colecția CȘPDPM) – la gradul 4 de toxicitate (substanțe cu toxicitate redusă) [195, 199].

4.5.2. Testarea toxicității acute a extractelor uscate de *H. perforatum* la administrarea intragastrală șobolanilor

Administrarea intragastrală. La administrarea intragastrală a soluțiilor de extracte analizate în doze de 300, 2000 mg/kg s-a observat adinamie, somnolență și reducerea reacției la stimuli exogeni. Această stare a revenit în limitele normei (starea grupului de control) pe parcursul primelor 24 de ore în doza de 300 mg/kg, și pe parcursul a 24-48 ore în doza de 2000 mg/kg. În loturile experimentale cărora s-au administrat extracte uscate din flori de *H. perforatum* (flora spontană și colecția CȘPDPM) s-a constatat inapetență și diaree pe parcursul primelor 48-72 de ore; animalele cărora au fost introduse extracte din părți aeriene (flora spontană și colecția CȘPDPM) au manifestat diaree, care a trecut peste 24 de ore. La administrarea dozei de 300 mg/kg animalele au supraviețuit în toate loturile experimentale; la administrarea dozei de 2000 mg/kg a decedat un singur animal, căruia s-a administrat extractul din *Hyperici flores* (colecția CȘPDPM) (tabelul 4.10); animalelor lotului de control s-au administrat intragastral câte 5 ml de soluție fiziologică de 0,9% [194, 196].

Tabelul 4.10. Determinarea toxicității acute la administrarea intragastrală a extractelor uscate din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* șobolanilor

Dozele extractelor	Nr. total de animale	Extractele uscate din produse vegetale analizate							
		<i>Hyperici herba</i> (flora spontană)		<i>Hyperici flores</i> (flora spontană)		<i>Hyperici herba</i> (colecția CȘPDPM)		<i>Hyperici flores</i> (colecția CȘPDPM)	
		Nr. animale decedate	Deces, %	Nr. animale decedate	Deces, %	Nr. animale decedate	Deces, %	Nr. animale decedate	Deces, %
300	6	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	6	0	0	0	0	0	0	1	17

Pe parcursul cercetării nu s-au constatat diferențe semnificative în raport cu dinamica de creștere a masei corporale și consumul alimentelor la animalele din grupurile experimentale și în de control. La necropsie și examinarea organelor interne (limba, mucoasele cavității bucale, traheea, esofagul, plămânii, inima, ficatul, rinichii, splina, vezica urinară, ovarele) în loturile experimentale și de control modificări patologice vizibile la administrarea intragastrală nu au fost înregistrate.

S-a stabilit LD 0% la administrarea enterală a extractelor uscate din *Hyperici herba* și

Hyperici flores din flora spontană și *Hyperici herba* din colecția CȘPDPM, care a constituit doza de 2000 mg/kg, iar în cazul probei de *Hyperici flores* din colecția CȘPDPM valoarea acesteia a corespuns dozei de 300 mg/kg (tabelul 4.10).

A fost determinată clasa de toxicitate pentru administrarea enterală șobolanilor a extractelor uscate din flori și din părți aeriene de *H. perforatum* (flora spontană și colecția CȘPDPM) conform clasificării propuse de OECD (*TG 423 Acute Toxic Class Method*) [179]. Datele experimentale relevă faptul că extractele uscate obținute din *Hyperici herba*, *Hyperici flores* (flora spontană), *Hyperici herba* (colecția CȘPDPM) corespund gradului de toxicitate 5, pentru care LD₅₀ estimat este ≥ 5000 mg/kg, iar proba *Hyperici flores* (colecția CȘPDPM) corespunde gradului de toxicitate 5, pentru care LD₅₀ este estimat cu 2500 mg/kg (tabelul 4.11).

Tabelul 4.11. Clasa de toxicitate acută a extractelor uscate din *Hyperici herba* și *Hyperici flores* determinată la administrare intragastrală șobolanilor

Extractele uscate analizate	Clasa de toxicitate	LD ₅₀ estimat, mg/kg
<i>Hyperici herba</i> (flora spontană)	5 (practic netoxic)	≥ 5000
<i>Hyperici flores</i> (flora spontană)	5 (practic netoxic)	≥ 5000
<i>Hyperici herba</i> (colecția CȘPDPM)	5 (practic netoxic)	≥ 5000
<i>Hyperici flores</i> (colecția CȘPDPM)	5 (practic netoxic)	>2000-5000=2500

În cadrul studiului preclinic pe animale de laborator (șobolani) s-a constatat că extractele analizate nu posedă efect toxic. Astfel, pot fi utilizate drept componente în elaborarea formelor farmaceutice de uz intern și extern, cu proprietăți antioxidante, antiinflamatoare și antibacteriene.

4.6. Sinteza capitoului 4

Prin metodele DPPH și ABTS a fost determinată activitatea antioxidantă mai înaltă la extractul uscat din flori. Valoarea IC₅₀ μg/ml (13,351 μg/ml,) determinată prin metoda DPPH a extractului uscat din flori a fost mai aproape de valoarea IC₅₀ μg/ml a substanței de referință – Trolox (4,13 μg/ml), comparativ cu extractul din părți aeriene (22,52 μg/ml). Capacitatea antioxidantă determinată prin metoda ABTS⁺⁺ a demonstrat următoarele: extractul uscat din *Hyperici flores* (28,79 μM; CI 95% 28,71-28,80) posedă activitate antioxidantă mai mare comparativ cu extractul uscat din *Hyperici herba* (23,68 μM; CI 95% 22,27-25,08). Extractele uscate din flori (45,80%; CI 95% 44,30-47,29) și din părți aeriene (35,94%; CI 95% 34,07-37,81) au dovedit o capacitate mai scăzută de chelare a fierului comparativ cu EDTA (99,06%; CI 95% 98,55-99,56) – substanță de referință.

Au fost demonstrate acțiunile antibacteriană și antifungică ale uleiului volatil, obținut prin hidrodistilare din *Hyperici herba*, care a manifestat o activitate bacteriostatică înaltă în raport cu microorganismele gram-pozitive în concentrație de 0,0009% – *S. aureus* 209-P și 0,125% – de *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*.

A fost demonstrată activitatea bacteriostatică și bactericidă ale extractului obținut din *Hyperici flores*. În calitate de culturi de referință au fost folosite: *Staphylococcus aureus* 209-P, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 3177, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 și *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. Extractul din *Hyperici flores* a manifestat activitate bacteriostatică față de *S. aureus* 209-P în concentrație de 37,5 μg/ml; *E. faecalis* – în concentrație de 75 μg/ml; în celelalte culturi-test bacteriene s-a atestat o activitate bacteriostatică în concentrații mai mari de 300 μg/ml. Extractele uscate obținute din părți aeriene de sunătoare posedă proprietăți antibacteriene în concentrații mai mari de 300 μg/ml, fiind inactive față de fungi.

Studiul activității antiinflamatoare a extractelor uscate din părți aeriene și din flori de *H. perforatum* L. a fost realizat *in vivo* prin inducerea edemului în laba posterioară a șobolanilor. Toate extractele și-au demonstrat eficiența în condiții de inflamație acută. Rezultatele obținute denotă eficacitatea antiinflamatoare a extractelor polifenolice din *Hyperici herba* (44,2%; CI 95% 31,9-56,6) și din *Hyperici flores* (39,33%; CI 95% 27,2-51,5) - produse vegetale colectate din flora spontană. Aceste date au fost mai aproape valorilor substanței de referință (diclofenac de sodiu), care a redus esențial procesul de extindere a edemului (49,76%; CI 95% 43,0-56,8), comparativ cu extractele obținute din *Hyperici herba* (35,89%; CI 95% 20,2-51,6) și *Hyperici flores* (35,89%; CI 95% 20,2-51,6) din colecția CȘPDPM.

Cercetările efectuate au demonstrat că extractele uscate obținute din părți aeriene (flora spontană, colecție) și din flori (flora spontană, colecție), la administrarea pe cale internă unimomentană animalelor de laborator (șoareci, șobolani) practic nu manifestă efecte toxice. Administrarea intragastrală și cea intraperitoneală au generat un număr redus de decese și lipsa de modificări macroscopice la nivelul organelor interne. Această stare de lucruri permite atribuirea extractelor uscate din *H. herba* și *H. flores* din colecție la gradul 4 de toxicitate (substanțe cu toxicitate redusă), iar extractele din *H. herba* și *H. flores* din flora spontană la gradul 5 de toxicitate (substanțe practic netoxice).

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 RM a permis evidențierea caracterelor macroscopice (numărul de coaste și modul de aranjare pe tulpini, pubescența părților aeriene) și microscopice (structurilor secretoare – glande negre, buzunare translucide și canale, cu caracteristici de diferențiere – tipul, culoarea, forma, localizarea), pentru identificarea produselor vegetale.
2. Analiza cantitativă comparativă al 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. Constatarea conținutului maxim de flavonoide în părțile aeriene de *H. perforatum* a servit 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,I8-biapigenină (0,28) în cele cultivate.
4. Studiul comparativ al uleiului volatil, obținut prin hidrodistilare, la 4 specii de *Hypericum* a pus în evidență părțile aerine de *H. perforatum* prin conținut maximal – 0,26%. Taxonomia speciei corelează cu componenții majori ai uleiului volatil în produsele vegetale: *H. perforatum* – β -cariofilen (12,175%), oxid de cariofilen (12,119%) și α -pinen (8,574%); *H. elegans* – g-gurjunen (13, 99%), aromadendren (13,99%) și undecan (10,262%); *H. tetrapterum* – dodecanal (9,271%) și α -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 $\mu\text{g/ml}$) și *E. faecalis* (75 $\mu\text{g/ml}$), comparativ cu extractul obținut din părți aeriene de *H. perforatum* (300 $\mu\text{g/ml}$).
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 ($\text{LD}_{50} > 5000 \text{ mg/kg}$) și cultivată ($\text{LD}_{50} = 2500 \text{ mg/kg}$), 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 RM, 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. САМБУКОВА, Т.В. и др. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии. В: *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2017, Т. 15, № 2, с. 56-63. ISSN 2542-1875 (Online).
2. 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).
3. European Medicines Agency. European Union herbal monograph on *Hypericum perforatum* L. herba. 2018, 56 p. Disponibil: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-aloe-barbadensis-mill-aloe-various-species-mainly-aloe-ferox-mill-its_en.pdf
4. BÉJAOU, 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).
5. SHRIVASTAVA, M., DWIVEDI, L.K. Therapeutic potential of *Hypericum perforatum*: a review. In: *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2015; Vol. 6(12), pp. 1000-1007. ISSN: 0975-8232.
6. BENE, A., NISTREANU, A., TIHON, Iu. Studiul chimic al unor specii din genul *Hypericum* L. din flora Republicii Moldova. In: *Analele Științifice ale USMF „N. Testemițanu”*. 2011, №. 1(12), pp. 418-421. ISSN 1857-1719.
7. BENE, A. Compoziția chimică a speciilor genului *Hypericum* L. În: *Revista Farmaceutică a Moldovei*. 2021, Vol. 45, № 1, pp. 82-84. ISSN 1812-5077.
8. BENE, A. Efectele farmacologice ale compușilor chimici din specia *Hypericum perforatum* L. În: *Revista Farmaceutică a Moldovei*. 2021, Vol. 45, № 1, pp. 55-57. ISSN 1812-5077.
9. ADAMCZAK, A., OŻAROWSKI, M., KARPIŃSKI, T.M. Antibacterial activity of some flavonoids and organic acids widely distributed in plants. In: *Journal of Clinical Medicine*. 2020, 9, 109. ISSN: 2077-0383. Disponibil: doi:10.3390/jcm9010109.
10. 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.

11. CROCKETT, S. Essential oil and volatile components of the genus *Hypericum* (Hypericaceae). In: *Natural Product Communications*. 2010, Vol. 5 (9), pp. 1493-1506. ISSN 1555-9475 (Online).
12. 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).
13. COJOCARU-TOMA, M. *Produse vegetale și fitopreparate din Republica Moldova*. Chișinău: Centrul Editorial-Poligrafic Medicina, 2017. 330 p. ISBN 978-9975-82-059-2.
14. TĂMAȘ, M. *Botanica Farmaceutică, Vol. III, Sistemica – Cormobionta*. Cluj Napoca: Editura medicală „Iuliu Hațieganu”, 1999. 252 p. ISBN 973-98636-7-3.
15. CALALB, T., BODRUG, M. *Botanica Farmaceutică*. Chișinău: CEP Mediana, 2009, p. 315-317. ISBN 978-9975-915-44-1.
16. NEGRU, A. și a. *Lumea vegetală a Moldovei. Plante cu flori – II*. Chișinău: Știința, 2006. p. 13. ISBN 978-9975-67-535-2.
17. ГЕЙДЕМАН, Т. *Определитель высших растений Молдавской ССР*. Кишинев: Штиинца, 1986, с. 369-371.
18. ЦВЕЛЕВА, Н. *Флора Восточной Европы*. Санкт-Петербург: Мир и семья-95. 1996, том IX, с. 173-177. ISBN 5-90016-28-X.
19. КИТАНОВ, Г., БЛИНОВА, К. Современное состояние химического изучения видов рода *Hypericum*. В: *Химия природных соединений*. Ташкент, 1987, том 2, с. 185-199.
20. *Natura rezervației „Plaiul Fagului”*. Coord. A. Ursu; Agenția pentru Silvicultură „Moldsilva”; Academia de Științe a Republicii Moldova. Chișinău – Rădenii Vechi. 2005, 102 p. ISBN 975-944-88-4.
21. КУРКИН, В.А., ПРАВДИВЦЕВА, О.Е., ЗИМИНА, Л.Н. Сравнительное морфолого–анатомическое исследование сырья некоторых видов рода *Hypericum* L. В: *Медицинский альманах*. 2010, № 1 (10), с. 207-209. ISSN 2499-9954 (Online).
22. КУРКИН, В.А., ПРАВДИВЦЕВА, О.Е., ЗИМИНА Л.Н. Сравнительное микроскопическое исследование некоторых видов зверобоя. В: *Фармация*. 2009, № 3, с. 11-12. ISSN 2541-9218.
23. PERRONE, R., DE ROSA, P., DE CASTRO, O., COLOMBO, P. Leaf and stem anatomy in eight *Hypericum* species (Clusiaceae). In: *Acta Botanica Croatica*. 2013, 72 (2), pp. 268-286. ISSN 1847-8476 (Online).
24. CICCARELLI, D., ANDREUCCI, A.C., PAGNI A. M. Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): Morphological, anatomical and

- histochemical studies during the course of ontogenesis. In: *Annals of Botany*. 2001, 88, pp. 637-644. ISSN 0305-7364.
25. 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).
 26. PERRONE, R., DE ROSA, P., De CASTRO, O., COLOMBO, P. A further analysis of secretory structures of some taxa belonging to the genus *Hypericum* (Clusiaceae) in relation to the leaf vascular pattern. In: *Turkish Journal of Botany*. 2013, 3, pp. 847-858. ISSN 1303-6106.
 27. ŁOTOSKA, B., OSINSKA, E. Shoot anatomy and secretory structures in *Hypericum* species (Hypericaceae). In: *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2010, 163, pp. 70-86. ISSN 1095-8339 (Online).
 28. CURTIS, J.D., LERSTEN N.R. Internal secretory structures in *Hypericum* (Clusiaceae): *H. perforatum* L. and *H. balearicum* L. In: *New Phytologist*. 1990, 114, pp. 571-580. ISSN 1469-8137 (Online).
 29. Фролова, Л. Н., Т. Л. Киселева, Н. Н. Мельникова, Е. В. Цветаева, и Д. А. Константинова. «морфолого-анатомическое изучение свежесобранного сырья отдельных представителей рода *Hypericum*. *Традиционная медицина*, вып. 2(17) 2009. сс. 7-13, <http://www.tradmed.ru/index.php/tm/article/view/121>.
 30. CICCARELLI, D., ANDREUCCI, A.C., PAGNI, A.M. The "black nodules" of *Hypericum perforatum* L. subsp. *perforatum*: Morphological, anatomical, and histochemical studies during the course of ontogenesis. In: *Israel Journal of Plant Sciences*. 2001, vol. 49, pp. 33-40. ISSN 2223-8980 (Online).
 31. MINARCHENKO, V. et al. Morphological investigations on the diagnostic features of six *Hypericum* species of the Ukrainian flora. In: *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021, 46(1), pp. 31-42. ISSN 1300-4182.
 32. ȘIPOȘ, M., GÎTEA D. Secretory structures in species of the *Hypericum* genus from Bihor county note II flowers. In: *Farmacia*. 2014, Vol. 62, 3, pp. 617-624. ISSN 2413-2241 (Online).
 33. NÜRK, N.M. *Phylogenetic analyses in St. John's wort (Hypericum). Inferring character evolution and historical biogeography*. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. Nat.) eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität. Berlin, 2011. 129 p.

34. КИТАНОВ, Г.М., БЛИНОВА К.Ф. Современное состояние химического изучения видов рода *Hypericum*. В: *Химия природных соединений*. 1987, 2, с. 185-195. ISSN 1573-8388 (Online).
35. MÜLLER, W. E. *St. John's Wort and its active principles in depression and anxiety*. Basel Boston Berlin: Birkhäuser Verlag, 2005, 15 p. ISBN 978-3-7643-6160-0.
36. GÎTEA, D., VLASE, L., TĂMAȘ, M., ONIGA, I. Identification and quantitative determination of hyperforin in some *Hypericum* species. In: *Contribuții Botanice. Grădina Botanică "Alexandru Borza" Cluj-Napoca*. 2010, XLV, pp. 35-40. ISSN 1857-095X.
37. TĂMAȘ, M., DRĂGULESCU, C., ONIGA, I., GLIGA, F. Comparative phytochemical research on some species of *Hypericum* and populations of *H. perforatum* L. (Hypericaceae) in România. In: *Acta oecologica*. 2001, Vol. VIII, 1-2, pp. 25-33. ISSN 1221-5015.
38. HUANG, L., Chen, S. Hypericin in *Hypericum*: chemistry, botanical sources and biological activities. In: *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*. 2012, 21, pp. 388-400. ISSN 1003-1057.
39. MALEŠ, Ž. et al. Comparative phytochemical and antimicrobial investigations of *Hypericum perforatum* L. subsp. *perforatum* and *H. perforatum* subsp. *angustifolium* (DC.) Gaudin. In: *Acta Pharmaceutica*. 2006, 56, pp. 359-367. ISSN 1846-9558.
40. KARPPINEN, K. Biosynthesis of hypericins and hyperforins in *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort) – precursors and genes involved. In: *Acta universitatis ouluensis*. 2010, pp. 14-18. ISSN 1796-220X.
41. ЗЛОБИН, А.А. и др. Состав и свойства пектиновых полисахаридов зверобоя продырявленного *Hypericum perforatum* L. В: *Химия растительного сырья*. 2011, № 1, с. 33-38. ISSN 1029-5143 (Online).
42. PELLATI, F., BENVENUTI, S., MELEGARI, M. Chromatographic performance of a new polar poly(ethylene glycol) bonded phase for the phytochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. In: *Journal of Chromatography A*. 2005, Vol. 1088, pp. 205-217. ISSN 0021-9673.
43. GRANZOW, D. *Untersuchungen zu Hypericum perforatum L.: anbau und selektion, analytische und präparative arbeiten*. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. Nat.). Marburg, 2000, 160 p.
44. BAGDONAITĖ, E., JANULIS, V., IVANAUSKAS, L., LABOKAS, J. Ex situ studies on chemical and morphological variability of *Hypericum perforatum* L. in Lithuania. In: *Biologija*. 2007, Vol. 53, № 3, pp. 63-70. ISSN 2029-0578 (Online).

45. ZOBAYED, S.M.A, AFREEN,F., GOTO, E., KOZAI, T. Accumulation of hypericin in dark glands of *Hypericum perforatum*. In: *Annals of Botany*. 2006, 98, pp. 793-804. ISSN 1095-8290 (Online).
46. REPČÁK, M., MÁRTONFI, P. The localization of secondary substances in *Hypericum perforatum* flower. In: *Biologi, Bratislava*. 1997, 52 (1), pp. 91-94. ISSN 0006-3088.
47. GÎTEA, D., ȘIPOȘ, M., TĂMAȘ, M., PAȘCA, B. The analysis of alcoholic extracts *Hypericum* species by UV/VIS spectrophotometry. In: *Analele Universității din Oradea – Fascicula Biologie*. 2010, Tom. XVII, 1, pp. 111-115. ISSN 1224-5119.
48. ПРАВДИВЦЕВА, О.Е., КУРКИН, В.А. Сравнительное исследование химического состава надземной части некоторых видов рода *Hypericum* L. В: *Химия растительного сырья*. 2009, №1, с. 79-82. ISSN 1029-5143.
49. KITANOV, G.M. Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. In: *Biochemical Systematics and Ecology*. 2001, 29, pp. 171-178. ISSN 0305-1978.
50. SOELBERG, J., JORGENSEN, L.B., JAGER, A.K. Hyperforin accumulates in the translucent glands of *Hypericum perforatum*. In: *Annals of Botany*. 2007, 99, pp. 1097-1100. ISSN 1095-8290 (Online).
51. VATTIKUTI, U.M.R., VEERESHAM, C. An overview on *Hypericum perforatum* Linn. In: *Natural Product Radiance*. 2005, Vol. 4(5), pp. 368-381. ISSN 0972592X.
52. SMELCEROVIC, A., SPITELLER, M. Phytochemical analysis of nine *Hypericum* L species from Serbia and the F.Y.R. Macedonia. In: *Pharmazie*. 2006,61(3), pp. 251-252. ISSN 0031-7144.
53. BRUNI, R., SACCHETTI, G. Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). In: *Molecules*. 2009, 14, pp. 682-725. ISSN 1420-3049 (Online).
54. SCHULTE-LOBBERT, S. et al. Development of a high-performance-liquid-chromatographic method for the determination of biapigenin in biorelevant media. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003, 33, pp. 53-60. ISSN 07317085.
55. BOUBAKIR, Z. *Hyperforin biosynthesis – Characterization and purification of a prenyltransferase from Hypericum calycinum cell cultures*. Dissertation doctor of natural science. Derna, 2006, 129 p.
56. BETÜL, D. *Isolation of a bioactive compound hypericin from a medicinal plant Hypericum perforatum L. using basic chromatography methods*. For the degree of master of science in the department of chemistry. 2003, 71 p. Disponibil la: <http://etd.lib.metu.edu.tr/upload/12604846/index.pdf>

57. ЗИМИНА, Л.Н., КУРКИН, В.А., РЫЖКОВ, В.М. 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).
58. ПАТОЧКА, J. The chemistry, pharmacology, and toxicology of the biologically active constituents of the herb *Hypericum perforatum* L. In: *Journal of Applied Biomedicine*. 2003, 1, pp. 61-70. ISSN 1214-0287.
59. KUMAR, V., SINGH, P.N., MURUGANANDAM, A.V., BHATTACHARYA, S.K. *Hypericum perforatum*: Nature's mood stabilizer. In: *Indian Journal of Experimental Biology*. 2000, Vol. 38, pp.1077-1085. ISSN 0975-1009 (Online).
60. ERKEN, H. et al. Chemical investigations on some *Hypericum* species growing in Turkey. In: *Chemistry of Natural Compounds*. 2001, 37, 5, pp. 434-438. ISSN 1573-8388 (Online).
61. MAGGI, F. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from several *Hypericum* taxa (Guttiferae) growing in central Italy (Appennino Umbro-Marchigiano). In: *Chemistry & Biodiversity*. 2010, 7(2), pp. 447-466. ISSN:1612-1880.
62. PAVLOVIĆ, M., TZAKOU, O., PETRAKIS, P. V., COULADIS, M. The essential oil of *Hypericum perforatum* L., *Hypericum tetrapterum* Fries. and *Hypericum olympicum* L. growing in Greece. In: *Flavour and Fragrance Journal*. 2006, 21(1), pp. 84-87. ISSN 0882-5734.
63. SAROGLU, V. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species from Serbia. In: *Biochemical Systematics and Ecology*. 2007, 35(3), pp. 146-152. ISSN 0305-1978.
64. BASER, K.H.C., OZEK, T., NURIDDINOV, H. R., DEMIRCI A. Essential oils of two *Hypericum* species from Uzbekistan. In: *Chemistry of Natural Compounds*. 2002, Vol. 38 (1), pp. 54-56. 1573-8388 (Online).
65. SCHWOB, I., BESSIERE, J.-M., MASOTTI, V., VIANO, J. Composition of the essential oils of *Hypericum perforatum* L. from southeastern France. In: *Biochemical Systematic and Ecology*. 2004, 32(8), pp 735-745. ISSN 0305-1978.
66. SCHWOB, I., BESSIÈRE, J.-M., VIANO, J. Composition of the essential oils of *Hypericum perforatum* L. from southeastern France. In: *Comptes Rendus Biologies*. 2002, 325, pp. 781-785. ISSN1631-0691.
67. SHAROPOV, F.S., GULMURODOV, I.S., SETZER, W.N. Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum scabrum* L. growing wild in Tajikistan. In: *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2010, 2(6), pp. 284-290. ISSN 0975-7384.

