

**UNIVERSITATEA „BABEȘ - BOLYAI” CLUJ - NAPOCA**

**Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică**

**Școala Doctorală de Chimie**

**STUDIUL IZOLĂRII ȘI SINTEZEI UNOR PRODUSI  
FITOCHIMICI DE IMPORTANȚĂ FARMACOLOGICĂ**

**Rezumatul tezei de doctorat**

**Conducător științific**

**Prof. dr. Ioan Oprean**

**Doctorand**

**Ing. dr. Dorin Manciula**

**Cluj-Napoca**

**Septembrie 2013**

## **COMISIA**

### **Președinte**

**Prof. dr. Luminița Silaghi-Dumitrescu** - Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea „Babeș-Bolyai”, Cluj-Napoca

### **Conducător științific**

**Prof. emerit dr. Ioan Oprean** - Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea „Babeș-Bolyai”, Cluj-Napoca

### **Referenți**

**Prof. dr. Mircea Tămaș** - Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hașeganu”, Cluj-Napoca

**Conf. dr. ing. Radu Mișca** - Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea „Babeș-Bolyai”, Cluj-Napoca

**Conf. dr. Zoița Berinde** - Facultatea de Științe, Universitatea de Nord, Baia Mare

Data susținerii publice: 17 Septembrie 2013

# CUPRINS

## INTRODUCERE

Motivația cercetării. Scop și obiective. Modul de realizare a tezei.	2
--	---

## PARTEA I. ISTORIC ȘI DATE DE LITERATURĂ

### Cap. 1. CONSIDERAȚII PRIVIND UTILIZAREA PLANTELOR MEDICINALE

1.1. Prezentare generală	5
1.2. Tradiții românești privind utilizarea plantelor medicinale	6
1.3. Clasificarea plantelor medicinale	8
1.4. Principalii factori care determină calitatea plantelor	8

### Cap. 2. CONSIDERAȚII ASUPRA NEOPLASMELOR MALIGNNE, FORMAȚIUNILOR TUMORALE CANCEROASE ȘI A VIRUSULUI IMUNODEFICIENȚEI UMANE, (HIV)

2.1. Neoplasme maligne și formațiuni tumorale canceroase	9
2.2. Virusul imunodeficienței umane, (HIV)	9

### Cap. 3. CONSIDERAȚII PRIVIND COMPUȘII NATURALI BIOLOGIC ACTIVI ȘI SPECIILE VEGETALE VIZATE CA MATERIE PRIMĂ PENTRU IZOLAREA LOR

3.1. Acidul betulinic	10
3.1.1. Activitatea farmacodinamică a acidului betulinic	10
3.1.2. Sinteza compușilor derivați din acidul betulinic	12
3.2. Acidul ursolic	14
3.2.1. Activitatea farmacodinamică a acidului ursolic	15
3.2.2. Sinteza compușilor derivați din acidul ursolic	16
3.3. Materialul vegetal utilizat ca materie primă în vederea izolării acidului betulinic	17
3.3.1. Specia <i>Betula pendula</i> Roth, (Betulaceae)	17
3.4. Materialele vegetal utilizate ca materie primă în vederea izolării acidului ursolic	20
3.4.1. Specia <i>Calluna vulgaris</i> (L) Hull, (Ericaceae)	20
3.4.2. Specia <i>Bruckenthalia spiculifolia</i> , Salisb., (Ericaceae)	22

## **Cap. 4. METODE ȘI TEHNICI LA EXTRAȚIA ȘI SEPARAREA COMPUȘILOR BIOLOGIC ACTIVI DIN MATERIALE VEGETALE PROASPETE ȘI USCATE**

<b>4.1.</b> Considerații generale privind extracția solid-lichid	23
4.1.1. Separarea compușilor din produse naturale	24

## **Cap. 5. CONSIDERAȚII FENOMENOLOGICE ȘI PRACTICE LA REALIZAREA EXTRAȚIEI DIN MATERIALE VEGETALE**

<b>5.1.</b> Fenomenologia procesului de extracție solid-lichid	25
5.1.1. Echilibrul de dizolvare	29
5.1.2. Selectivitatea și gradul de extracție	30
5.1.3. Cinetica și fenomenologia dizolvării solidelor din materiale poroase	35
5.1.4. Relații criteriale la dizolvare-extracție	37
5.1.5. Identificarea etapei determinante de viteză	46
5.1.6. Transferul de proprietate la extracția cu fluide	47
<b>5.2.</b> Factorii care influențează extracția solid-lichid	48
<b>5.3.</b> Fenomene principale la extracția solid-lichid	50

## **PARTEA II. CONTRIBUȚII ORIGINALE**

### **Cap. 6. EXTRAȚIA ACIZILOR BETULINIC ȘI URSOLIC DIN MATERIALE VEGETALE ȘI CARACTERIZAREA ACESTORA**

<b>6.1.</b> Prepararea materialului vegetal	55
6.1.1. Recoltarea	56
6.1.2. Sortarea	56
6.1.3. Uscarea	57
6.1.3.1. Uscarea naturală	57
6.1.3.2. Uscarea artificială	58
6.1.3.3. Ridicarea curbelor de uscare	64
6.1.3.4. Determinarea punctelor critice și a vitezei de uscare	64
6.1.3.5. Determinarea coeficienților de transfer de masă la uscare	77
6.1.3.6. Identificarea structurii materialului vegetal	78
6.1.4. Mărunțirea materialului vegetal	79

6.1.4.1. Clasarea materialului vegetal	80
<b>6.2. Extracția acizilor betulinic și ursolic</b>	<b>86</b>
6.2.1. Extracția acidului betulinic din specia <i>Betula pendula</i>	89
6.2.1.1. Extracția acidului betulinic prin procedeul cu contact multiplu	89
6.2.1.2. Extracția acidului betulinic prin procedeul macerării	92
6.2.1.3. Extracția acidului betulinic în prezența ultrasunetelor	94
6.2.1.4. Extracția acidului betulinic în câmp de microunde	101
6.2.2. Extracția acidului ursolic din specia <i>Bruckenthalia spiculifolia</i>	109
6.2.2.1. Extracția acidului ursolic prin procedeul macerării	109
6.2.2.2. Extracția acidului ursolic în prezența ultrasunetelor	112
6.2.2.3. Extracția acidului ursolic în câmp de microunde	116
6.2.3. Extracția acidului ursolic din specia <i>Calluna vulgaris</i>	120
6.2.3.1. Extracția acidului ursolic prin procedeul discontinuu	120
6.2.3.2. Extracția acidului ursolic prin procedeul macerării	128
6.2.3.3. Extracția acidului ursolic în prezența ultrasunetelor	131
6.2.3.4. Extracția acidului ursolic în câmp de microunde	134
6.2.3.5. Izolarea acidului ursolic prin procedeul Soxhlet	137
<b>6.3. Separarea, identificarea și cuantificarea acizilor betulinic și ursolic din extractele vegetale</b>	<b>139</b>
<b>6.4. Studiul experimental al extracției solid-lichid prin analogie fenomenologică</b>	<b>151</b>

## **Cap.7. OBȚINEREA DERIVAȚILOR DE SINTEZĂ AI ACIZILOR BETULINIC ȘI URSOLIC**

<b>7.1. Sinteza derivaților substituiți ai acidului betulinic</b>	<b>156</b>
7.1.1. Studiul reacției de formare a compusului betulinoil-alanil-glicină	156
7.1.2. Studiul reacției de formare a compusului betulinoil-glicil-leucină	159
7.1.3. Studiul reacției de formare a compusului betulinoil-leucil-glicină	163
<b>7.2. Sinteza derivaților substituiți ai acidului ursolic</b>	<b>166</b>
7.2.1. Studiul reacției de formare a compusului ursoloil-alanil-glicină	166
7.2.2. Studiul reacției de formare a compusului ursoloil-glicil-leucină	170
7.2.3. Studiul reacției de formare a compusului ursoloil-leucil-glicină	174

**Cap. 8. TESTAREA BIOLOGICĂ A PRODUȘILOR DE DERIVATIZARE ÎN VEDEREA DETERMINĂRII ACTIVITĂȚII LOR BIOLOGICE**

<b>8.1. Potențarea activității biologice și a stabilității acizilor betulinic și ursolic</b>	178
<b>8.2. Evaluarea activității antiproliferative a compușilor nou sintetizați</b>	181

**PARTEA III. PARTEA EXPERIMENTALĂ**

**Cap. 9. PRELUCRAREA MATERIALULUI VEGETAL. EXTRACȚIA ACIDULUI BETULINIC. EXTRACȚIA ACIDULUI URSOLIC. TEHNICI ANALITICE. SINTEZA DERIVAȚILOR BETULINICI ȘI URSOLICI**

<b>9.1. Descrierea metodologiei de prelucrare primară a materialului vegetal</b>	187
<b>9.2. Descrierea metodologiei de extracție a acizilor betulinic și ursolic</b>	189
9.2.1. Extracția acidului betulinic din <i>Betula pendula</i> , (Betulaceae)	189
9.2.2. Extracția acidului ursolic din <i>Bruckenthalia spiculifolia</i> , (Ericaceae)	191
9.2.3. Extracția acidului ursolic din <i>Calluna vulgaris</i> , (Ericaceae)	192
<b>9.3. Tehnici analitice și echipamente</b>	194
<b>9.4. Separarea, identificarea și cuantificarea acizilor betulinic și ursolic din extractele vegetale alcoolice</b>	196
<b>9.5. Procedura „one-pot” în patru etape, de obținere a produșilor de condensare ai acizilor betulinic și ursolic</b>	196
<b>9.6. Măsurarea efectelor antiproliferative prin intermediul testului MTT</b>	201

<b>CONCLUZII GENERALE</b>	202
---------------------------	-----

<b>Anexe</b>	208
--------------	-----

**Bibliografie**

**Abrevieri**

**Lista compușilor sintetizați și testați biologic**

**Lista de lucrări**

**Cuvinte cheie:** acid betulinic, acid ursolic, dipeptide, produși fitochimici, compuși biologic activi.

## **INTRODUCERE**

### **Motivația cercetării**

Există un interes deosebit pentru utilizarea în terapeutică a unor plante medicinale care conțin principii activi eficienți împotriva cancerului și a virusului imunodeficienței umane, (HIV). Deși în ultimii ani s-au făcut progrese importante în cunoașterea și combaterea acestor boli, au rămas destule aspecte neelucidate care fac obiectul cercetărilor de specialitate. Costurile ridicate și disponibilitatea scăzută a terapiilor actuale pentru majoritatea populației din țările sărace, au determinat efectuarea unor cercetări intense bazate pe valorificarea potențialului terapeutic natural al plantelor medicinale și pe utilizarea tehnologiilor moderne de prelucrare a materialelor vegetale și a compușilor cu proprietăți biologice active.

De-a lungul cercetărilor efectuate la nivel mondial în domeniul agenților antitumorali și antivirali, au fost studiate și modificări structurale sau derivatizări ale compușilor din categoria terpenelor, din care fac parte și acizii betulinic și ursolic, demonstrându-se că printr-o modificare a structurii „părinte” se pot genera un număr important de potențiali derivați care îmbunătățesc semnificativ profilul toxicității selective. Din acest punct de vedere, triterpenele constituie o clasă promițătoare de agenți antitumorali și anti-HIV, modul lor de acțiune fiind asociat câtorva pași din ciclul de viață al celulei, inclusiv fuziunea, transcriptaza inversă și maturarea acestora.

Deși în ultimii ani numeroși derivați sintetici ai celor doi acizi au fost produși în încercarea de a mări activitatea acestora, lucrarea abordează posibilitatea obținerii unor derivați dipeptidici noi, capabili să protejeze membrana celulară și să inhibe dezvoltarea și maturarea formațiunilor tumorale, blocând formarea conexiunilor intercelulare și devenind astfel inhibitori ai fuziunii.

### **Scopul și obiectivele lucrării**

Lucrarea își propune efectuarea unui studiu teoretic și experimental asupra posibilității obținerii unor structuri de semisinteză, derivate din compuși naturali cu proprietăți bioactive și care ulterior să poată fi utilizate eventual ca precursori ai unor preparate cu proprietăți antitumorale și antivirale. Predecesorii derivaților sunt doi acizi organici, acidul betulinic și acidul ursolic, ambii cu proprietăți bioactive care fac parte din clasa triterpenelor pentaciclice, fiind înrudiți atât prin structura lor chimică, cât și prin efectele lor terapeutice.

