

UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

Facultatea de Biologie și Geologie

Școala Doctorală Biologie Integrativă

# Extrakte vegetale de *Vinca* și *Catharanthus* și utilizări ale potențialului terapeutic

Teză de doctorat

Rezumat

Conducător științific: Marcel Pârvu; Student-doctorand: Alexandra Ciorîță

## Cuprins

Cuvinte cheie .....	1
Introducere .....	1
Scopul și obiectivele cercetării.....	2
1. Date din literatură .....	2
2. Materiale și metode .....	3
3. Rezultate și discuții.....	3
4. Concluzii.....	7
5. Diseminare .....	7
Referințe bibliografice .....	8

## Cuvinte cheie

extrakte vegetale; morfologie și ultrastructură; activitate antioxidantă; activitate antibacteriană; citotoxicitate; nanoparticule metalice; sinteză chimică-verde

Cluj-Napoca

2021

## Introducere

În teza de doctorat realizată sunt prezentate rezultatele cercetării efectuate privind plante de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don și specii reprezentative din genul *Vinca* L. (saschiu) precum: *Vinca minor* L., *Vinca major* L., *Vinca herbacea* Waldst. & Kit. și varietatea de cultură *Vinca major* L. var. *variegata* Louden. Cercetarea comparativă a acestor specii cu importanță terapeutică a vizat: morfologia, anatomia și ultrastructura funzei; compoziția chimică și potențialul farmacologic al extractelor foliare, privind: tipuri de acitivitate antioxidantă și antibacteriană, citotoxicitate *in vitro* pe linii celulare normale și canceroase și capacitate de formare de nanoparticule metalice.

Teza de doctorat este structurată în patru capitole majore, iar acest rezumat cuprinde ideile principale din acestea. Primul capitol (**Date din literatură**) cuprinde informații de specialitate despre: importanța medicinală a folosirii plantelor de-a lungul timpului și impactul nanotehnologiei și al nanoparticulelor metalice pentru medicina modernă. Al doilea capitol descrie **Materialele și metodele** folosite în realizarea activității de cercetare, cel de-al treilea capitol prezintă principalele **Rezultate și discuții**, iar cel de-al patrulea capitol grupează **Concluziile**.

## Scopul și obiectivele cercetării

Scopul și obiectivele tezei de doctorat realizate (**Extrakte vegetale de *Vinca* și *Catharanthus* și utilizări ale potențialului terapeutic**) au vizat studiul comparativ al unor extracte vegetale de *Vinca minor* L. (**saschiu comun**), *Vinca major* L. (**saschiu cu frunză mare**), *Vinca major* L. var. *variegata* Loudon, *Vinca herbacea* Waldst. & Kit. (**saschiu herbaceu**) și *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (**saschiu de Madagascar**) în ceea ce privește potențialul farmacologic al acestora.

Activitățile de cercetare s-au desfășurat în cadrul mai multor laboratoare:

- Microscopie Electronică „Constantin Crăciun” – UBB Cluj-Napoca;
- Extracte Naturale al Facultății de Biologie și Geologie, UBB;
- Departamentul de Chimie – Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, UBB;
- Laboratorul Integrat de Microscopie Electronică, Centrul de Cercetare și Tehnologii Avansate pentru Energii Alternative, Laboratorul Integrat de Culturi Celulare și Microbiologie, Departamentul de Fizică Moleculară și Biomoleculară și Departamentul de Fizica Sistemelor Nanostructurate – INCDTIM, Cluj-Napoca.

### 1. Date din literatură

Plantele medicinale din care se obțin extracte vegetale apoase sau alcoolice au vaste întrebunțări farmacologice. Printre acestea, se numără activitatea antibacteriană și activitatea antitumorală sau cea citotoxică. Descoperirea antibioticelor, deși un pas important pentru medicina modernă, a generat răspuns

de rezistență în rândul infecțiilor bacteriene (Bhagwat și colab., 2014; Jhanji și colab., 2019; Newman, 2008). Ca și în cazul antibioticelor, rezistența pacienților bolnavi de cancer la tratamentul cu citostatice constituie o reală problemă, prin urmare acest proces natural larg răspândit în natură poate avea consecințe dramatice (D’Costa și colab., 2011; Mahmoudi și colab., 2016).