68. HAJDARI, A. et al. Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* L. from wild population in Kosovo. In: *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. 2014, Vol. 27(1), pp. 51-54. ISSN 2300-6676 (Online).
69. BERTOLI, A., CÜNEYT, Ç., TEIXEIRA DA SILVA, J. A. *Hypericum* species as sources of valuable essential oils. In: *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 2011, 5, pp. 29-47. ISSN 1752-3389.
70. ĐORĐEVIĆ, A. Chemical composition of *Hypericum perforatum* L. essential oil. In: *Advanced technologies*. 2015, 4(1), pp. 64-68. ISSN 2620-147X (Online).
71. RADUSIENE, J., JUDZENTIENE, A., BERNOTIENE, G. Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* L. growing in Lithuania. In: *Biochemical Systematics and Ecology*. 2005, 33, pp. 113-124. ISSN 0305-1978.
72. RADULOVIĆ, N.S, ĐORĐEVIĆ, A.S., PALIĆ, R.M. The intrasectional chemotaxonomic placement of *Hypericum elegans* Stephan. Ex Willd. Inferred from the essential-oil chemical composition. In: *Chemistry & Biodiversity*. 2010, Vol. 7 (4), pp. 943-952. ISSN:1612-1880.
73. FATHI, H., EBRAHIMZADEH, M.A. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort). In: *International Journal of Forest, Soil and Erosion*. 2013, 3(2), pp. 68-72. ISSN 2251-6387.
74. BANKHALID, V., WAFAA, M.A., AL. SHAIKH HAMED. Preliminary phytochemical screening and evaluation of *in vitro* antioxidant activity of Iraqi species of *Hypericum perforatum* aerial part. In: *International Research Journal of Pharmacy*. 2014, 5(5), pp. 369-373. ISSN 2230-8407.
75. КУРКИН, В.А., ДУБИЩЕВ, А.В., ПРАВДИВЦЕВА, О.Е., ЗИМИНА, Л.Н. Изучение нейротропной активности новых лекарственных препаратов из травы зверобоя. В: *Медицинский альманах*. 2009, № 4 (9), с. 33-36. ISSN 2499-9954 (Online).
76. КУРКИН, В.А, ПРАВДИВЦЕВА, О.Е., ЗИМИНА, Л.Н. Антидепрессантная активность препаратов травы зверобоя. В: *Фармация*. 2010, № 5, с. 40-41. ISSN 0367-3014.
77. SADDIQE, Z., NAEEM, I., MAIMOONA, A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. In: *Journal of Ethnopharmacology*. 2010, 131, pp. 511-521. ISSN 0378-8741.
78. KARIOTI, A., BILIA, A.R. Hypericins as potential leads for new therapeutics. In: *International Journal of Molecular Sciences*. 2010, 11, pp. 562-594. ISSN 1422-0067.
79. GREESON, J.M., SANFORD, B., MONTI, D.A. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. In: *Psychopharmacology*. 2001, 153, pp. 402-414. ISSN 0033-3158.

80. ASSADI, A., ZARRINDAST, M.R., JOUYBAN, A., SAMINI, M. Comparing of the effects of hypericin and synthetic antidepressants on the expression of morphine induced conditioned place preference. In: *Iranian Journal of Pharmaceutical*. 2011, 10(3), pp. 619-626. ISSN 1726-6890 (Online).
81. FEYZIOĞLU, B. et al. Antibacterial effect of hypericin. In: *African Journal of Microbiology Research*. 2013, 7(11), pp. 979-982. ISSN 1996-0808.
82. BUTTERWECK, V. et al. Effect of the total extract and fraction of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. In: *Pharmacopsychiatry*. 1997, 30, pp. 117-124. ISSN 1439-0795 (Online).
83. SILVA, B., OLIVERA, P.J., DIAS, A., MALVA, J.O. Quercetin, kaempferol and biapigenin from *Hypericum perforatum* are neuroprotective against excitotoxic insults. In: *Neurotoxicity Research*. 2008, Vol. 13(3,4), pp.265-279. ISSN 1476-3524 (Online).
84. PAULKE, A., NÖLDNER, M., SCHUBERT-ZSILAVECZ, M., WURGLICS, M. St. John's wort flavonoids and their metabolites show antidepressant activity and accumulate in brain after multiple oral doses. In: *Pharmazie*. 2008, 63, pp. 296-302. ISSN 0031-7144.
85. КУРКИН, В.А., ПРАВДИВЦЕВА, О.Е. Флавоноиды надземной части *Hypericum perforatum*. В: *Химия природных соединений*. 2007, № 5, с. 512-513. ISSN 0023-1150.
86. NAHRSTEDT, A., BUTTERWECK, V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. In: *Pharmacopsychiatry*. 1997, 30, suppl. 2, pp. 129-134. Disponibil: <https://www.researchgate.net/publication/13885419>
87. BEERHAUS, L. Biosynthesis of the active *Hypericum perforatum* constituents. In: *Medicinal and aromatic plant science and biotechnology*. 2011, 5(1), pp. 70-77. ISSN 1752-3389.
88. WÖLFLE, U., SEELINGER, G., SCHEMPP, C.M. Topical application of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). In: *Planta Med*. 2014, 80, pp. 109-120. ISSN 0032-0943.
89. НАЛИМОВА, Н. В., ЕФЕЙКИНА, Н. Б. Содержание биологически активных веществ в *Hypericum perforatum* L. и фармакотерапевтическое действие препаратов на его основе (обзор). В: *Acta medica Eurasica*. 2019, № 3, с. 24-33. ISSN 2413-4864.
90. ИНЬЛИН, Ч. Зверобой в традиционной медицине белорусов и китайцев. В: *Сборник научных статей студентов, магистрантов, аспирантов. Выпуск 20. Минск*. 2018, 270 с. Disponibil: <http://elib.bsu./handle//123456789/216918>
91. ISACCHI, B. et al. Analysis and stability of the constituents of St. John's wort oils prepared with different methods. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007, 45, pp. 756-761. ISSN 0731-7085

92. ARSIĆ, I. Preparation and characterization of St. John's wort herb extracts using olive, sunflower and palm oils. In: *Acta facultatis medicae Naissensis*. 2016, 33(2), pp. 119-126. ISSN 2217-2521 (Online).
93. LYLES, J.T. The chemical and antibacterial evaluation of St. John's Wort oil macerates used in Kosovar traditional medicine. In: *Front. Microbiol.* 2017, 8, article 1639. [citat 13.06.2021]. Disponibil: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01639>
94. КУРКИН, В.А. и др. Исследование сырья и препаратов зверобоя. В: *Фармация*. 2005. Т. 53. № 3. с. 23-25. ISSN 0367-3014.
95. ЗАЙЦЕВА, Е.Н. и др. Препараты на основе травы зверобоя как средства коррекции экскреторной функции почек. В: *Известия Самарского научного центра Российской Академии Наук*. 2011, том 13, №1(8), с. 1999-2002. ISSN 2413-9645.
96. FRANCHI, G.G., NENCINI, C., COLLAVOLI, E., MASSARELLI, P. Composition and antioxidant activity *in vitro* of different St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) extracts. In: *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011, 5(17), pp. 4349-4353. ISSN 1996-0875.
97. BOOKER, A. et. al. St John's wort (*Hypericum perforatum*) products – an assessment of their authenticity and quality. In: *Phytomedicine*. 2018, Vol. 40, pp. 158-164. ISSN 0944-7113.
98. RUSSO, E. et. al. *Hypericum perforatum*: pharmacokinetic, mechanism of action, tolerability, and clinical drug – drug interactions. In: *Phytotherapy research*. 2013. ISSN 1099-1573 (Online). [citat 03.03.2016]. Disponibil: DOI: 10.1002/ptr.5050.
99. АВДАЧЁНОК, В.Д., ТУМИНЕЦ, О.А. *Применение препаратов зверобоя продырявленного при смешанных инвазиях у жвачных животных*. Методические рекомендации. Витебск, 2017, ВГАВМ, 12 с. ISBN 978-985-512-982-1.
100. MAGGI, F. et. al. Morphological, histochemical and phytochemical investigation of the genus *Hypericum* of the Central Italy. In: *Fitoterapia*. 2004, 75, pp. 702-711. ISSN 0367-326X.
101. NISTREANU, A., CALALB, T. *Analiza farmacognostică a produselor vegetale medicinale*. Chişinău: CEP Medicina, 2016. 310 p. ISBN 978-9975-82-032-5.
102. ONIGA, I., BENEDEC, D., HANCANU, D. *Analiza produselor naturale medicinale*. Cluj-Napoca: Editura Medicală Universitară „IuliuHaţieganu”, 2004. 194 p. ISBN973-693-062-9.
103. RACLARIU, A.C. Comparative authentication of *Hypericum perforatum* herbal products using DNA metabarcoding, TLC and HPLC-MS. In: *Scientific Reports*. 2017, 7, 1291. ISSN 2045-2322 (Online). Disponibil: DOI:10.1038/s41598-017-01389-w

104. *Государственная Фармакопея Республики Беларусь. Том II, Общие и частные фармакопейные статьи*, Минск, 2007. 457 с. ISBN 985-6742-40-4.
105. *European Pharmacopoeia 6.0, Vol 2*. Council of Europe, Strasbourg, 2008. pp. 2958-2959. ISBN 978-92-871-6054-6.
106. 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.
107. **BENEA, A.** ș. a. Bioactive compounds of the aerial parts of *Hypericum* species from Republic of Moldova. In: *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy, 23th International Congress Phytopharm*, Saint-Petersburg, Russia, 2019, p. 7-8. ISSN 1683-4100 (Print).
108. 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).
109. SOROCA, I., **BENEA, 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, Republic of Moldova. 2017, p. 107. ISBN 978-9975-4182-1-8.
110. **BENEA, A.** Studiul totalului antracenderivaților în speciile genului *Hypericum* din flora Republicii Moldova. In: *Analele Științifice ale USMF „N. Testemițanu”*. 2012, №. 1(13), pp. 316-319. ISSN 1857-1719.
111. **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 4th International Medical Congress for Students and Young Doctors*. Chisinau, 2012, p. 238. ISBN 978-9975-57-031-2.
112. ЗИМИНА, Л. *Фармакогностическое исследование по обоснованию создания антидепрессантных препаратов на основе травы зверобоя*: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук. Самара, 2011. с. 13-17.
113. ЗИМИНА, Л., КУРКИН, В., РЫЖОВ, В. Исследование флавоноидного состава травы зверобоя пятнистого методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. В: *Медицинский альманах*. 2012, 2 (21), с. 227-229. ISSN 2499-9954 (Online).

114. 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).
115. *Государственная Фармакопея Республики Беларусь*. Первое издание. Минск, 2006. с. 459-460. ISBN 985-6742-40-4.
116. *Общая фармакопейная статья. Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах*. ОФС.1.5.3.0010.15. Disponibil la: <http://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/08/OFS.1.5.3.0010.15-Opredelenie-soderzhaniya-efirnogo-masla-v-lekarstvennom-rastitelnom-syre-i-lekarstvennyh-rastitelnyh-preparatah.pdf>
117. GONCEARIUC, M. ş. 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.
118. БЕНЯ, А.А., БАЛМУШ, З.К., КУЛЬЧИЦКИЙ, В.Н., ГОНЧАРЮК, М.М., НИСТРЯНУ, А.К. 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, 2012, с. 95. ISBN 978-966-443-053-8.
119. BENEŞ, A., GONCEARIUC, M., DRAGALIN, I., NISTREANU, A., CHIRU, T. Study of volatile oil from the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. By GC-MS. In: *Phytochemicals in medicine and pharmacognosy Piatra-Neamţ, Romania*. 2014, p. 37. ISBN-13 978-0-9565472-4.
120. MONTANARI, R.M, BARBOSA, L.C.A., DEMUNER, A.J, SILVA, C.J. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Verbenaceae* species: Alternative sources of (E)-caryophyllene and germacrene-D. In: *Química Nova*. 2011, Vol. 34, No. 9, pp. 1550-1555. ISSN 0100-4042.
121. GYRDYMOVA, Y. V., RUBTSOVA, S. A. Caryophyllene and caryophyllene oxide: a variety of chemical transformations and biological activities. In *Chemical Papers*. 2022, 76, 1–39. ISSN 1336-9075 (Online). Disponibil: <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01865-8>
122. Gushiken LFS et al. Beta-caryophyllene as an antioxidant, anti-inflammatory and re-epithelialization activities in a rat skin wound excision model. In: *Oxidative Medicine and*

- Cellular Longevity*. 2022, vol. 2022, 21 p. ISSN: 1942-0994 (Online). Disponibil: <https://doi.org/10.1155/2022/9004014>
123. POPOVICI, I., LUPULEASA, D. *Tehnologia farmaceutică. Volumul 1. Ediția a IV-a*. Iași: Poliform. 2017. pp. 468-475. ISBN: 978-973-46-6579-2.
 124. 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.
 125. **BENEA**, A. Conținutul polifenolic în extracte uscate de *Hypericum perforatum* L. din flora Republicii Moldova. In: *Anale științifice ale IP USMF “Nicolae Testemițanu”. Ed. a 9-a*. Chișinău: CEP Medicina, 2013, vol. 1: Probleme medico-biologice și farmaceutice, pp. 411-416, ISBN 978-9975- 118-03-3.
 126. **BENEA**, A. Totalul flavonoidelor în extracte uscate din *Hypericum perforatum* L., obținut prin diverse metode. In: *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: CEP Medicina, 2014, p. 22. ISSN 1857-1719.
 127. CIOBANU, C. *Specia Cynara scolymus L. – sursă de noi produse farmaceutice: autoreferat* t.z.de doct. în farmacie. Chișinău, 215. 30 p.
 128. **BENEA**, A., NISTREANU, A., GOTCĂ, C. Conținutul substanțelor tanante în produse vegetale și extracte uscate din *Hypericum perforatum* L. În: *Revista Farmaceutică a Moldovei*. 2014, № 3-4, p. 65. ISSN 1812-5077.
 129. ФЕДОСЕЕВА, Л.М. Изучение дубильных веществ подземных и надземных вегетативных органов бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* (L.) Fitch.), произрастающего на Алтае. В: *Химия растительного сырья*. 2005, №3, с. 45-50. ISSN 1029-5143 (Online).
 130. МУЗЫЧКИНА, Р.А., КОРУЛЬКИН, Д.Ю., АБИЛОВ, Ж.А. *Качественный и количественный анализ основных групп БАВ в лекарственном растительном сырье и фитопрепаратах*. Алматы: Қазақ Университеті, 2004, 288 с. Disponibil: <https://megaobuchalka.ru/8/11176.html>
 131. 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.

132. CHIRU, T., ANTOGNONI, F., POLI, F., NISTREANU, A. Extracția fenolilor și flavonoidelor din specia *Centaurea cyanus* L. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. 2012, Vol. 36, nr. 4, pp. 223-227. ISSN 1857-0011.
133. 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.
134. CIBOTARU, N., **BENEA, 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, Republic of Moldova*. 2017, p. 72. ISBN 978-9975-4182-1-8.
135. **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,
136. **BENEA, A.** Optimizarea procesului de obținere și studiul chimic al extractelor uscate din *Hyperici flores*. In: *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: CEP Medicina, 2015, p. 290. ISSN 1857-1719.
137. МИРОВИЧ, В., КРИВОШЕЕВ, И., ГОРДЕЕВА, В., ЦЫРЕНЖАПОВ, А. *Способ получения средства, обладающего противовоспалительной, мочегонной и антиоксидантной активностью*. Патентообладатели: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования „Иркутский государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU). Номер документа RU2 542 493C1. Заявка: 2013150048/15, 08.11.2013. Опубликовано: 20.02.2015 Бюл. № 5, 14 с.
138. ДЕВЯТКИНА, И.А., ЗЮБР, Т.П., ДУДКИН, Р.В., БАРДАКОВ, А.И. Разработка технологии получения сухого экстракта <<Секрет молодости>>, применяемого в гериатрической практике. В: *Вестник Самарского Государственного Университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2005, № 1, с. 166-169. ISSN 1609-0675.
139. PIRBALOUTI, A.G et al. Antioxidant activity and total phenolic of extracts from five species of *Amygdalus* leaves. În: *Electronic Journal of Biology*. 2013, Vol. 9(4), pp. 92-95. ISSN 1860-3122.

140. *European Pharmacopoeia. Sixth edition. Supplement 6.3.* Council of Europe, Strasbourg, 2009. p. 4309. ISBN 978-92-871-6312-7.
141. BHANDARI, L., RAJBHANDARI, M. Isolation of quercetin from flower petals, estimation of total phenolic, total flavonoid and antioxidant activity of the different parts of *Rhododendron arboreum* Smith. In: *Scientific World*. 2014, Vol. 12(12), pp. 34-40. ISSN 1996-8949.
142. КРЫЛОВ, Н.Н., КОМПАНИЦЕВА, Е.В. Разработка и валидационная оценка методики определения суммы флавоноидов в таблетках ноотропного действия. В: *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016, №3 (16), с. 147-151. ISSN 2658-5049.
143. МАРЧЕНКО, М.А., ЗИЛФИКАРОВ, И.Н., ИБРАГИМОВ, Т.А., МАЛЕЕВ, А.Г. Разработка методик стандартизации сухого экстракта и лекарственных препаратов гинкго двулопастного. В: *Фармация и фармакология*. 2017, №3 (5), с. 222-241. ISSN 2413-2241 (Online).
144. GAVĂȚ, C.C., ȘPAC, A.F., APOSTU, M., DORNEANU, V. Determinarea spectrofotometrică a colorantului Reactive Red 2. În: *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici și Naturalisti din Iasi*. 2007, Vol. 111, nr. 2, Supliment nr. 2, pp. 391-394. ISSN 0048-7848.
145. NEAGU, M. Validarea metodei analitice (HPLC), utilizată pentru identificarea și dozarea ingredientului farmaceutic activ, Tylosin tartrat pentru uz veterinar și a produsului finit Tilodem 50, pulbere hidrosolubilă. În: *Medicamentul Veterinar/Veterinary Drug*. 2010, Year 4, nr. 2, pp. 1-18. ISSN 1843-9527.
146. ВОЛОДИНА, Т.А., ПЕНЬЕВСКАЯ, Н.А., УШАКОВА, Л.С., ЛЯШЕНКО, С.С. Разработка и валидационные характеристики методики количественного определения содержания флавоноидов в фитогеле репаративного действия. В: *Фундаментальные исследования*. 2013, № 10-9, с. 1987-1990. ISSN 1812-7339.
147. ДРОЗДОВА, И.Л., ЛУПИЛИНА, Т.И. Разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в траве икотника серого. В: *Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье"*. 2016, № 1, с.106-112. ISSN 1998-5754 (Online).
148. КУТАТЕЛАДЗЕ, Г.Р., ФЕДОСЕЕВА, Л.М. Исследования по разработке и валидации методики количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве, заготовленной на территории алтайского края. В: *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019, 8(2), с. 80-86. ISSN 2658-5049 (Online).

149. ЧИСТОВА, Ю. Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот в экстракте сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухом. В: *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2019, Т. 18, № 1, с.170-170. ISSN 2225-6016.
150. ДЖАВАХЯН, М.А., ТОКАРЕВА, М.Г., ПРОЖОГИНА, Ю.Э., КАЛЕНИКОВА, Е.И. Разработка капсул «Седофлав», стандартизация и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов. В: *Разработка и регистрация лекарственных средств*, 2020. Т. 9, № 3, с. 118-127. ISSN 2658-5049 (Online).
151. *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.
152. *Руководство для предприятий фармацевтической промышленности / методические рекомендации*. М.: Издательство «Спорт и Культура – 2000», 2007. 192 с. ISBN 978-5-901682-46-4.
153. *Государственная фармакопея XIII online (ГФ 13 online). ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик*. Disponibil: <http://pharmacopoeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-xiii-online-gf-13-online/>
154. ЭПШТЕЙН, Н.А. Валидация аналитических методик: графические и расчетные критерии для оценки линейности методик на практике. В: *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019, Т. 8, № 2, с. 123-130. ISSN 2658-5049 (Online).
155. СМЫСЛОВА, О. Исследования по разработке и стандартизации комплексного урологического растительного средства: диссертация на соискание ученой кандидата фармацевтических наук. Москва, 2018. 233 с.
156. 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.
157. КУЗНЕЦОВ, А.В., ФЕСЮН, А.П., САМОХВАЛОВ, С.Г., МАХОНЬКО, Э.П.. *Методические указания по определению тяжелых металлов в почвах сельхозугодий и продукции растениеводства*. Центральный институт агрохимического обслуживания сельского хозяйства (ЦИНАО). Москва, 1992. Disponibil: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293771/4293771886.pdf>

158. *Farmacopeea Română, ediția X, Editura medicală București 1993*
159. *Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV издание, Том I, „Зола общая”, ОФС.1.2.2.2.0013.15. Москва, 2018, с. 981. Disponibil: https://vk.com/doc205521540_523898206?hash=8275c9ba3379007366*
160. *Общая фармакопейная статья. Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, ОФС.1.5.3.0005.15. Disponibil: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-5-3-0005-15-zola-nerastvorimaya-v-hloristovodorodnoj-kislote/>*
161. **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.*
162. *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)*
163. MOLYNEUX, P. The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. In: *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 2004, Vol. 26, № 2, pp. 211-219. ISSN 1253395.
164. ALAM, M.N., BRISTI, N.J, RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. In: *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013, 21, pp. 143-153. ISSN 1319-0164.
165. BEHRENDORFF, J.B, VICKERS, C.E, CHRYSANTHOPOULOS, P., NIELSEN, L.K. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl as a screening tool for recombinant monoterpene biosynthesis. In: *Microbial Cell Factories*. 2013, 12, 76. Disponibil: <http://www.microbialcellfactories.com/content/12/1/76>
166. BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. In: *LWT – Food Science and Tehnology*. 1995, Vol. 28, № 1, pp. 25-30. ISSN: 0023-6438.
167. MOSQUERA, O.M., CORREA, Y.M., BUITRAGO, D.C., NINO, J. Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity. In: *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007, Vol. 102(5), pp. 631-634. ISSN 1678-8060.
168. 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, 13(3), pp. 441-447. ISSN 1306-3057.