Punctele de referință și obiectivele urmărite în cadrul acestui studiu sunt:

- extracția acidului betulinic, respectiv a acidului ursolic dintr-un număr de trei specii de plante prezente în flora noastră spontană și utilizate empiric: *Betula pendula*, Roth, (Betulaceae), (*Mesteacănul alb*), *Calluna vulgaris* (L) Hull, (Ericaceae), (*Iarba neagră*) și *Bruckenthalia spiculifolia*, Salisb., (Ericaceae), (*Coacăzul de munte*);
- utilizarea tehnicilor de uscare naturală și artificială prin convecție și în câmp de microunde pentru materialele vegetale proaspete și efectuarea unui studiu comparativ în vederea alegerii procedurii de uscare optim;
- prezentarea generală a procesului de extracție solid-lichid și a principalilor factori care îl influențează;
- studiul fenomenologic al procesului de extracție solid-lichid utilizat pentru recuperarea acizilor din materialul vegetal;
- propunerea unui model bazat pe analiza dimensională, pornind de la fenomenologia procesului de extracție și verificarea acestuia pe cale experimentală;
- derivatizarea acizilor betulinic și ursolic în vederea obținerii unor noi produși biologic activi, prin legarea lor pe cale chimică de compuși din clasa dipeptidelor: glicil-leucină, alanil-glicină, respectiv leucil-glicină, structuri care se găsesc în mod natural în compoziția fluidelor biologice, acestea îndeplinind rol de vector pentru componenta activă, spre zonele sau țesuturile infectate sau afectate de către unele formațiuni tumorale;
- investigarea procedurii de legare și testarea structurilor legate pe mai multe tipuri de celule canceroase / tumorale, în scopul evidențierii activității biologice a compușilor sintetizați și a efectelor lor terapeutice.



## DATE DIN LITERATURĂ

### 3. CONSIDERAȚII PRIVIND COMPUȘII NATURALI BIOLOGIC ACTIVI ȘI SPECIILE VEGETALE VIZATE CA MATERIE PRIMĂ PENTRU IZOLAREA LOR

#### 3.1. Acidul betulinic

Acidul (3 $\beta$ )-3-hidroxi-20(29)-lupen-28-oic sau acidul betulinic, (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>), (Fig. 3.1.1.a.), este un compus natural derivat din betulină, (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>), (Fig. 3.1.1.b.), o triterpenă pentaciclică care se găsește din abundența în coaja scoarței de mesteacăn, (Betula pendula, Betula costata, Betula ermanii), [1].

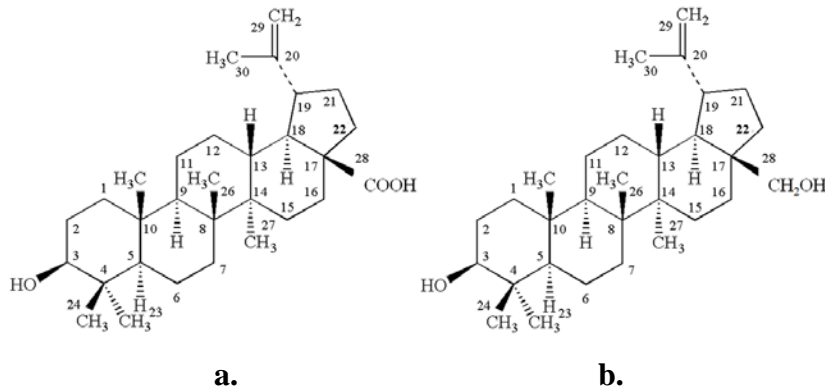


Fig. 3.1.1. a. Acidul betulinic b. Betulina

#### 3.1.1. Activitatea farmacodinamică a acidului betulinic

O mare varietate de proprietăți medicinale și acțiuni biologice au fost atribuite acidului betulinic, inclusiv proprietăți anticanceroase antitumorale, [2], antiinflamatorii, [3], antimicrobiene, [4], antiischemice, [5] antimalarice, [6], anti-HIV, [7], antimelanom, [8], citotoxice specifice pentru carcinomul pulmonar, [9], pentru cel al colonului, [9] și pentru tumorile neuroectodermice, [10]. În plus compusul dezvoltă și o acțiune antiangiogenică, [11], antileucemică și antilinfomatică, [12], fiind un bun inhibitor al tumorilor maligne cerebrale, [10] prin activarea directă a apoptozei la nivel mitocondrial, [13].

Capacitatea acidului betulinic de a induce apoptoza atât în melanoame, cât și indexul său terapeutic favorabil unei toxicități scăzute față de celulele normale, îi conferă acestuia o mare atractivitate, fiind un promițător agent antitumoral.

### 3.1.2. Sinteza compușilor derivați din acidul betulinic

De-a lungul cercetărilor efectuate la nivel mondial în domeniul agenților antitumorali, au fost studiate mai multe modificări structurale și derivatizări ale acidului betulinic, [14], demonstrându-se că printr-o simplă modificare a structurii părinte se pot genera un număr important de potențiali derivați care îmbunătățesc semnificativ profilul toxicității selective, [15], sau care pot induce un efect toxic general asupra celulelor leucemice, [15]. Acidul betulinic prezintă trei poziții: C<sub>3</sub>, C<sub>20</sub> și C<sub>28</sub> unde se pot efectua modificări chimice în vederea obținerii derivaților cu activitate antitumorală importantă.

### 3.2. Acidul ursolic

Acidul (3β)-hidroxi-urs-12-en-28-oic sau acidul ursolic, (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>), (Fig. 3.2.1.a.), este o triterpenă hidroxi-pentaciclică care manifestă o bună activitate chemoprotectivă pentru organismul uman, este larg răspândit în natură și se izolează din diferite extracte din plante, singur sau conjugat cu zaharuri. Alături de izomerul său, acidul (3β)-hidroxi-olean-12-en-28-oic sau acidul oleanolic, (Fig. 3.2.1.b.), acesta se găsește în numeroase plante, inclusiv cele care au fost folosite timp îndelungat în medicina tradițională, [16].

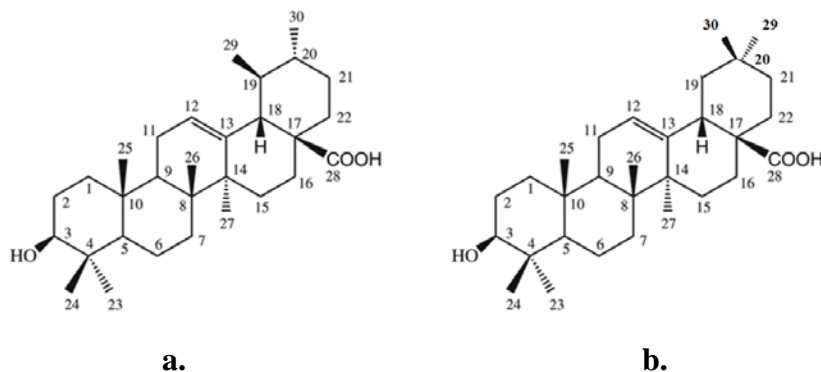


Fig. 3.2.1. a. Acidul ursolic b. Acidul oleanolic

#### 3.2.1. Activitatea farmacodinamică a acidului ursolic

Acidul ursolic prezintă proprietăți farmacologice remarcabile, cele mai importante constând în efecte antihiperlipidemice, [17], antiinflamatoare, [18], hepatoprotective, [19], inhibitorii ale proceselor de inițiere și proliferare a tumorilor, [20], analgezice, [21], cardiotonice, [22], sedative și anxiolitice, [23], antiulceroase, [24], antimicrobiene, [25], hipoglicemiante, [26], antiaterosclerotice, [27],

protective împotriva toxicității induse de ciclofosfamide, [28] și anticariogenice, [29], dar și efecte tonice și modulate a sintezei de colagen, [30]. Ca agent natural antiinflamator și antitumoral, acidul acționează prin inhibarea promotorilor tumorali și a proceselor inflamatoare datorate prezenței tumorilor.

### **3.2.2. Sinteza compușilor derivați din acidul ursolic**

La fel ca și în cazul acidului betulinic și acidul ursolic prezintă cele trei poziții: C<sub>3</sub>, C<sub>20</sub> și C<sub>28</sub> care în urma unor modificări chimice au furnizat o serie de derivați noi cu proprietăți biologice semnificative. În urma investigării unui număr de peste 70 de compuși și derivați sintetici ai acidului ursolic, s-a remarcat frecvența acțiunii lor biologice, de inhibare a proliferării și dezvoltării celulelor tumorale, fiind considerați potențiali agenți chemo-preventivi în diverse tipuri de cancer, [31].

### **3.3. Materialul vegetal utilizat ca materie primă în vederea izolării acidului betulinic**

În vederea extracției acidului betulinic a fost utilizată specia *Betula pendula* Roth, (Betulaceae), un arbore care se regăsește și sub numele de *mesteacăn*, *mastacăn*, sau *mesteacăn alb* și este specific zonelor deluroase până la etajul subalpin, putând însă coborî și la câmpie sau urca în zonele montane până la 1500 m pe coastele înșorite.

### **3.4. Materialele vegetale utilizate ca materie primă în vederea izolării acidului ursolic**

Extracția acidului ursolic s-a realizat din speciile *Calluna vulgaris* (L) Hull, (Ericaceae), cunoscută și sub denumirile populare de *iarbă neagră*, *coacăză*, *pernaj*, *tăulă*, *troșcoțel*, *mărtăloagă* sau *negruș*, [32], specifică regiunilor sub-montane și celor alpine și din specia *Bruckenthalia spiculifolia*, Salisb. (Ericaceae), cunoscută sub denumirea populară de *coacăz de munte*, specifică zonelor deschise sau împădurite din regiunea montană până în cea subalpină.

## CONTRIBUȚII ORIGINALE

### 6. EXTRACȚIA ACIZILOR BETULINIC ȘI URSOLIC DIN MATERIALE VEGETALE ȘI CARACTERIZAREA ACESTORA

Pentru realizarea unei separări cât mai eficiente a compușilor biologic activi din matricea vegetală, au fost respectate anumite etape tehnologice și determinate condițiile optime de lucru. În acest sens am conceput o schemă de operații în care etapele de lucru sunt prezentate în ordinea succesiunii lor, (Fig. 6.1.1.) și aplicată la extracția acizilor betulinic și ursolic din speciile vegetale *Betula pendula* Roth, (Betulaceae), *Bruckenthalia spiculifolia*, Salisb., (Ericaceae) și *Calluna vulgaris* (L) Hull, (Ericaceae).

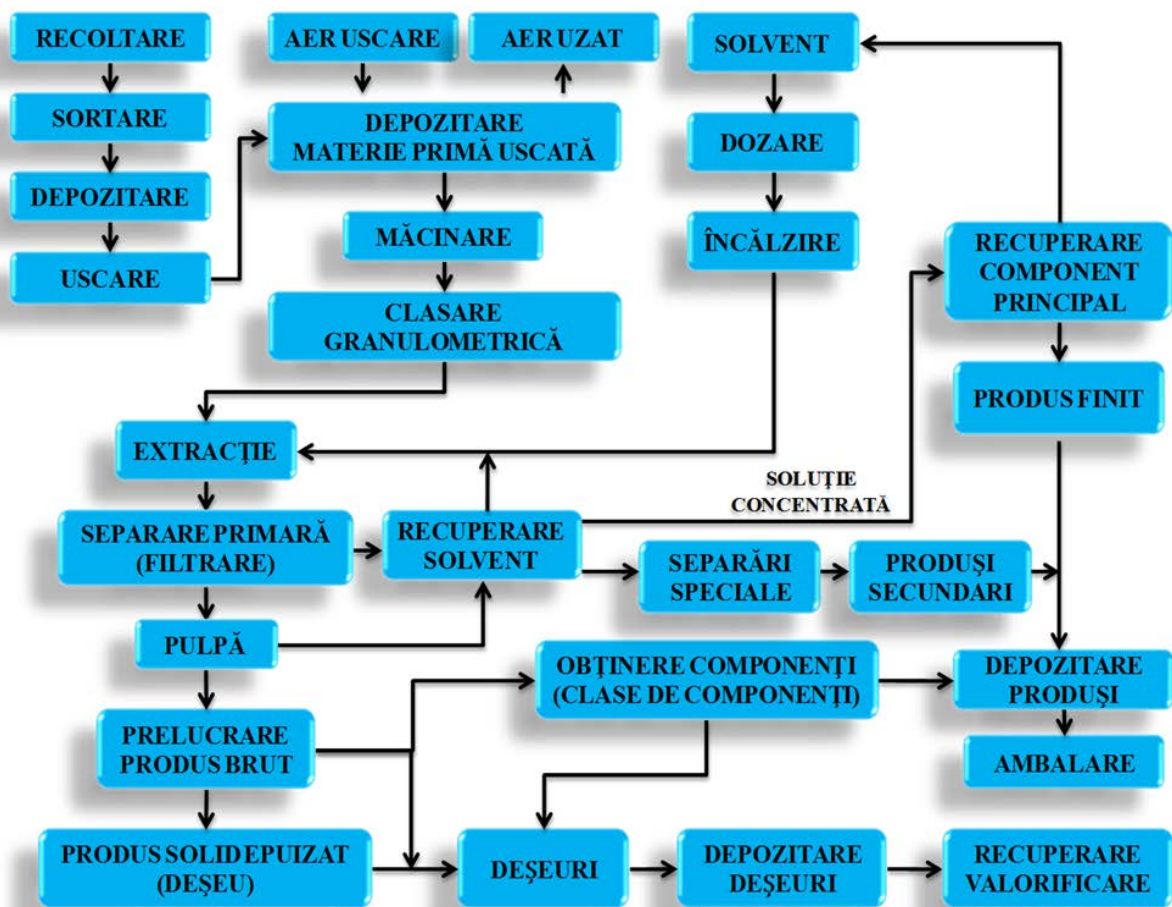


Fig. 6.1.1. Schema generală de operații corespunzătoare procesului de separare

### **6.1.3. Uscarea**

Uscarea materialului vegetal s-a realizat imediat după sortare pentru a împiedica declanșarea proceselor de degradare, procesul fiind realizat pe două căi, uscare naturală, respectiv uscare artificială.