Astfel, această teză de doctorat cercetează comparativ compoziția chimică și potențialul farmacologic al extractelor foliare hidroalcoolice de: *V. minor* L., *V. major* L., *V. herbacea* Waldst. & Kit.; varietatea de cultură *V. major* L. var. *variegata* Louden; și cultivarul *C. roseus* (L.) G. Don cv. Pacifica, pentru a aduce o completare la metodele convenționale de tratament. Plantele de *Vinca* și specia *Catharanthus roseus* (familia **Apocynaceae**) sunt bogate în alcaloizi, substanțe active cu potențial farmacologic demonstrat (O’Connor, 2008): activitate antioxidantă (Bahadori și colab., 2012), activitate antibacteriană (Grujić și colab., 2015) sau activitate antitumorală și efect citotoxic (Garcia-Lazaro și colab., 2020).

Mai mult decât atât, din ce în ce mai multe resurse au fost alocate în sinteza-verde de nanoparticule metalice cu ajutorul extractelor vegetale, care să contribuie la dezvoltarea bionanomedicinii (Suciu și colab., 2020).

## 2. Materiale și metode

Pentru a îndeplini obiectivele stabilite s-au realizat trei studii principale:

- a. Analiză morfologică și ultrastructurală a frunzei de *Vinca* și *C. roseus* prin microscopie fonică, microscopie cu electroni cu baleiaj și cu transmisie (S/TEM);
- b. Analiză fitochimică comparativă a extractelor vegetale foliare de *Vinca* și *C. roseus* în ceea ce privește potențialul farmacologic (activități antioxidantă, antibacteriană și citotoxică);
- c. Obținere și caracterizare fizică și biologică de nanoparticule metalice (Ag-MnO<sub>2</sub>) folosind extractul vegetal de *Vinca minor* și/sau *Chelidonium majus*.

## 3. Rezultate și discuții

- a. Morfologie și ultrastructură la frunze de *Vinca* și *Catharanthus roseus*

Unele caracteristici morfologice și ultrastructurale la frunze de *Vinca* și *C. roseus* au fost determinate prin tehnici de microscopie (Figura 1). Frunzele speciilor sunt hipostomatice și cu excepția speciei *V. minor*, au fost remarcate stomate în număr mic și pe fața adaxială a frunzei. Cel mai mare index stomatal a fost determinat la *V. minor*, iar cel mai mic, la *V. major*, în timp ce distribuția perişorilor a fost dependentă de specie. Mezofilul s-a dovedit a fi diferențiat în țesut palisadic și țesut spongios lacunar, iar speciile cu expoziție mai bună la lumină (*V. minor* și *V. herbacea*) au avut o delimitare clară între cele două tipuri de țesuturi. Adicional, s-a estimat și raportul dintre spațiul intercelular și celulele ale mezofilului

