

**PN-III-P2-2.1-BG-2016-0369/ Contract nr. 116 BG 30/09/2016**

**TRANSFERUL CUNOAȘTERII PRIVIND INVESTIGAREA PROPRIETĂȚILOR  
ANTIINFECȚIOASE ȘI ANTITUMORALE ALE UNOR NOI FORMULĂRI COSMETICE SI  
FARMACEUTICE PE BAZĂ DE EXTRACTE NATURALE**

**RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC**

**FAZA DE EXECUȚIE NR. 3**

**CU TITLUL STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTITUMORALE ȘI AL GENOTOXICITĂȚII  
EXTRACTELOR VEGETALE ȘI APICOLE ȘI ELABORAREA FIȘEI DE CARACTERIZARE  
COMPLETĂ A MATERIILOR PRIME ACTIVE OBȚINUTE PRIN CERCETARE  
INOVATIVĂ**

**AVIZAT**

**COORDONATOR  
UNIVERSITATEA BUCUREȘTI**

**PARTENER 1  
INSTITUTUL DE  
VIRUSOLOGIE "STEFAN  
S.NICOLAU"**

**AGENT ECONOMIC  
HOFIGAL EXPORT IMPORT  
SA**

**REPREZENTANT LEGAL  
PROF. DR. MIRCEA DUMITRU**

**REPREZENTANT LEGAL  
DR. CARMEN CRISTINA DIACONU**

**REPREZENTANT LEGAL  
ADMINISTRATOR CÎNDEA  
CLAUDIU VALENTIN**

**DIRECTOR PROIECT  
MARIANA CARMEN  
CHIFIRIUC**

**RESPONSABIL P1  
CORALIA BLEOTU**

**RESPONSABIL DE PROIECT  
ALEXANDRU SUCIU**

# **TRANSFERUL CUNOAȘTERII PRIVIND INVESTIGAREA PROPRIETĂȚILOR ANTIINFECȚIOASE ȘI ANTITUMORALE ALE UNOR NOI FORMULĂRI COSMETICE SI FARMACEUTICE PE BAZĂ DE EXTRACTE NATURALE**

## **RAPORT ȘTIINȚIFIC DE FAZĂ 2018**

**DURATA PROIECTULUI -24 DE LUNI**

### **CUPRINS**

- **Obiectivul general al proiectului**
- **Obiectivele fazei de execuție**
- **Rezumatul fazei**
- **Descrierea științifică și tehnică**
- **Concluzii**
- **Bibliografie selectivă**

### **OBIECTIVUL GENERAL AL PROIECTULUI**

Obiectivul general al proiectului este elaborarea unei metodologii inovative de testare a activității antimicrobiene, antivirale, antitumorale și imunomodulatoare, precum și de elucidare a mecanismelor de acțiune la nivel celular și molecular a unor extracte naturale vegetale și apicole, în scopul introducerii acestora în noi formulări cosmetico-farmaceutice pentru extinderea gamei de produse comercializate de agentul economic participant în proiect - Hofigal S.A.

### **OBIECTIVELE FAZEI DE EXECUȚIE**

- Studiul activității antitumorale și al genotoxicității extractelor vegetale și apicole
- Elaborarea fișei de caracterizare completă a materiilor prime active obținute prin cercetare inovativă

## REZUMATUL FAZEI

În cadrul ultimei faze a proiectului au fost analizate un număr total de 15 extracte vegetale și apicole, pentru care s-a realizat studiul activității antitumorale și al genotoxicității extractelor analizate în fazele anterioare, în scopul formulării indicațiilor de utilizare ale acestora.

**Cuantificarea citotoxicității** extractelor vegetale s-a realizat utilizând kiturile CellTiter-Glo<sup>®</sup>, și Annexin V-FITC – iodură de propidium. Rezultatele obținute au demonstrat o relație de directă proporționalitate între gradul de reducere a viabilității celulare și concentrația de extract în mediul de cultură. Concentrațiile la care extractele testate au fost non-toxice la 24 h au fost: 10% pentru soluțiile apoase de propolis, de 1% de extract de armurariu și rozmarin, de 0,1% pentru extractul de rostopască și pentru tincturile de propolis, de 0,05% pentru extractul de lemn dulce și de 0,01% pentru extractul de cătină roșie. Tincturile de propolis, la fel ca și extractele vegetale de cătină, rostopască, armurariu, lemn dulce, rozmarin induc o **activare a activității caspazice globale în celulele tumorale Hep-2**, cuantificată cu ajutorul kitului carboxifluorescein multi-caspase activity (bml-ak117-001).

**Analiza ciclului celular al celulelor tumorale Hep-2 a aratat că extractele vegetale sunt blocanti de faza G2**, iar tratarea celulelor cu concentrații de 5 ori mai mari decât concentrația non-citoxică de extracte vegetale sau combinații ale acestora au indicat faptul că extractele de cătină și de rostopască, precum și amestecul rostopască-cătină, cătină-lemn dulce, rostopască –lemn dulce și rostopască cătină–lemn dulce induc apariția apoptozei (faza subG0), demonstrând efectul antitumoral al acestora.

**Evaluarea și testarea genotoxicității** s-a realizat pentru extractele naturale cele mai active, din punct de vedere al acțiunilor biologice urmărite, și care au făcut obiectul cererilor de brevet depuse sau care urmează a fi depuse, respectiv extractele totale concentrate de rostopască, cătină roșie și lemn dulce.

Extractul total de rostopască de concentrație 0,1% a determinat o incidență scăzută a micronucleilor, comparativ cu controlul negativ, în timp ce concentrația de 0,2% a prezentat o capacitate genotoxică crescută. În cazul extractului de cătină roșie s-a constatat scăderea incidenței micronucleilor sub limita controlului negativ, concomitent cu scăderea proliferării celulare, probabil ca urmare a inhibării diviziunii celulare. Extractul de lemn dulce în concentrație de 0,02% prezintă o incidență scăzută a micronucleilor, și consecutiv, o genotoxicitate scăzută

În cadrul acestei etape, s-a realizat, de asemenea, **transferul cunoștințelor către HOFIGAL, cu privire la procedurile de evaluare a efectului antiproliferativ, antimicrobian, citotoxic, imunomodulator al extractelor vegetale și apicole și al unor combinații ale acestora**, în cadrul unui workshop.

Au fost comunicate agentului economic **indicațiile terapeutice ale extractelor naturale testate (antimicrobiene, antivirale, antiproliferative, imunomodulatoare)**, în funcție de analiza tuturor rezultatelor obținute.