169. LUPAȘCU, L. Activitățile antioxidante și antimicrobiene ale extractelor intacte și oxidate izolate din ceai verde comercial. În: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2019, nr. 2(338). pp. 144-151. ISSN 1857-064X.
170. COJOCARU-TOMA, M. ș. a. Studiul acțiunii antioxidante a unor plante medicinale din colecția CȘCPM USMF „Nicolae Testemițanu” prin utilizarea testului DPPH. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Secția Științe Medicale*. 2016, nr. 1(50), pp. 208-213. ISSN 1857-0011.
171. BOLIGON, A.A., MACHADO, M.M., ATHAYDE, M.L. Technical evaluation of antioxidant activity. In: *Medicinal chemistry*. 2014, 4(7), pp. 517-522. ISSN: 2161-0444.
172. CHIRU, T. Cercetările farmacognostice și farmacologice în vederea valorificării speciei centaurea cyanus L.: tz. de doct. În farmacie. Chișinău, 2014. 184 p.
173. 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.
174. 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).
175. EBRAHIMZADEH, M.A., POURMORAD, F., BEKHRADNIA, A.R. Iron chelating activiy, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. In: *African Journal of Biotechnology*. 2008, Vol. 7(18), pp. 3188-3192. ISSN 1684–5315.
176. 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).
177. ЗАМОЩИНА, Т.А. и др. Биологическая активность спиртовых извлечений из ряски малой (*Lemna minor* L.) в отношении процесса воспаления. В: Вестник Томского государственного университета. Биология. 2011. № 2 (14), с. 73–80. ISSN 2311-2077 (Online).
178. ДАШИНАМЖИЛОВ, Ж.Б., ПЕТРОВ, Е.В. Противовоспалительное действие фитосредства «Панкреофит». В: Сибирский медицинский журнал. 2015, № 1, с. 103-105. ISSN 1815-7572.
179. CHIRU, T., BACALOV, Iu., NISTREANU, A. Activitatea antiinflamatorie a extractelor din specia *Centaurea cyanus* L. In: *Anale științifice ale IP USMF “Nicolae Testemițanu”*. Ediția a XIV-a. 2013, vol. 1: Probleme medico-biologice și farmaceutice, pp. 416-418. ISSN 1857-1719.

180. 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.
181. PRISACARI, V. ș. a. Substanțe antibacteriene și antifungice noi din materie primă locală. În: Academos. 2010, nr. 2(17), pp. 66-75. ISSN 1857-0461.
182. 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.
183. **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”, 1-2 octombrie, 2021, Chișinău, Republica Moldova, p. 75. ISBN 978-9975-56-909-5.
184. **BENEA, A.**, GONCEARIUC, M., DRAGALIN, I., NISTREANU, A. Conținutul și componența uleiului esențial la specii de *Hypericum* L. din flora spontană a Republicii Moldova. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei*. 2013, 2(320), pp. 87-92. ISSN 1857-064X.
185. **BENEA, A.**, GONCEARIUC, M., KULCITKI, V., DRAGALIN, I., NISTREANU, A. 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. Museum of Oltenia Craiova, Romania*. 2013, Tom. 29, №. 2, pp. 47-52. ISSN 1454-6914.
186. **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, № 1-4, pp. 88-90. ISSN 1812-5077.
187. *OECD Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure*. 2001, No 420, 14 p. Disponibil: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl420.pdf
188. *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>
189. *OECD Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP)*. 2008, No 425, 27 p. ISSN: 20745788 (Online). Disponibil: <https://doi.org/10.1787/20745788>.

190. Legea RM nr. 265 din 28.07.2006 „Privind protecția animalelor folosite în scopuri experimentale sau în alte scopuri științifice”. În: *Monitorul Oficial al Republicii Moldova*, 2006 nr. 168-169 [online]. Disponibil: https://www.legis.md/cautare/getResults?doc_id=25977&lang=ro
191. HODGE, H.C., GOSSELIN, R.E., SMITH, R.P., GLEASON, M.N. Clinical toxicology of commercial products. acute poisoning. 4th ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 1975. p .427. ISBN -10: 0683036319.
192. РЫБАКОВА; А.В. др. Существующие требования и подходы к дозированию лекарственных средств лабораторным животным. В: *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018. Т. 8, № 4, с. 207-217. ISSN 2619-1172 (Online).
193. ХАБРИЕВ, Р.У. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. Москва, Медицина, 2005, 32с. ISBN 5-225-04219-8.
194. COJOCARU-TOMA, M. ș. a. Determinarea toxicității acute a extractelor obținute din *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba*: studiu experimental. În: *Revista de Științe ale Sănătății din Moldova*. 2018, nr. 2(16), pp. 35-43. ISSN 2345-1467.
195. БЕРЕЗОВСКАЯ, И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения. В: *Химико-фармацевтический журнал*. 2003, Том 37, № 3, с. 32-34. ISSN 0023-1134.
196. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*, под редакцией: Н.Н. Каркищенко и С.В. Грачева. Москва. 2010, 358 с. ISBN 978-5-903950-10-2.
197. PARII, S. ș. a. Determinarea toxicității acute a unor noi compuși chimici cu proprietăți antituberculoase. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. 2015, nr. 1(46), pp. 445-451. ISSN 1857-0011.
198. **BENEA, A.**, NICOLAI, E., PUHNAIA, A., VALICA, V. Evaluarea toxicității acute a extractelor uscate din produsele vegetale de *Hypericum perforatum* L. In: *Conferința științifică anuală a colaboratorilor și studenților: culegere de rezumate științifice ale IP Universitatea de Stat de Medicina și Farmacie "Nicolae Testemitanu" din Republica Moldova*. Chișinău: CEP Medicina, 2015, p. 288. ISSN 1857-1719.
199. АВДЕЕВА, О.И., МАКАРЕНКО, И.Е., МАКАРОВА, М.Н. Гармонизация исследований по проведению острой токсичности в соответствии с российскими и зарубежными требованиями. В: *Международный вестник ветеринарии*. 2015, № 1, с. 103-109. ISSN 2072-2419.

ANEXE

Anexa 1. Analiza chimică a produselor vegetale

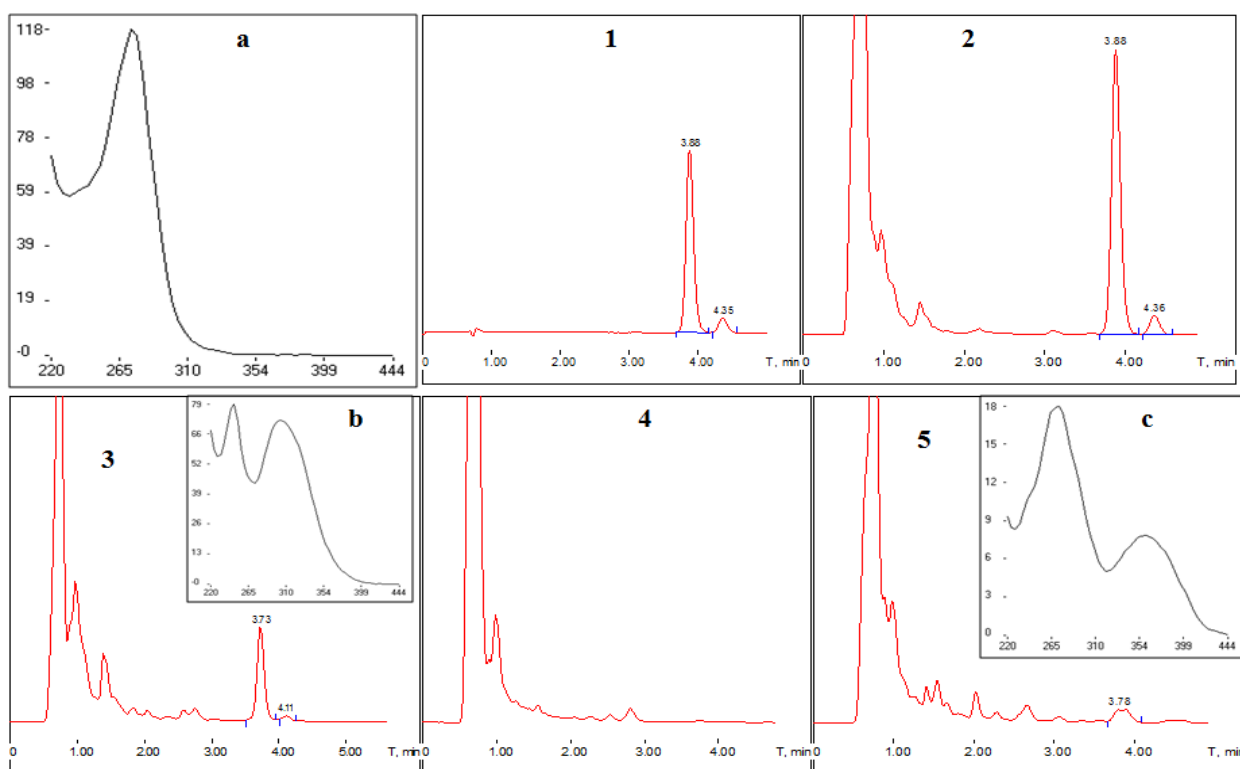


Fig. A1.1. Cromatogramele HPLC, obținute în condiții izocratice: soluția-standard de hiperforină (1). Extractele hidroetanolic de: *H. perforatum* L. (2), *H. elegans* Steph. (3), *H. hirsutum* L. (4), *H. tetrapterum* Fries. Spectrele UV (5): hiperforina standard (a), picul $t_R = 3,73$ min din *H. elegans* Steph. (b), picul $t_R = 3,78$ min din *H. tetrapterum* Fries (c)

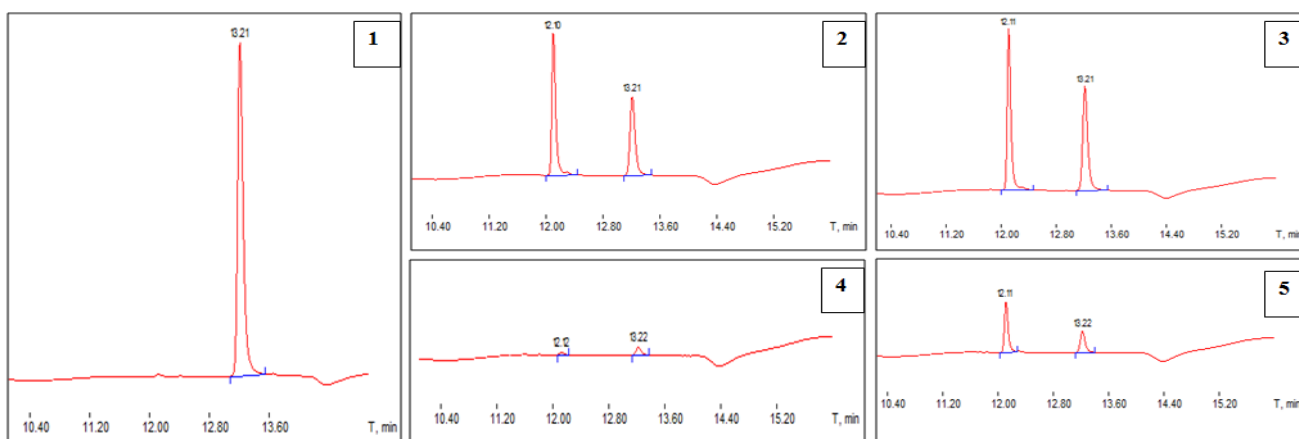


Fig. A1.2. Cromatogramele HPLC, obținute în gradient, ale: hipericinei (1), extractelor hidroetanolic din părți aeriene de *H. perforatum* L. (2), *H. elegans* Steph. (3), *H. hirsutum* L. (4), *H. tetrapterum* Fries. (5)

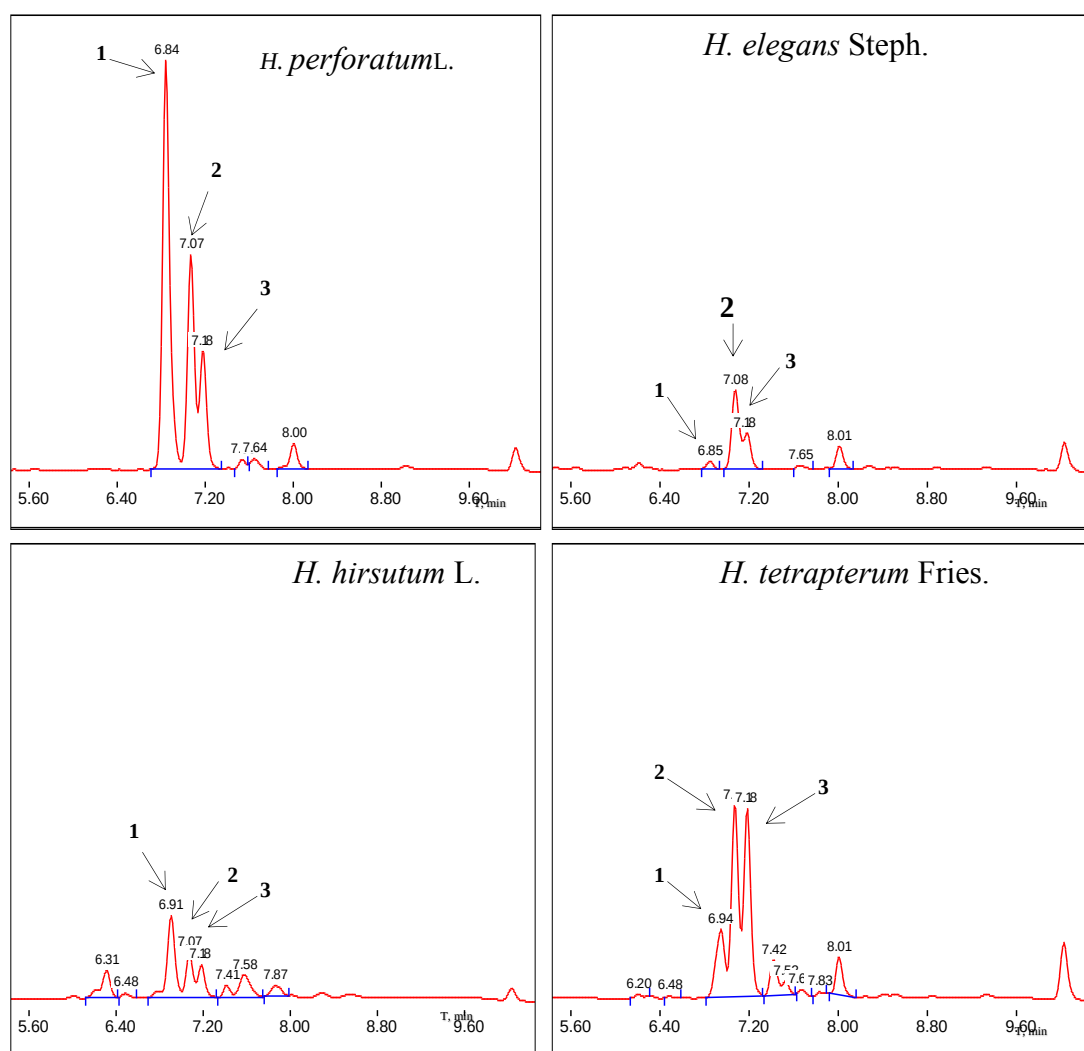


Fig. A1.3. Cromatogramele HPLC ale flavonozidelor, în extractele hidroetanolicе din părți aeriene ale speciilor de *Hypericum*: rutozida (1), hiperozida (2), izocvercetrozida (3)

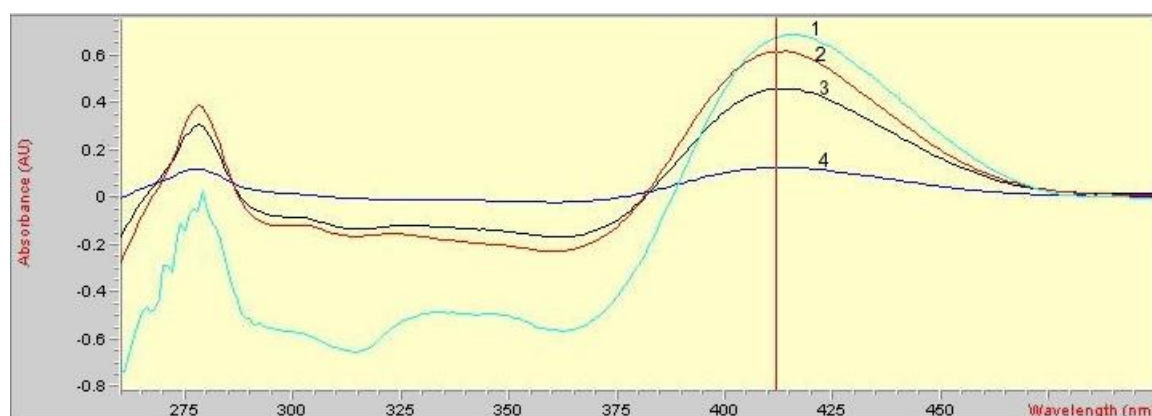


Fig. A1.4. Spectrele UV-VIS ale extractelor hidroetanolicе de 70%, din diferite părți ale speciei *H. perforatum*: flori (1), frunze (2), părți aeriene (3), tulpini (4)

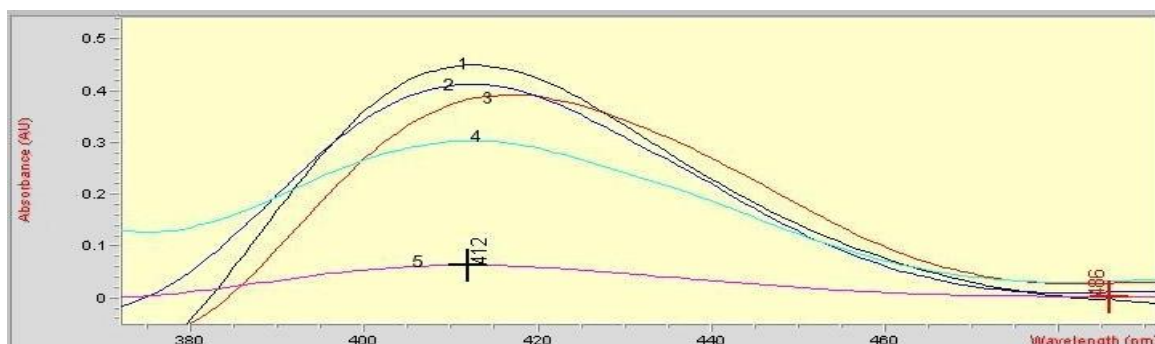


Fig. A1.5. Spectrele UV-VIS ale extractelor hidroetanolicе de 70%, din diferite părți ale speciei *H. elegans*: soluția etalon a rutozidei (1), frunze (2), flori (3), părți aeriene (4), tulpini (5)

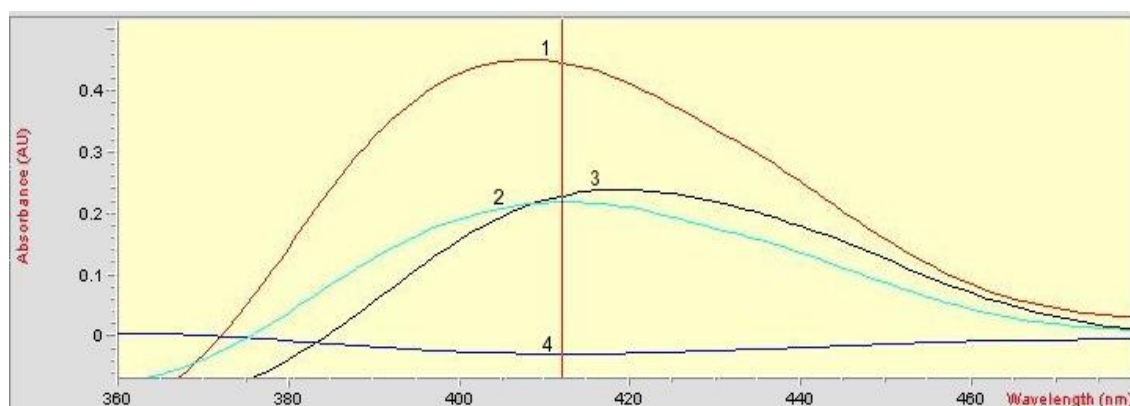


Fig. A1.6. Spectrele UV-VIS ale extractelor hidroetanolicе de 70%, din diferite părți ale speciei *H. hirsutum*: frunze (1), flori (2), părți aeriene (3), tulpini (4)

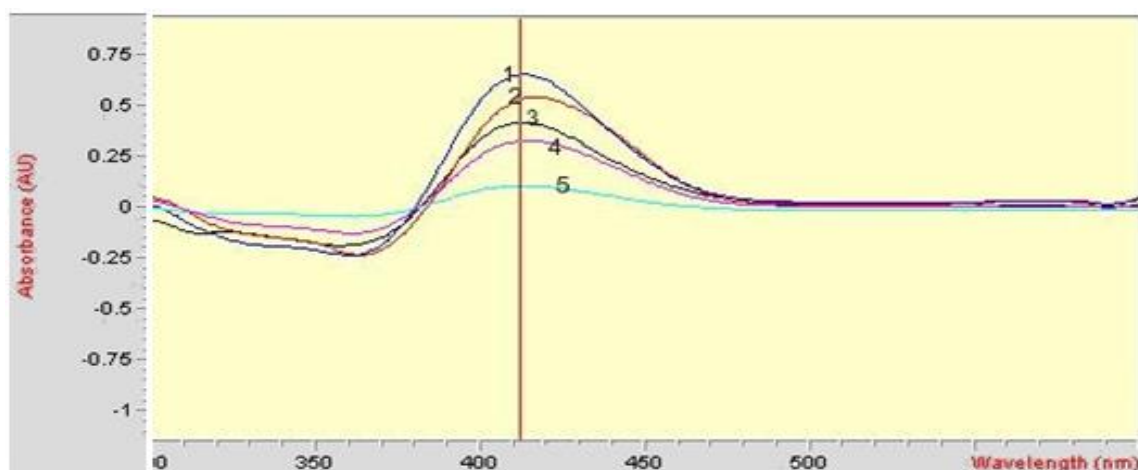


Fig. A1.7. Spectrele UV-VIS ale extractelor hidroetanolicе de 70%, din diferite părți ale speciei *H. tetrapterum*: frunze (1), flori (2), soluție de referință a rutozidei (3), părți aeriene (4), tulpini (5)