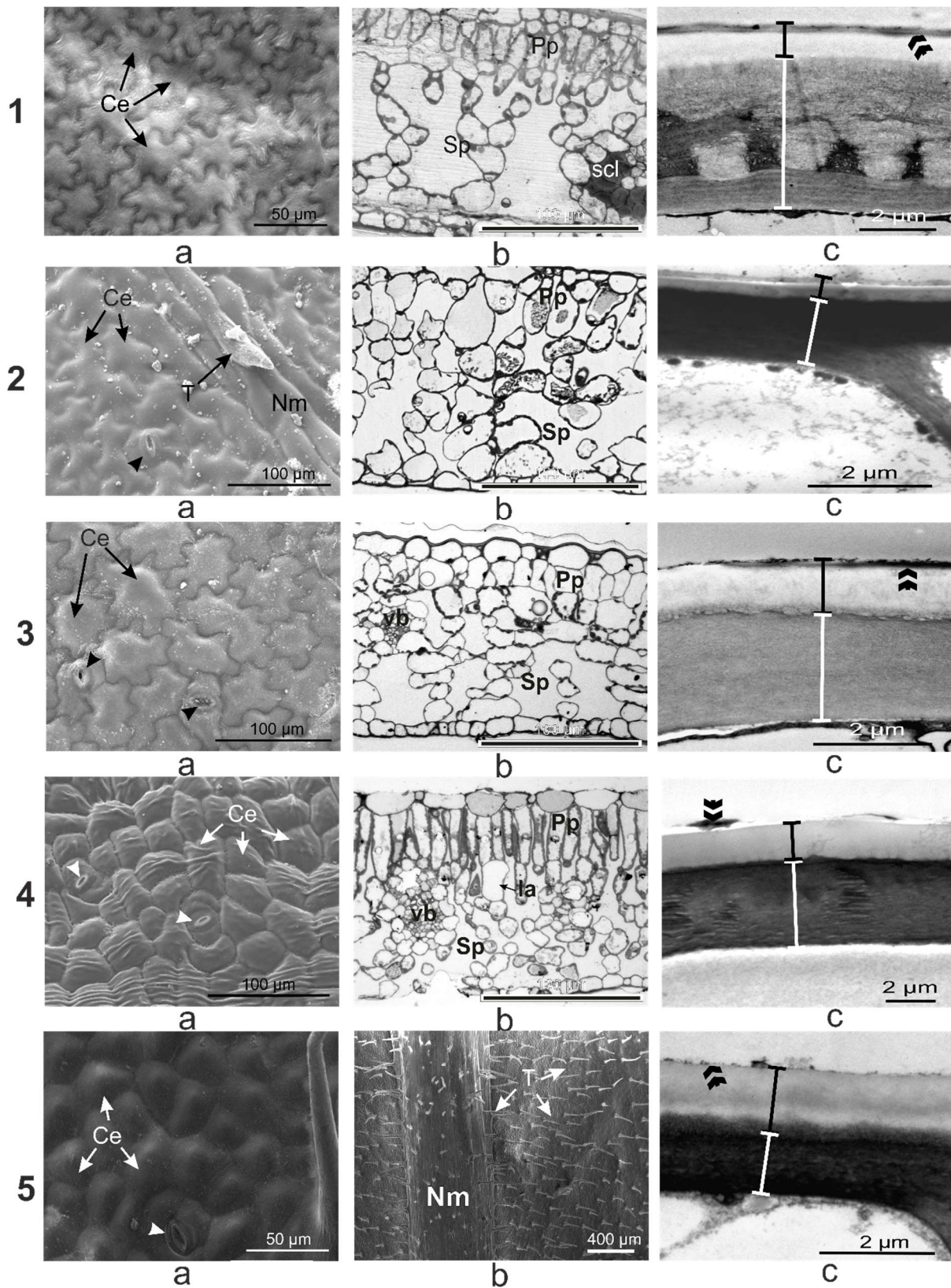
foliar prin analiză computațională. Cuticula și cerurile epicuticulare au fost descrise pentru prima dată la aceste specii prin TEM, iar stratul gros de cutină s-a observat la speciile de *V. minor* și *V. herbacea*. Toate aceste caracteristici au fost corelate cu compoziția chimică a speciilor (Ciorîță și colab., 2021a).

b. Compoziție fitochimică și potențial farmacologic ale extractelor vegetale de *Vinca* și *C. roseus*