**Diseminarea rezultatelor proiectului în anul 2018** s-a realizat prin comunicarea rezultatelor de cercetare în cadrul a **4 conferințe naționale**, publicarea a **4 articole ISI, 1 articol BDI, 1 capitol într-o carte publicată în editură internațională, 2 brevete de invenție, 1 workshop final, 2 teze de licență, capitol din 2 teze de doctorat.**

În concluzie, obiectivele propuse în cadrul acestei etape, precum și livrabilele propuse au fost realizate în totalitate.

## RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC

### Introducere

Plantele au fost utilizate încă din cele mai vechi timpuri pentru tratarea sau prevenția diferitelor tipuri de afecțiuni, fiind folosite de 65-80% din populația lumii, în conformitate cu datele furnizate de Organizația Mondială a Sănătății. De asemenea, aproape jumătate dintre medicamentele utilizate în prezent sunt agenți de semisinteză care au ca materii prime fitocomponente specifice, iar un sfert dintre ele conțin extracte sau compuși chimici activi din plante (Cowan, 1999). Bolile infecțioase rămân una din principalele cauze de mortalitate la nivel mondial. Necesitatea identificării de noi substanțe antimicrobiene este evidentă, mai ales în cazul bacteriilor Gram-negative multirezistente, dintre care unele specii sunt incluse în grupul ESKAPE (ex. *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Enterobacter sp.*) responsabile, în multe cazuri, de infecții netratabile cu agenții antimicrobieni existenți (Santajit și Indrawattan, 2016). Pe de altă parte, în ciuda progreselor care s-au înregistrat în obținerea vaccinurilor și dezvoltarea medicamentelor, pentru multe virusuri, terapiile antivirale sunt ineficiente sau lipsesc; astfel, identificarea de noi medicamente / adjuvanți antivirali este foarte importantă. Totodată, cancerul rămâne cauza principală de mortalitate la nivel mondial, în timp ce agenți chimioterapeutici de sinteză introduși în clinică pe parcursul ultimului deceniu nu au dovedit o eficiență mai bună, în ciuda costurilor considerabile și a perioadei lungi de dezvoltare a acestora.

Plantele sintetizează o serie de substanțe farmacologic active, reprezentând o alternativă ecologică valoroasă pentru tratamentele antiinfecțioase și antitumorale clasice, având un statut relativ sigur și larg acceptat de către consumatori, datorită riscului redus al efectelor secundare, activităților biologice diverse, inclusiv imunomodulatoare, care ar putea potența activitatea antimicrobiană, antivirală și antitumorală. Datorită compoziției lor complexe, aceste extracte naturale acționează concomitant prin diferite mecanisme (degradarea peretelui celular, inhibarea formării biofilmelor microbiene, deteriorarea membranei citoplasmatică și/sau a proteinelor membranare, coagularea citoplasmei, inhibarea glicolizei și a transportului de glucoză etc.) (Burt, 2004).

Numeroși compuși naturali de origine vegetală studiați cu precădere în ultimele două decenii au demonstrat un potențial efect antimicrobian, antiviral și antitumoral (Solowey și colab., 2014).

**În continuare vor fi prezentate sintetic principalele rezultate obținute în cadrul activităților menționate în planul de realizare aferent etapei III de execuție a proiectului.**

### **Activitate 3.1. Testarea citotoxicității pe linii celulare normale și tumorale**

Analiza cantitativă a toxicității induse de extractele vegetale s-a realizat utilizând kitul CellTiter-Glo<sup>®</sup>, pe scurt, celulele au fost tripsinizate, numărate și însămânțate în plăci albe de 96 de godeuri (NUNC, SUA) la o densitate de  $7,5 \times 10^3$  celule per godeu (Hep2 VSHE; HT-29 (ATCC<sup>®</sup> HTB-38<sup>™</sup>). Plăcile s-au incubat în mediu Dulbecco modificat (DMEM:F12) (Sigma, USA), suplimentat cu ser bovin fetal 10% inactivat termic (Sigma, USA), la 37°C, în atmosferă umedă cu 5% CO<sub>2</sub> timp de 24 de ore. Pentru a evalua citotoxicitatea extractelor, celulele au fost tratate cu diluții seriale și menținute timp de 24 de ore la 37°C, în atmosferă umedă cu 5% CO<sub>2</sub>. Viabilitatea celulară a fost determinată folosind kitul CellTiter-Glo<sup>®</sup> (Promega, G7572). Pentru determinarea viabilității celulelor, în fiecare godeu s-a adăugat un volum egal de reactiv CellTiter-Glo<sup>®</sup>. Plăcile s-au incubat la temperatura camerei timp de 10 minute pentru a permite stabilizarea semnalului luminescent. Luminiscenta s-a citit la un FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, SUA). Rezultatele au fost interpretate ca procent de celule viabile după tratamentul cu diferite concentrații de extract raportat la viabilitatea celulelor netratate.

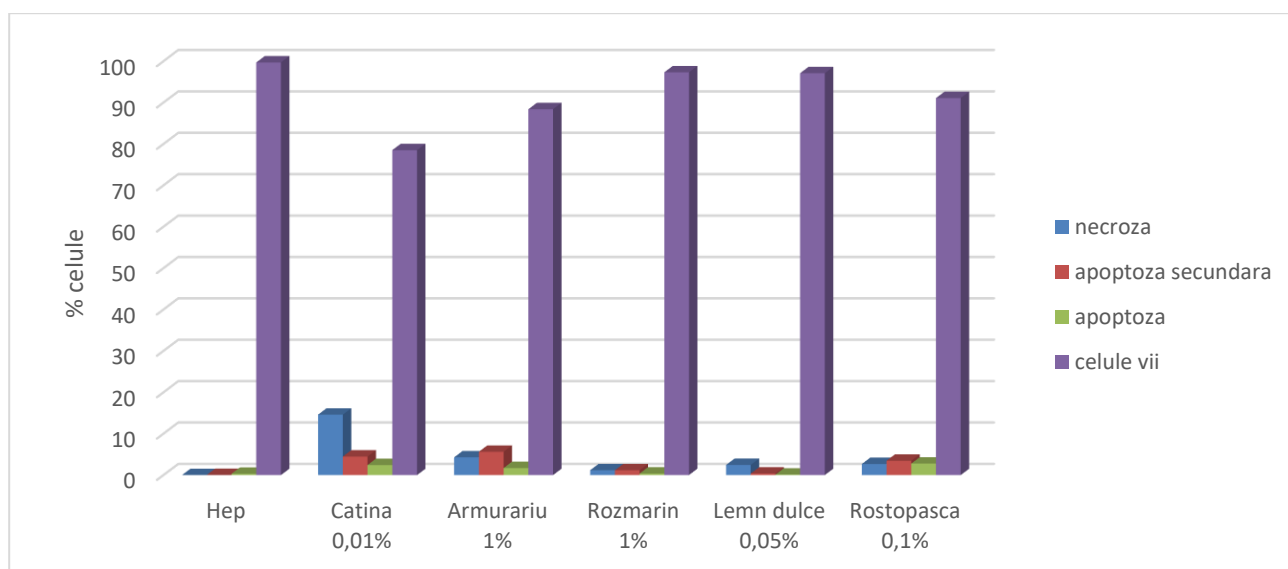
Cuantificarea toxicității induse de extractele testate arată o reducere progresivă a viabilității celulare odată cu creșterea concentrației de extract în mediul de cultură.