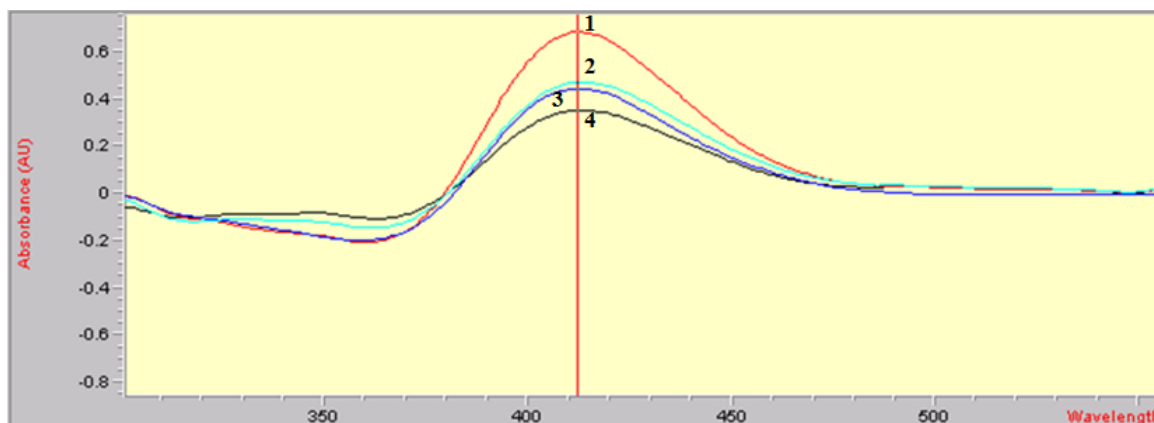


Fig. A1.8. Spectrele UV-VIS ale extractelor hidroetanolicе de 70% din *Hyperici herba*, colectate din diverse zone geografice ale RM: nord (1), centru (2), soluție de referință a rutozidei (3), sud (4)

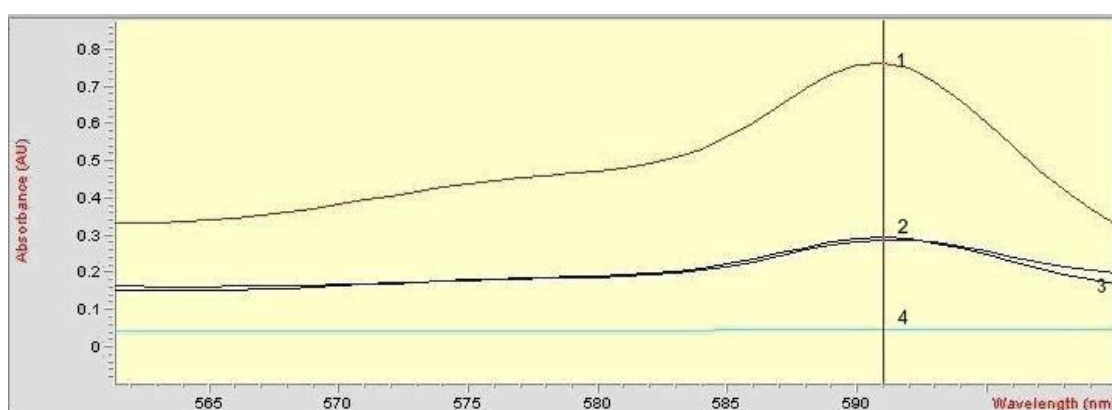


Fig. A1.9. Spectrele UV-VIS VIS (λ_{max} 591 nm) ale extractelor hidroetanolicе de 70%, din diferite părți ale speciei *H. perforatum* L.: flori (1), părți aeriene (2), frunze (3), tulpini (4)

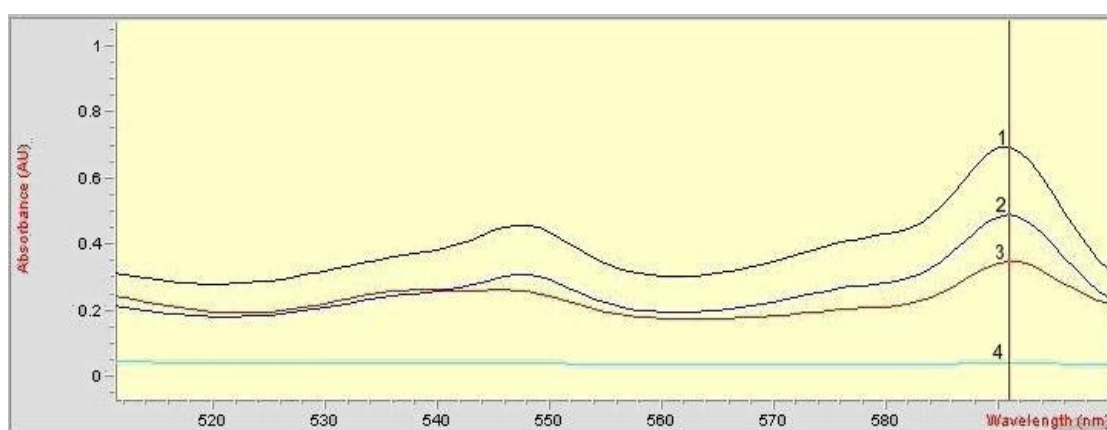


Fig. A1.10. Spectrele UV-VIS ale extractelor hidroetanolicе de 70%, din diferite părți ale speciei *H. elegans*: flori (1), părți aeriene (2), frunze (3), tulpini (4)

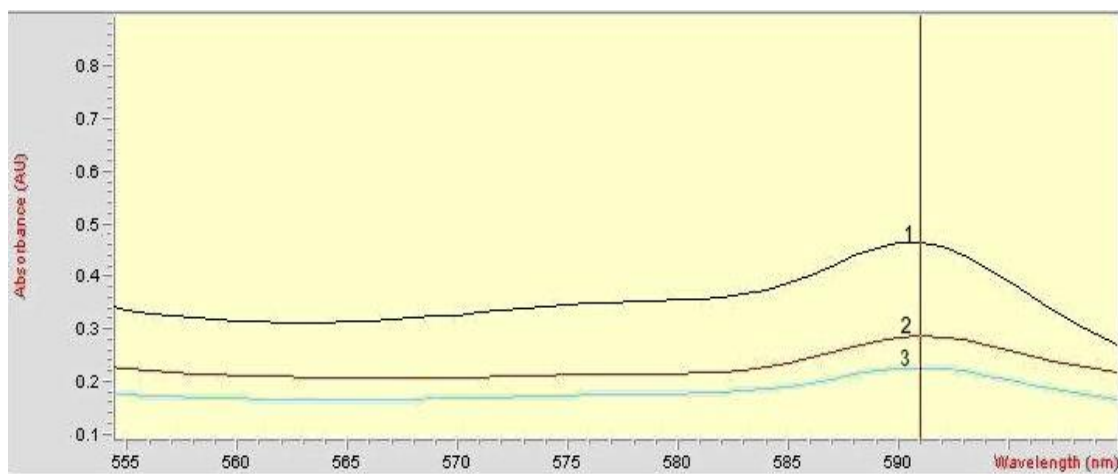


Fig. A1.11. Spectrele UV-VIS ale extractelor hidroetanolicе de 70%, din diferite părți ale speciei *H. tetrapterum*: flori (1), părți aeriene (2), frunze (3)

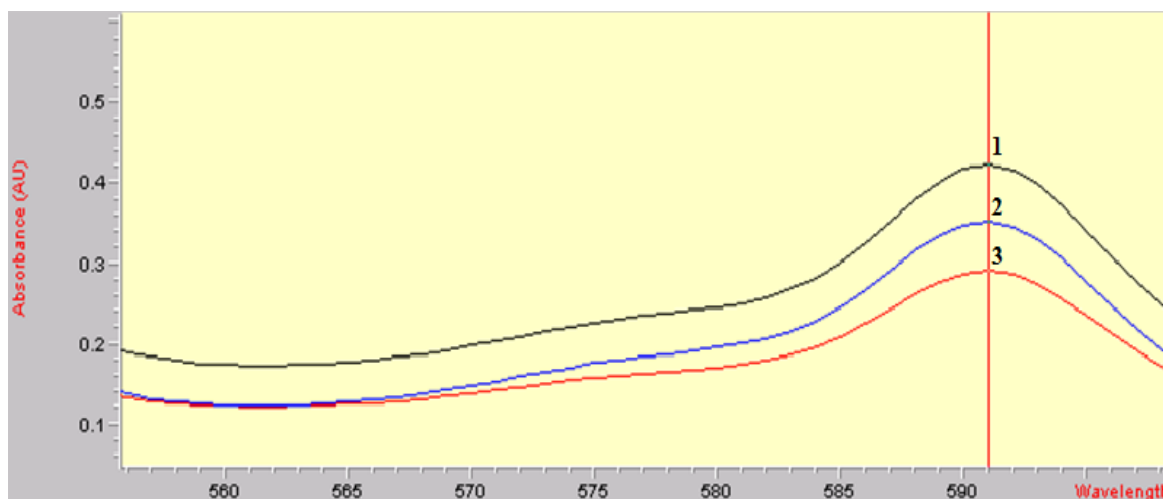


Fig. A1.12. Spectrele UV-VIS ale extractelor hidroetanolicе de 70% din *Hyperici herba*, colectate din diverse zone geografice ale RM: nord (1), centru (2), sud (3)

Tabelul A1.1. Statistica descriptivă a rezultatelor dozării totalului de flavonoide (%) în produse vegetale ale speciilor genului *Hypericum*

Speciile de <i>Hypericum</i>	Produse vegetale	Media	Mediana (Me)	Abaterea standard	Intervalul intercuartil (IQR)	Xmin	Xmax	95% CI	
								Limita de jos	Limita de sus
<i>H. perforatum</i>	Părți aeriene	5,579	5,582	0,011	0,019	5,563	5,588	5,565	5,591
	Flori	8,224	8,223	0,012	0,194	8,207	8,241	8,208	8,238
	Frunze	7,475	7,477	0,013	0,024	7,461	7,491	7,459	7,490
	Tulpini	1,527	1,537	0,055	0,109	1,467	1,582	1,459	1,595
<i>H. elegans</i>	Părți aeriene	3,689	3,688	0,027	0,052	3,662	3,722	3,655	3,722
	Flori	4,666	4,664	0,013	0,025	4,652	4,681	4,650	4,682

	Frunze	5,431	5,400	0,143	0,019	3,662	3,734	5,253	5,608
	Tulpini	0,762	0,769	0,017	0,027	0,733	0,778	0,740	0,783
H. hirsutum	Părți aeriene	2,861	2,943	0,133	0,242	2,678	2,969	2,696	3,026
	Flori	2,986	2,942	0,179	0,343	2,803	3,226	2,763	3,207
	Frunze	5,845	5,763	0,254	0,465	5,513	6,142	5,530	6,160
	Tulpini	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
H. tetrapetrum	Părți aeriene	4,667	4,327	0,484	0,888	4,293	5,250	4,065	5,268
	Flori	6,976	6,973	0,033	0,057	6,928	7,019	6,934	7,016
	Frunze	8,568	8,576	0,029	0,055	8,532	8,607	8,531	8,604
	Tulpini	1,442	1,443	0,007	0,019	1,431	1,450	1,433	1,450

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

Tabelul A1.2. Statistica descriptivă a rezultatelor dozării totalului (%) derivaților de antracen în produsele vegetale ale speciilor genului *Hypericum*

Specia de <i>Hypericum</i>	Produse vegetale	Media	Media na (M _E)	Abater ea standard (SD)	Intervalul inter-cuar-til (IQR)	Xmin	Xmax	95% IÎ	
								Limi-ta de jos	Limi-ta de sus
H. perforatum	Părți aeriene	0,220	0,221	0,003	0,005	0,216	0,223	0,216	0,224
	Flori	0,578	0,578	0,002	0,004	0,575	0,5809	0,575	0,581
	Frunze	0,213	0,212	0,003	0,004	0,211	0,2188	0,209	0,217
	Tulpini	0,035	0,036	0,001	0,001	0,035	0,037	0,035	0,037
H. elegans	Părți aeriene	0,371	0,371	0,003	0,005	0,368	0,374	0,368	0,374
	Flori	0,534	0,534	0,003	0,005	0,531	0,538	0,531	0,537
	Frunze	0,262	0,261	0,003	0,006	0,259	0,266	0,258	0,266
	Tulpini	0,031	0,031	0,001	0,001	0,031	0,032	0,031	0,032
H. hirsutum	Părți aeriene	0,061	0,061	0,001	0,005	0,058	0,062	0,059	0,063
	Flori	0,084	0,083	0,001	0,002	0,083	0,086	0,083	0,086
	Frunze	0,143	0,143	0,004	0,007	0,140	0,148	0,139	0,148
	Tulpini	0,017	0,015	0,004	0,007	0,014	0,023	0,012	0,022
H. tetrapetrum	Părți aeriene	0,172	0,173	0,003	0,005	0,168	0,176	0,169	0,177
	Flori	0,352	0,352	0,003	0,008	0,349	0,357	0,348	0,357
	Frunze	0,214	0,215	0,004	0,007	0,210	0,215	0,209	0,218
	Tulpini	0,035	0,035	0,0004	0,001	0,035	0,036	0,035	0,036

Tabelul A1.3. Statistica descriptivă a rezultatelor dozării totalului de flavonoide și derivaților de antracen în *Hyperici herba*, în dependență de locul colectării

Parametrii statistici		Locuri de colectare a produsului vegetal <i>Hyperici herba</i>		
		s. Tîrnova, Dondușeni (nord)	s. Nimoreni, Ialoveni (centru)	s. Lopățica, Cahul (sud)
Totalul de flavonoide				
$\bar{X}$		4,326	5,785	8,437
95% CI	Limita de jos	4,263	5,525	8,349
	Limita de sus	4,390	6,044	8,524
SD		0,051	0,206	0,070
M _e		4,330	5,782	8,447
IQR		0,082	0,324	0,117
Xmin; Xmax		4,252; 4,395	5,531; 6,109	8,328; 8,519
Totalul derivaților de antracen				
$\bar{X}$		0,320	0,268	0,220
95% CI	Limita de jos	0,265	0,213	0,213
	Limita de sus	0,270	0,226	0,226
SD		0,001	0,002	0,004
M _e		0,320	0,267	0,221
IQR		0,002	0,004	0,008
Xmin; Xmax		0,318; 0,321	0,265; 0,271	0,212; 0,225

Tabelul A1.4. Statistica descriptivă a rezultatelor dozării unor flavonoide în produsul vegetal *Hyperici herba*

Parametrii statistici		Rutozida	Hiperozida	Cvercetrozida	Cvercetol	I3,I18- biapigenina
Conținutul (%) compușilor chimici în <i>Hyperici herba</i>, PV din flora spontană						
n		6	6	6	6	6
$\bar{X}$		2,015	0,947	0,501	0,161	0,170
95% CI	Limita de jos	1,940	0,914	0,424	0,153	0,150
	Limita de sus	2,088	0,979	0,577	0,170	0,188
SD		0,046	0,020	0,048	0,005	0,011
M _e		2,014	0,947	0,498	0,162	0,170
IQR		0,081	0,036	0,089	0,009	0,020
Xmin; Xmax		1,973; 2,055	0,929; 0,967	0,455; 0,552	0,155; 0,166	0,159; 0,180
Conținutul (%) compușilor chimici în <i>Hyperici herba</i>, PV din colecția CȘPDPM						
$\bar{X}$		1,763	0,758	0,536	0,254	0,277
95% CI	Limita de jos	1,725	0,745	1,725	0,252	0,247
	Limita de sus	1,799	0,772	0,008	0,255	0,307
SD		0,023	0,759	0,030	0,000	0,018
M _e		1,763	0,015	0,536	0,254	0,277
IQR		0,041	0,008	0,055	0,001	0,034
Xmin; Xmax		1,741; 1,783	0,749; 0,767	0,505; 0,564	0,253; 0,255	0,260; 0,296

Anexa 2. Analiza chimică a produselor extractive

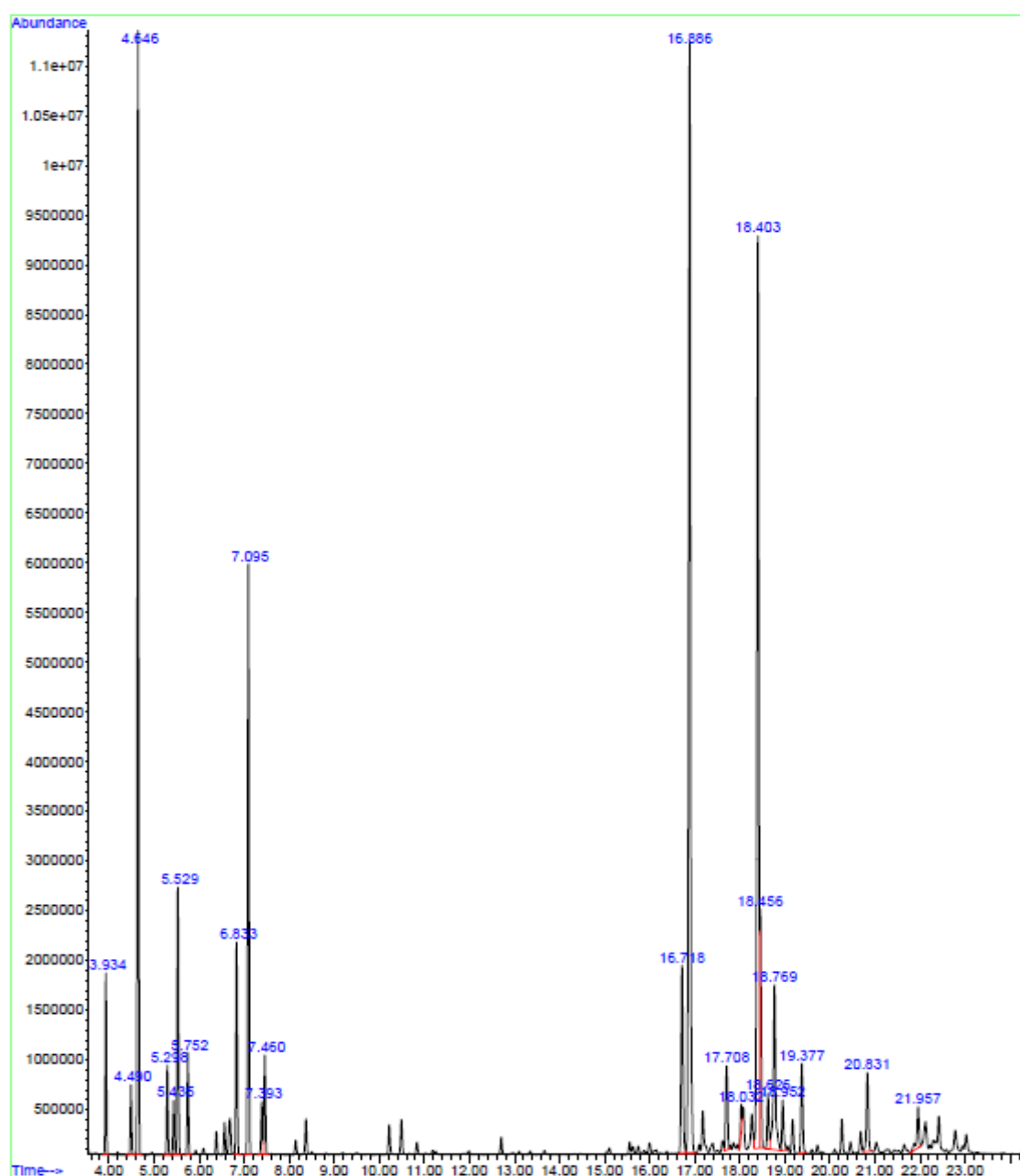


Fig. A2.1. Gaz-cromatograma uleiului volatil, izolat din părți aeriene proaspete de *H. perforatum*, colectate din flora spontană

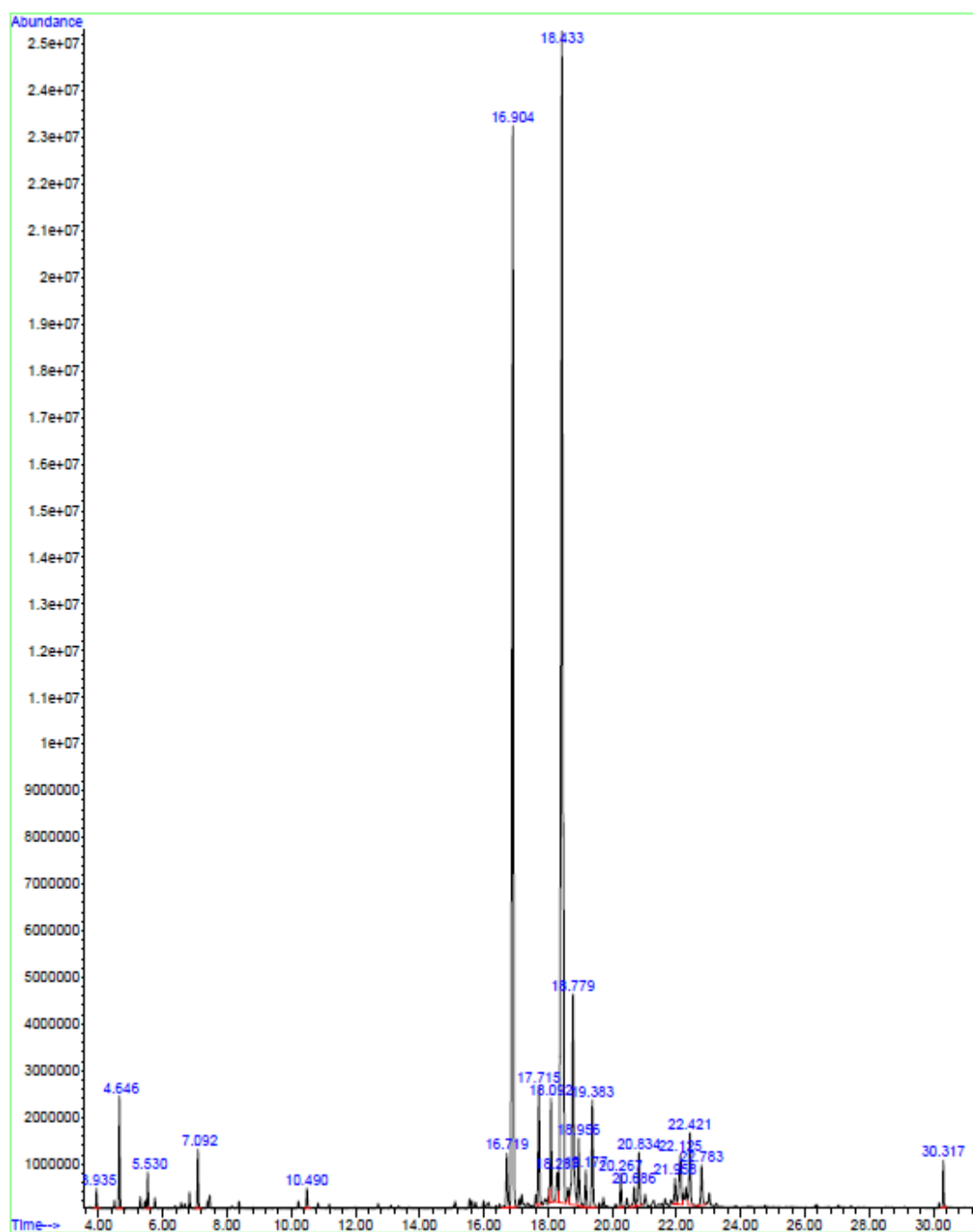


Fig. A2.2. Gaz-cromatograma uleiului volatil, izolat din părțile aeriene proaspete de *H. perforatum*, colectate din colecția CȘPDPM, USMF „Nicolae Testemițanu”