#### **6.1.3.1. Uscarea naturală**

Uscarea naturală s-a efectuat imediat după recoltare și sortare, într-o încăpere bine aerisită și ferită de acțiunea directă a razelor solare. Pe toată durata procesului, materialul vegetal a fost cântărit zilnic, iar încăperea a fost monitorizată constant din punct de vedere termic și a umidității. S-a constatat după finalizarea procesului că viteza de uscare este puternic influențată de conținutul de apă din plante, dar și de forma, respectiv dimensiunile materialului vegetal.

#### **6.1.3.2. Uscarea artificială**

Uscarea artificială a fost realizată în două moduri:

- prin convecție, într-un spațiu prevăzut cu un sistem de încălzire și aerisire, folosind în acest scop o etuvă cu rafturi;
- în câmp de microunde, într-un spațiu prevăzut cu un sistem de generare a microundelor și cu ventilație.

În ambele cazuri, pe toată durata procesului materialul vegetal a fost cântărit periodic și monitorizat constant din punct de vedere al aspectului morfologic.

La uscarea prin convecție, după încetarea procesului de uscare și examinarea aspectului morfologic, nu s-a observat o degradare vizibilă a produsului vegetal, acesta neschimbându-și culoarea și mirosul, ci doar forma și dimensiunile.

Pentru uscarea în câmp de microunde am considerat ca fiind importanți pentru proces următorii parametri: temperatura, umiditatea materialului, puterea aplicată microundelor, timpul de expunere la câmpul radiativ și evoluția morfologică a materialului vegetal în timpul procesului sub acțiunea energiei microundelor.

În urma efectuării studiului comparativ privind uscarea materialelor vegetale prin cele trei metode, *uscarea liberă*, *uscarea în etuvă* și *uscarea în câmp de microunde*, am obținut date experimentale care au permis ridicarea și interpretarea curbelor de uscare pentru fiecare specie vegetală. Variația greutatea materialului vegetal după pierderea apei prin cele trei metode de uscare, pentru fiecare specie sunt reprezentate în figurile de mai jos, (Fig. 6.1.3 - 6.1.5).

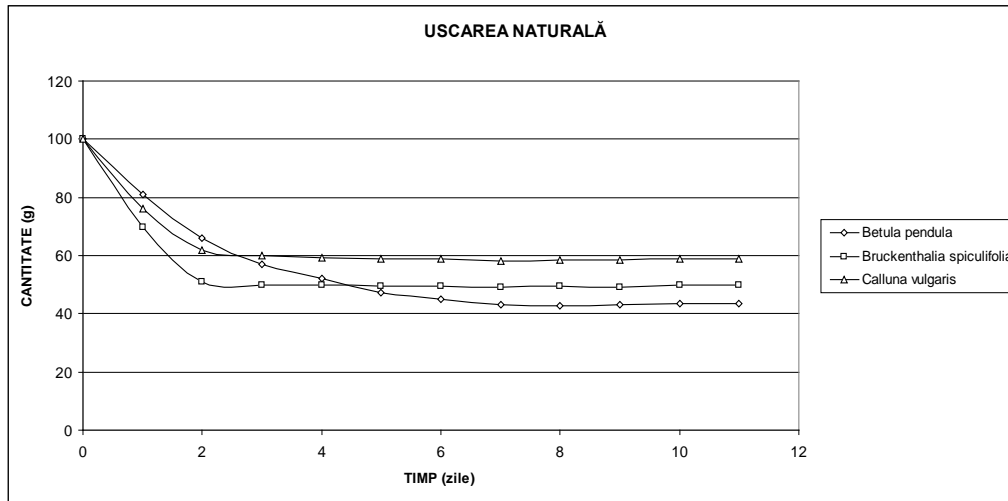


Fig. 6.1.3. Variația greutății materialului vegetal în urma pierderii apei prin uscare naturală

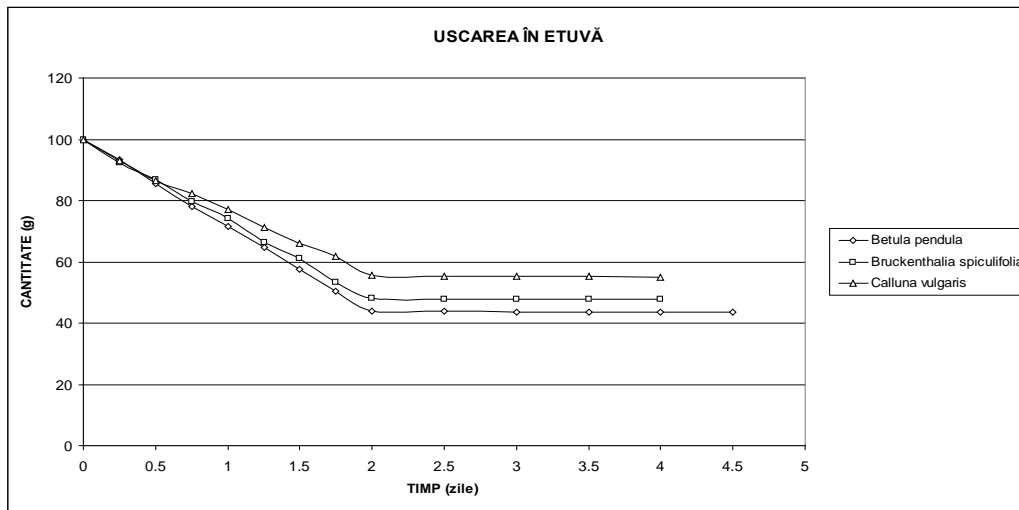


Fig. 6.1.4. Variația greutății materialului vegetal în urma pierderii apei prin uscare convectivă

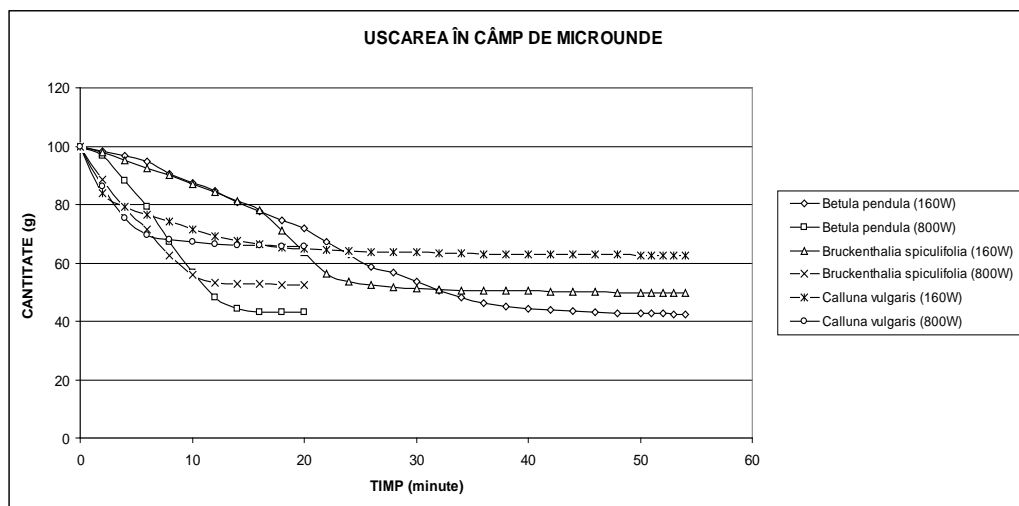


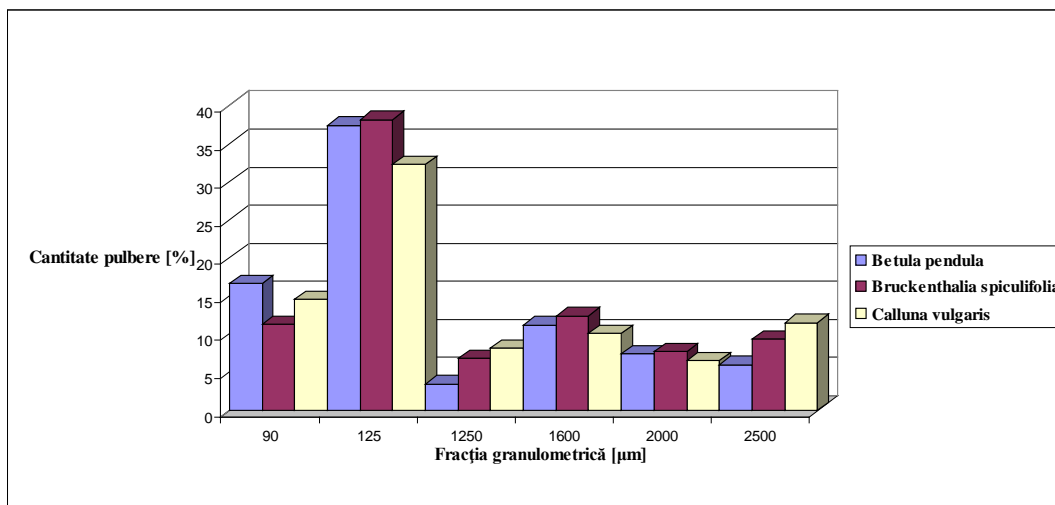
Fig. 6.1.5. Variația greutății materialului vegetal în câmp de microunde la 160 W și 800 W

Alegerea metodei optime de uscare pentru fiecare specie vegetală prelucrată s-a făcut după efectuarea studiului comparativ privind tehnicile de uscare utilizate și după interpretarea datelor experimentale, a diagramelor de uscare și considerând avantajele și dezavantajele pe care le implică fiecare din metodele de uscare aplicate experimental, (Tab. 6.1.20).

**Tab. 6.1.20.** Parametri pentru alegerea metodei optime de uscare a materialelor vegetale

SPECIA	USCAREA LIBERĂ	USCARE CONVECTIVĂ	USCARE ÎN CÂMP DE MICROUNDE
Betula pendula, (Betulaceae)	Durată proces: 8 zile Scădere în volum: 43,62 % Pierdere apă: 56,38 % Randament: 42,31 %	Durată proces: 2,5 zile Scădere în volum: 43,50 % Pierdere apă: 56,50 % Randament: 43,50 %	Putere: 160 W Durată: 50 min Scădere în vol.: 42,50 % Pierdere apă: 57,50 % Randament: 42,58 %
			Putere: 800 W Durată: 16 min Scădere în vol.: 43,10 % Pierdere apă: 56,90 % Randament: 43,12 %
Bruckenthalia Spiculifolia, (Ericaceae)	Durată proces: 4 zile Scădere în volum: 50,04 % Pierdere apă: 49,96 % Randament: 49,06 %	Durată proces: 2,5 zile Scădere în volum: 47,70 % Pierdere apă: 52,30 % Randament: 47,70 %	Putere: 160 W Durată: 42 min Scădere în vol.: 49,70 % Pierdere apă: 50,10 % Randament: 49,73 %
			Putere: 800 W Durată: 14 min Scădere în vol.: 52,50 % Pierdere apă: 47,50 % Randament: 52,57 %
Caluna vulgaris, (Ericaceae)	Durată proces: 5 zile Scădere în volum: 58,74 % Pierdere apă: 41,26 % Randament: 58,11 %	Durată proces: 2,5 zile Scădere în volum: 55,11 % Pierdere apă: 44,89 % Randament: 55,11 %	Putere: 160 W Durată: 40 min Scădere în vol.: 62,60 % Pierdere apă: 37,40 % Randament: 62,68 %
			Putere: 800 W Durată: 14 min Scădere în vol.: 65,50 % Pierdere apă: 34,50 % Randament: 65,52 %

Pentru caracterizarea materiei prime s-a efectuat un studiu granulometric asupra materialului vegetal uscat. Analiza granulometrică s-a realizat prin cernerea cu site standardizate, indicate de Farmacopeea Română, iar materialul cernut a fost apoi cântărit separat pe fracții granulometrice. Pe baza rezultatelor obținute s-a trasat histograma distribuției granulometrice în trepte, (Fig. 6.1.13).