### **Activitate 3.2. Teste de proliferare celulară: analiza ciclului celular, analiza apoptozei, testul clonelor celulare**

Pentru confirmarea rezultatelor, concentrațiile non-citotoxice au fost analizate utilizând kitul Annexin V-FITC – iodură de propidium, care cuantifică apoptoza și necroza celulelor.

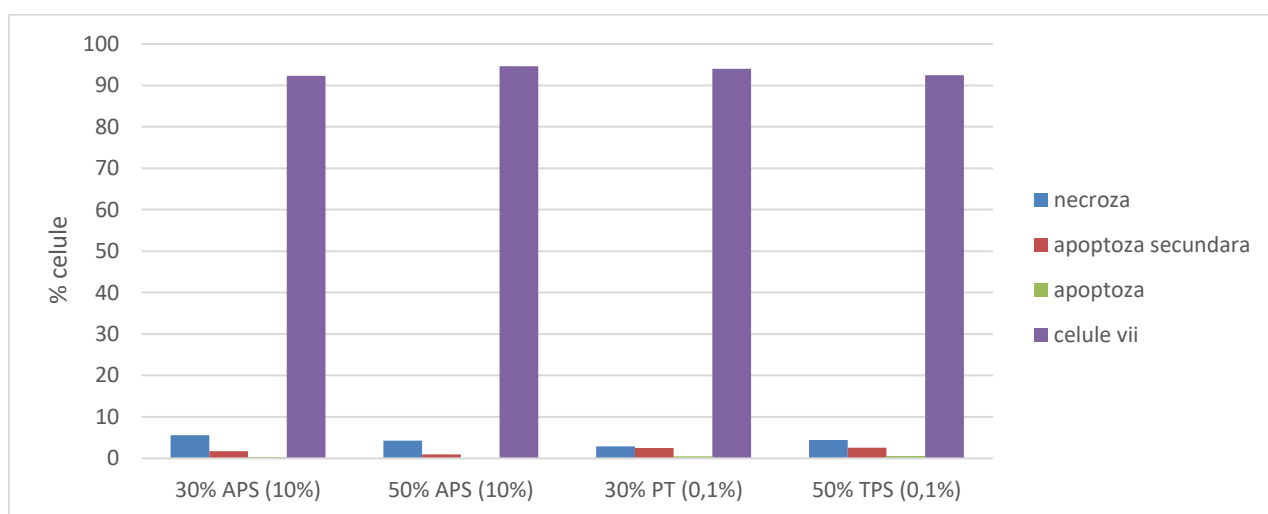
Pentru a detecta apoptoza timpurie se cuantifică externalizarea fosfatidil serinei în celulele apoptotice utilizând annexin V conjugată cu FITC, în timp ce apoptoza târzie se cuantifică utilizând iodură de propidium (PI). Astfel, la 24 de ore de la tratamentul cu 0,1% extract, celulele se tripsinizează, se spală în TFS și se resuspendă în 200 μL tampon de legare pre-diluat, ajustându-se la o densitate de  $2-5 \times 10^5$  celule/mL. Ulterior, suspensia celulară a fost marcată cu 5 μL Annexin V: FITC, 10 minute la întuneric la temperatura camerei, spălată cu tampon de legare pre-diluat și colorată cu 10 μL soluție de iodură de propidium pentru evidențierea celulelor moarte.

Rezultatele sunt prezentate ca procent de celule viabile /necrotice /apoptotice (figurile 1-2).



	Hep	Catina 0,01%	Armurariu 1%	Rozmarin 1%	Lemn dulce 0,05%	Rostopasca 0,1%
necroza	0.013	14.6	4.3	1.17	2.45	2.69
apoptoza secundara	0.018	4.48	5.63	1.16	0.379	3.47
apoptoza	0.31	2.43	1.7	0.369	0.12	2.78
celule vii	99.7	78.5	88.4	97.3	97.1	91.1

Fig. 1. Reprezentarea grafică a toxicității extractelor vegetale testate.



	30% APS (10%)	50% APS (10%)	30% PT (0,1%)	50% TPS (0,1%)
necroza	5.62	4.29	2.92	4.42
apoptoza secundara	1.77	0.99	2.52	2.55
apoptoza	0.354	0.13	0.507	0.577
celule vii	92.3	94.6	94	92.5

Fig. 2. Reprezentarea grafica a toxicității extractelor apoase de propolis si tincturilor de propolis testate.

Demonstrarea activității caspazice globale s-a realizat utilizând kitul carboxifluorescein multi-caspase activity (bml-ak117-001).

Caspazele (*Cysteiny*l *Aspartate-Specific* *Proteases*) sunt o familie de enzime cu rol important în apoptoză (moartea programată a celulelor). Kitul Carboxyfluorescein Multi-Caspase Activity (BML-AK117-001) detectează apoptoza prin legarea covalentă a unei sonde fluorescente verzi de caspazele active din celulele vii. FAM-VAD-FMK este un derivat al valylalanyl aspartic acid fluoromethyl ketone (VAD-FMK). Acesta este un inhibitor al activității caspazice, prin legare la Cys285 pe heterodimerii caspazici. Utilizarea substratului VAD permite detecția globală a caspazelor 1-9, iar cuantificarea fluorimetrică permite evaluarea cantitativă a activității acestora. Pentru evaluarea activității caspazice, celulele au fost însamantate în plăci de 24 godeuri la o densitate de  $3 \times 10^5$  celule/mL. La 24 ore s-a realizat tratamentul cu extractele vegetale în concentrațiile cunoscute/stabilite. Densitatea celulară în recipientul de cultură nu trebuie să depășească  $10^6$  celule /mL deoarece celulele cultivate în exces față de această concentrație pot induce apoptoza naturală. Totuși concentrația celulară optimă variază în funcție de linia celulară. La 24 ore de la tratament celulele au fost reluate de pe substrat, numărate, și împărțite în două aliquote la o concentrație de  $10^5$  celule /100microL. Un aliquot a fost tratat cu 2,5 microL FAM-VAD-FMK/ 100 microL suspensie celulară, agitat și incubat o oră la  $37^{\circ}\text{C}$ , %  $\text{CO}_2$ , protejat de lumină. Celulele au fost spălate de 2 ori cu lichid de spălare, iar câte 100 microL din fiecare suspensie celulară au fost puși în duplicat într-o placă de microtitrare neagră. Intensitatea fluorescenței fluoresceinei (excitație 490nm, emisie 520nm) a fost cuantificată la reader. Rezultatele sunt prezentate ca log a raportului dintre valoarea integrată probei tratate vs control celule netratate.