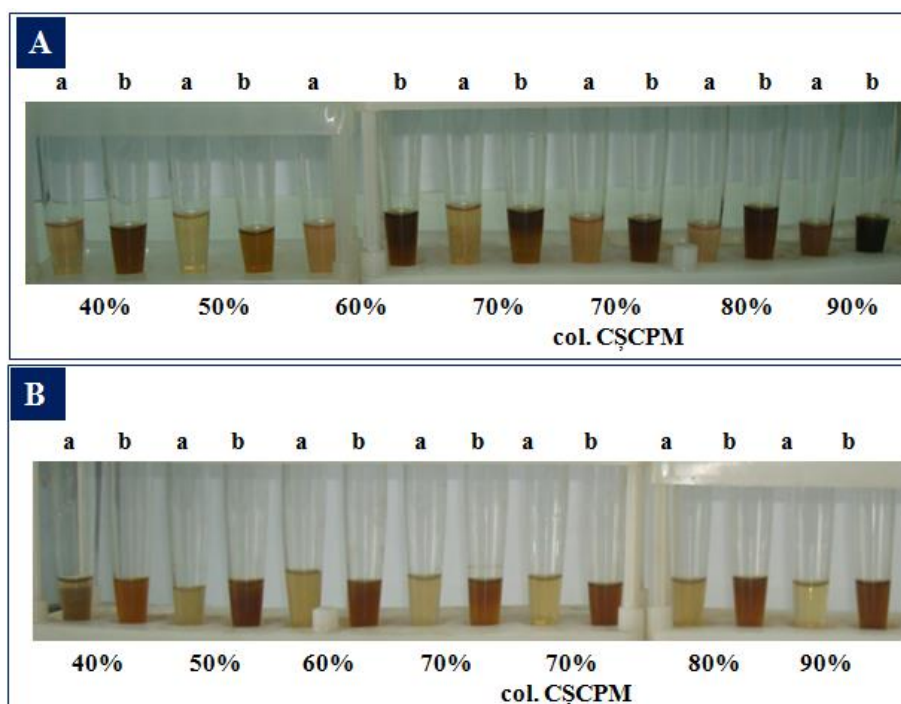


Fig. A2.3. Reacțiile de identificare a substanțelor tanante, în extractele uscate de *Hyperici herba*: soluții alcoolice (A), soluții apoase (B); reacția cu gelatină (a), cu alaun de fier și amoniu (b)

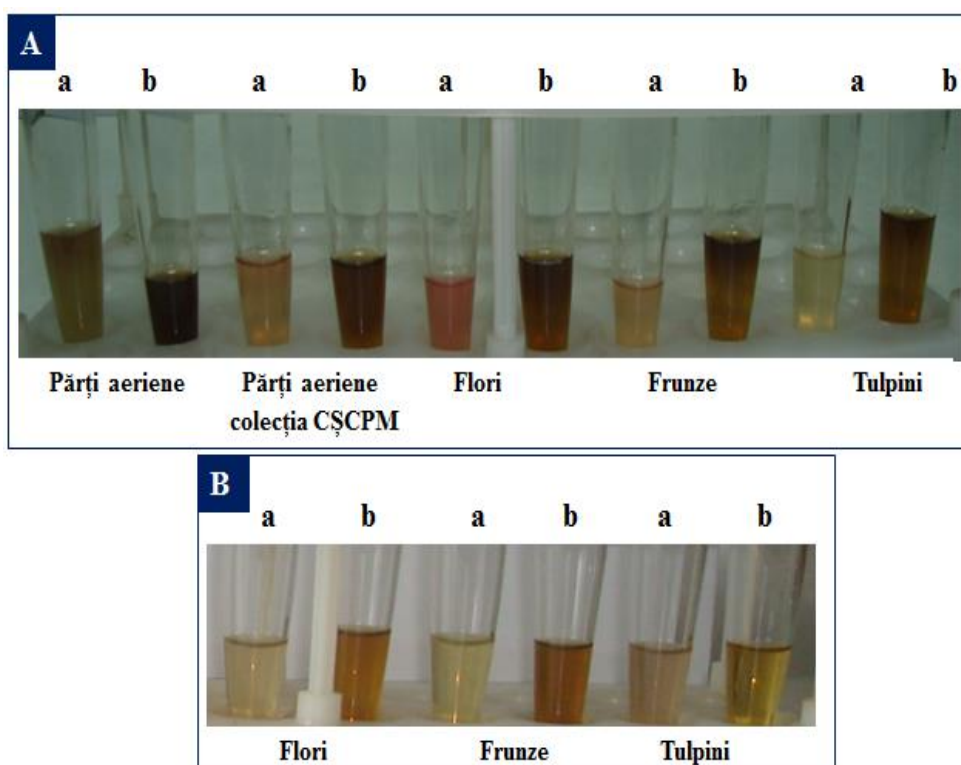


Fig. A2.4. Reacțiile de identificare a substanțelor tanante, în extractele uscate de *H. perforatum*, obținute prin metoda de macerare: soluții alcoolice (A), soluții apoase (B); reacția cu gelatină (a), reacția cu alaun de fier și amoniu (b)

Tabelul A2.1. Statistica descriptivă a rezultatelor dozării totalului de polifenoli, flavonoide și derivați de antracen în extractele uscate obținute din *Hyperici herba*

Extractele etanolice/ Concentrația solventului	Media	Mediana	Abaterea standard	Intervalul inter-quartil	Minimum	Maximum	95% CI	
							Limita inferioară	Limita superioară
Totalul de polifenoli exprimat în echivalentul acidului galic (%)								
Etanol 40%	6,616	6,620	0,056	0,11	6,609	6,620	6,610	6,622
Etanol 50%	9,916	9,914	0,240	0,48	9,892	9,951	9,891	9,942
Etanol 60%	10,691	10,687	0,544	1,00	10632	10,755	10,634	10,748
Etanol 70%	9,857	9,857	0,215	0,38	9,827	9,888	9,835	9,880
Etanol 80%	9,636	9,636	0,217	0,46	9,609	9,655	9,613	9,660
Etanol 90%	8,243	8,243	0,270	0,73	8,201	8,274	8,224	8,271
Totalul de flavonoide exprimat în echivalentul rutozidei (%)								
Etanol 40%	8,71	8,75	0,122	0,25	8,71	8,81	8,58	8,84
Etanol 50%	12,40	12,48	0,184	0,30	12,40	12,61	12,21	12,60
Etanol 60%	15,09	15,07	0,120	0,09	15,09	15,31	14,96	15,21
Etanol 70%	15,54	15,54	0,111	0,25	15,54	15,67	15,43	15,66
Etanol 80%	18,54	18,53	0,058	0,08	18,54	18,65	18,48	18,60
Etanol 90%	17,96	18,00	0,067	0,13	17,96	18,00	17,89	18,03
Totalul derivaților de antracen exprimat în echivalentul hipericinei (%)								
Etanol 40%	0,255	0,258	0,010	0,022	0,241	0,265	0,247	0,23
Etanol 50%	0,372	0,382	0,016	0,033	0,350	0,384	0,359	0,384
Etanol 60%	0,385	0,393	0,011	0,023	0,370	0,393	0,376	0,394
Etanol 70%	0,414	0,414	0,001	0,004	,412	0,416	0,413	0,415
Etanol 80%	0,365	0,360	0.013	0,029	0,354	0,383	0,355	0,375
Etanol 90%	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

Notă: n/a- analiza nu a fost efectuată

Tabelul A2.2. Statistica descriptivă a rezultatelor dozării totalului de polifenoli, flavonoide și derivați de antracen în extractele uscate, obținute din produsele vegetale de *H. perforatum* prin metoda de macerare

Parametrii statistici		Extractele uscate din produsele vegetale de <i>H. perforatum</i>				
		Părți aeriene (colecția CȘPDPM)	Părți aeriene (flora spontană)	Flori (flora spontană)	Frunze (flora spontană)	Tulpini (flora spontană)
Totalul de polifenoli exprimat în echivalentul acidului galic (mg /g extract uscat)						
n		6	6	6	6	6
$\bar{X}$		108,321	108,176	150,951	115,343	33,507
95% CI	Limita de jos	105,020	106,780	150,442	114,798	33,406
	Limita de sus	111,623	109,572	151,461	115,888	33,608
SD		0,096	1,330	0,485	0,519	0,096
M _e		108,325	108,425	150,915	115,110	33,485
IQR		6,94	2,77	0,84	1,03	0,16
Xmin; Xmax		104,68; 111,90	106,40; 109,61	150,35; 151,70	114,92; 116,10	33,39; 33,65
Totalul de flavonoide exprimat în rutozidă (%)						
$\bar{X}$		12,573	10,783	14,470	13,361	5,113
95% CI	Limita de jos	12,335	10,401	14,357	13,173	4,936
	Limita de sus	12,811	11,165	14,582	13,550	5,291
SD		0,227	0,364	0,103	0,179	0,168
M _e		12,650	10,60	14,47	13,32	5,070
IQR		0,49	0,75	0,24	0,30	0,37
Xmin; Xmax		12,29; 12,78	10,50; 11,25	14,35; 14,59	13,14; 13,63	4,95; 5,32
Totalul derivaților de antracen exprimat în hipericină (%)						
$\bar{X}$		0,435	0,287	0,839	0,269	0,0356
95% CI	Limita de jos	0,432	0,283	0,831	0,268	0,0355
	Limita de sus	0,437	0,291	0,847	0,271	0,0360
SD		0,003	0,005	0,010	0,001	0,0005
M _e		0,437	0,289	0,845	0,269	0,036
IQR		0,007	0,011	0,022	0,004	0,001
Xmin; Xmax		0,431; 0,438	0,280; 0,292	0,826; 0,848	0,268; 0,272	0,035; 0,036

Notă: colecția CȘPDPM – produsele vegetale colectate din colecția CȘPDPM, USMF „Nicolae Testemițanu”; flora spontană – produsele vegetale colectate din flora spontană

Tabelul A2.3. Timpul de retenție și ariile picurilor unor flavonoide în extractele uscate, obținute din *Hyperici herba*

Substanțele de referință									
Rutozida		Hiperozida		Cvercetrozida		Cvercetol		I3, II8-Biapigenina	
Tr (min)	A (s)	Tr (min)	A (s)	Tr (min)	A (s)	Tr (min)	A (s)	Tr (min)	A (s)
2,461	525,770	3,418	852,130	3,538	97,600	6,999	1243,880	13,720	727,700
2,455	527,020	3,426	867,530	3,548	93,400	6,991	1226,650	13,110	729,960
Extractul obținut prin metoda de repercolare din PV, colectat din colecția CȘPDPM (extragent – alcool etilic de 70%)									
2,456	3070,87329	3,311	3598,78076	3,542	290,10626	6,979	481,69260	13,662	289,7645
2,455	3073,85083	3,317	3592,36694	3,531	297,48032	6,938	484,80084	13,523	286,44531
2,452	3107,69775	3,318	3582,95801	3,537	303,22592	6,959	490,43454	13,632	301,30710
2,451	3107,06689	3,313	3580,42578	3,534	299,75351	6,948	490,59735	13,585	302,10101
2,448	3125,53345	3,310	3580,51050	3,543	315,85995	6,983	500,46100	13,700	298,66400
2,451	3127,88062	3,309	3565,84863	3,542	314,72086	6,976	498,38840	13,675	299,70969
Extractul obținut prin metoda de repercolare din PV, colectat din flora spontană (extragent – alcool etilic de 70%)									
2,477	3504,35815	3,467	3975,62964	3,562	171,70552	7,015	1000,01319	13,805	308,13419
2,475	3520,45972	3,470	3977,96167	3,561	169,61020	7,015	1006,26257	13,808	309,39569
2,469	3553,89380	3,478	3982,19678	3,563	182,21574	7,017	1000,21350	13,811	299,11197
2,474	3528,12134	3,476	3972,89453	3,559	181,55200	7,019	1000,97339	13,818	303,44370
2,466	3533,26782	3,479	3987,22827	3,561	191,95648	7,016	1021,83783	13,815	302,08893
2,465	3532,88745	3,479	3997,73267	3,560	186,36537	7,022	1031,85767	13,833	300,51041
Extractul obținut prin metoda de repercolare din PV, colectat din flora spontană (extragent – alcool etilic de 80%)									
2,477	3690,65503	3,471	4668,50049	3,556	201,26695	7,010	1022,65295	13,773	331,47058
2,476	3701,65674	3,471	4654,90381	3,555	203,59389	7,009	1021,67371	13,765	332,12250
2,475	3677,60376	3,463	4672,60376	3,554	201,02237	7,008	1018,44189	13,764	335,32501
2,471	3679,57202	3,461	4684,78320	3,555	208,20508	7,006	1021,45459	13,757	334,03986
2,471	3677,10303	3,468	4660,26318	3,552	216,55432	7,008	1009,75085	13,761	335,75049
2,464	3637,15625	3,472	4646,79688	3,552	194,33101	6,996	1006,64575	13,738	332,42001
Extractul obținut prin metoda de macerare fracționată cu agitare din PV, colectat din colecția CȘPDPM (extragent – alcool etilic de 70%)									
2,453	3040,45923	3,301	3370,21313	3,553	255,96628	6,986	729,84717	13,719	321,87933
2,447	3070,14307	3,352	3377,83691	3,552	255,83505	6,987	714,60541	13,716	324,50162
2,449	3941,57910	3,327	3421,96094	3,554	272,31339	6,987	716,59943	13,730	326,12119
2,450	3030,58301	3,324	3324,32666	3,550	282,50092	6,980	716,68036	13,705	326,49573
2,446	3020,49951	3,296	3354,70508	3,545	267,63565	6,984	704,62909	13,713	328,45343

Substanțele de referință									
Rutozida		Hiperozida		Cvercetrozida		Cvercetol		I3, II8-Biapigenina	
2,450	3046,43408	3,307	3346,96680	3,508	267,54395	6,974	705,51465	13,691	326,44678
Extractul obținut prin metoda de macerare fracționată cu agitare din PV, colectat din flora spontană (extragent - alcool etilic de 70%)									
2,450	2729,46875	3,310	3231,44360	3,511	167,32599	6,985	202,59575	13,698	152,93106
2,449	2720,04639	3,308	3279,23120	3,516	163,01968	6,986	200,176621	13,693	151,82706
2,442	2790,12109	3,327	3111,10156	3,521	154,02625	6,972	196,33505	13,675	146,22784
2,447	2786,16284	3,311	3095,79370	3,530	157,14487	6,975	198,35989	13,673	146,30121
2,446	2747,48975	3,327	3239,04199	3,518	147,27257	6,978	198,85213	13,693	151,91479
2,449	2747,79712	3,325	3244,14941	3,543	153,72540	6,981	199,44199	13,683	151,71440

Tabelul A2.4. Timpul de retenție al substanțelor-standard și al derivaților de flavonol, în extractele uscate obținute din *Hyperici flores*

Compușii de referință									
Rutozida		Hiperozida		Cvercetrozida		Cvercetol		I3, II8-Biapigenin	
Tr (min)	A (s)	Tr (min)	A (s)	Tr (min)	A (s)	Tr (min)	A (s)	Tr (min)	A (s)
2,461	525,770	3,418	852,130	3,538	97,600	6,999	1243,880	13,720	727,700
2,455	527,020	3,426	867,530	3,548	93,400	6,991	1226,650	13,110	729,960
Extractul uscat din flori de <i>H. perforatum</i> , colectate din colecția CȘCPM, USMF „Nicolae Testemițanu”									
2,418	1756,040	3,196	3378,910	3,611	228,700	6,915	667,430	13,514	514,660
2,428	1740,970	3,204	3413,220	3,621	213,110	6,912	669,940	13,500	506,880
2,423	1777,050	3,205	3386,090	3,618	223,250	6,923	695,650	13,545	518,210
2,418	1779,600	3,203	3370,030	3,616	238,750	6,931	698,660	13,576	522,890
2,417	1792,450	3,209	3363,900	3,616	231,033	6,936	694,960	13,581	502,040
2,417	1810,693	3,203	3356,150	3,615	229,820	6,934	697,580	13,576	507,110
Extractul uscat din flori de <i>H. perforatum</i> , colectate din flora spontană									
2,424	2067,930	3,234	3474,780	3,622	343,430	6,937	1414,450	13,583	1255,230
2,425	2103,630	3,239	3461,590	3,624	353,900	6,941	1404,950	13,592	1256,430
2,421	2086,640	3,231	3423,910	3,613	338,820	6,938	1442,800	13,601	1287,700
2,428	2092,240	3,242	3438,940	3,622	342,800	6,943	1445,700	13,602	1282,550
2,429	2157,990	3,246	3467,070	3,621	386,600	6,948	1481,180	13,604	1303,420
2,428	2150,960	3,239	3471,900	3,617	3896,096	6,946	1480,590	13,604	1298,570

Tabelul A2.5. Statistica descriptivă a rezultatelor dozării (%) unor flavonoide în extractele uscate, obținute prin repercolare din *Hyperici herba*

Parametrii statistici		Rutozida	Hiperozida	Cvercetrozida	Cvercitol	I3,II8-biapigenina
Extract uscat din PV colectat din flora spontană, extragent – alcool etilic de 80%						
n		6	6	6	6	6
$\bar{X}$		8,651	3,411	0,845	0,899	0,391
95% CI	Limita de jos	8,558	3,400	0,823	0,847	0,373
	Limita de sus	8,744	3,422	0,867	0,950	0,407
SD		0,088	0,010	0,020	0,049	0,016
Me		8,695	3,410	0,845	0,925	0,400
IQR		0,128	0,018	0,033	0,099	0,032
Xmin; Xmax		8,490; 8,723	3,400; 3,427	0,811; 0,869	0,835; 0,937	0,369; 0,403
Extract uscat din PV colectat din flora spontană, extragent – alcool etilic de 70%						
$\bar{X}$		8,255	2,829	0,747	0,823	0,371
95% CI	Limita de jos	8,202	2,680	0,716	0,812	0,355
	Limita de sus	8,308	2,978	0,778	0,832	0,387
SD		0,050	0,141	0,029	0,009	0,015
Me		8,241	2,883	0,749	0,832	0,368
IQR		0,086	0,100	0,055	0,018	0,031
Xmin; Xmax		8,190; 8,329	2,540; 2,890	0,710; 0,790	0,810;	0,354; 0,390
Extract uscat din PV din colecția CȘPDPM, extragent – alcool etilic de 70%						
$\bar{X}$		7,172	2,565	1,252	0,392	0,349
95% CI	Limita de jos	7,121	2,536	1,205	0,386	0,338
	Limita de sus	7,221	2,593	1,300	0,398	0,360
SD		0,047	0,026	0,045	0,005	0,010
Me		7,178	2,554	1,279	0,392	0,352
IQR		0,064	0,030	0,079	0,012	0,022
Xmin; Xmax		7,089; 7,226	2,546; ,6189	1,181; 1,284	0,355; 0,399	0,335; 0,360

Tabelul A2.6 Statistica descriptivă a rezultatelor dozării (%) unor flavonoide în extractele uscate, obținute din *Hyperici herba* și din *Hyperici flores* prin metoda de macerare fracționată cu agitare

Parametrii statistici		Rutozida	Hiperozida	Cvercetrozida	Cvercetol	I3,I18-biapigenina
<i>Hyperici herba</i>, PV din flora spontană, extragent – alcool etilic de 70%						
n		6	6	6	6	6
$\bar{X}$		6,413	2,264	0,649	0,161	0,177
95%	Limita de jos	6,338	2,130	0,616	0,159	0,173
CI	Limita de sus	6,487	2,399	0,681	0,161	0,179
SD		0,070	0,128	0,030	0,001	0,002
Me		6,387	2,320	0,652	0,161	0,178
IQR		0,127	0,140	0,051	0,001	0,006
Xmin; Xmax		8,490; 8,723	2,011; 2,324	0,604; 0,682	0,159; 0,162	0,173; 0,179
<i>Hyperici herba</i>, PV din colecția CȘPDPM, extragent – alcool etilic de 70%						
$\bar{X}$		7,019	2,390	1,084	0,569	0,380
95%	Limita de jos	6,986	2,339	1,041	0,561	0,377
CI	Limita de sus	7,053	2,440	1,128	0,577	0,383
SD		0,031	0,047	0,041	0,007	0,002
Me		7,013	2,399	1,088	0,568	0,381
IQR		0,031	0,052	0,077	0,012	0,004
Xmin; Xmax		6,989; 7,079	2,300; 2,442	1,039; 1,147	0,563; 0,583	0,376; 0,384
<i>Hyperici flores</i>, PV din flora spontană, extragent – alcool etilic de 80%						
$\bar{X}$		4,919	2,543	1,471	1,192	1,492
95%	Limita de jos	4,677	2,519	1,353	1,169	1,409
CI	Limita de sus	5,161	2,566	1,588	1,215	1,575
SD		0,230	0,022	0,112	0,012	0,079
Me		4,996	2,540	1,471	0,572	1,494
IQR		0,343	0,034	0,244	0,023	0,166
Xmin; Xmax		4,495; 5,106	2,507; 2,572	1,339; 1,596	0,552; 0,583	1,390; 1,564
<i>Hyperici flores</i>, PV din colecția CȘPDPM, extragent – alcool etilic de 80%						
$\bar{X}$		4,251	2,502	0,961	0,570	0,618
95%	Limita de jos	4,194	2,471	0,917	0,557	0,610
CI	Limita de sus	4,308	2,533	1,005	0,582	0,626
SD		0,054	0,029	0,042	0,012	0,007
Me		4,243	2,514	0,951	0,572	0,615
IQR		0,094	0,059	0,079	0,031	0,015
Xmin; Xmax		4,175; 4,329	2,464; 2,533	0,920; 1,028	0,552; 0,583	0,610; 0,628

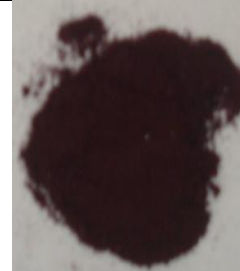
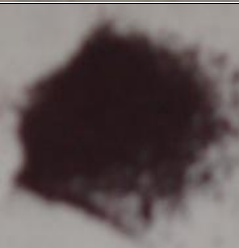
Ciclul de extracție	Timpul unui ciclu de extracție, min			
	60	45	30	15
I				
II				
III				
IV				
V				

Fig. A2.5. Optimizarea metodei de obținere a extractelor uscate, obținute din *Hyperici flores*, prin macerare fracționată cu agitare

Tabelul A2.7. Statistica descriptivă a rezultatelor determinării totalului de flavonoide în extractele uscate din *Hyperici flores*, în funcție de ordinea ciclului și durata unei extracții