Efectele antioxidant, antibacterian și citotoxic ale extractelor de *Vinca* și *C. roseus* sunt dependente de specie și de compoziția fitochimică. Vincamina a fost identificată în patru din cele cinci extracte vegetale analizate (a lipsit la *V. herbacea*), pe când vinblastina a fost identificată doar în *C. roseus* (Tabel 1). *V. minor* a fost cel mai bogat extract în alcaloizi, urmat de *C. roseus* și *V. herbacea* care a avut, de asemenea, și cel mai ridicat conținut de rutin. Acest aspect a clasat *V. herbacea* cu cea mai puternică activitate antioxidantă, urmat de *V. major* var. *variegata*. Efectul antibacterian testat pe *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli* a fost cel mai puternic pentru extractul vegetal de *V. minor*. Extractele de *Vinca* au acționat într-o manieră dozo-dependentă asupra melanomului uman A375 și asupra keratinocitelor umane HaCaT, în timp ce *C. roseus* a avut un puternic efect citotoxic la toate concentrațiile folosite. Prin urmare, speciile de *Vinca* și *C. roseus* prezintă potențial farmacologic (Ciorîță și colab., 2021b).

c. Sinteză-verde de nanoparticule de Ag-MnO<sub>2</sub> cu extracte vegetale de *V. minor* și *Chelidonium majus*

Sinteza-verde de nanoparticule (NP) metalice se realizează cu ajutorul unor extracte vegetale. Astfel, pe baza rezultatelor obținute în analizele fitochimice, extractul vegetal de *V. minor* a fost ales pentru a sintetiza NP de Ag-MnO<sub>2</sub> (Figura 2). Întrucât studii anterioare au arătat potențialul promițător de formare de NP al extractului de *Chelidonium majus*, acesta a fost folosit pentru a obține trei tipuri de NP: cu extract vegetal de *V. minor* (VmNPs), *C. majus* (CmNPs) și combinație 1:1 dintre acestea (MNPs). NP au fost analizate prin S/TEM, Difrakție cu Raze-X, analiză elementală EDX, Spectroscopie în Infra-Roșu cu Transformată Fourier, iar capacitatea terapeutică a fost determinată prin analize de microbiologie și citotoxicitate. NP au avut dimensiuni cuprinse între 9.3 nm și 32.4 nm, VmNPs având cea mai uniformă distribuție. NP au fost de tipul miez-coajă, cu Mn la interior, Ag la exterior și înveliș organic format de extracte. Cele mai eficiente din punct de vedere farmacologic au fost VmNPs, urmate de MNPs și CmNPs (Figura 3). Astfel s-a putut arăta capacitatea extractelor de *V. minor* și *C. majus* de a forma nanoparticule de Ag-MnO<sub>2</sub> cu aplicabilitate în tratamente selective (Ciorîță și colab., 2020).



**Figura 1.** Imagini de microscopie fonică, SEM și TEM ale frunzelor de *V. minor* (1), *V. major* (2), *V. major* var. *variegata* (3), *V. herbacea* (4) și *C. roseus* cv. *Pacifica* (5). Ce = celulă epidermală, Nm = nervură mediană, T = tricrom/perişor, Ia = idioblast, Pp = parenchim palisadic, Sp = parenchim spongios, scl = sclerenchim, vb = vas conducător, vârf săgeată simplă = stomata, vârf săgeată dublă = cutină

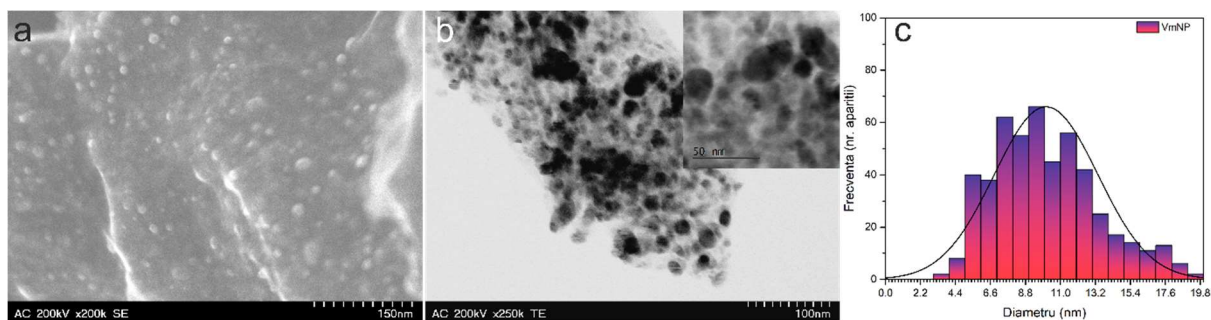


Figura 2. Imagini SEM (a), TEM (b) și distribuția dimensiunilor (c) la nanoparticule de Ag-MnO<sub>2</sub> (*V. minor*)