Tincturile de propolis, la fel ca și extractele vegetale de cătină, rostopască, armurariu, lemn dulce, rozmarin induc o activare activității caspazice globale.



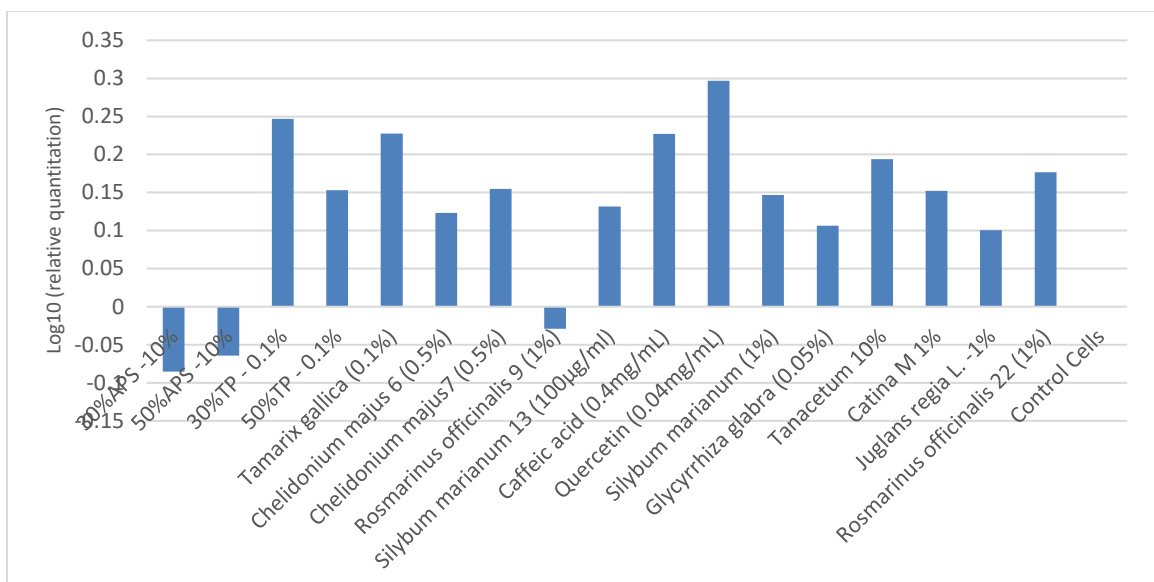


Fig. 3. Reprezentarea grafică activității caspazice induse de tratamentul cu concentrații slab citotoxice.

### Analiza ciclului celular

Celulele tratate cu concentrații slab toxice de extracte vegetale sau combinații ale acestora au fost tripsinizate, spălate în tampon fosfat salin (TFS) și fixate în 1 ml etanol 70% rece, cel puțin 30 de minute la  $-20^{\circ}\text{C}$ . Celulele au fost spălate în TFS, resuspendate în 100  $\mu\text{l}$  TFS, tratate cu RNAză (concentrație finală 1 mg/ml) la  $37^{\circ}\text{C}$  timp de 30 minute și colorate cu PI (concentrație finală 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) timp de 30 de minute la  $37^{\circ}\text{C}$ , cu agitare periodică. Probele au fost citite la citometrul în flux Beckman Coulter XLM și analizate cu programul FlowJo.

**Analiza ciclului celular al celulelor tumorale Hep-2 a aratat că extractele vegetale sunt blocanți de faza G2**, iar tratarea celulelor cu concentrații de 5 ori mai mari decât concentrația non-citoxică de extracte vegetale sau combinații ale acestora au indicat faptul că extractele de cătină și de rostopască, precum și amestecul rostopască-cătină, cătină-lemn dulce, rostopască –lemn dulce și rostopască cătină–lemn dulce induc apariția apoptozei (faza subG0), demonstrând efectul antitumoral al acestora.