**Fig. 6.1.13.** Distribuția granulometrică după cernerea materialelor vegetale

## 6.2. Extracția acizilor betulinic și ursolic

Tehnologiile de obținere și concentrare a produșilor bioactivi din speciile *Betula pendula* Roth, (Betulaceae), *Bruckenthalia spiculifolia*, Salisb., (Ericaceae) și *Calluna vulgaris*, (L.) Hull, (Ericaceae) au fost elaborate având la bază atât procedee clasice de extracție, cât și metode moderne de separare bazate pe câmpuri de surse radiative în medii naturale inerte, de tipul radiațiilor cu microunde și a radiațiilor ultrasonice, (Tab. 6.2.1.).

**Tab. 6.2.1.** Metodele experimentale utilizate la izolarea acizilor betulinic și ursolic

SPECIA VEGETALĂ	METODA DE SEPARARE	SOLVENT	COMPUS
<i>Betula pendula</i> , (Betulaceae)	Macerare	Alcool etilic	Acid betulinic
	Extracție simplă cu contact multiplu în condiții normale		
	Extracție prin ultrasonare		
	Extracție în câmp de microunde		
<i>Bruckenthalia spiculifolia</i> , (Ericaceae)	Macerare	Alcool etilic	Acid ursolic
	Extracție prin ultrasonare		
	Extracție în câmp de microunde		
<i>Calluna vulgaris</i> , (Ericaceae)	Macerare	Alcool etilic	Acid ursolic
	Extracție prin procedeul discontinuu		
	Extracție prin ultrasonare		
	Extracție în câmp de microunde		
	Extracție prin metoda Soxhlet	Eter de petrol, eter etilic, clorură de metilen	Acid ursolic



### 6.2.1. Extracția acidului betulinic din specia *Betula pendula*, (Betulaceae)

Procedeul de extracție a urmărit obținerea din frunzele uscate de mesteacăn, în condițiile impuse de contactul multiplu, macerare, de câmpul de ultrasunete și de câmpul de microunde, a unor extracte în care să se regăsească alături de acidul betulinic, cât mai puțini compuși co-extrași. Drept solvent s-a utilizat o soluție apoasă de alcool etilic, având concentrații diferite, de 30, 50, 60, 70, 80 și 95 %, în procente volumice.

#### 6.2.1.1. Extracția acidului betulinic prin procedeul cu contact multiplu

Extracția s-a efectuat la temperatura camerei, iar determinările s-au efectuat refractometric până la indice constant care reflectă atingerea echilibrului în condițiile de lucru, în urma lor observându-se că soluția cea mai eficientă este cea cu concentrația de 70 %, (Fig. 6.2.1.4).

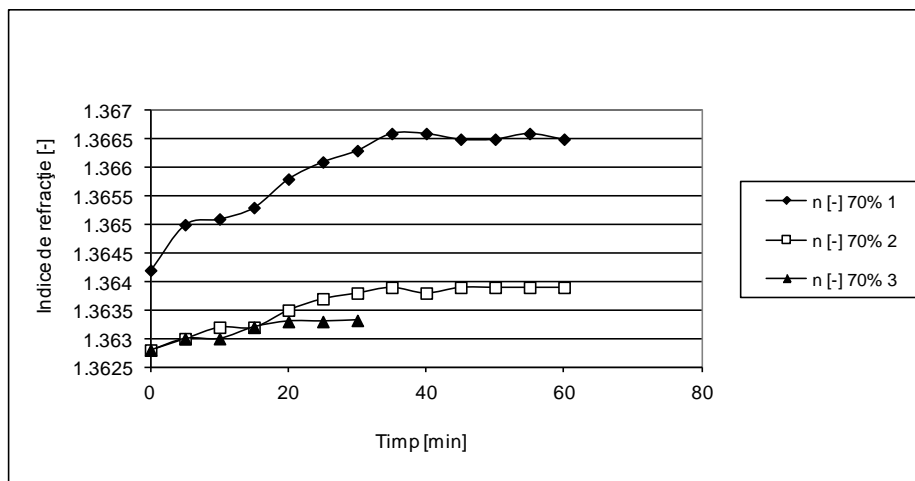


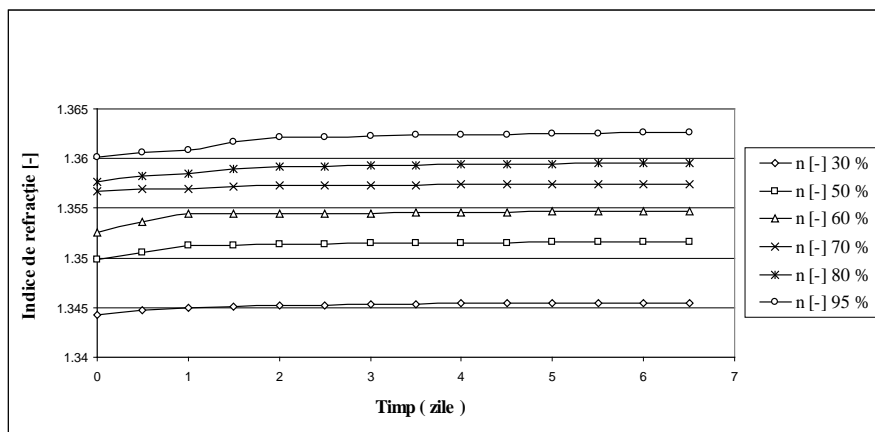
Fig. 6.2.1.4. Variația indicelui de refracție cu timpul de contact

#### 6.2.1.2. Extracția acidului betulinic prin procedeul macerării

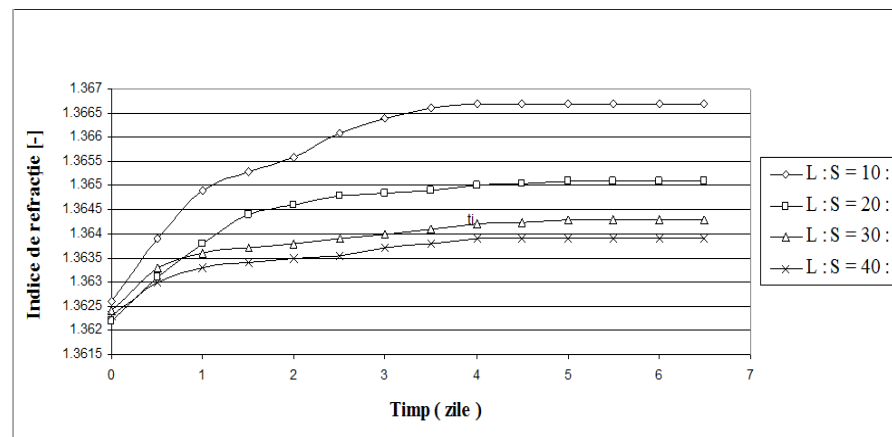
Studiul privind extracția acidului betulinic prin procedeul macerării s-a realizat urmărind influența mai multor parametri asupra procesului, (Fig. 6.2.1.5 - 6.2.1.7). Eficiența cea mai mare la extracție a avut-o concentrația solventului etanol-apă de 95 % pentru un raport L : S de (10 : 1), [ml : g] și fracția granulometrică - 1250  $\mu\text{m}$ .

#### 6.2.1.3. Extracția acidului betulinic în prezența ultrasunetelor

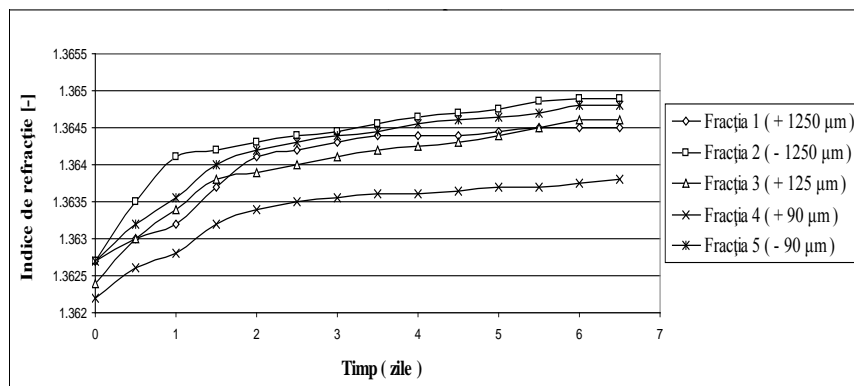
S-a studiat influența mai multor parametri asupra extracției, (Fig. 6.2.1.12 - 6.2.1.16) iar evoluția procesului a fost urmărită refractometric până la indice constant. S-au determinat parametrii optimi ai procesului, respectiv fracția + 125  $\mu\text{m}$ , raportul L : S de 10 : 1 (ml : g), concentrația solventului de 80 %, temperatura de 60  $^{\circ}\text{C}$  și timpul de contact de 55 minute.



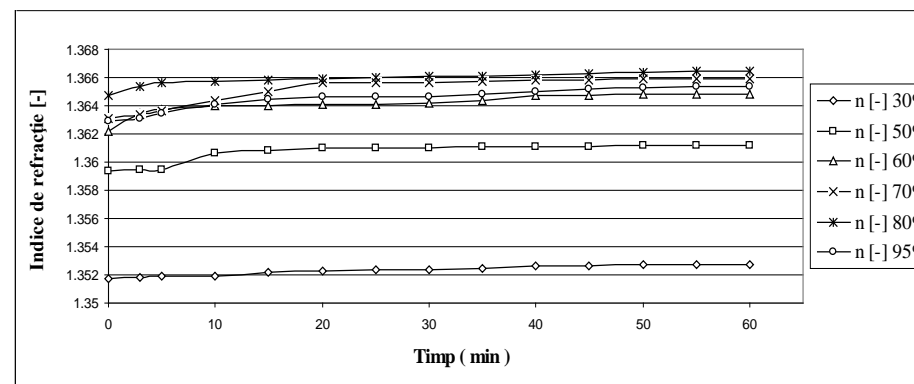
**Fig. 6.2.1.5.** Influența concentrației solventului asupra indicelui de refracție



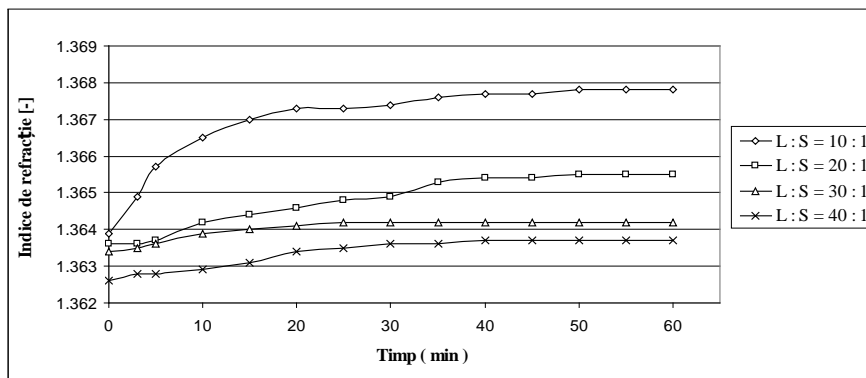
**Fig. 6.2.1.6.** Influența raportului lichid-solid asupra indicelui de refracție



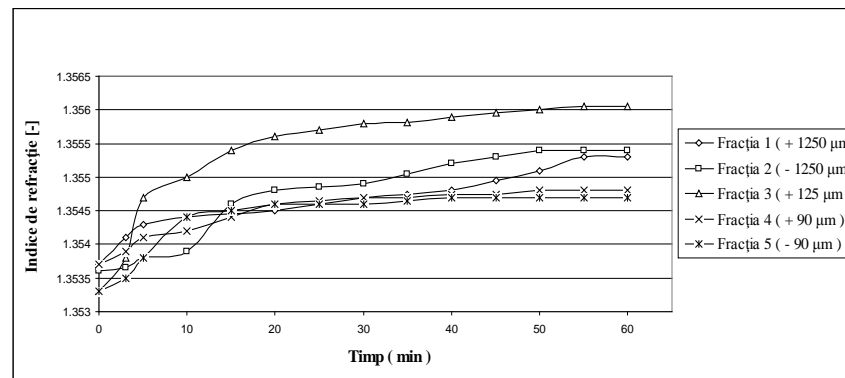
**Fig. 6.2.1.7.** Influența dimensiunii granulelor asupra indicelui de refracție



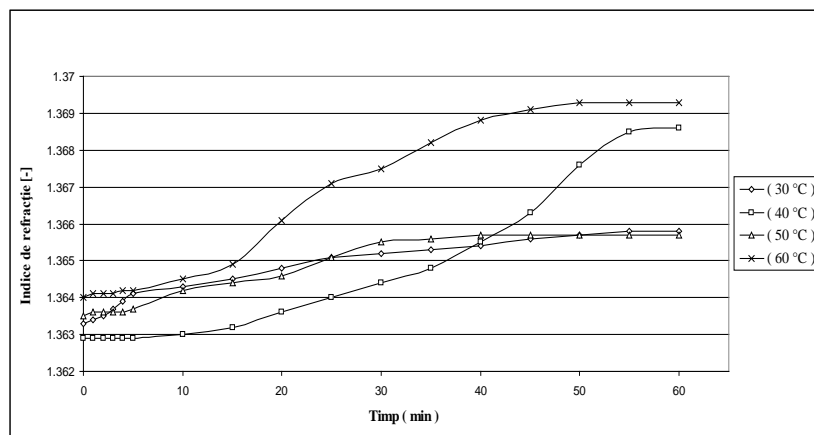
**Fig. 6.2.1.12.** Influența concentrației solventului asupra indicelui de refracție