Parametrii statistici		Numărul de ordine al ciclului de extracție				
		I	II	III	IV	V
Timpul de extracție al unui ciclu, 60 min						
n		9	9	9	9	9
$\bar{X}$		31,746	13,437	5,685	2,471	1,182
95 % CI	Limita de jos	30,947	13,265	5,453	2,390	1,150
	Limita de sus	32,546	13,609	5,917	2,551	1,213
SD		1,040	0,223	0,301	0,104	0,041
Me		32,440	13,290	5,760	2,470	1,160
IQR		2,080	0,510	0,675	0,240	0,090
Xmin; Xmax		30,36; 32,44	13,29;13,80	5,29; 5,99	2,35;2,59	1,15; 1,24
Totalul de flavonoide (Mediana, mg/g)		55,35 mg în echivalentul rutozidei/g extract uscat				
Timpul de extracție al unui ciclu, 45 min						
$\bar{X}$		32,143	11,426	4,066	3,150	1,153
95 % CI	Limita de jos	31,461	11,124	3,969	3,076	1,133
	Limita de sus	32,825	11,728	4,163	3,223	1,173
SD		0,887	0,393	0,126	0,095	0,026
Me		32,45	11,530	4,130	3,150	1,160
IQR		1,98	0,89	0,23	0,22	0,06
Xmin; Xmax		31,00; 32,98	10,93; 11,82	3,90; 4,17	3,04; 3,26	1,12; 1,18
Totalul de flavonoide (Mediana, mg/g)		52,42 mg în echivalentul rutozidei/g extract uscat				
Timpul de extracție al unui ciclu, 30 min						
$\bar{X}$		29,766	12,450	3,090	2,133	1,703
95 % CI	Limita de jos	29,316	29,316	2,933	2,089	1,640
	Limita de sus	30,217	30,217	3,247	2,177	1,766
SD		0,585	0,233	0,204	0,057	0,081
Me		30,020	12,58	3,150	2,100	1,670
IQR		1,28	0,49	0,46	0,12	0,18
Xmin; Xmax		29,00;30,28	12,14; 12,63	2,83; 3,29	2,09; 2,21	1,63; 1,81
Totalul de flavonoide (Mediana, mg/g)		49,52 mg în echivalentul rutozidei/g extract uscat				
Timpul de extracție al unui ciclu, 15 min						
$\bar{X}$		25,117	9,236	5,173	3,146	2,573
95 % CI	Limita de jos	23,869	8,956	5,143	3,073	2,543
	Limita de sus	26,363	9,516	5,203	3,220	2,603
SD		1,622	0,039	0,039	0,095	0,039
Me		25,630	9,27	5,170	3,200	2,570
IQR		3,64	0,84	0,09	0,20	0,09
Xmin; Xmax		23,04; 26,68	8,80; 9,64	5,13; 5,22	3,02; 3,22	2,53; 2,62
Totalul de flavonoide (Mediana, mg/g)		45,84 mg în echivalentul rutozidei/g extract uscat				

Tabelul A2.8. Statistica descriptivă a rezultatelor determinării totalului de polifenoli în extractele uscate din *Hyperici flores*, în funcție de ordinea ciclului și durata unei extracții

Parametrii statistici		Numărul de ordine al ciclului de extracție				
		I	II	III	IV	V
Timpul de extracție al unui ciclu, 60 min						
n		9	9	9	9	9
$\bar{X}$		56,516	22,283	11,230	5,543	3,856
95 % CI	Limita de jos	55,692	21,883	11,118	5,358	3,816
	Limita de sus	57,340	22,683	11,342	5,728	3,897
SD		1,071	0,519	0,145	0,240	0,052
M _e		57,16	22,29	11,29	5,43	3,87
IQR		2,21	1,18	0,32	0,52	0,12
Xmin; Xmax		55,09; 57,30	21,64; 22,88	11,04; 11,36	5,34; 5,86	3,79; 3,91
Totalul , mg/g		100,04 mg în echivalentul acidului galic/g extract uscat				
Timpul de extracție al unui ciclu, 45 min						
$\bar{X}$		57,446	19,426	7,956	6,813	3,176
95% CI	Limita de jos	56,634	19,269	7,840	6,647	2,863
	Limita de sus	58,259	19,583	8,073	6,979	3,490
SD		1,057	0,204	0,151	0,215	0,407
M _e		57,40	19,51	7,96	6,69	3,21
IQR		2,44	0,45	0,35	0,45	0,94
Xmin; Xmax		56,25; 58,69	19,16; 19,61	7,78; 8,13	6,65; 7,10	2,69; 3,63
Totalul , mg/g		94,77 mg în echivalentul acidului galic/g extract uscat				
Timpul de extracție al unui ciclu, 30 min						
$\bar{X}$		56,816	24,583	6,740	4,890	3,753
95% CI	Limita de jos	56,409	24,425	6,561	4,744	3,749
	Limita de sus	57,223	24,741	6,918	5,035	3,757
SD		0,529	0,205	0,232	0,188	0,005
M _e		56,77	24,62	6,69	4,79	3,75
IQR		1,22	0,47	0,53	0,40	0,01
Xmin; Xmax		56,23; 57,45	24,33; 24,80	6,50; 7,03	4,74; 5,14	3,75; 3,76
Totalul , mg/g		96,62 mg în echivalentul acidului galic/g extract uscat				
Timpul de extracție al unui ciclu, 15 min						
X		53,483	19,570	10,760	7,010	5,460
95% CI	Limita de jos	50,880	19,118	10,702	6,917	5,371
	Limita de sus	56,085	20,021	10,817	7,102	5,548
SD		3,385	0,587	0,075	0,120	0,114
M _e		54,08	19,69	10,81	6,94	5,51
IQR		7,75	1,34	0,15	0,25	0,25
Xmin; Xmax		49,31; 57,06	18,84; 20,18	10,66; 10,81	6,92; 7,17	5,31; 5,56
Totalul , mg/g		97,03 mg în echivalentul acidului galic/g extract uscat				

Anexa 3. Validarea metodei spectrofotometrice de dozare a totalului de flavonoide în extracte uscate

Tabelul A3.1. Determinarea ecuației de regresie liniară a metodei de dozare a totalului de flavonoide, în extractul uscat din părți aeriene de *H. perforatum*

Nr d/o	i	x_i mg/ml	y_i	$x_i y_i$	x_i^2	y_i^2
1	1	1	0,105	0,105	1	0,011
	2	2	0,219	0,438	4	0,048
	3	3	0,324	0,972	9	0,105
	4	4	0,434	1,736	16	0,1884
	5	5	0,543	2,715	25	0,2948
	6	6	0,646	3,876	36	0,4173
	7	7	0,754	5,278	49	0,5685
	Σ	28	3,025	15,12	140	1,633
2	1	1	0,106	0,106	1	0,0112
	2	2	0,218	0,436	4	0,0475
	3	3	0,334	1,002	9	0,1116
	4	4	0,440	1,76	16	0,1936
	5	5	0,545	2,725	25	0,297
	6	6	0,659	3,954	36	0,4343
	7	7	0,749	5,243	49	0,561
	Σ	28	3,051	15,226	140	1,6562
3	1	1	0,107	0,107	1	0,0114
	2	2	0,216	0,432	4	0,0467
	3	3	0,334	1,002	9	0,1116
	4	4	0,438	1,752	16	0,1918
	5	5	0,543	2,715	25	0,2948
	6	6	0,656	3,936	36	0,4303
	7	7	0,749	5,243	49	0,561
	Σ	28	3,043	15,187	140	1,6477

Tabelul A3.2 Rezultatele parametrilor de liniaritate ale metodei spectrofotometrice de dozare a flavonoidelor în extractul uscat din părți aeriene

Determinările	Parametrul de liniaritate			
	Coeficientul de corelație (r_{xy})	Coeficientul de regresie, R^2	Panta, a	Intercepția, b
1	0,9999	0,9999	0,1079	+0,0007
2	0,9996	0,9992	0,1079	+0,0041
3	0,9997	0,9994	0,1077	+0,004
Media	0,9997	0,9995	0,10783	0,0029
Deviația standard	0,00015	0,00036	0,0001	0,001

Tabelul A3.3. Determinarea ecuației de regresie liniară în dozarea totalului de flavonoide, în extractul uscat din flori de *H. perforatum*

Nr. d/o	i	x_i mg/ml	y_i	$x_i y_i$	x_i^2	y_i^2
1	1	0,028	0,078	0,0022	0,0008	0,0061
	2	0,032	0,089	0,0028	0,0010	0,0079
	3	0,036	0,102	0,0037	0,0013	0,0104
	4	0,04	0,112	0,0045	0,0016	0,0125
	5	0,044	0,126	0,0055	0,0019	0,0159
	6	0,048	0,136	0,0065	0,0023	0,0185
	7	0,06	0,167	0,01	0,0036	0,0279
	Σ	0,288	0,81	0,0353	0,0125	0,0992
2	1	0,028	0,082	0,0023	0,0008	0,0067
	2	0,032	0,088	0,0028	0,0010	0,0077
	3	0,036	0,101	0,0036	0,0013	0,0102
	4	0,04	0,11	0,0044	0,0016	0,0121
	5	0,044	0,124	0,0055	0,0019	0,0154
	6	0,048	0,137	0,0066	0,0023	0,0188
	7	0,06	0,169	0,0101	0,0036	0,0286
	Σ	0,288	0,811	0,0353	0,0125	0,0995
3	1	0,028	0,080	0,0022	0,0008	0,0064
	2	0,032	0,088	0,0028	0,0010	0,0077
	3	0,036	0,103	0,0037	0,0013	0,0106
	4	0,04	0,111	0,0044	0,0016	0,0123
	5	0,044	0,125	0,0055	0,0019	0,0156
	6	0,048	0,136	0,0065	0,0023	0,0185
	7	0,06	0,168	0,0101	0,0036	0,0282
	Σ	0,288	0,811	0,0353	0,0125	0,0994

Tabelul A3.4. Rezultatele parametrilor de liniaritate ale metodei spectrofotometrice la dozarea flavonoidelor, în extractul uscat din flori

Determinările	Parametrul de liniaritate		
	Coeficientul de corelație, r_{xy}	Panta, a	Intercepția, b
1	0,9990	2,8067	+0,0002
2	0,9977	2,8109	+0,0002
3	0,9987	2,7993	+0,0007
Media	0,9986	2,8056	0,0004
Deviația standard	0,0001	0,0058	0,0003

Tabelul A3.5. Rezultatele evaluării preciziei intermediare a metodei de dozare a totalului de flavonoide, în extractele uscate din *Hyperici herba* și *Hyperici flores*

Analitic Parametrii statistici		Extractul uscat din <i>Hyperici herba</i> (5mg/ml)		Extractul uscat din <i>Hyperici flores</i> (1 mg/ml)	
		Ziua I	Ziua a II-a	Ziua I	Ziua a II-a
		C, mg/g extract uscat	C, mg/g extract uscat	C, mg/g extract uscat	C, mg/g extract uscat
n		6	6	6	6
Analiticul I		36,297	35,087	51,092	49,767
		35,851	35,150	50,209	50,209
		35,660	36,106	50,650	50,650
		35,787	35,341	50,209	51,092
		35,723	36,297	51,092	50,650
		35,914	35,194	51,092	50,209
$\bar{X}$		35,872	35,529	50,724	50,429
95 % CI	Limita de jos	35,633	34,972	50,268	49,943
	Limita de sus	36,110	36,086	51,179	50,915
SD		0,226	0,530	0,434	0,463
M _e		35,819	35,267	50,871	50,429
IQR		0,302	1,019	0,883	0,662
Xmin; Xmax		35,660; 36,297	35,087; 38, 297	50,209; 51,092	49,767; 51,092
RSD, %		0,630	1,419	0,855	0,918
P		0,029		0,227	
Analiticul II		35,023	35,372	49,326	50,209
		34,513	35,341	49,326	49,326
		35,533	34,813	50,209	50,650
		34,768	34,895	50,209	49,326
		35,277	35,150	49,767	49,767
		34,895	35,023	49,767	49,767
$\bar{X}$		35,001	35,099	49,767	49,840
95 % CI	Limita de jos	34,619	34,857	49,352	49,299
	Limita de sus	35,383	35,340	50,181	50,382
SD		0,364	0,230	0,394	0,516
M _e		34,959	35,086	49,767	49,767
IQR		0,636	0,474	0,883	0,516
Xmin; Xmax		34,513; 35, 372	34,813; 35,372	49,326; 50,209	49,326, 59,650
RSD, %		1,039	0,655	0,791	1,035
P		0,520		0,867	

Anexa 4. Activități farmacologice ale produselor extractive

Tabelul A4.1. Activitatea antioxidantă a extractelor uscate, determinată prin metoda DPPH

Parametrii statistici		DPPH, IC ₅₀ µg/ml		
		Extract din <i>Hyperici herba</i>	Extract din <i>Hyperici flores</i>	Trolox
n		9	9	9
$\bar{X}$		22,52	13,35	4,13
95 % CI	Limita de jos	18,48	12,49	3,41
	Limita de sus	26,56	14,23	4,86
SD		5,252	1,133	0,941
M_e		22,15	13,08	4,18
IQR		11,11	1,125	1,810
Xmin; Xmax		15,08; 28,88	11,67; 15,48	2,98; 5,17

Tabelul A4.2. Activitatea antioxidantă a extractelor uscate, determinată prin metoda ABTS

Parametrii statistici		ABTS, µM TE/g masă uscată	
		Extract din <i>Hyperici herba</i>	Extract din <i>Hyperici flores</i>
n		9	9
$\bar{X}$		23,68	28,79
95 % CI	Limita de jos	22,27	28,71
	Limita de sus	25,08	28,80
SD		1,824	0,114
M_e		23,12	28,80
IQR		5,87	0,16
Xmin; Xmax		22,47; 28,34	28,58; 28,96

Tabelul A4.3. Capacitatea extractelor uscate de chelare a ionilor de Fe²⁺ *in vitro*

Parametrii statistici		Capacitatea de chelare a fierului, %		
		Extract din <i>Hyperici herba</i>	Extract din <i>Hyperici flores</i>	EDTA
n		9	9	9
$\bar{X}$		35,94	45,80	99,06
95 % CI	Limita de jos	34,07	44,30	98,55
	Limita de sus	37,81	47,29	99,56
SD		2,428	1,942	0,653
M_e		35,63	45,98	99,33
IQR		3,90	2,98	1,28
Xmin; Xmax		32,02; 39,60	42,70; 49,10	98; 99,76



nr. 33
la nr. 29 din 24.03.2015

**Aviz favorabil al
Comitetului de Etică a Cercetării**

La Proiectul științific de doctorat cu titlul „*Hypericum perforatum L. – sursă de noi forme farmaceutice*”, realizat de Anna Benea; conducător științific: Nistoreanu Anatolie - doctor în științe farmaceutice, profesor universitar; consultant științific: Parii Sergiu - doctor în științe medicale, conferențiar cercetător.

Comitetul de Etică a Cercetării USMF „Nicolae Testemițanu”, examinând la ședința din 16 martie 2015 următoarele documente:

1. Forma de solicitare pentru evaluare etică a cercetării.
2. Protocolul proiectului.
3. Adnotarea la teza de doctor în științe medicale.
4. CV-urile conducătorului științific, consultantului științific și al doctorandului.

A decis că proiectul de cercetare „*Hypericum perforatum L. – sursă de noi forme farmaceutice*”, corespunde exigențelor etice.

Lista nominală a membrilor CEC prezenți în ședință: Curocichin Ghenadie, Gramma Rodica, Nacu Viorel, Bețiu Mircea, Diug Eugen, Tagadiuc Olga, Paulescu Andrei, Rusu Natalia, Nemerenco Ala, Rojnoveanu Gheorghe, Gavriliuc Mihail.

Președintele
Comitetului de Etică a Cercetării

Mihail Gavriliuc

Fig. A4.1 Avizul Comitetului de Etică a Cercetării, USMF „Nicolae Testemițanu”

Tabelul A4.4. Statistica descriptivă a rezultatelor acțiunii extractelor uscate din *Hyperici flores* și *Hyperici herba* asupra edemului, indus de histamină

Loturile experimentale	Parametrii statistici (n=5)		Extinderea edemului, %	Inhibiția edemului, %
1. Lotul-martor – intraplantar 0,1 ml ser fiziologic de 0,9% (n = 5).	$\bar{X}$		5,034	—
	95 % CI	Limita de jos	0,541	
		Limita de sus	9,526	
	SD		3,618	
	Me		6,11	
	IQR		6,58	
	Xmin; Xmax		0,49; 9,74	
2. Lotul de control – intraperitoneal, 1 ml ser fiziologic de 0,9% și, intraplantar, 0,1 ml soluție de histamină de 1% (n = 5).	$\bar{X}$		44,20	—
	95 % CI	Limita de jos	34,373	
		Limita de sus	54,026	
	SD		7,914	
	Me		45,23	
	IQR		12,555	
	Xmin; Xmax		31,02; 51, 50	
3. Lotul de referință – intraperitoneal, 1 ml soluție de diclofenac de sodiu, 50 mg/kg și, intraplantar, 0,1 ml soluție de histamină de 1% (n = 5).	$\bar{X}$		22,146	49,898
	95 % CI	Limita de jos	19,110	43,027
		Limita de sus	25,181	56,768
	SD		2,445	5,533
	Me		21,54	51,270
	IQR		4,635	10,49
	Xmin; Xmax		18,99; 24,69	44,14; 57,04
4. Lotul experimental – 1 ml extract uscat (100 mg/kg) din <i>Hyperici herba</i> (flora spontană), intraperitoneal, și 0,1 ml soluție de histamină de 1%, intraplantar (n = 5).	$\bar{X}$		24,680	44,202
	95 % CI	Limita de jos	19,189	31,783
		Limita de sus	30,170	56,620
	SD		4,421	10,001
	Me		25,15	43,30
	IQR		7,435	16,825
	Xmin; Xmax		18,72; 30,89	30,11, 57,65
5. Lotul experimental – 1 ml extract uscat (100 mg/kg) din <i>Hyperici flores</i> (flora spontană), intraperitoneal, și 0,1 ml soluție de histamină de 1%, intraplantar (n = 5).	$\bar{X}$		28,192	39,330
	95 % CI	Limita de jos	22,553	27,196
		Limita de sus	33,830	51,463
	SD		4,541	9,772
	Me		28,26	39,19
	IQR		7,62	16,40
	Xmin; Xmax		24,00; 35,46	23,69; 48,35
6. Lotul experimental – 1 ml extract uscat (100 mg/kg) din <i>Hyperici herba</i> (colecția CȘPDPM), intraperitoneal, și 0,1 ml soluție de histamină de 1%, intraplantar (n = 5).	$\bar{X}$		28,334	35,894
	95 % CI	Limita de jos	21,392	20,188
		Limita de sus	35,275	51,599
	SD		5,590	12,648
	Me		25,950	41,290
	IQR		10,44	23,62
	Xmin; Xmax		23,03; 36,15	18,21; 47,89
7. Lotul experimental – 1 ml extract uscat (100 mg/kg) din <i>Hyperici flores</i> (colecția CȘPDPM), intraperitoneal, și 0,1 ml soluție de histamină de 1%, intraplantar (n = 5).	$\bar{X}$		32,21±2,21	27,130
	95 % CI	Limita de jos	26,069	13,239
		Limita de sus	38,346	41,021
	SD		4,943	11,187
	Me		31,95	27,71
	IQR		8,975	20,31
	Xmin; Xmax		24,86; 36,83	16,67; 43,76

Notă: n = 5 – numărul de animale în lot

Anexa 5. Proiectul de monografie farmaceutică al produsului vegetal „Flori de sunătoare – *Hyperici perforati flores*”

PROIECT DE MONOGRAFIE FARMACOTEICĂ

Flori de sunătoare

MF MD-08/

Hyperici flores

Se pune în aplicare prima data

Pusă în aplicare din

„_____” _____ 20__

Valabilă până la

„_____” _____ 20__

Prezenta monografie farmaceutică reglementează calitatea produsului vegetal **Flori de sunătoare** – inflorescențe, colectate în faza de înflorire și uscate după recoltare, ale plantei erbacee perene *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae). Conține cel puțin 6% de flavonoide, exprimate în rutozida (C₂₇H₃₀O₁₆; M.m.611).