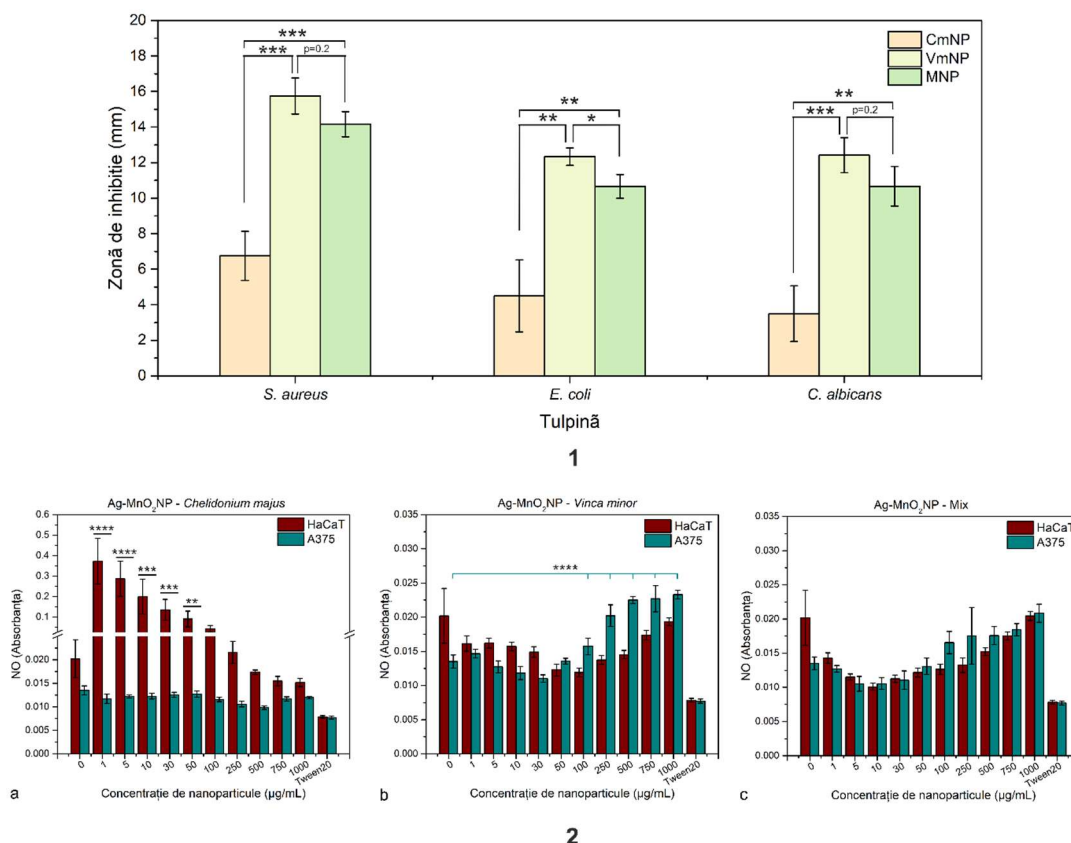


Figura 3. Efect antimicrobian (1) și efect citotoxic (2) al nanoparticulelor de Ag-MnO<sub>2</sub> sintetizate

Tabel 1. Concentrația principalilor fitoconstituenți determinați în extracte vegetale din specii de *Vinca* și *C. roseus*

Compus	Concentrația compusului (μg/g)				
	Vm	VM	VMv	Vh	Crp
Acid clorogenic	4112±13	675±160	932±260	1538±200	2959±240
Acid cafeic	229±2	13±2	182±23	13±1	13±1
Rutin	73±1	11±1	94±10	2528±160	44±2
Isoquercitrin	12±1	12±1	38±4	87±4	82±7
Quercitrin	52±4	11±1	45±8	109±10	86±6
Vincamină	65±1	42±3	31±2	n.d.	4±1
Quercetin	21±2	14±2	28±2	20±3	21±2
Vinblastină	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.8±2

\*Vm = *V. minor*, VM = *V. major*, VMv = *V. major* var. *variegata*, Vh = *V. herbacea*, Crp = *C. roseus* cv. 'Pacifica'; n.d. – nedetectat.