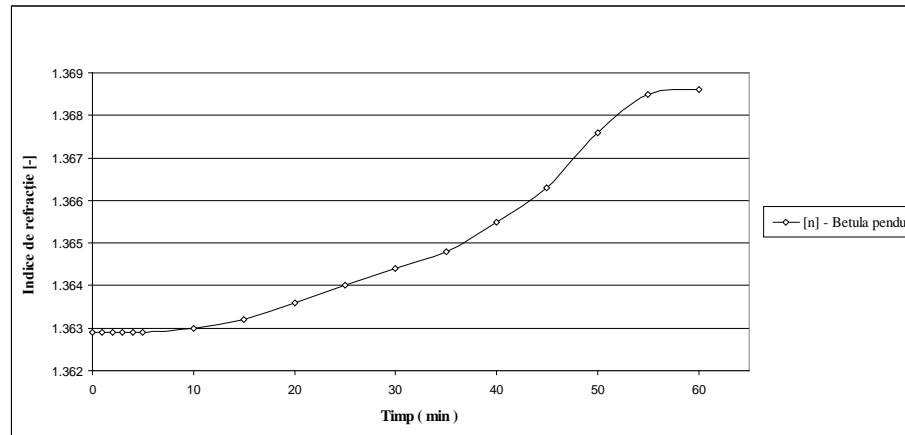
**Fig. 6.2.1.13.** Influența raportului lichid-solid asupra indicelui de refracție



**Fig. 6.2.1.14.** Influența dimensiunii granulelor asupra indicelui de refracție



**Fig. 6.2.1.15.** Influența temperaturii asupra indicelui de refracție



**Fig. 6.2.1.16.** Influența timpului de contact asupra indicelui de refracție

#### **6.2.1.4. Extracția acidului betulinic în câmp de microunde**

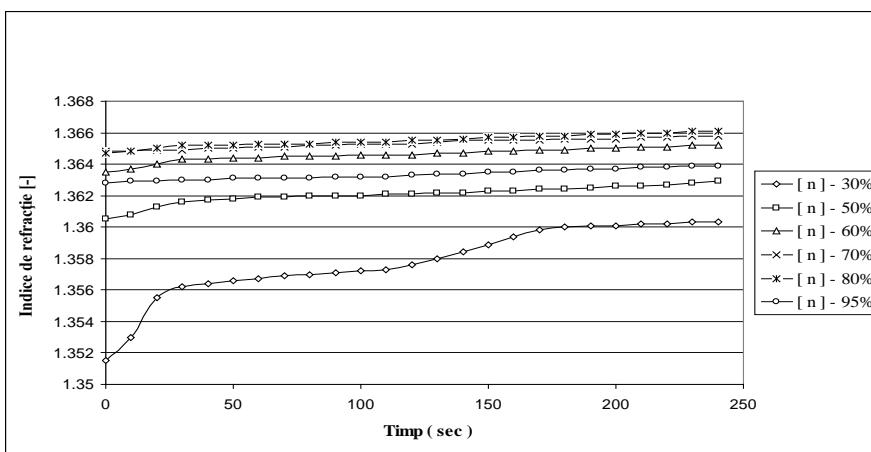
Studiul asupra extracției acidului betulinic din frunzele de mesteacăn prin procedeul extracției în câmp de microunde s-a realizat urmărind influența mai multor parametri asupra procesului. Pentru efectuarea experimentelor s-a recurs la varianta de lucru în volum compact. S-au determinat parametri optimi pentru desfășurarea procesului, puterea microundelor la Tr H, 800 W, raportul L : S, (10 : 1), [ml : g], concentrația soluției apoase etanolice de 80 %, temperatura 60 °C, fracția granulometrică - 1250 μm și durata procesului de 3,5 minute, (Fig. 6.2.1.22 - 6.2.1.25).

#### **6.2.2. Extracția acidului ursolic din specia *Bruckenthalia spiculifolia*, (Ericaceae)**

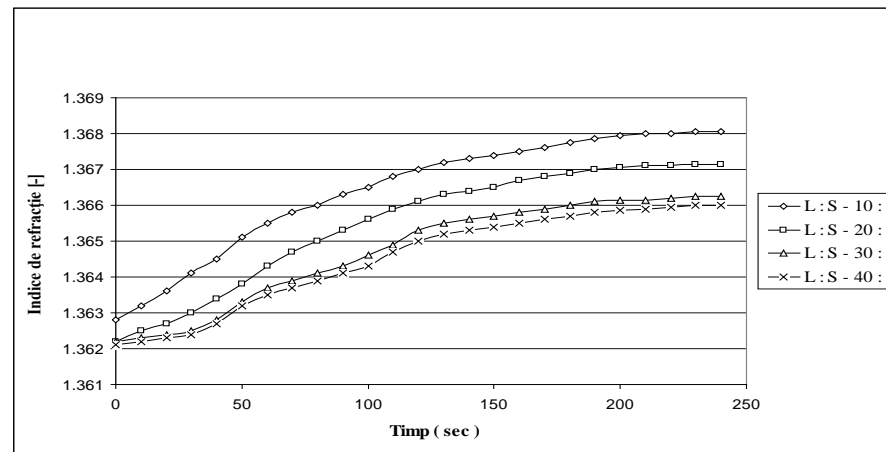
Pentru extracția acidului ursolic din specia *Bruckenthalia spiculifolia* s-au utilizat ca metode de separare, extracția prin macerare, extracția cu ajutorul undelor ultrasonice și extracția în câmp de microunde. Experimentele au decurs în aceleași condiții ca și în cazul speciei *Betula pendula*, (Betulaceae), diferența față de cazul precedent constând în forma, compoziția și structura matricei solide, a materialului vegetal, format din frunze, flori și tulpini tinere și utilizat în proces sub forma unui amestec eterogen. Am studiat influența concentrației solventului etanol-apă, a raportului solid-lichid, a dimensiunii materialului vegetal, a timpului de operare și a temperaturii asupra extracției.

#### **6.2.3. Extracția acidului ursolic din specia *Calluna vulgaris* (L) Hull, (Ericaceae)**

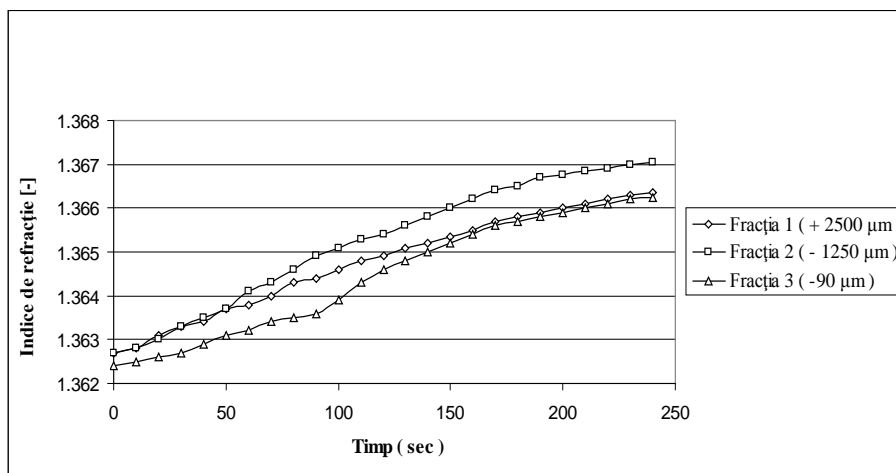
Extracția acidului ursolic din specia *Calluna vulgaris*, (Ericaceae) a fost efectuată utilizând mai multe tehnici de separare, extracția discontinuă, macerarea, extracția asistată de ultrasunete și extracția în câmp de microunde. Experimentele au decurs în aceleași condiții ca și în cazul speciilor *Betula pendula*, (Betulaceae) și *Bruckenthalia spiculifolia*, (Ericaceae).



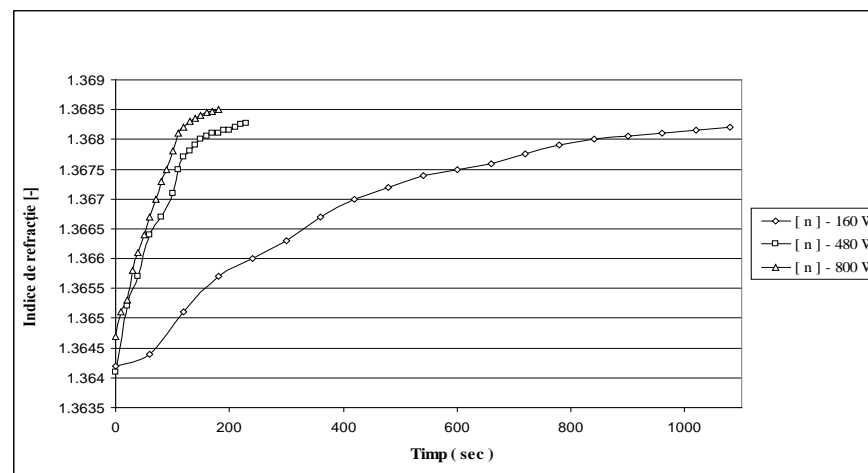
**Fig. 6.2.1.22.** Influența concentrației solventului asupra indicelui de refracție



**Fig. 6.2.1.23.** Influența raportului L:S asupra indicelui de refracție



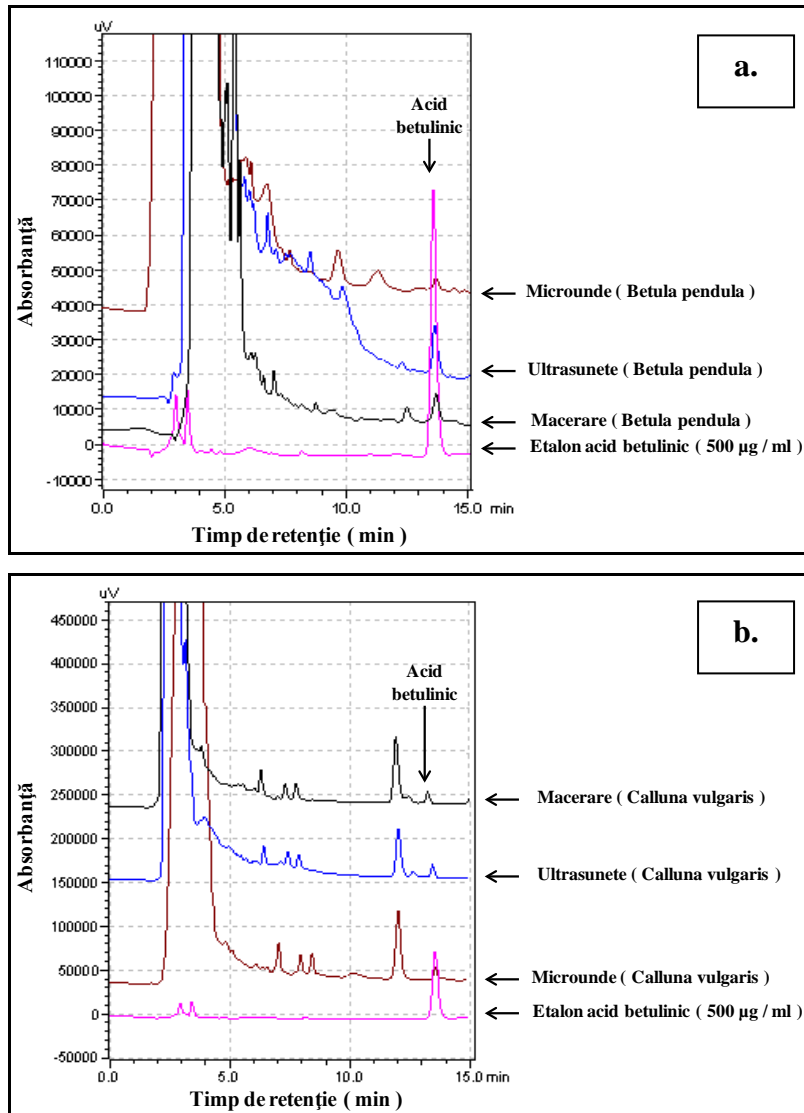
**Fig. 6.2.1.24.** Influența dimensiunii granulelor asupra indicelui de refracție