Ediție oficială

Reproducere interzisă

SPECIFICAȚIE
pentru produsul vegetal
Flori de sunătoare
Hyperici perforati flores

Caracteristici	Metode de analiză	Condiții de admisibilitate
Descriere	Ph. Eur., ed. 6, supliment 6.2, 07/2008:1438, p. 3839; FS XIV, vol. al IV-a, p. 6074; FR, ed. a X-a , p. 483	Produs întreg. Florile sunt grupate în inflorescențe corimbiforme, ce formează panicule. Flori actinomorfe, pentamere. Bractee lanceolate, acute. Caliciu format din cinci sepale lanceolate, ascuțite, nefimbriate, glabre, cu puncte translucide și, pe margini, cu puncte negre. Corola, formată din 5 petale galben-aurii, care prezintă, pe margini, puncte brun-negricioase. Numeroase stamine, cu filamente concrescute, în 3 fascicule. Miros slab, specific. Gustul extractului apos – amărui, puțin astringent. Produs mărunțit. Amestec de inflorescențe corimbiforme, flori întregi, boboci florali, pedunculi, petale, stamine și antere. Pulbere. La examinarea pulberii din flori sub lupă (10^x) sau sub stereomicroscop (16^x), se observă fragmente de boboci florali de culoare galben-cafenie; petale și fragmente ale lor de culoare galbenă, alb-gălbuie, cafenie; cu puncte negre sau formațiuni ovale, ușor vizibile; sepale separate și fragmentate. Culoarea pulberii oranj-verzuie; mirosul slab, caracteristic; gustul extractului apos – amărui, puțin astringent.
Caractere microscopice	Ph. Eur., ed. 6, supliment 6.2, 07/2008:1438, p. 3840; FS XIV, vol. IV, p. 6076	Structuri secretoare pe sepale: glande negre ovale pe apexul limbului situate rar pe margine; buzunare translucide de formă alungită și canalele secretoare cu un conținut galben pe toată suprafața. Structuri secretoare pe petale: glande negre sferiforme, localizate pe marginea oblică a petalelor pungi translucide

Caracteristici	Metode de analiză	Condiții de admisibilitate
		ovale și canale secretoare localizate între nervuri. În epiderma petalelor, se observă cromoplaste; pereții epidermei – cu un contur sinuos.
Identificare	Ph. Eur., ed. 6, supliment 6.2, 07/2008:1438, p. 3840; Reacții calitative	Prin CSS în produsele extractive din flori s-au identificat: rutozida, hiperozida, izocvercetrozida, cvercetrozida, acidul clorogenic, acidul cafeic, hipericina; prin reacții de identificare – substanțele tanante.
Masa conținutului ambalajului	FS XIV Vol. I, p. 171; Farmacopeea Belarusă vol. 2, 2007, p. 58	Masa conținutului ambalajului individual trebuie să fie cel puțin 47,5 și cel mult 52,5 g. Masa medie a conținutului pentru 10 ambalaje trebuie să fie cel puțin 49,2 și cel mult 50,8 g.
Pierdere prin uscare	Ph. Eur., ed.6, 01/2008:20232, p. 53; FS XIV Vol. I, MF 1.2.1.0010.15	Cel mult 13%.
Cenușă totală	Ph. Eur., ed. 6, 01/2008:20416, p.116	Cel mult 14%.
Cenușă insolubilă în acid clorhidric de 10%	Ph. Eur., ed. 6, vol. 1, 01/2008:20801, p.249	Cel mult 8%.
Grad de mărunțire <i>Probus întreg</i>	Ph. Eur., ed. 6, vol. 1, 2.2.32, p. 52	Cel mult 5% din fragmentele ce trec prin sită cu orificii de 1 mm.
<i>Probus mărunțit</i>	FS XIV, vol II, MF 1.5.3.0004.15	Cel mult 5% din particulele ce nu trec prin sită cu orificii de 7 mm; cel mult 5% din fragmentele ce trec prin sită cu orificii de 0,5 mm.
<i>Pulbere</i>		Cel mult 5% din particulele ce nu trec prin sită cu orificii de 2 mm; cel mult 5% din particulele ce trec prin sită cu orificii de 0,18 mm.
Impurități <i>Alte părți ale plantei (frunze, tulpini, fructe)</i>		Cel mult 2%.
<i>Flori decolorate</i>		Cel mult 3%.
<i>Produse organice</i>		Cel mult 1%.
<i>Produse minerale</i>		Cel mult 1%.
Metale grele	FS XIV, vol. II, MF 1.5.3.0009.15	Pb – cel mult 6,0 mg/kg; Cd – cel mult 1,0 mg/kg;

Caracteristici	Metode de analiză	Condiții de admisibilitate
	FR, ed. X, p.420	Hg – cel mult 0,1 mg/kg; Cel mult 0,04%.
Radioizotopi	FS XIV, vol. al II, MF 1.5.3.0001.15	Limitele conținutului permis de radioizotopi în produsul vegetal: Cs-137 – cel mult 400 Bq/kg; Sr-90 – cel mult 200 Bq/kg.
Reziduuri de pesticide	Ph. Eur., ed. 6, vol. 1, 01/2008:20813, p. 252; FS XIV, vol. II, 1.5.3.0011.15; Farmacopeea Belarusă (5.1.8)	Determinarea se efectuează conform cerințelor Ph. Eur. 2.8.13; FS XIV MF 1.5.3.0011.15
Contaminare microbiană - total microorganisme aerobe (NTMA) în 1,0 g de produs - total levuri și funghi (NTLF) în 1,0 g de produs - <i>Escherichia coli</i> în 1 g de produs	Ph. Eur. (2.6.12, 2.6.13, 5.1.4) Farmacopeea Belarusă (5.1.8)	Cel mult 10 ⁷ . Cel mult 10 ⁵ . Cel mult 10 ² .
Dozarea totalului de flavonoide	Farmacopeea Belarusă, 2007, p. 347 FS XIV, Vol IV, p.6081	Totalul de flavonoide, în recalcul la rutozidă, nu mai puțin de 6%.
Ambalare - ambalaj primar - ambalaj secundar	GOST 7247-90 GOST 7933-89 sau GOST 12301-2006	Câte 50 g de produs medicamentos <i>Flori de sunătoare Hyperici flores</i> , produs vegetal 50,0 g se ambalează în pungi de hârtie albă sau brună. Pungile, cu produs vegetal, însoțit de instrucțiunea de administrare, se plasează în cutii pliante de carton lăcuite, confecționate și marcate conform specificației producătorului.
Marcare	FS XIV, vol. I, MF 1.1.0019.15	Conform cerințelor MF 1.1.0019.15.
Condiții de depozitare		A se păstra la temperatura de sub 25°C.
Termen de valabilitate		2 ani
Grupa farmacoterapeutică și codul ATC		XNF Produse fitoterapice, antiinflamator, antioxidant, antibacterian

Descriere

Produs mărunțit. Amestec de inflorescențe corimbiforme, flori întregi, boboci florali, pedunculi, petale, stamine și antere. Flori actinomorfe, pentamere; bractee lanceolate, acute. Caliciu format din cinci sepale lanceolate, ascuțite, nefimbriate, glabre, cu puncte translucide și, pe margini, cu puncte negre. Corola, formată din 5 petale galben-aurii, prezintă pe margini puncte brun-negre. Numeroase stamine, cu filamente concrescute în 3 fascicule.

Miros slab, specific. Gustul extractului apos – amăru, puțin astringent.

Pulbere. La examinarea pulberii din flori cu ajutorul lupei ($10\times$) sau al stereomicroscopului ($16\times$), se văd fragmente de boboci florali, de culoare galben-cafenie; petale și fragmente ale lor, de culoare galbenă, alb-gălbuie, cafenie; cu puncte negre sau cu formațiuni ovale, ușor vizibile; sepale separate și fragmentate. Culoarea pulberii – oranj-verzuie; miros slab, caracteristic; gustul extractului apos – amăru, puțin astringent.

Caractere microscopice

Sepalele sunt alungit-lanceolate, cu glande negre ovale pe apexul limbului, rare pe margini; buzunarele translucide de formă alungită și canalele secretoare cu un conținut galben sunt prezente între nervuri pe toată suprafața. Pentru sp. *H. perforatum* sunt caracteristice glande negre sferiforme, localizate pe marginea oblică a petalelor; buzunarele translucide, ovale sau alungite și canalelele secretoare sunt localizate între nervuri.

Identificarea principiilor active

Cromatografie în strat subțire (CSS)

Soluția-test. Într-un balon, prevăzut cu refrigerent ascendent, se tratează 0,5 g produs vegetal mărunțit (*Hyperici flores*) cu 10 ml alcool etilic de 70-80%, apoi se fierbe pe baia de apă, la temperatură de 60°C , timp de 30 de minute, cu agitare, după care se filtrează.

Soluția de referință. Câte 5 mg de rutozidă, hiperozidă, izocvercetrozidă, cvercetrozidă, acid clorogenic, acid cafeic, hipericină se dizolvă în 10 ml de alcool etilic de 96%. **Faza staționară.** Plăci cromatografice Silicagel 60, F₂₅₄, 20x20 cm, Merck. **Faza mobilă.** Acid formic anhidru:apă:etilacetat (6:9:90). **Aplicare.** 10 μl de soluție de analizat și 5 μl de soluție de referință. **Migrare.** 10-12 cm. **Uscarea plăcilor.** La temperatura de $100-105^{\circ}\text{C}$, timp de 10 minute. **Detecție:** Se pulverizează placa cu soluție de 10 g/l reactiv NEU (difenil-boriloxietilamină) în metanol și apoi cu soluție 50 g/l de polietilenglicol 400 în metanol. După 30 de minute se examinează placa în lumină UV la 365 nm.

Reacția de identificare a substanțelor tanante

Pregătirea extractului. La 1,0 g de produs vegetal mărunțit se adaugă 20 ml de apă. Se fierbe la baia de apă, timp de 2-3 minute, apoi se răcește și se filtrează.

La 2-3 ml de extract se adaugă 4-5 picături soluție de alaun de fier și amoniu. În cazul substanțelor tanante hidrolizabile, apare culoare sau precipitat negru-albastru, iar în cazul celor condensate – precipitat negru-verde.

Masa conținutului ambalajului

Determinarea se efectuează conform prevederilor din *Farmacopeea Belarusă*, vol. 2, 2007, p. 58 și FS XIV, vol. 2, p. 171.

Se determină masa medie a 10 ambalaje, prin cântărirea fiecărui ambalaj în parte, cu o exactitate de 0,01 g. Se cântărește fiecare cutie cu conținut, apoi se deschide în așa mod, încât ca să nu fie pierdute fragmentele de produs vegetal. Ambalajul se curăță bine cu o perie, apoi se cântărește ambalajul gol și se calculează masa conținutului ambalajului, prin scădere. Toate aceste acțiuni se aplică și la restul ambalajelor.

Abaterile acceptate pentru masa unui ambalaj – 5%, masa produsului trebuie să fie cuprinsă între cel puțin 47,5 și cel mult 52,5 g. Masa medie a conținutului din 10 ambalaje trebuie să fie cel puțin 49,2 și cel mult 50,8 g. Abaterea acceptată pentru 10 ambalaje este de 1,6%.

Indici numerici

Pierdere prin uscare (umiditatea)

Într-o fiolă de cântărire cu dop rodat, uscată și cântărită în prealabil, se introduce o cantitate specificată (1-5 g) de produs vegetal (pulverizat). Fiola de cântărire (și capacul acesteia) se ține în etuvă, deschisă timp de 3-4 ore, la temperatura de 105°C. Ulterior, fiola se închide, se răcește în exsicator, după care se cântărește. Continuă uscarea pe perioade a câte o oră, urmată de răcire în exsicator și de cântărire până la atingerea unei mase constante.

Umiditatea produsului vegetal se calculează în baza formulei:

$$X = (a - b) * 100 / a,$$

în care: X – umiditatea produsului vegetal, %; a – masa produsului vegetal, înainte de uscare, g;

b – masa produsului vegetal, după uscare, g.

Cenușă totală. Cel mult 14%.

Creuzetele de porțelan se aduc la o masă constantă, prin expunerea la aceeași temperatură, la care urmează să se efectueze calcinarea și se răcesc în exicator. În creuzetul de porțelan, cântărit în prealabil, se introduce 3 g de produs de analizat (probă cântărită cu exactitate) și se distribuie uniform cantitatea cântărită pe partea de jos a creuzetului. Proba de testare din creuzet este încălzită cu atenție, la temperatura de 100-105°C, timp de 1 oră, și apoi se efectuează arderea, urmată de calcinarea restului probei, la temperatura de 600°C, timp de 30 de minute, până când se obține un reziduu de culoare albă sau cenușiu-deschisă, fără urme de cărbune. Creuzetul se răcește în exsicator până la temperatura camerei și apoi se cântărește.

Conținutul de cenușă totală (X, %), se calculează în baza formulei:

$$X = (m_1 * 100) / m_2, \text{ în care:}$$

m_1 – masa cenușii, g; m_2 – masa produsului vegetal, g.

Cenușa insolubilă în soluție HCl de 10%. Cel mult 8%.

Cenușa obținută prin calcinarea probei, la temperatura de 600°C, se trece în creuzet de porțelan de 50 ml și se dizolvă în 25 ml HCl de 10%, se acoperă cu o sticlă de ceas și se încălzește pe baia de apă timp de 15 minute. Suspensia obținută se trece prin hârtia de filtru cantitativă (prin calcinare nu lasă cenușă), cu o porozitate fină. Filtrul cu sediment se spală cu apă fierbinte, până când apa devine neutră, folosind hârtia indicatoare universală. Filtrul, cu reziduu insolubil în HCl, se introduce din nou în creuzet, se usucă și se calcinează la temperatura de 600°C, timp de 30 de minute, apoi se cântărește.

Conținutul de cenușă insolubilă în soluție HCl de 10% (X, %), se calculează în baza formulei:

$$X = (m_1 - m) * 100 / m_2,$$

în care: m_1 – masa cenușii totale, g; m – masa cenușii insolubile în HCl 10%, g;

m_2 – masa probei analizate, g.

Grad de mărunțire

Produs întreg. Cel mult 5% de fragmente ce trec prin sită cu orificii de 1 mm.

Produs mărunțit. Cel mult 5% din fragmente ce nu trec prin sită cu orificii de 7 mm; cel mult 5% din fragmente ce trec prin sită cu orificii de 0,5 mm.

Pulbere. Cel mult 5% din fragmente ce nu trec prin sită cu orificii de 2 mm; cel mult 5% din particule ce trec prin sită cu orificii de 0,18 mm.

Impurități

Fiecare tip de impuritate se cântărește separat cu o precizie de $\pm 0,1$ g, când masa probei analitice este mai mare de 100 g și o precizie de $\pm 0,05$ g, cu masa probei analitice de 100 g sau mai mică.

Conținutul fiecărui tip de impuritate se calculează în procente (X) după formula:

$$X = m_1 * 100 / m_2,$$

în care: m_1 – masa de impurități, g; m_2 – masa produsului analizat, g.

Normele admisibile pentru impurități: cel mult 2% – alte părți ale plantei (frunze, tulpini, fructe); nu mai mult de 3% flori decolorate, cel mult 1% produse organice și minerale.

Metale grele. Se determină în funcție de prevederile stipulate în FS XIV, Vol. II, MF 1.5.3.0009.15. Conținutul maxim admis de metale grele, în produsele vegetale și în preparatele din plante medicinale: Pb – cel mult 6,0 mg/kg; Cd – cel mult 1,0 mg/kg; Hg – cel mult 0,1 mg/kg.

Radioizotopi. Se determină conform prevederilor stipulate în FS XIV, Vol. II, MF 1.5.3.0001.15: *Determinarea conținutului de radioizotopi din produse vegetale și preparate din plante medicinale.*

Reziduuri de pesticide. Determinarea se efectuează conform cerințelor cuprinse în Ph. Eur. 2.8.13; FS XIVM.F 1.5.3.0011.15.

Dozare. *Determinarea totalului de flavonoide în Hyperici flores, prin utilizarea metodei spectrofotometrice UV-VIS.* 1,0 g de produs vegetal (probă exactă) mărunțit (1 mm) se trece în balon conic cu capacitatea de 100 ml și se adaugă 50 ml alcool etilic de 70%. Balonul se unește cu refrigerentul și se încălzește pe baie de apă timp de 90 de minute, după care balonul se închide, se răcește și se cântărește repetat, apoi se suplimentează cu extragent până la masa inițială, la necesitate. Extractul se filtrează prin vată și se lasă să se răcească timp de 30 de minute (soluția A).

Proba de analizat. Într-un balon cotat (25 ml), la 1 ml de soluție A se adaugă 1 ml de clorură de aluminiu 50 g/l în alcool etilic de 96%; se agită și se suplinește cu alcool etilic de 96%, până la cotă (soluția B).

Soluția de compensare. La 1 ml de soluție A se adaugă o picătură de acid acetic și se completează cu alcool etilic de 96% la 25 ml, într-un balon cotat (soluția B).

Soluția de referință. 0,05 mg de rutozidă, preuscată la temperaturi de 130-135°C, timp de 3 ore, se dizolvă în alcool etilic de 96% și se completează până la 100 ml în balon cotat. La 1 ml de soluție obținută, se adaugă 1 ml de clorură de aluminiu (20 g/l în alcool etilic de 96%) și se aduce până la cotă (25 ml) cu alcool etilic de 96%.

Densitatea optică a soluției B a probei de analizat se măsoară după 40 de minute la spectrofotometru, la lungimea de undă de 412 nm, într-o cuvă cu grosimea stratului de 10 mm.

Totalul de flavonoide, în echivalentul rutozidei, se calculează în baza formulei:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 100 \times 25 \times 1 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 1 \times 100 \times 25 \times (100 - W)}, \text{ în care:}$$

D – densitatea optică a soluției de analizat; D_0 – densitatea optică a soluției-standard de rutozidă; m_0 – masa rutozidei, g; m – masa produsului vegetal, g; W – pierderea în masă la uscare, %.

Contaminare microbiană. Produsul trebuie să corespundă prevederilor stipulate în Ph. Eur. (5.1.4, 2.6.12, 2.6.13). În 1,0 g de produs vegetal se admite prezența unui număr total de microorganisme aerobe (NTMA) cel mult 10^7 bacterii aerobe, a unui număr total de levuri și de fungi cel mult 10^5 (NTLF) și a unui număr total de *Escherichia coli* cel mult 10^2 .

Ambalare. *Ambalaj primar.* Câte 50 g de produs medicamentos „Flori de sunătoare *Hyperici flores*, produs vegetal 50,0 g” se ambalează în pungi de hârtie albă sau brună conform

GOST 7247-90.

Ambalaj secundar. Pungile cu produs vegetal, însoțite de instrucțiunea de administrare, se plasează în cutii pliante de carton lăcuite, confecționate și marcate conform GOST 7933-89 sau GOST 12301-2006.

Marcare

Denumirea producătorului

Adresa producătorului

Denumirea produsului

Forma farmaceutică

Masa conținutului ambalajului

Indicațiile terapeutice

Modul de utilizare

Condițiile de păstrare

Mențiuni

Numărul de înregistrare

Codul de bare

Seria

Termenul de valabilitate

Transportare. În conformitate cu prevederile GOST 17768-90.

Condiții de depozitare. A se păstra la temperaturi sub +25°C, în ambalajul original, pentru a fi protejat de lumină și de umiditate.

Termen de valabilitate. În condițiile de ambalare, depozitare și de transport, prevăzute în prezenta Specificație, **Flori de sunătoare *Hyperici flores***, produs vegetal 50 g are termen de valabilitate 2 ani.

Acțiune farmacologică: antiinflamatoare, antibacteriană, antioxidantă.

Șef Catedră de farmacognozie și botanică

farmaceutică, profesor universitar,

doctor habilitat în științe biologice

Calalb Tatiana

„ 30” iunie 2021

Absolventa doctoratului,

Catedra de farmacognozie

și botanică farmaceutică

Benea Anna

„ 30” iunie 2021

**Anexa 6. Proiectul de monografie farmaceutică a extractului uscat din flori de sunătoare –
*Hyperici perforati flores extractum siccum***

PROIECT DE MONOGRAFIE FARMACOTEICĂ

Extract uscat din flori de sunătoare

MF MD-08/

Hyperici perforati flores extractum siccum

Se pune în aplicare prima data

Pusă în aplicare din

„_____” _____ 20__

Valabilă până la

„_____” _____ 20__

Prezentă Monografie Farmaceutică reglementează calitatea extractului uscat de sunătoare, obținut prin extracție din flori de *Hypericum perforatum* L. din familia Hypericaceae cu solvent corespunzător, se utilizează la fabricarea preparatelor medicamentoase.

Ediție oficială

Reproducere interzisă

SPECIFICAȚIE

Produs farmaceutic *Hyperici perforati flores extractum siccum*

Extract uscat din flori de sunătoare

Caracteristici	Metode de analiză	Condiții de admisibilitate
Preparare	FR, ed. X, p. 419, punctul 1	Metoda de macerare repetată, cu agitare.
Descriere	FR, ed. X, p. 420, <i>Extracta</i>	Pulbere purpuriu-brună, higroscopică, miros specific, gust amar, astringent.
Identificare	Ph. Eu., ed. 6, supliment 6.2, 07/2008:1874; Farmacopeea Belarusă, vol. II, 2009, p. 346	Prin CSS, în produsele extractive din flori s-au identificat: rutozida, hiperozida, izocvercetrozida, cvercetrozida, I3,II8-biapi-genina, acidul clorogenic, acidul cafeic, hipericina. Prin reacții de culoare și de sedimentare, au fost identificate substanțele tanante.
Pierdere prin uscare	Ph. Eu., ed. 6,01/2008.2817, p.256; FR, ed. X, p. 421.	Cel mult 5%.
Solvenți organici reziduali	FS, MF1.1.0008.15 <i>Solvenți organici reziduali</i>	Conținutul de alcool etilic, în extract uscat, cel mult 0,5%.
Metale grele	FR, ed. X, p.419; FR, ed. X, IX. .13; FS, ed. XIV, 1.5.3.0009.15	Cel mult 0,04%; Limitele maxime admisibile: Cd –cel mult 1 mg/kg; Pb – cel mult 6 mg/ml.
Contaminare microbiană - total microorganisme aerobe în 1,0 g	Ph. Eu., ed. 6, 5.1.4, p. 529; Ph. Eu., ed. 6, 2.6.12; Ph. Eu., ed. 6, 2.6.13	Categoria 3B; Cel mult 10 ⁴ în 1,0 g.
- total fungi per 1,0 g		Cel mult 10 ² .
- <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> per 1,0 g		Absenți.
- Enterobacterii		Cel mult 10 ² .
Dozare	Metoda spectrofotometrică	Totalul de flavonoide, exprimat în echivalentul rutozidei, cel puțin 11%.
Conservare	FR, ed. X, p. 421, „Extracta”	În recipient închis etanș, ferit de lumină, la temperatura de cel mult +25°C.

Preparare. Extractul uscat se obține prin utilizarea metodei de macerare repetată, cu agitare. 10,0 g produs vegetal (*Hyperici flores*) se tratează cu 5 porțiuni de alcool etilic de 80% a câte 200 ml (1:20). Durata unui ciclu de extracție – 60 de minute. După fiecare extracție, lichidul extractiv se separă de reziduul vegetal. Frațiunile de soluții extractive se unesc și se păstrează timp de 5-6 ore la temperatura de +5°C, apoi se filtrează prin hârtia de filtru *Whatman* nr. 2, la vid. Pentru concentrarea soluțiilor extractive se utilizează evaporatorul rotativ. Evaporarea solventului se realizează la temperatura de +40°C. Reziduul se usucă la vid.

Descriere. Conform cerințelor incluse în monografia *Extracta* din *FR*, ed. X, p. 420. Extract uscat din flori – pulbere brun-purpurie, higroscopică, cu un miros balsamic, plăcut, gust amar, astringent.

Identificare

Analiza calitativă prin cromatografie în strat subțire (CSS)

Identificarea compușilor activi, din diverse grupuri chimice (flavonoide, derivați de antracen, acizi fenolici), se realizează conform cerințelor stipulate în *Farmacopeea Europeană*, ed. 6, supliment 6.2, 07/2008:1874 și în *Farmacopeea Belarusă*, Vol. II, 2009, monografia *Hyperici herba*.

Soluție test: 0,25 g de extract uscat se dizolvă în 10 ml alcool etilic de 80%.

Substanțe de referință: soluții de 0,1% de rutozidă, hiperozidă, luteolină, cvercetrozidă, izocvercetrozidă, cvercetol, apigenă, apigenin-7-glucozidă, biapigenină, acid clorogenic, acid cafeic și de hipericină.

Faza staționară: Plăci de sticlă (20×20 cm), acoperite cu silicagel, cu un indicator de fluorescență.

Faza mobilă: acetat de etil:acid formic:apă (6:9:90).

Migrare: 10-13 cm.

Uscarea plăcilor: la temperatura de 100-105°C timp de 10 minute.

Detecție: pulverizarea plăcii cu o soluție de difenil-boriloxietilamină (10 g/l), în metanol, și cu soluția de macrogol 400, în metanol (50 g/l). După 30 de minute se examinează placa în lumină UV, la lungimea de undă de 366 nm.

Reacții calitative

Reacții de identificare a substanțelor tanante

Pregătirea soluțiilor de analizat. La 0,01 g de extract uscat s-a adăugat 10 ml de alcool etilic de 70%; amestecul s-a agitat până la dizolvarea completă, apoi s-a filtrat.

Reacția cu gelatină. La 2-3 ml de soluție se adaugă o soluție de gelatină de 1%. Apare opalescență, care dispare la adăugarea excesului de gelatină.

Reacția cu soluție de alăun de fier și amoniu. La 2-3 ml de soluție analizată se adaugă 4-5 picături de soluție de alaun de fier și amoniu. Substanțele tanante hidrolizabile formează un precipitat de culoare negru-albastră, iar cele condensate – un precipitat negru-verde.

Pierdere prin uscare (umiditatea)

Cel mult 5%. Se procedează conform prevederilor incluse în monografia din *Ph. Eu.*, ed. 6, 01/2008.2817, p. 256 și din *Extracta, FR*, ed. X, p. 421.