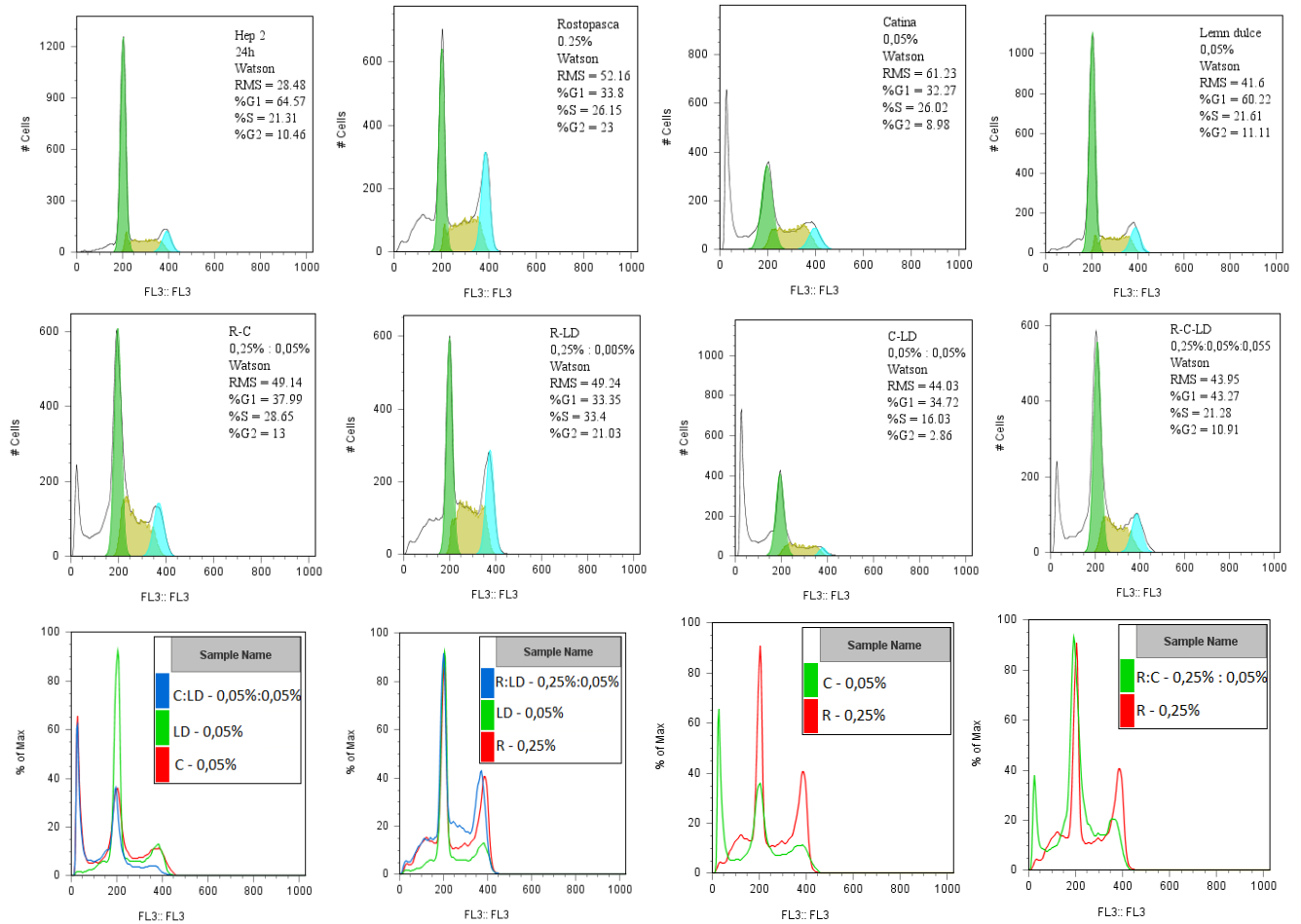


Fig. 3. Histograme ciclului celular al celulelor Hep2 tratate cu extracte vegetale și combinații ale acestora.

### Activitate 3.3. Transferul cunoștințelor către HOFIGAL, cu privire la procedurile de evaluare a efectului antiproliferativ al extractelor vegetale și apicole și al unor combinații ale acestora

Transferul cunoștințelor către Hofigal s-a realizat în cursul stagiilor de perfecționare în cadrul Institutului de Virusologie Ștefan S Nicolau și al Facultății de Biologie. În cadrul Institutului de Virusologie Ștefan S Nicolau (fig. 4) subiectele abordate în timpul trainingului au inclus:

- **laboratorul de culturi celulare:** tehnici aseptice, întreținerea de rutină a culturilor celulare, tehnicile de cultură specializate și diverse aplicații (colorații; metode spectrofotometrice; evidențierea și cuantificarea virusului în cultură);
- **laboratorul de citometrie în flux:** analiza ciclului celular, detecția apoptozei utilizând kitul anexin V-FITC- iodura de propidium;

- **laboratorul de proteomică:** dot blot, Western Blot pentru o serie de biomarkeri din căile de semnalizare activate în urma tratamentului cu extracte vegetale sau apicole; detecția și cuantificarea citokinelor în sistem multiplex pe bile magnetice utilizând aparatul Bio-Plex 200 etc;
- **laboratorul de biologie moleculară:** RT-*real time* –PCR pentru evidențierea nivelului de expresie a anumitor biomarkeri în urma tratamentului cu extracte vegetale; evidențierea metilării globale și a unor biomarkeri specifici etc.

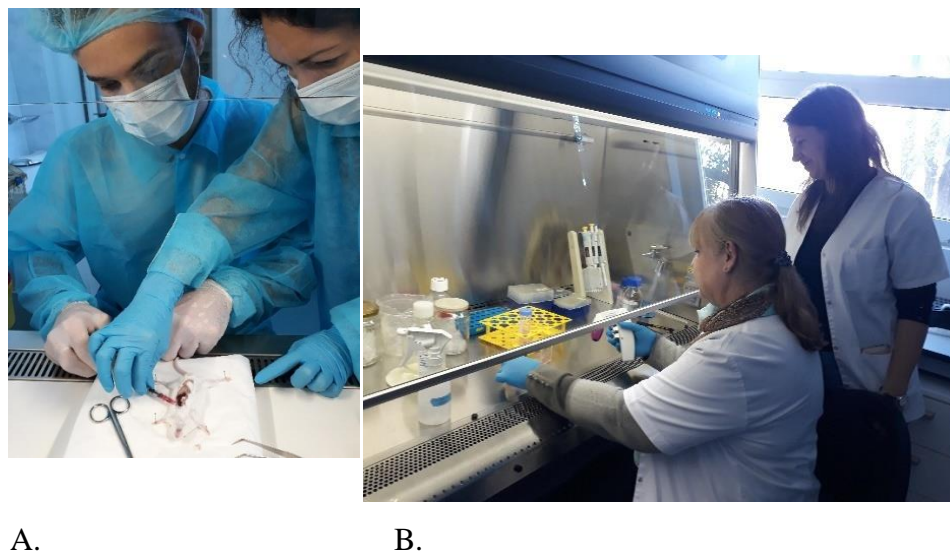


Fig. 4. A. Învățarea procedurilor de colectare a sângelui total prin puncție cardiacă (Biobaza Institutului de Virusologie Ștefan S. Nicolau); B. Insușirea teoriei și practicilor necesare pentru inițierea și menținerea cu succes a culturilor de celule animale de către angajații Hofigal.

În cadrul Institutului de Cercetări al Universității din București subiectele abordate în timpul trainingului au inclus **determinarea activității antimicrobiene și antibiofilm a extractelor vegetale:** determinarea concentrației minime inhibitorii prin metoda microdiluțiilor, concentrației minime de eradicare a biofilmelor prin metoda microtitrării, zonelor de inhibiție a creșterii prin metoda difuzimetrică.

### **Activitate 3.4. Studiul genotoxicității extractelor vegetale și apicole și al unor combinații ale acestora**

Evaluarea și testarea genotoxicității s-a realizat pentru extractele naturale cele mai active, din punct de vedere al acțiunilor biologice urmărite, și care au făcut obiectul cererilor de brevet depuse sau care urmează a fi depuse, respective extractul de rostopască (extract total concentrat) *Chelidonium majus*, cătină roșie (*Tamarix gallica*) și lemn dulce (*Glycyrrhiza glabra*).

Conform OECD, testul de micronucleație *in vitro* (487 OECD Guideline) este recomandat ca un test de bază pentru evaluarea și caracterizarea capacității genotoxice a agenților chimici/farmaceutici. Este utilizat în scopul detectării micronucleilor în citoplasma celulelor interfazice. Micronucleii sunt fragmente cromozomale acentrice (fără centromer) sau cromozomi întregi incapabili de a migra la unul din cei doi poli ai celulei în timpul anafazei mitotice. Acest test detectează activitatea clastogenică și aneugenică a unor agenți chimici, în celule care au parcurs diviziunea celulară în timpul sau după expunerea la substanța de testat. Prin intermediul testului de micronucleație *in vitro* (MNvit) se poate determina rapid frecvența leziunilor cromozomale precum și a perturbărilor în desfășurarea ciclului celular produse de un agent chimic (care este testat). Acest test a câștigat mai multă popularitate față de testul detectării aberațiilor cromozomale (CAAT) deoarece este mult mai fezabil, ușor de realizat, rapid și mai sensibil în detectarea leziunilor subtile provocate de agenții aneugeni și clastogeni. Pentru evaluarea genotoxicității prin testul MNvit, sângele periferic a fost recoltat de la o persoană feminină, de vârstă medie, sănătoasă, care nu a fost expusă recent la agenți genotoxici (substanțe chimice, radiații ionizante, infecții bacteriene/virale). Sângele periferic a fost recoltat pe anticoagulant (heparină) și transferat în mediu PB-MAX (GIBCO) suplimentat cu fitohemaglutinină (agent mitogen), BSA, aminoacizi și antibiotic. Culturile au fost incubate la 37°C, 5%CO<sub>2</sub>. Fiecare probă, inclusiv controlul negativ, a fost realizată în duplicat. După 48 de ore culturile de limfocite au fost tratate cu extracte vegetale, după cum urmează:

- Extract total de rostopască: concentrațiile 0,1% (concentrația A) și 0,2% (concentrația B);
- Extract de cătină roșie: concentrațiile: 0,02% (concentrația A) și 0,1% (concentrația B);
- Extract de lemn dulce: 0,02% (concentrația A) și 0,05% (concentrația B).

Ulterior, culturile de limfocite sacrificate la 24 de ore după adăugarea extractelor timp suficient pentru ca celulele să treacă prin mai multe runde de diviziune celulară astfel încât, să se poată identifica potențialele leziuni ADN sub forma de micronuclei în celulele interfazice. Sacrificarea s-a realizat prin

hipotonizare în soluție de KCl 0,075M și fixarea celulelor în soluție de metanol/acid acetic 3:1. Preparatele microscopice din suspensia celulară au fost colorate în soluție Giemsa (Merck). Lamele microscopice au fost tratate în prealabil cu Tripsina-EDTA 10X. Analiza preparatelor microscopice s-a realizat la microscopul Olympus BX40 și analizate cu ajutorul programului QuickPhotoMicro 2.3. Culturile de limfocite s-au realizat fără cytochalasin B, fiind astfel necesară măsurarea indicelui RICC (*Relative Increase in Cell Count*) astfel încât, să se demonstreze faptul că celulele din cultură au parcurs diviziunea celulară (s-a evitat răspunsul fals pozitiv). Astfel, dacă citotoxicitatea depășește 60%, apariția micronucleilor este un efect secundar al citotoxicității, astfel încât nu poate fi evaluată incidența micronucleilor ca urmare a genotoxicității substanței.

**Rezultate:** conform indicelui RICC a fost calculată citotoxicitatea pentru fiecare concentrație și pentru fiecare tip de extract. Concentrațiile testate au fost alese în funcție de valoarea concentrației minime inhibitorii și de eradicare a biofilmelor microbiene. Citotoxicitatea extractelor testate s-a încadrat în limitele de admisibilitate pentru o analiză de acuratețe a genotoxicității, putându-se evalua incidența micronucleilor.

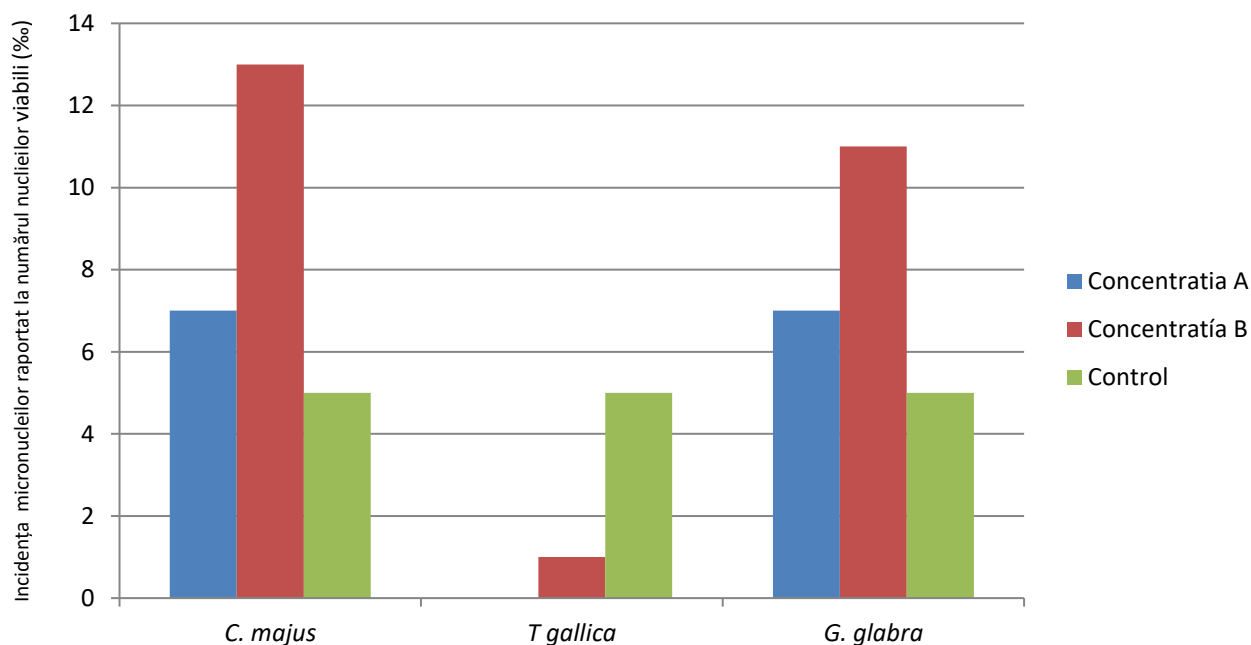


Fig. 5. Reprezentarea grafică a incidenței micronucleilor (%) în extractele naturale studiate raportat la controlul negativ.

Extractul total de *C. majus* de concentrație 0,1% a determinat o incidență scăzută a micronucleilor, comparativ cu controlul negativ și reprezintă o concentrație favorabilă evaluării

capacității genotoxice. Creșterea concentrației la 0,2% în cele două replici ale culturii a determinat o incidență ridicată a micronucleilor și deci, o capacitate genotoxică crescută.

În cazul extractului de *T. gallica* s-a constatat scăderea incidenței micronucleilor sub limita controlului negativ, concomitent cu scăderea proliferării celulare, probabil ca urmare a inhibării diviziunii celulare. Extractul de *G. glabra* la concentrația de 0,02% a indus o incidență scăzută a micronucleilor raportat la control, deci o genotoxicitate scăzută (fig. 5).