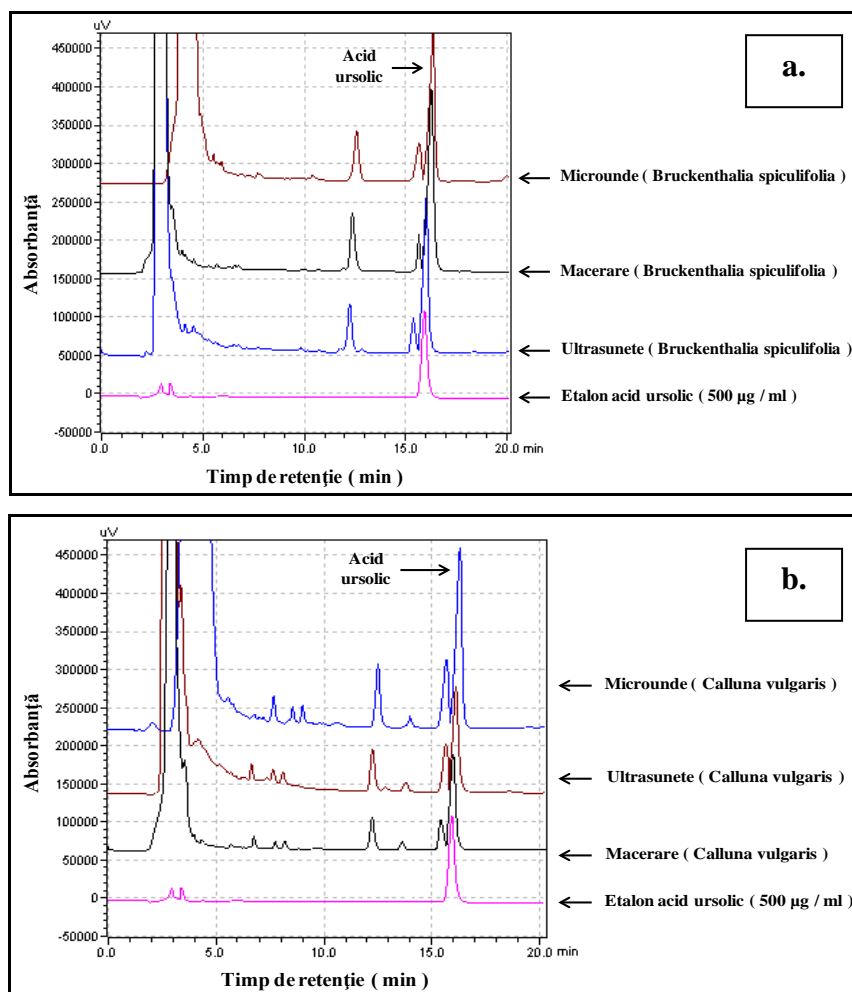
**Fig. 6.2.1.25.** Influența puterii radiative asupra indicelui de refracție

### 6.3. Separarea, identificarea și cuantificarea acizilor betulinic și ursolic din extractele vegetale

În cadrul studiului experimental, atât analiza calitativă, cât și cea cantitativă a acizilor betulinic și ursolic, au fost realizate prin intermediul cromatografiei de lichide de înaltă performanță cu fază inversă, (RP-HPLC), metoda oferind o bună selectivitate și sensibilitate la identificarea și cuantificarea celor doi compuși. În Fig. 6.3.1. și 6.3.2., sunt redate cromatogramele soluțiilor etalon pentru compușii de interes și cromatogramele unor probe de extracte vegetale, analizate în aceleași condiții cromatografice.

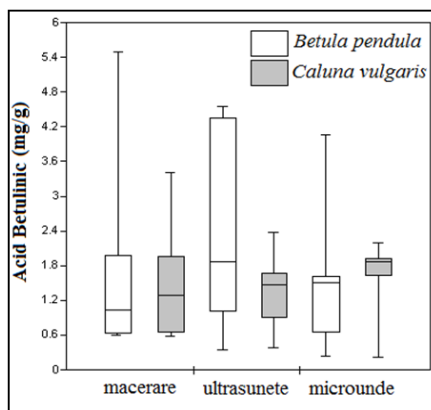


**Fig. 6.3.1.** Cromatogramele suprapuse corespunzătoare soluției etalon de acid betulinic și probelor de extract vegetal **a.** Specia *Betula pendula*, **b.** Specia *Calluna vulgaris*

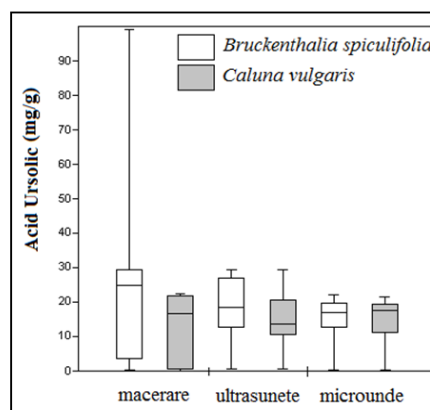


**Fig. 6.3.2.** Cromatogramele suprapuse corespunzătoare soluției etalon de acid ursolic și probelor de extract vegetal. **a.** Specia *Bruckenthalia spiculifolia* **b.** Specia *Calluna vulgaris*

Pentru a evidenția condițiile optime de extracție ale acizilor studiați, rezultatele obținute au fost prezentate grafic sub forma unor diagrame de tip Boxplot, (Fig. 6.3.7. - 6.3.8.).



**Fig. 6.3.7.** Eficiența extracției acidului betulinic din speciile *Betula pendula* și *Calluna vulgaris*



**Fig. 6.3.8.** Eficiența extracției acidului ursolic din speciile *Bruckenthalia spiculifolia* și *Calluna vulgaris*

Concentrația acidului betulinic în extractul vegetal diferă considerabil în funcție de tehnologia aplicată pentru extracția lui din matricea vegetală. În cazul macerării, exceptând unele situații izolate când s-au înregistrat concentrații mari de acid betulinic, în general concentrațiile au variat între 0,64 - 1,97 [mg / g] cu o valoare medie de 1,03 [mg / g] pentru *Betula pendula*, respectiv între 0,66 - 1,96 [mg / g] cu o valoare medie de 1,28 [mg / g] pentru *Calluna vulgaris*. În cazul extracției cu ultrasunte, concentrațiile au crescut considerabil pentru *Betula pendula*, o mare parte din concentrații încadrându-se între 1,02 - 4,35 [mg / g], cu o valoare medie de 1,87 [mg / g]. Extracția în câmp de microunde, a îmbunătățit randamentul de extracție din *Calluna vulgaris*, concentrațiile acidului betulinic încadrându-se în acest caz între 1,62 - 1,92 [mg / g] cu o valoare medie de 1,87 [mg / g]. În cazul acidului ursolic, condițiile optime de extracție s-au dovedit a fi cele prin macerare, între 3,71 - 29,41 [mg / g], cu o valoare medie de 24,84 [mg / g], în cazul extracției din *Bruckenthalia spiculifolia*, respectiv prin microunde, în cazul extracției din *Calluna vulgaris*, între 11,31 - 19,52 [mg / g], cu o valoare medie de 17,55 [mg / g]. Extracția cu ajutorul ultrasunetelor a avut un randament scăzut pentru acidul ursolic, obținându-se concentrații între 0,58 - 29,54 [mg / g], cu o valoare medie de 18,41 [mg / g] pentru *Bruckenthalia spiculifolia*, respectiv între 0,58 - 29,48 [mg / g] cu o valoare medie de 13,63 [mg / g] pentru *Calluna vulgaris*.

#### 6.4. Studiul experimental al extracției solid-lichid prin analogie fenomenologică

Modelul propus se poate aplica oricărei metode de extracție studiate mai sus și pentru materiale vegetale cu structuri și forme diferite. Integratorul hidraulic este dispozitivul experimental ce poate face analogia între două fenomene și se poate utiliza cu succes la simularea sau modelarea proceselor rapide sau a cazurilor în care materialul studiat are dimensiuni reduse, cazul frunzei. Variația concentrației solutului din interiorul frunzei în timpul procesului se poate urmări în Fig. 6.4.2.

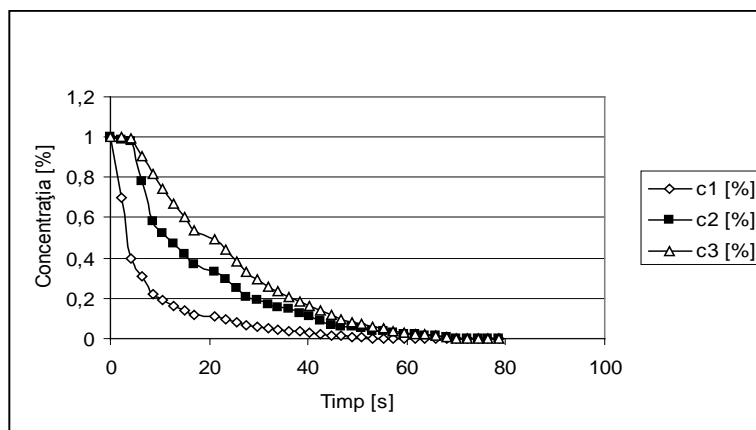


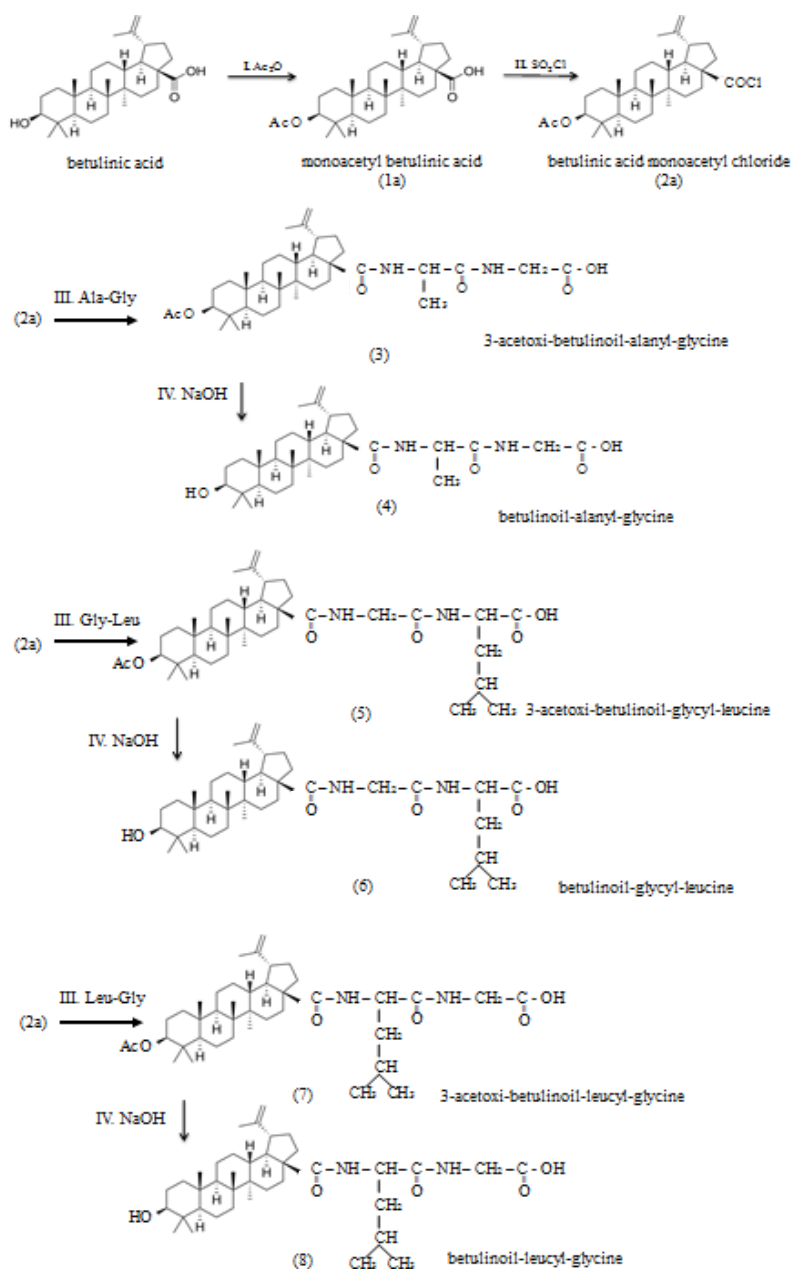
Fig. 6.4.2. Evoluția concentrației solutului în timpul extracției