#### 4. Concluzii

Această teză de doctorat descrie comparativ potențialul farmacologic al unor extracte foliare hidroalcoolice din specii de *Vinca* și specia *Catharanthus roseus*. Aspecte morfologice ale frunzei, compoziția chimică a extractelor foliare și efecte farmacologice ale acestora s-au determinat prin diferite metode de cercetare în mai multe laboratoare de specialitate. Mai mult decât atât, extractul de *V. minor* a fost ales pe baza rezultatelor obținute și folosit în sinteza nanoparticulelor de Ag-MnO<sub>2</sub> împreună cu extractul de *Chelidonium majus*. Aceste nanoparticule au fost apoi caracterizate din punct de vedere fizic și biologic prin teste efectuate pe bacterii, fungi și culturi de celule umane.

Acest studiu aduce o completare valoroasă în literatura de specialitate prin lucrările publicate. Documentarea bibliografică a tezei de doctorat s-a bazat pe 352 de titluri, reprezentate de articole științifice, din literatura națională și, mai ales, literatura internațională. Diferite metode de cercetare utilizate în studierea plantelor de *Vinca* și *Catharanthus* deschid perspective importante pentru abordări interdisciplinare cu diferiți specialiști.

#### 5. Diseminare

Articole în reviste indexate ISI, ca autor principal (\* din subiectul tezei de doctorat):

1. \* **Ciorîță, A.**, Zăgrea-Tuza, C., Moș, A. C., Carpa, R., Pârvu, M., The phytochemical analysis of *Vinca* L. species leaf extracts is correlated with the antioxidant, antibacterial, and antitumor effects. (2021). The phytochemical analysis of *Vinca* L. species leaf extracts is correlated with the antioxidant, antibacterial, and antitumor effects. *Molecules*, 26(10), 3040. <https://doi.org/10.3390/molecules26103040>; **FI:** 3.267; **AIS:** 0.6.
2. \* **Ciorîță, A.**, Tripon, S.-C., Mircea, I.-G., Podar, D., Barbu-Tudoran, L., Mircea, C., Pârvu, M. (2021). The morphological and anatomical traits of the leaf in representative *Vinca* species observed on indoor-and outdoor-grown plants. *Plants-Basel*, 10(4), 622. <https://doi.org/10.3390/plants10040622>; **FI:** 2.762.
3. \* **Ciorîță, A.**, Suciuc, M., Macavei, S., Kacso, I., Lung, I., Soran, M.-L., Pârvu, M. (2020). Green synthesis of Ag-MnO<sub>2</sub> nanoparticles using *Chelidonium majus* and *Vinca minor* extracts and their *in vitro* cytotoxicity; *Molecules*, 25(4), 819. <https://doi.org/10.3390/molecules25040819>; **FI:** 3.267; **AIS:** 0.6.

Participări la conferințe internaționale

1. **Ciorîță, A.**, Surducu, V., Surducu, E. 12<sup>th</sup> International Conference „Processes in Isotopes and Molecules”; Poster: *Automated photographic device for real-time monitoring of in vitro biological samples*, 2019, România, <http://pim.itim-cj.ro/2019/>.
2. **Ciorîță, A.**, Tripon, S.-C., Podar, D., Barbu-Tudoran, L., Pârvu, M. 18<sup>th</sup> International Balkan Workshop on Applied Physics and Materials Science; Poster: *Light and electron microscopy analysis of the leaves of Vinca species*, 2018, România, <http://ibwap.ro/>.
3. **Ciorîță, A.**, Bugiel, M., Schaeffer, E., Jannasch, A. Microtubules: From Atoms to Complex Systems – Virtual; Poster: *Single kinesin-8, Kip3, stabilizes microtubules*, 2020, Germania, <https://www.embo-embl-symposia.org/symposia/2020/EES20-05/index.html>.