### Activitate 3.5. Formularea indicațiilor terapeutice ale extractelor naturale testate, ca substanțe farmaceutice active din punct de vedere al calității și siguranței, în conformitate cu prevederile legislației în vigoare

**Tabelul 1. Indicațiile terapeutice ale celor mai active extracte testate**

Extract	Activitate antimicrobiană		Activitate antivirală		Activitate antitumorală		Activitate imunomodulatoare		Siguranță	
	Activitate antibacteriană	Activitate antibiofilm	Activitate virucidă HSV2/HSV1/ADV5 (log inhibiție)	Acțiune profilactică (log inhibiție) HSV2/HSV1/ADV5	Blocarea CC/ Efect pro-apoptotic (concentrație %)	Stimularea activității caspazice	Efect pro-inflamator	Efect anti-inflamator	Citotoxicitate (24h)	Efect genotoxic
Tinctură de propolis 30%			2,5/2,7	1,3/0	0,1 (>24h)	0,25			<0,1%	
Tinctură de propolis 50%			3/2,7	2/0,05/	0,1 (>24h)	0,15			<0,1%	
Soluție apoasă de propolis 30%			3,5/0,7	1,5/0,4	10	-0,09			1%	
Soluție apoasă de propolis 50%			1,15/0,7	0,8/0,4	10	-0,06			1%	
Extract total concentrat (ETC) de rostopască			2/3,3/1,3	1,3/2/1	≥0,25	0,12			0,05%	
ETC de cătină roșie			4/4,3/4,3	0,6/0,7/1	0,05	0,23			<0.01%	
ETC de armurariu			2/2,3/2,3	0,3/1/0,3	1%(>24h)	0,13			1%	
ETC de rozmarin			2/3/3	1,3/0/0,3	10%	0,18			1%	
ETC de lemn dulce			3/3/2,3	1,3/0,3/0,3	0,05	0,11			<0.01%	

**Tabelul 2. Indicațiile terapeutice ale compozițiilor cu efecte terapeutice superioare extractelor individuale**

Extract	Activitate antimicrobiană		Activitate antivirală (log inhibiție) - HSV2/ADV5/ECHO			Activitate antitumorală	Activitate imunomodulatoare		Siguranță	
	Activitate antibacteriană	Activitate antibiofilm	Activitate virucidă	Acțiune profilactică (extract conc. nontoxica)	Acțiune antivirală (extract conc. nontoxica)	Blocarea CC/ Efect pro-apoptotic (concentrație %)	Activitate antibiofilm	Activitate virucidă	Citotoxicitate (24h)	Efect pro-apoptotic
Rostopască-cătină roșie			2/2,7/2	0,3/0/1	0,3/2/0,3	0,25/0,05 (>24h)			0,05-0,01	
Rostopască-lemn dulce			1,7/1/1	1/0/1	0/2,6/0	0,25/0,05 (>24h)			0,05-0,01	
Cătină-lemn dulce			2/2,7/2	0,6/0/1,6	0,3/2/0,3	0,05/0,05 (>24h)			0,01-0,01	
Rostopască-lemn dulce-cătină			2/2,7/1	0/0/0,3	0,3/3/0,3	0,25/0,05/0,05 (>24h)			0,05-0,01-0,01	

### Activitate 3.6. Diseminarea rezultatelor proiectului

**Comunicarea rezultatelor de cercetare în cadrul unor conferințe anuale (Cel puțin 2 conferințe /an)**

1. Dunya A. Al-Kurjiya, Haifa Najee, Marcela Popa, Omar Sadik Shalal, Othman Al-Mahdawy, Grigore Mihăescu, Mariana Carmen Chifiriuc, Antifungal activity of some plant extracts on non- *Candida albicans* spp. strains isolated from hospitalized patients. ESENIAS and DIAS Scientific Conference and 8th ESENIAS Workshop. 26 – 28 September 2018, București, România

2. Haifaa Najee, Luminița Măruțescu, Marcela Popa, Carmen Chifiriuc, Veronica Lazăr, Antimicrobial activity of medicinal plants essential oils and their synergy with antibiotics on adherent microbial cells. Sesiunea de Comunicări Științifice a Studenților Facultății de Biologie – Ediția 2018, 19.05.2018, București, România
3. Lilia Matei, Ioana Mădălina Pitică, Denisa Dragu, Cristian Coman, Mihaela Economescu-Chivu, Irina Alexiu, Laura necula, Cristina Mambert, Alina Iulia Neagu, Saviana Nedeianu, Carmen Cristina Diaconu, Iuliana Crișan, Coralia Bleotu. The antiviral and immunomodulatory activities of *Chelidonium majus L.* and of *Tamarix gallica* extracts. Poster prezentat la a XIII-a editie a Simpozionului Academician Nicolae Cajal, 22-24 martie, 2018, București, România
4. Irina LAexiu, Lilia Matei, Ioana Mădălina Pitica, Denisa Dragu, Marcela Popa, Luminița Măruțescu, Cristian Coman, Mihaela Economescu, Laura Necula, Cristina Mambert, Alina Iulia Neagu, Carmen Cristina Diaconu, Iuliana Crișan, Coralia Bleotu, Three medicinal plants tested for their antimicrobial and antiviral activity, 2nd World Congress and Expo on Traditional and Alternative Medicine, 14-16.06.2018, Roma Italia – **premiul pentru cel mai bun poster**
5. Lilia Matei, Corina Dinică, Denisa Dragu, Felix Brehar, Laura Necula, Mihaela Economescu, Carmen Cristina Diaconu, Coralia Bleotu. The influence of micro-media on the glioblastoma cells features, Zilele Medicale și Științifice ale Institutul Oncologic Prof. univ. dr. Alexandru Trestioreanu - Abordarea multidisciplinară a pacientului oncologic, 17-19.05.2018, București, România

### **Trimiterea spre publicare a articolelor de cercetare către reviste internaționale**

#### **Articole ISI**

1. Haifaa Najee, Crina Kamerzan, Luminița Măruțescu, Irina Gheorghe, Marcela Popa, Grațiela G Pircalabioru, Mariana Carmen Chifiriuc, Veronica Lazăr, 2018. Antifungal activity of some medicinal plant extracts against *Candida albicans* nosocomial isolates, *Romanian Biotechnological Letters*, 23(6):14074-14079, doi:10.26327/RBL2018.190  
<https://romanianbiotechnologicalletters.wordpress.com/2018/07/23/antifungal-activity-of-some-medicinal-plant-extracts-against-candida-albicans-nosocomial-isolates/>
2. Veronica Lazăr, Lia Mara Dițu, Grațiela Grădișteanu Pîrcălăbioru, Irina Gheorghe, Carmen Curuțiu, Alina Maria Holban, Ariana picu, Laura Petcu, Mariana Carmen Chifiriuc, 2018. Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer. *Frontiers in Immunology*, 9, 1830. doi:10.3389/fimmu.2018.01830