## Cap. 7. OBȚINEREA DERIVAȚILOR DE SINTEZĂ AI ACIZILOR BETULINIC ȘI URSOLIC

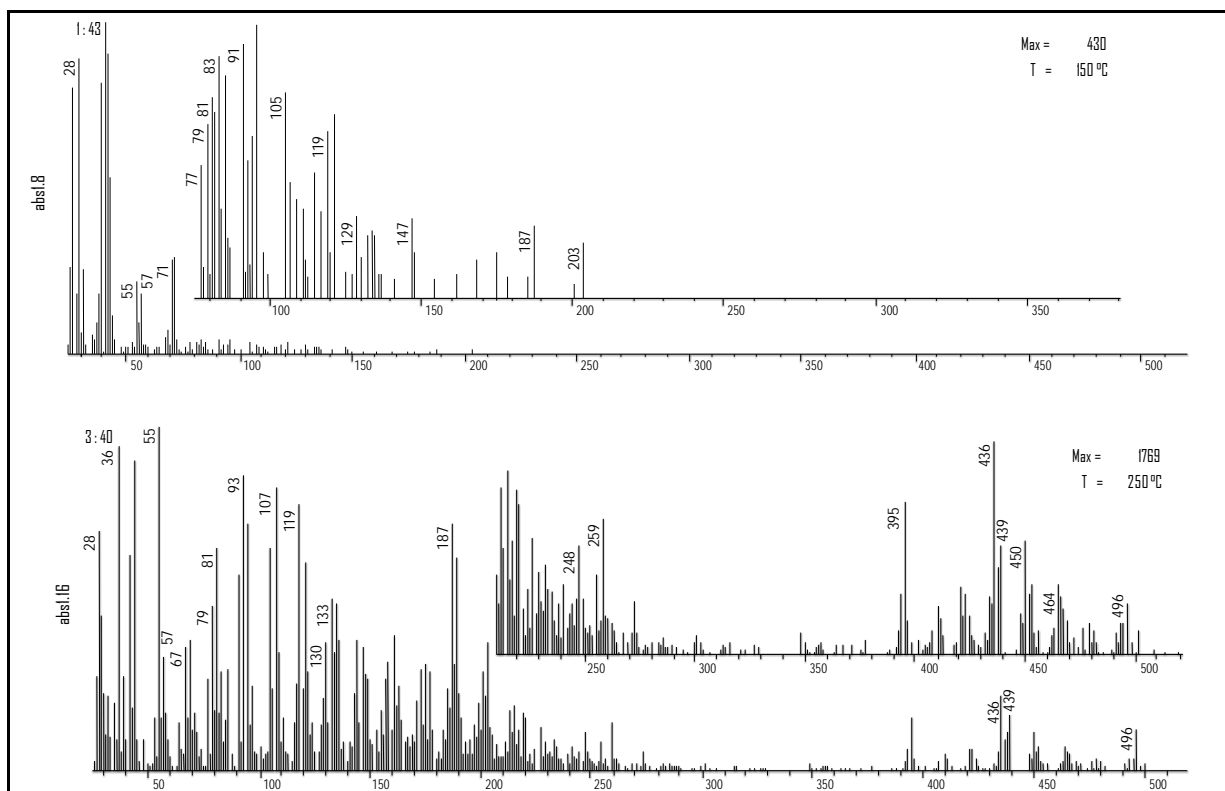
### 7.1. Sinteza derivaților substituiți ai acidului betulinic

Obținerea derivaților dipeptidici ai acidului betulinic s-a realizat prin condensarea acestuia cu alanil-glicina, glicil-leucina și leucil-glicina după schema din Fig. 7.1. Sinteza derivaților betulinici a presupus efectuarea unor serii de reacții desfășurate în patru etape succesive, dintre care primele două, respectiv obținerea produșilor intermediari, (1a) și (2a), sunt comune ca modalitate de lucru obținerii celor trei derivați betulinici, (4), (6) și (8).



**Fig. 7.1.** Schema de sinteză a derivaților betulinici

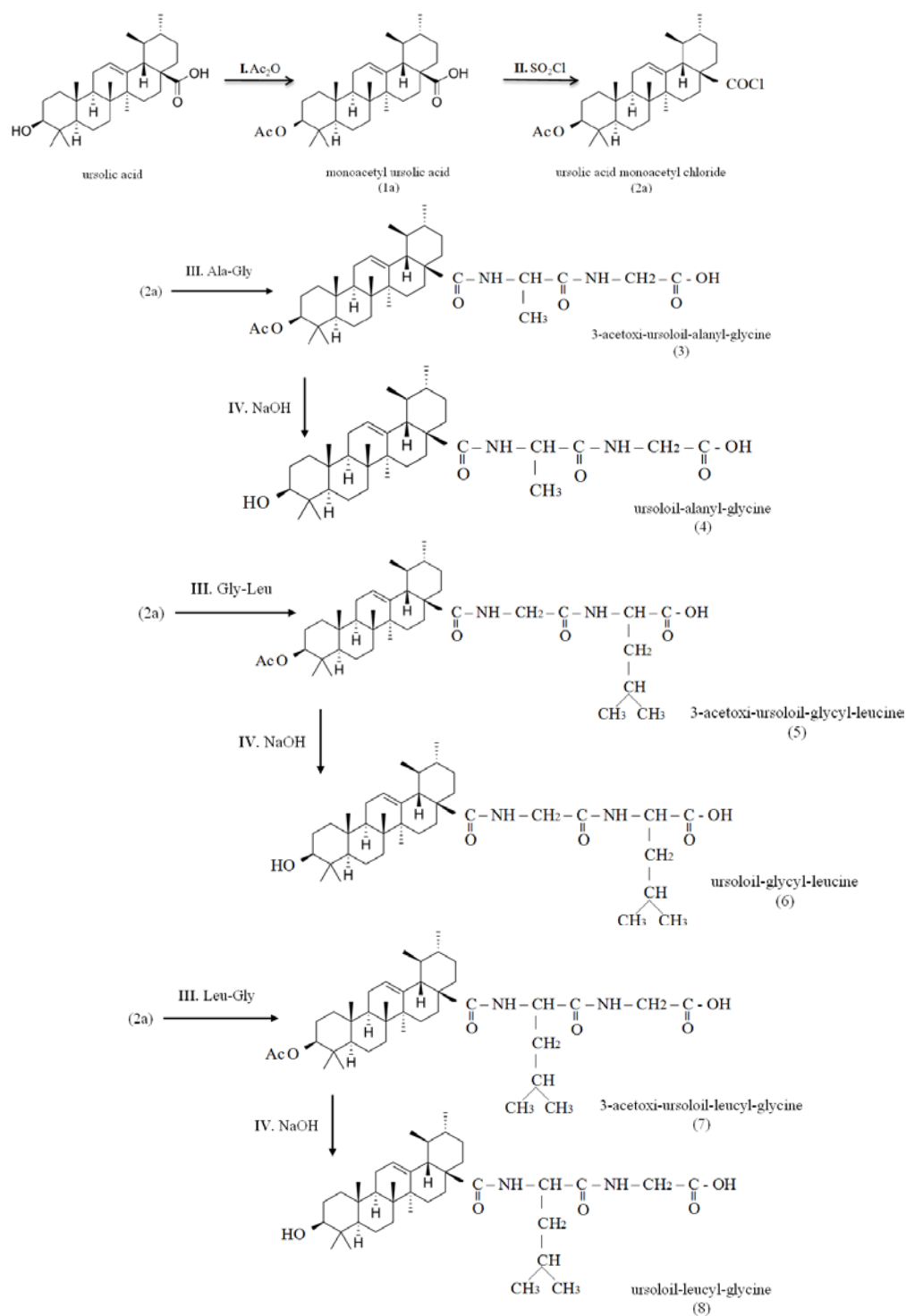
Compușii (4), (6) și (8) au fost caracterizați prin două metode analitice, spectrometria de masă, (GC-MS) prin impact electronic (EI) și spectroscopia în domeniul infraroșu, (IR). În figura de mai jos, (Fig.7.1.5) este redat spectrul de masă pentru compusul betulinoil-glicil-leucină, (6) care a fost testat din punct de vedere al efectului biologic.



**Fig. 7.1.5.** Spectrul de masă (EI) al compusului betulinoil-glicil-leucină, (Bet-Gly-Leu)

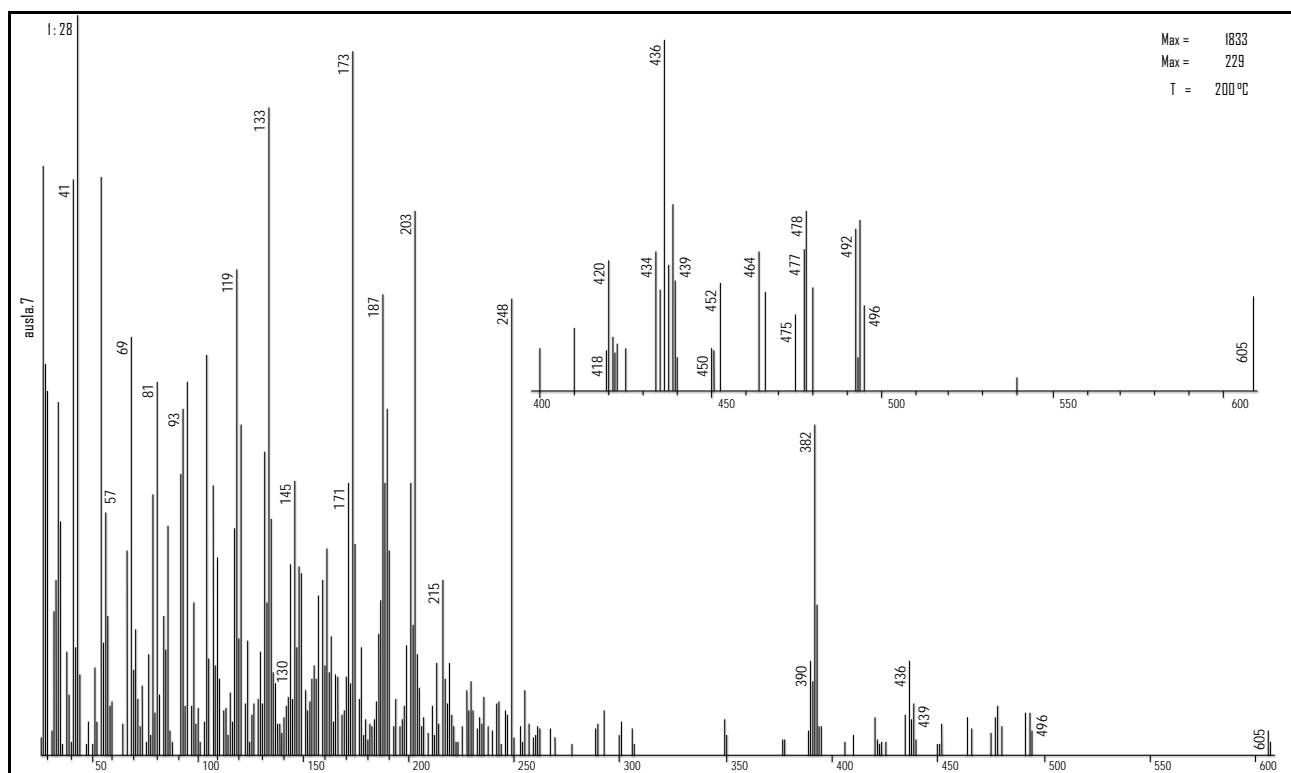
## 7.2. Sinteza derivaților substituiți ai acidului ursolic

Prin condensări ale acidului ursolic cu alanil-glicina, glicil-leucina și leucil-glicina s-au obținut derivații dipeptidici corespunzători, după schema din Fig. 7.2. Sinteza derivaților ursolici a presupus efectuarea unor serii de reacții desfășurate în patru etape succesive, dintre care primele două, respectiv obținerea produșilor intermediari, (1a) și (2a), sunt comune ca modalitate de lucru obținerii celor trei derivați ursolici, (4), (6) și (8).



**Fig. 2.** Schema de sinteză a derivaților ursolici

Compușii (4), (6) și (8) au fost caracterizați prin două metode analitice, spectrometria de masă, (GC-MS) prin impact electronic (EI) și spectroscopia în domeniul infraroșu, (IR). În figura (Fig.7.2.6) este redat spectrul de masă pentru compusul ursolol-glicil-leucină, (6) care a fost testat din punct de vedere al efectului biologic.