Într-o fiolă de cântărire, cu un dop rodat, uscată și cântărită în prealabil, se introduce 0,5 g de extract uscat, mărunțit. Fiola de cântărire (și capacul ei) cu proba supusă cercetării, se ține în etuvă, deschisă, la temperatura de 105°C timp de 3 ore. Apoi fiola se închide și se răcește, în exicator; după 1 oră se cântărește. Continuă uscarea pe perioade a câte 1 oră, urmată de răcire, în exicator, și de cântărire până la atingerea unei mase constante.

Umiditatea extractelor uscate s-a calculat în baza formulei:

$$X = (a - b) * 100/a,$$

în care:

X – umiditatea extractului uscat, %; a – masa extractului uscat, înainte de uscare, g;

b – masa extractului uscat, după uscare, g.

Solvenți organici reziduali. Conținutul de alcool etilic în extract - cel mult 0,5%. Conform cerințelor FS XIV, MF1.1.0008.15 *Solvenți organici reziduali*, alcoolul etilic se determină prin utilizarea metodei „Pierdere prin uscare”.

Metale grele. Cel mult 0,04%. Se procedează conform prevederilor stipulate în *Extracta* (FR, ed. a X-a, p. 419) și conform prevederilor de „Control al limitelor pentru impurități anorganice” (FR, ed. a X-a, IX. C.13).

Contaminare microbiană

Cercetările se efectuează conform cerințelor incluse în *Ph. Eu.*, ed. 6, 5.1.4, p. 529.

Per 1,0 g de extract uscat se admite prezența a cel mult 10⁴ microorganisme aerobe și a cel mult 10² fungi (*Ph. Eu.*, ed. 6, 2.6.12); a cel mult 10², per 1,0 g de extract uscat, de enterobacterii și de bacterii gram-negative (*Ph. Eu.*, ed. 6, 2.6.13). În *Ph. Eu.*, ed. 6, 2.6.13, se recomandă absența de *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Dozare

Tehnica de lucru. 0,01 g de extract uscat (probă exactă) se dizolvă într-un balon cotat de 10 ml, cu 5 ml de alcool etilic de 70%, apoi extractul hidroetanolic se aduce la cotă cu același

solvent (soluția A). Soluția obținută se trece prin hârtia de filtru (linia albastră). Ulterior, din soluția A se pregătesc soluțiile de analizat și de referință.

Prepararea soluției de analizat: 1 ml de soluție A se introduce într-un balon cotat de 25 ml, la care se adaugă 1 ml de soluție alcoolică de AlCl_3 de 3% și suplinește cu alcool etilic de 95%, până la cotă (soluția de analizat B). **Prepararea soluției de referință:** 1 ml de soluție A se transferă într-un balon cotat, cu o capacitate de 25 ml, la care se adaugă o picătură de acid acetic și se aduce la cotă cu alcool etilic de 95%; conținutul se omogenizează. Concomitent se pregătește soluția-standard de rutozidă.

Prepararea soluției-standard de rutozidă. 0,0250 g (masă exactă) de rutozidă se trec în balon cotat cu capacitatea de 50 ml, se dizolvă în 20 ml alcool etilic 70%, volumul soluției se aduce la cotă cu același solvent și se omogenizează (soluția A). 1 ml de soluție A se trece în balon de 25 ml, la care se adaugă 1 ml de soluție alcoolică de AlCl_3 de 3% și se completează cu alcool etilic de 95% până la cotă (soluția de analizat B). **Prepararea soluției de referință:** 1 ml de soluție A se transferă în balon cu capacitate de 25 ml la care se adaugă o picătură de acid acetic, la cotă se aduce cu alcool etilic de 95%, conținutul se omogenizează.

Absorbanța se citește peste 40 de minute, la lungimea de undă de 412 nm. Concentrația procentuală a totalului de flavonoide, în extractul uscat, se calculează utilizând formula:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 10 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 50 \cdot 25 \cdot 1 \cdot (100 - w)},$$

în care:

A – absorbanța soluției de analizat de extract uscat, nm; A_0 – absorbanța soluției-standard de rutozidă, nm; m – masa extractului uscat, g; m_0 – masa substanței-standard de rutozidă, g; w – pierderea prin uscare a extractului uscat, %.

Șefa Catedrei de farmacognozie și botanică
farmaceutică, profesor universitar,
doctor habilitat în științe biologice

Calalb Tatiana
„30” iunie 2021

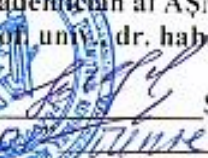
Absolventa doctoratului,
Catedra de farmacognozie
și botanică farmaceutică

Benea Anna
„30” iunie 2021

Anexa 7. Acte de implementare a inovațiilor



Instituție Publică
USMF „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova
Institutul Național de Cercetare în Medicină și Sănătate

APROB
Prorector pentru activitate de cercetare,
USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
academician al AȘM,
prof. univ., dr. hab. șt. med.

Stanislav GROPPA
2021

ACTUL nr. 30
DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI
(în procesul științifico-practic)

1. Denumirea ofertei pentru implementare: **“EVALUAREA INOFENSIVITĂȚII EXTRACTELOR USCATE DIN *HYPERICUM PERFORATUM* L. PRIN DETERMINAREA TOXICITĂȚII ACUTE”**
2. Autorii: BENEĂ Anna, asist. univ. cerc. șt.; PARII Sergiu, dr. șt. med., conf. univ. cerc. șt. coordonator; Nicolae Eugeniu cerc. șt.
3. Numarul inovației: Nr. 5846 din 01 iunie 2021
4. Unde și când a fost implementată: În activitatea științifico-practică a Centrului Științific al Medicamentului
5. Eficacitatea implementării: Cercetarea comparativă a inofensivității extractelor uscate, obținute din flori și părți aeriene a speciei *Hypericum perforatum* L., recoltate din flora spontană și CȘCPM USMF „Nicolae Testemițanu”, a fost efectuată prin determinarea toxicității acute, utilizând metoda dozelor fixe. Administrarea intragastrală și intraperitoneală a soluțiilor, cu diverse concentrații, a dus la un număr redus de decese al animalelor. Examenul macroscopic al organelor interne nu a prezentat modificări structurale.
6. **Rezultatele:** Cercetările farmacologice ale toxicității acute a extractelor uscate polifenolice, obținute din produsele vegetale *Hyperici herba*, *Hyperici flores* colectate din flora spontană și din colecția CȘCPM conform ghidului TG 423 (Acute Toxic Class Method), recomandată de Organizația Economică pentru Cooperare și Dezvoltare (OECD), au demonstrat toxicitate redusă, fiind clasificate ca practic inofensive (clasa de toxicitate 5 $LD_{50} > 5000$ mg/kg), iar proba extract uscat *Hyperici flores* din produs vegetal cultivat, corespunde clasei 5 de toxicitate cu LD_{50} 2500 mg/kg

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Director Centru Științific al Medicamentului
prof. univ., dr. hab. șt. farm.

Vladimir VALICA

Șef Departament Cercetare,
conf. univ., dr. hab. șt. med.,

Elena RAEVSCHI



Instituție Publică
USMF „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova
Institutul Național de Cercetare în Medicină și Sănătate

APROB

Prorector pentru activitate de cercetare,
USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
academician al AȘM,
prof. univ., dr. hab. și med.

Stanislav GROPPA

2021

ACTUL nr. 31

DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI

(în procesul științifico-didactic)

1. Denumirea ofertei pentru implementare: „EXTRACTELE USCATE DIN *HYPERICI FLORES* ȘI *HYPERICI HERBA* CU EFECT ANTIMICROBIAN ASUPRA BACTERIILOR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ȘI *ENTEROCOCCUS FAECALIS*”
2. Autorii: BENEĂ Anna, asist. univ., SAVA Veronica, cere. št., CIOBANU Nicolae, dr. št. farm., conf. univ., CIOBANU Cristina, dr. št. farm., conf. univ., COJOCARU-TOMA Maria, dr. št. farm., conf. univ.
3. Numarul inovației: Nr. 5847 din 01 iunie 2021.
4. Unde și când a fost implementată: în procesul didactic la Catedrele de farmacognozie și botanică farmaceutică, farmacologie și farmacie clinică, în perioada 2019– 2021 aa.
5. Eficacitatea inovației: Cercetarea efectului antibacterian a extractelor uscate, obținute din produsele vegetale de *Hypericum perforatum* L. (*Hyperici flores*, *Hyperici herba*), s-a efectuat prin metoda diluțiilor în serie în mediu nutritiv lichid. Efectul antibacterian s-a dovedit a fi mai pronunțat către bacterii Gram-pozitive *Staphylococcus aureus* și *Enterococcus faecalis*. Concentrația minimă de inhibiție a extractului din flori față de *S. aureus* (209-P) a fost în concentrație de 37,5 μg/ml și față de *E. faecalis* (ATCC 19433) în concentrație de 75 μg/ml; iar pentru extract din părțile aeriene – 150 μg/ml față de *S. aureus* (209-P) și 300 μg/ml față de *E. faecalis* (ATCC 19433). Concentrația minimă bactericidă a extractului din flori către *S. aureus* (209-P) și *E. faecalis* (ATCC 19433) a fost în concentrație de 300 μg/ml, iar pentru extractul din părțile aeriene către ambele test-culturi bacteriene a fost 437,5 μg/ml.
6. Rezultatele: Cercetările acțiunii antibacteriene a extractelor uscate obținute *Hyperici flores* și *Hyperici herba*, recolectate din flora spontană a Republicii Moldova, au permis de a califica aceste produse extractive cu un nivel înalt de acțiune bacteriostatică și bactericidă față de bacterii Gram-pozitive *Staphylococcus* și *Enterococcus faecalis*.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Șef Catedră de farmacognozie și botanică farmaceutică,
dr. hab. št. biol., prof. univ.

Tatiana CALALB

Departamentul didactic
conf. univ., dr. št. med.

Silvia STRATULAT

Șef Departament Cercetare,
dr. hab. št. med., conf. univ.

Elena RAEVSCHI



Instituție Publică
USMF „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova
Institutul Național de Cercetare în Medicină și Sănătate

APROB

Prorector pentru activitate de cercetare,
USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
academician al AȘM,
prof. univ., dr. hab. șt. med.



Stanislav GROPPA
2021

ACTUL nr. 32

DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI

(în procesul științifico-practic, didactic)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** „OPTIMIZAREA METODEI DE MACERARE FRAȚIONATĂ CU AGITARE ÎN OBTINEREA EXTRACTULUI USCAT DIN FLORI DE *HYPERICUM PERFORATUM*”
2. **Autorii:** BENEĂ Anna, asist.univ., cerc. șt., CIOBANU Cristina dr. șt. farm., conf. univ., CIOBANU Nicolae, dr. șt. farm., conf. univ.
3. **Numarul inovației:** Nr. 5848 din 01 iunie 2021.
4. **Unde și când a fost implementată:** În activitatea științifico-practică la Centrul Științifico-Practic în domeniul Plantelor Medicinale „Nicolae Testemițanu”, în procesul didactic la Catedra de tehnologie a medicamentelor, în perioada aa. 2019-2021.
5. **Eficacitatea inovației:** Metoda de macerare fracționată cu agitare permite epuizarea completă a materiei prime în timp scurt, deoarece se menține în mod constant diferență mare de concentrație între materia primă și solvent de extracție. Experimental s-a demonstrat, că valorile masei totale a extractului, randamentului total, eficacității de extracție a substanțelor solubile în alcool etilic 80%, totalul de flavonoide și de polifenoli au fost mai înalte în extractul uscat cu timpul de extracție a unui ciclu 60 min., ce denotă despre eficacitatea extractivă a metodei optimizate.
6. **Rezultatele:** S-au stabilit unii parametri optimali pentru obținerea extractului uscat din flori de sunătoare prin metoda de macerare fracționată cu agitare: extragentul – alcool etilic 80%; timpul extracției – 5 ore; numărul de fracții – 5, cu durata unui ciclu de extracție 60 min; raportul dintre produsul vegetal și solvent 1:20.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Șef Centrul Științifico-Practic în Domeniul Plantelor Medicinale,
dr. șt. biol., conf. univ.

Ion UNGUREANU

Departamentul didactic
conf. univ., dr. șt. med.

Silvia STRATULAT

Șef Departament Cercetare,
dr. hab. șt. med., conf. univ.

Elena RAEVSCHI

Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5219

Pentru inovația cu titlul

**Uleiul eteric din pojarniță cu efect
antistafilococic**

19.02.2013

Inovația a fost înregistrată pe data de
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**Benea Anna, Dizdari Ana,
Sava Veronica**

16.05.2013

Data eliberării

(Semnătura autorizată)



Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5846

Pentru inovația cu titlul
**EVALUAREA INOFENSIVITĂȚII EXTRACTELOR
USCATE DIN *HYPERICUM PERFORATUM* L. PRIN
DETERMINAREA TOXICITĂȚII ACUTE**

Inovația a fost înregistrată pe data de
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

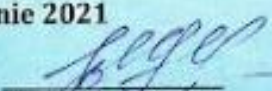
Se recunoaște calitatea de autor(i)

BENEA Anna,

PARII Sergiu, NICOLAI Eugeniu



Data eliberării 01 iunie 2021


(Semnătura autorizată)



Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5847

Pentru inovația cu titlul

**EXTRACTELE USCATE DIN *HYPERICI FLORES* ȘI
HYPERICI HERBA CU EFECT ANTIMICROBIAN
ASUPRA BACTERIILOR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
ȘI *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

Inovația a fost înregistrată pe data de
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**BENEA Anna, SAVA Veronica,
CIOBANU Nicolae, CIOBANU Cristina,
COJOCARU-TOMA Maria**



Data eliberării 01 iunie 2021


(Semnătura autorizată)





Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5848

Pentru inovația cu titlul
**OPTIMIZAREA METODEI DE MACERARE
FRACTIONATĂ CU AGITARE ÎN OBTINEREA
EXTRACTULUI USCAT DIN FLORI DE
HYPERICUM PERFORATUM L.**

Inovația a fost înregistrată pe data de
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**BENEA Anna,
CIOBANU Cristina, CIOBANU Nicolae**



Data eliberării 01 iunie 2021


(Semnătură autorizată)

Anexa 9. Certificatele de înregistrare a obiectelor dreptului de autor și a drepturilor conexe

REPUBLICA MOLDOVA

Agencia de Stat pentru
Proprietatea Intelectuala

CERTIFICAT
DE ÎNREGISTRARE A OBIECTELOR
DREPTULUI DE AUTOR ȘI DREPTURILOR CONEXE

SERIA O NR. 6918
DIN 02.06.2021

Eliberat în temeiul Legii nr.139/2010 privind dreptul de autor
și drepturile conexe, obiectul de pe verso a fost înregistrat în Registrul
de Stat al obiectelor protejate de dreptul de autor și drepturile conexe

Director General

CHIȘINĂU

Seria: O

Numărul de înregistrare: 6918

Data înregistrării: 14.05.2021

Numărul cererii: 1693

Denumirea obiectului: „CERCETĂRI FARMACOLOGICE A EXTRACTELOR
USCATE ȘI ULEIULUI VOLATIL DIN *HYPERICUM*
*PERFORATUM*L.”

Autori:

Benea Anna **IDNP:** 0972502325438

Parii Sergiu **IDNP:** 2000003057652

Titularul drepturilor patrimoniale:

Instituția Publică Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae
Testemițanu" din Republica Moldova **IDNO:** 1007600000794

EXTRAS

din Legea nr. 139/2010 privind dreptul de autor și drepturile conexe:

Art. 5 alin. (6): Protecția dreptului de autor se extinde asupra formei de exprimare, dar nu se extinde asupra ideilor, teoriilor, descoperirilor științifice, procedeeelor, metodelor de funcționare sau asupra conceptelor matematice ca atare și nici asupra invențiilor cuprinse într-o operă, oricare ar fi modul de preluare, explicare sau de exprimare.

L.S.



Șef Direcție Drept de Autor



REPUBLICA MOLDOVA

Agencia de Stat pentru
Proprietatea Intelectuala

CERTIFICAT

DE ÎNREGISTRARE A OBIECTELOR DREPTULUI DE AUTOR ȘI DREPTURILOR CONEXE

SERIA O NR. 6919

DIN 02.06.2021

Eliberat în temeiul Legii nr.139/2010 privind dreptul de autor
și drepturile conexe, obiectul de pe verso a fost înregistrat în Registrul
de Stat al obiectelor protejate de dreptul de autor și drepturile conexe



Director General

CHIȘINĂU

Seria: O

Numărul de înregistrare: 6919

Data înregistrării: 14.05.2021

Numărul cererii: 1694

Denumirea obiectului: „OBTINEREA ȘI STUDIUL CHIMIC
AL EXTRACTELOR USCATE DIN *HYPERICI*
HERBA ȘI HYPERICI FLORES”

Autori:

Benea Anna **IDNP:** 0972502325438

Ciobanu Nicolae **IDNP:** 0982503883950

Uncu Livia **IDNP:** 2000001061299

Titularul drepturilor patrimoniale:

Instituția Publică Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae
Testemițanu" din Republica Moldova **IDNO:** 1007600000794

EXTRAS

din Legea nr. 139/2010 privind dreptul de autor și drepturile conexe:

Art. 5 alin. (6): Protecția dreptului de autor se extinde asupra formei de exprimare, dar nu se extinde asupra ideilor, teoriilor, descoperirilor științifice, procedeeelor, metodelor de funcționare sau asupra conceptelor matematice ca atare și nici asupra invențiilor cuprinse într-o operă, oricare ar fi modul de preluare, explicare sau de exprimare.

L.Ș.

Șef Direcție Drept de Autor





REPUBLICA MOLDOVA

Agencia de Stat pentru
Proprietatea Intelectuala

CERTIFICAT

DE ÎNREGISTRARE A OBIECTELOR DREPTULUI DE AUTOR ȘI DREPTURILOR CONEXE

SERIA O NR. 6920

DIN 02.06.2021

Eliberat în temeiul Legii nr.139/2010 privind dreptul de autor
și drepturile conexe, obiectul de pe verso a fost înregistrat în Registrul
de Stat al obiectelor protejate de dreptul de autor și drepturile conexe



Director General

CHIȘINĂU

Seria: O

Numărul de înregistrare: 6920

Data înregistrării: 14.05.2021

Numărul cererii: 1695

Denumirea obiectului: „ANALIZA CHIMICĂ A PRODUSELOR VEGETALE
ȘI ULEIULUI VOLATIL DE LA SPECIILE
GENULUI *HYPERICUM* L.”

Autori:

Benea Anna **IDNP:** 0972502325438

Nistoreanu Anatolie **IDNP:** 0972712015745

Cojocaru-Toma Maria **IDNP:** 2000042302289

Titularul drepturilor patrimoniale:

Instituția Publică Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae
Testemițanu" din Republica Moldova **IDNO:** 1007600000794

EXTRAS

din Legea nr. 139/2010 privind dreptul de autor și drepturile conexe:

Art. 5 alin. (6): Protecția dreptului de autor se extinde asupra formei de exprimare, dar nu se extinde asupra ideilor, teoriilor, descoperirilor științifice, procedeelelor, metodelor de funcționare sau asupra conceptelor matematice ca atare și nici asupra invențiilor cuprinse într-o operă, oricare ar fi modul de preluare, explicare sau de exprimare.

L.S.



Șef Direcție Drept de Autor

Declarația privind asumarea răspunderii

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Numele, prenumele

Benea Anna

Semnătura

Data

CV-ul autorului



Nume și prenume Benea Anna

Cetățenie Republica Moldova

Studii

1997-2002 Licență Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, specialitatea Farmacie, calificarea Farmacist.

2002-2004 Diplomă de licență studii postuniversitare prin rezidențiat, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău (RM), specializarea Farmacognozie.

2011-2014 Doctorat, forma cu frecvență redusă, Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”, specialitatea 316.01 – Farmacie.

Stagii Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș”, Disciplina

02-28.02.2017 Botanica farmaceutică, Disciplina Farmacognozie.

Domenii de interes științific Studiul farmacognostic al plantelor medicinale; analiza chimică a produselor vegetale și extractive din plante.

Participări în proiecte științifice naționale

2011-2014 Cercetător științific, Proiect instituțional 11.817.09.14A „Studiul biologic și fitochimic al plantelor medicinale cu acțiune hepatoprotectoare și antimicrobiană”, AȘM.

2015-2019 Cercetător științific, Proiect instituțional 15.817.04.35A „Studiul biologic și fitochimic al plantelor medicinale cu acțiune antioxidantă, antiinflamatoare și hepatoprotectoare”, AȘM.

2020-2023 Cercetător științific, Proiect de cercetare din cadrul Programului de Stat: „Studiul biologic și fitochimic al plantelor medicinale cu acțiune antioxidantă, antimicrobiană și hepatoprotectoare” 20.80009.8007.24, Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare.

2020-2023 Proiect de cercetare din cadrul Programului de Stat: „Diminuarea consecințelor schimbărilor climatice prin crearea, implementarea soiurilor de plante medicinale și aromatice cu productivitate înaltă, rezistente la secetă, iernare, boli, ce asigură dezvoltare sustenabilă a agriculturii, garantează produse de calitate superioară, predestinate industriei de parfumerie, cosmetică, farmaceutică, alimentară” 20.80009.5107.07, Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare.

Participări la foruri științifice

● Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених, присвячена 155-річчю з дня народження В. В. Підвисоцького, Одеса, Україна, 19-20 квітня 2012;

internaționale și naționale	● 4th International Medical Congress for Students and Young Doctors MedEspera, USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republic of Moldova, 12-14 may 2012; ● Conferința științifică internațională „Museum and scientific research”, Croiova, România, 12-14 septembrie 2013; ● Conference „Phytochemicals in Medicine and Pharmacognosy”, Piatra-Neamt, România, 27-30 april 2014; ● XXIIIth International Congress “Phytopharm 2019 ”, Saint-Petersburg, Russia, juli 1-3, 2019; ● Zilele Universității și Conferința științifico-practică anuală a IP USMF “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015; ● Conferința științifică națională cu participare internațională „De la <i>design</i>-ul medicamentului la calitate și inofensivitate”, în memoria profesorului Filip Babilev „80 ani de la naștere”, Chișinău, Republica Moldova, 11 noiembrie 2016; ● 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” desfășurată la Chișinău, 31 ianuarie 2020 în cadrul Proiectului bilateral Internațional moldo-belarus; ● Conferința științifico-practică națională cu participare internațională „Actualități și perspective în studiul farmaceutic al plantelor medicinale”, Chișinău, 01-02 octombrie, 2021; ● Conferința științifică anuală „Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță”, 20-22 octombrie 2021.
Lista publicațiilor	În baza materialelor tezei, au fost publicate 25 de lucrări științifice, dintre care 10 articole, 4 publicații de monoautor, 1 publicație în revistă din bazele de date SCOPUS, 1 publicație în revistă internațională (categoria B+), 1 publicație în revistă națională (categoria B), 15 teze în culegeri științifice, naționale și internaționale.
Cunoașterea limbilor	Română, rusă (limbă maternă), engleza – B1.
Date de contact de serviciu (adresa, telefon, email)	Adresa: Str. Malina Mică, 66, MD-2020, Chișinău, Republica Moldova Telefon: +373 22 205 495, +373 69280775 e-mail: anna.benea@usmf.md