<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01830/full>

3. Carmen Limban, Alexandru Vasile Missir, Miron Teodor Caproiu, Alexandru Mihai Grumezescu, Mariana Carmen Chifiriuc, Coralia Bleotu, Luminita Marutescu, Marius Toma Papacocea, Diana Camelia Nuta, 2018. Novel hybrid formulations based on thiourea derivatives and Core@Shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C18 nanostructures for the development of antifungal strategies, *Nanomaterials*, 8 (47), doi:10.3390/nano8010047  
<https://www.mdpi.com/2079-4991/8/1/47>
4. Dunya A.Al-Kurjiya, Irina Gheorghe, Marcela Popa, Grațîela G Pîrcălăbîoru, Grigore Mihăescu, Luminița Măruțescu, 2018. Characterization of non-albicans *Candida* species involved in human infections, *Romanian Biotechnological Letters*, doi:10.26327/RBL2018.167  
<https://romanianbiotechnologicalletters.wordpress.com/2018/05/15/characterization-of-non-albicans-candida-species-involved-in-human-infections/>

#### Articole BDI

5. Haifaa Najee, Irina Gheorghe, Grațîela Grădișteanu Pîrcălăbîoru, Mariana Carmen Chifiriuc, Veronica Lazăr, 2018. Genotypic characterization of adhesion and biofilm development genes in *Candida albicans* strains isolated from different clinical specimens, *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 8(5):3590-3593  
<http://biointerfaceresearch.com/>

#### Capitole în cărți internaționale

1. Grațîela G. Pîrcălăbîoru, Ariana Picu, Laura Petcu, Marcela Popa, Mariana Carmen Chifiriuc, 2018. The Intricate Relationship between Diabetes, Diet and the Gut Microbiota. Additional information is available at the end of the chapter. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.70602>

#### Brevete de invenție (Cel puțin 2 brevete de invenție)

În urma analizei rezultatelor obținute au fost selectate 2 produse care au prezentat acțiune multifarmacologică, care au făcut obiectul a 2 cereri de brevet:

1. Cerere brevet invenție A/00846 - Procedeu de obținere a unui extract total concentrat de rostopască (*Chelidonium majus*) cu activitate antimicrobiană, antivirală, antitumorală și imunomodulatoare
2. Cerere brevet invenție A/00854 – Procedeu de obținere a unui extract total concentrat de cătină roșie (*Tamarix gallica*) cu activitate antimicrobiană, antivirală, imunomodulatoare și antiproliferativă

### **Workshop final**

În perioada 16 Septembrie – 4 Octombrie, în cadrul unui *workshop*, a fost realizat transferul cunoașterii privind investigarea proprietăților antiinfecțioase și antitumorale ale unor noi formulări cosmetice și farmaceutice pe bază de extracte naturale către gentul economic, prin prezentarea metodologiei utilizate și discutarea modului de valorificare a rezultatelor obținute (selectarea produselor pentru brevetare, respectiv agreearea planului de diseminare a rezultatelor nepublicate, după finalizarea proiectului).

Link eveniment:

<http://icub.unibuc.ro/index.php/component/jevents/eventdetail/1105/49%7C50%7C51%7C52%7C63/workshop-metode-de-investigare-a-proprietatilor-antiinfecioase-si-antitumorale-ale-unor-extracte-naturale-si-apicole?Itemid=1>

### **Realizarea tezelor de finalizare a studiilor**

În cadrul acestui proiect au fost implicați 2 studenți și 2 doctoranzi, care și-au realizat partea experimentală a tezelor de licență, masterat sau unele capitole din tezele de doctorat, cu titlurile:

Licență – 2018 – Almăjanu E. Oana-Lorena – Studiul influenței unor produși apicoli și vegetali asupra microbiotei – Coordonator: Curuțiu Carmen

Licență – 2018 – Tritean L. Namoni - Efectul imunomodulator și antimicrobian al extractelor vegetale – Coordonator: Mariana Carmen Chifiriuc

Doctorat – în pregătire - Haifaa Bawie Najee - Biological activity of vegetal total extracts and essential oils on antibiotic resistant microbial strains and biofilm forming microorganisms Coordonator prof. dr. Veronica Lazăr

Doctorat – în pregătire – Coban Sorina – Studiul activităților biologice ale unor extracte totale și ale unor fracții ale acestora provenite din flora autohtonă Coordonator prof. dr. Veronica Lazăr

## Concluzii

- În cadrul ultimei faze a proiectului au fost analizate un număr total de, pentru care s-a realizat studiul activității antitumorale și al genotoxicității extractelor analizate în fazele anterioare, în scopul formulării indicațiilor de utilizare ale acestora.
- Testarea citotoxicității a 15 extracte vegetale și apicole extractelor vegetale celule Hep2 VSHE și HT-29 a permis stabilirea gamei de concentrații la care extractele testate au fost netoxice, respectiv de 0,01 - 10%, utilizate în determinările ulterioare.
- Cuantificarea apoptozei și necrozei celulelor tumorale în prezența concentrațiilor netoxice de extracte vegetale a indicat niveluri de viabilitate celulară ridicate pentru concentrații de 10% ale soluțiilor apoase de propolis, de 1% pentru extractele de armurariu și rozmarin, de 0,1% pentru extractul de rostopască și pentru tincturile de propolis, de 0,05% pentru extractul de lemn dulce și de 0,01% pentru extractul de cătină roșie.
- Tincturile de propolis și extractele de cătină, rostopască, armurariu, lemn dulce și rozmarin induc o activare a activității caspazice globale în celulele tumorale Hep-2. De asemenea, extractele de cătină și de rostopască, precum și combinațiile rostopască-cătină, cătină-lemn dulce, rostopască –lemn dulce și rostopască cătină–lemn dulce induc apariția apoptozei acestor celule, demonstrând potențialul efect antiproliferativ al acestora.
- Evaluarea genotoxicității celor mai active extracte naturale, care au făcut obiectul cererilor de brevet depuse sau care urmează a fi depuse a evidențiat faptul că extractul total de rostopască de concentrație 0,2% a prezentat o capacitate genotoxică crescută, în timp ce extractele de cătină roșie și de lemn dulce au prezentat o genotoxicitate scăzută.
- Diseminarea rezultatelor proiectului în anul 2018 s-a realizat prin comunicarea rezultatelor de cercetare în cadrul a 3 conferințe naționale, publicarea a 4 articole ISI, 1 articol BDI, 1 capitol într-o carte publicată în editură internațională, 2 brevete de invenție, 1 workshop final, 2 teze de licență, 2 teze de doctorat.
- În concluzie, obiectivele acestei etape, precum și livrabilele propuse au fost realizate în totalitate.

### **Bibliografie selectivă**

Burt S., *Int. J. Food Microbiol.*, 94(3), 223-53,2004

Cowan M.M. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4), 564-82, 1999

Santajit S., Indrawattana N. *Biomed. Res. Int.*,17, 123-127, 2016

Solowey E, et al., *The Scientific World J.*, 2014, Article ID 721402, 2014