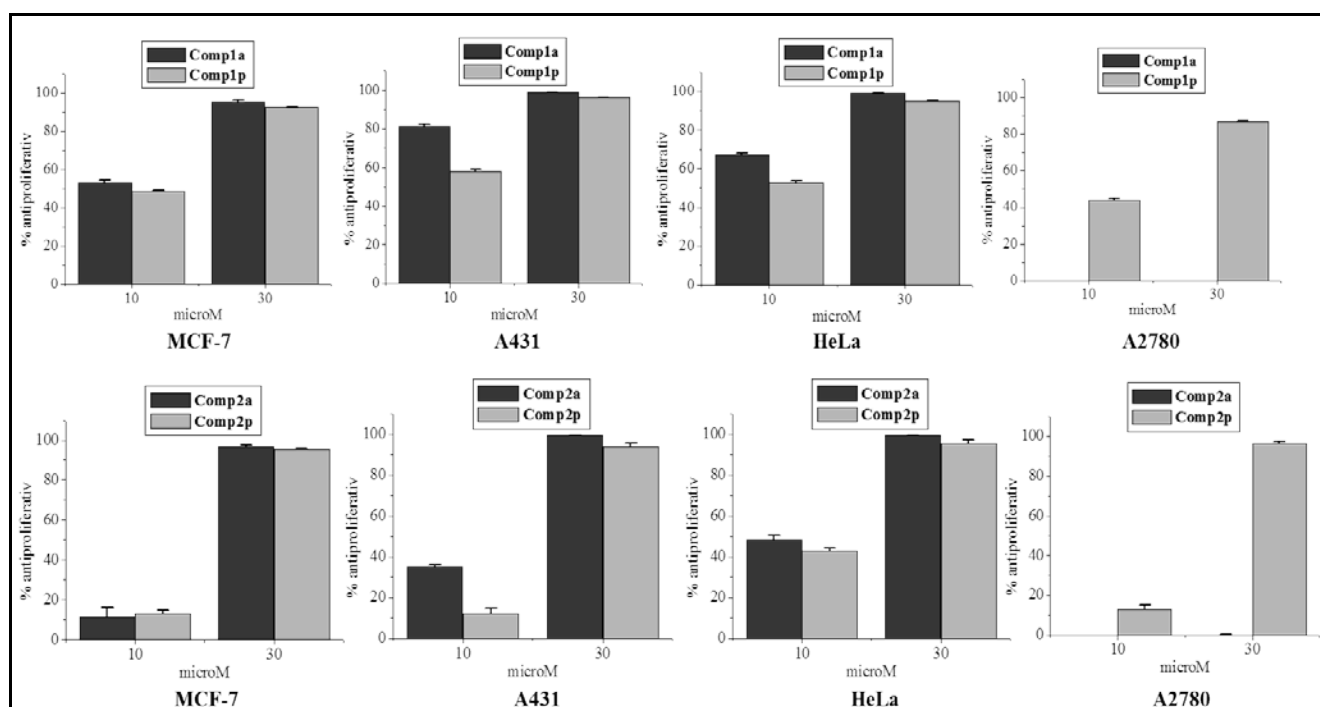


**Fig. 7.2.6.** Spectrul de masă al compusului ursoloil-glicil-leucină, (Urs-Gly-Leu)

## Cap. 8. TESTAREA BIOLOGICĂ A PRODUȘILOR DE DERIVATIZARE ÎN VEDEREA DETERMINĂRII ACTIVITĂȚII LOR BIOLOGICE

Măsurarea efectelor antiproliferative a fost realizată pentru compușii betulinoil-glicil-leucină, (6), (Fig. 7.1) și ursoloil-glicil-leucină, (6), (Fig.7.2), activitatea biologică fiind testată pe mai multe linii celulare canceroase, HeLa, MCF-7, A431 și A2780, (Fig.8.3.2). Pentru testele de laborator s-au utilizat concentrații ale compușilor de 10 și 30  $\mu\text{M}$  / l.

Analizele datelor conducând la concluzia că pentru primul compus nu există diferențe dramatice între activitatea acidului betulinic și a derivatului său substituit, în special în cazul liniilor celulare, MCF-7 și HeLa, iar pentru, A431 se observă o vagă tendință de micșorare a caracterului antiproliferativ pentru concentrația mai mică, 10  $\mu\text{M}$ . Nici în cazul derivatului ursolic, nu s-au constatat diferențe semnificative între activitatea acidului ursolic și a derivatului său substituit, în special în cazul liniilor celulare, A431 și HeLa. Pentru, MCF-7 se observă o vagă tendință de creștere a caracterului antiproliferativ pentru concentrația mai mică, 10  $\mu\text{M}$ .



**Fig. 8.2.3.** Procentul de efect antiproliferare al acidului betulinic și ursolic precum și a derivaților conjugați cu glicil-leucină pentru patru linii celulare

## CONCLUZII

1. În vederea alegerii procedurii de uscare optim al materialului vegetal proaspăt s-a efectuat un studiu comparativ privind utilizarea tehnicilor de uscare naturală și artificială prin convecție și în câmp de microunde pentru materialele vegetale proaspete;
2. S-a realizat extracția acidului betulinic, respectiv a acidului ursolic dintr-un număr de trei specii de plante prezente în flora noastră spontană și utilizate empiric, *Betula pendula*, (*Mesteacănul alb*), *Calluna vulgaris* (L) Hull, (*Iarba neagră*) și *Bruckenthalia spiculifolia*, (*Coacăzul de munte*);
3. A fost propus un model bazat pe analiza dimensională, pornind de la fenomenologia procesului de extracție și a fost verificat pe cale experimentală;
4. S-a realizat derivatizarea acizilor betulinic și ursolic în vederea obținerii unor noi produși biologic activi, prin legarea lor pe cale chimică de compuși din clasa dipeptidelor: glicil-leucină, alanil-glicină, respectiv leucil-glicină;
5. A fost realizată testarea compușilor betulinoil-glicil-leucină și ursoloil-glicil-leucină pe mai multe tipuri de celule canceroase / tumorale, MCF7, A431, A2780 și HeLa, în scopul evidențierii activității biologice a compușilor sintetizați și a efectelor lor terapeutice.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Kaur R., Kapoor K., Kaur H., Plants as a source of anticancer agents, *J. Nat. Prod. Plant Resour.*, **2011**, 1 (1), p.119-124;
2. Rzeski W., Stepulak A., Szymański M., Juszcak M., Grabarska A., Sifringer M., Kaczor J., Kandeferszerszeń M., Betulin elicits anti-cancer effects in tumour primary cultures and cell lines in vitro, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2009**, 105 (6), p.425-432;
3. Chi-Rei Wu, You-Cheng H., Jin-Cherng L., Li-Wei L., Yung-Ta L., Hui C., Triterpenoid Contents and Anti-inflammatory properties of the methanol extracts of *Ligustrum* species leaves, *Molecules*, **2011**, 16, p.1-15;
4. Kuete V., Kamga J., Sandjo L., Ngameni B., Poumale H., Ambassa P., Ngadjui T., Antimicrobial activities of the methanol extract, fractions and compounds from *Ficus polita* Vahl. (Moraceae), *Adv Exp Med Biol.*, **2011**, 11 (6), p.2-6;
5. Demiral E., Kardas E., Özgül S., Yagci T., Bilgin H., Sehirli O., Ercan F., Sener G., Betulinic acid protects against ischemia/reperfusion-induced renal damage and inhibits leukocyte apoptosis, *Phytother. Res.*, **2010**, 24, p.325–332;
6. De-Santos M., Oliveira J.F., Krettli A.U., Zalis M.G., Maia G.L., Sette I.M., Camara C.A., Filho M.,B., Harley A.G., Dos-Santos R.R., Antimalarial activity of betulinic acid and derivatives in vitro against *Plasmodium falciparum* and in vivo in *P. berghei*-infected mice , *Parasitol. Res.*, **2009**, 105 (1), p.275-279,
7. Vlietinck A.J., De Bruyne T., Apers S., Pieters L.A., HIV treatment, Mangosteen is leading compound for chemotherapy of HIV infection, *Planta Med.*, **1998**, 64 (2), p.97-109;
8. Liu W.K., Ho J.C., Cheung F.W., Liu B.P., Ye W.C., Che C.T., Apoptotic activity of betulinic acid derivatives on murine melanoma B16 cell line, *European Journal of Pharmacology*, **2004**, 498, p.71-78;
9. Mullauer F.; Van Bloois L.; Daalhuisen J.; Ten B., Marieke S.; Storm G.; Medema J.P.; Schiffelers R.; Kessler J., Betulinic acid delivered in liposomes reduces growth of human lung and colon cancers in mice without causing systemic toxicity, *Anti-Cancer Drug.*, **2011**, 22 (3), p.223–233;
10. Schmidt M.L., Kuzmanoff K.L., Indeck L.L., Pezzuto J.M., Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines, *Eur. J. Cancer*, **1997**, 33 (12), p.2007-2010;
11. Dehelean C.A., Feflea Ş., Ganta S., Amiji M., Anti-Angiogenic Effects of Betulinic Acid Administered in Nanoemulsion Formulation Using Chorioallantoic Membrane Assay, *J. Biomed. Nanotechnol.*, **2011** , 7, (2), p.317-324;
12. Faujan N:H., Cytotoxic effects of betulinic acid and its derivatives on human myeloid leukemia (HL-60) cell line, Master thesis, **2008**, University of Putra, Malaysia, p.52-105;
13. Galgon T., Riemschneider S., Wohlrab W., Betulinic Acid as an apoptosis inducer in HaCaT cell cultures, *Biochemica*, **2000**, 3, p.22-24;

14. Şoica C., Dehelean C., Peev C., Coneac G., Gruia T., Complexation with hydroxipropilgammacyclodextrin of some pentacyclic triterpenes. Characterisation of their binary products., *Farmacia*, **2008**, Vol. LVI, 2, p.182-190;
15. Mukherjee R., Jaggi M., Siddiqui M.J.A., Srivastava S.K., Rajendran P., Vardhana A., Burmana A.C., Synthesis and cytotoxic activity of 3-O-acyl/3-hydrazine /2-bromo/20,29-dibromo betulinic acid derivatives, *Bioorganic & Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14 (15), p.4087-4091;
16. Novotny L., Abdel-Hamid M.E., Hamza H., Masterova I., Grancai D., Development of LC-MS method for determination of ursolic acid. Application to the analysis of ursolic acid in *Staphylea holocarpa* hemsl., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 31, p.961-968;
17. Li Y., Kang Z., Li S., Kong T., Liu X., Sun C., Ursolic acid stimulates lipolysis in primary-cultured rat adipocytes, *Mol. Nutr. Food Res.*, **2010**, 54 (11), p.1609–1617;
18. Miceli N., Taviano M.F., Giuffrida D., Trovato D., Tzakou O., Galati E.M., Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Benth., *J. of Ethnopharmacol.*, **2005**, 97, p.261-266;
19. Saravanan R., Viswanathan P., Viswanathan K., Pugalendi K., Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats, *Life Sciences*, **2006**, 78, p.713-718;
20. De Angel R., Smith S., Glickman R., Perkins S., Hursting S., Antitumor effects of ursolic acid in a mouse model of postmenopausal breast cancer, *Nutr. Cancer*, **2010**, 62 (8), p.1074–1086;
21. Munoz O., Christen P., Cretton S., Backhouse N., Torres V., Correa O., Costa E., Miranda H., Delporte C., Chemical study and anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities of the leaves of *Aristolelia chilensis* (Mol.) Stuntz, *Elaeocarpaceae*, *J. of Pharma. and Pharmacol.*, **2011**, 63 (6), p.849–859;
22. Somova L., Shode F., Mipando M., Cardiotoxic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol, *Phytomedicine*, **2004**, 11, p.121-129;
23. Pemminati S., Gopalakrishna H., Venkatesh.V., Rai A., Shetty S., Vinod A., Pai P., Shenoy A., Anxiolytic effect of chronic administration of ursolic acid in rats, *J. Appl. Pharm. Sci.*, **2011**, 1 (03), p.68-71;
24. Ramos A. Lima C. Pereira M., Fernandes F., Pereira W., Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells. Evaluation by the comet assay, *Toxicology Lett.*, **2008**, 177 (1), p.66-73;
25. Azevedo M., Camsari C., SáI C., Lima C., Ferreira M., Wilson C., Ursolic acid and luteolin-7-glucoside improve lipid profiles and increase liver glycogen content through glycogen synthase kinase-3, *Phytother. Res.*, **2010**, 24 (S2), p.220–S.224;
26. Aragon M., Heras B., Reus M., Benedi J., Pharmacological modification of endogenous antioxidant enzymes by ursolic acid on tetrachloride-induced liver damage in rats and primary cultures of rat hepatocytes, *Exp. Toxic Pathol.*, **2001**, 53, p.199-206;
27. Somova L., Nadar A., Rammanan P., Shode F., Cardiovascular antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension, *Phytomedicine*, **2003**, 10, p.115-121;
28. Assimopoulou A., Zlatanov S., Papageorgiou V., Antioxidant activity of resins and bioactive triterpenes in oil substrates, *Food Chemistry*, **2005**, 92, p.721-727;

- 29.** Ramos A., Pereira C.W., Collins A.R., Protective effects of ursolic acid and luteolin against oxidative DNA damage include enhancement of DNA repair in Caco-2 cells, *Mutat. Res.*, **2010**, 692 (1–2), p.6–11;
- 30.** Kanjoormana M., Kuttan G., Antiangiogenic activity of ursolic acid, *Integr. Cancer Ther.*, **2010**, 9 (2), p.224–235;
- 31.** Simon A., Delage C., Saux A., Chulia A.J., Najid A., Rigaud M., Anti-herpes virus activities of bioactive fraction and isolated pure constituent of *Mallotus peltatus*. An ethnomedicine from Andaman Islands, *Virologia*, **2012**, 9, p.98-102;
- 32.** Coldea Gh., Negrean G., Sârbu I., Sârbu A., Ghid pentru identificarea și inventarierea pajiștilor seminaturale din România, Ed. Alo, București, **2001**, p.17-56;