*Cerere de brevet:*

1. **Ciorîță, A.**, Surducan, V., Surducan, E. (2019). Dispozitiv fotografic pentru observarea în timp real a evoluției materialului biologic microscopic *in vitro*. Cerere înregistrată cu nr. RO133721A0-2019-11-29.

**Referințe bibliografice**

1. Bahadori, F., Topçu, G., Boğa, M., Türkekul, A., Kolak, U., Kartal, M. (2012). Indole alkaloids from *Vinca major* and *V. minor* growing in Turkey. *Natural Product Communications*, 7(6), 731-734; doi:10.1177/1934578X1200700610;
2. Bhagwat, M. K., Datar, A. G. (2014). Antibacterial activity of herbal extracts against five plant pathogenic bacteria. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(7), 892–899; doi:10.1080/03235408.2013.870703;
3. Ciorîță, A., Suciuc, M., Macavei, S., Kacso, I., Lung, I., Soran, M.-L., Pârvu, M. (2020). Green synthesis of Ag-MnO<sub>2</sub> nanoparticles using *Chelidonium majus* and *Vinca minor* extracts and their *in vitro* cytotoxicity. *Molecules*, 25(4), 819; doi:10.3390/molecules25040819;
4. Ciorîță, A., Tripon, S. C., Mircea, I. G., Podar, D., Barbu-Tudoran, L., Mircea, C., Pârvu, M. (2021a). The Morphological and Anatomical Traits of the Leaf in Representative *Vinca* Species Observed on Indoor- and Outdoor-Grown Plants. *Plants*, 10(4), 622;
5. Ciorîță, A., Zăgorean-Tuza, C., Moș, A., Carpa, R., Pârvu, M. (2021b). The phytochemical analysis of *Vinca* L. species leaf extracts is correlated with the antioxidant, antibacterial, and antitumor effects *Molecules*, 26(10); doi:https://doi.org/10.3390/molecules26103040;
6. D’Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477, 457–461; doi:10.1038/nature10388;
7. Garcia-Lazaro, R. S., Lamdan, H., Caligiuri, L. G., Lorenzo, N., Berengeno, A. L., Ortega, H. H., Alonso, D. F., Farina, H. G. (2020). *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of Yerba Mate extract in colon cancer models. *Journal of Food Science*; doi:10.1111/1750-3841.15169;
8. Grujić, S. M., Radojevic, I. D., Vasic, S. M., Comic, L. R., Topuzovic, M. D. (2015). Antimicrobial and antibiofilm activities of secondary metabolites from *Vinca minor* L. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(5), 572–578; doi:10.1134/S0003683815050087;
9. Jhanji, R., Bhati, V., Singh, A., Kumar, A. (2019). Phytomolecules against bacterial biofilm and efflux pump: An *in silico* and *in vitro* study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*; doi:10.1080/07391102.2019.1704884;
10. Mahmoudi, S., Khali, M., Benkhaled, A., Benamirouche, K., Baiti, I. (2016). Phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts from ten Algerian *Ficus carica* L. varieties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(3), 239–245; doi:10.1016/j.apjtb.2015.12.010;
11. Newman, D. J. (2008). Natural products as leads to potential drugs: An old process or the new hope for drug discovery? *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(9), 2589–2599; doi:10.1021/jm0704090;
12. O’Connor, S. E. (2008). Alkaloid biosynthesis. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, 1, 17–33; doi:10.1002/9780470048672;
13. Suciuc, M., Ionescu, C. M., Ciorita, A., Tripon, S. C., Nica, D., Al-Salami, H., Barbu-Tudoran, L. (2020). Applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in drug and therapeutic delivery, and biotechnological advancements. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 1092–1109.