

REZUMAT

Structura tezei

Teza de doctorat este compusă din două părți, *Partea I – Sinteza datelor din literatură* cu capitolele I : Aspecte generale privind plantele medicinale studiate; II. Proprietățile terapeutice și antifungice ale plantelor medicinale studiate și *Partea a-II-a – Contribuții personale* cu capitolele: III. Obiectivele cercetării; IV. Metodologia de lucru; V. Rezultate experimentale obținute, iar la final un capitol de concluzii urmat de anexe și bibliografie.

Cuvinte cheie: Plante medicinale; Randament de obținere a uleiurilor esențiale; Compoziția chimică a uleiurilor esențiale; Concentrație minimă inhibitorie; Concentrație minimă fungică;

Ipoteză

Tema acestei teze de doctorat abordează una din principalele probleme ale agricultorilor și anume combaterea fungilor pentru reducerea pierderilor de cereale din depozite.

De asemenea preocuparea pentru calitatea produselor primare de origine vegetală este tot mai accentuată în zilele noastre. Evitarea utilizării compușilor chimici în tratamentele fitosanitare este o metodă foarte bună de a asigura produse necontaminate cu reziduuri de pesticide. În acest scop se caută soluții alternative care să asigure o protecție a culturilor și a recoltelor ecologice. Alături de alți fitocompuși, uleiurile esențiale ar putea fi printre cele mai promițătoare soluții pentru înlocuirea substanțelor chimice sintetice antifungice și antimicrobiene folosite în prezent.

Din punct de vedere chimic, uleiurile volatile reprezintă amestecuri de substanțe constituite din hidrocarburi terpenice, hidrocarburi aromatice, alcooli, aldehide, cetone, acizi organici, pigmenți, eteri, esteri. [62].

Din aceste considerente, tema tezei de doctorat intitulată „Studii privind proprietățile antifungice, antimicrobiene și antioxidante a uleiurilor esențiale din plante medicinale (*familia Lamiaceae*)” se concentrează pe următoarele direcții: activitatea antimicrobiană a extractelor alcoolice împotriva bacteriilor Gram pozitive și Gram negative, activitate antioxidantă ridicată, exprimată prin valorile FRAP din plantele medicinale și activitatea antifungică corelate cu lipsa de toxicitate, efectul uleiurilor esențiale împotriva producției DON dezvăluie o putere tot mai mare asupra

inhibării dezvoltării micotoxinei proporțională cu concentrația uleiuri, uleiurile esențiale ar fi recomandate ca un conservant natural pentru produse alimentare depozitate.

Această lucrare are ca obiect de cercetare studiul în vitro (în condiții controlate, de laborator) a potențialului antifungic al uleiurilor esențiale extrase din speciile de plante medicinale: *Lavandula angustifolia* Mill., *Mentha piperita* L. și *Mentha smithiana*, *Melissa officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Ocimum basilicum* L., toate aparținând familiei *Lamiaceae*.

Obiective principale:

- Determinarea compoziției chimice a uleiurilor esențiale studiate;
- Determinarea concentrației minime de inhibare a fungilor *Verticillium dahliae* și *Penicillium aurantiogriseum*;
- Determinarea concentrației fungicide a uleiurilor esențiale studiate asupra fungilor *Verticillium dahliae* și *Penicillium aurantiogriseum*.

Obiective secundare:

- Determinarea compoziției chimice primare și a conținutului de micro și macroelemente din materialul vegetal;
- Determinarea randamentului de uscare.

Material și metodă

Speciile de plante medicinale studiate: *Lavandula angustifolia* Mill., *Mentha piperita* și *Mentha smithiana*, *Melissa officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Ocimum basilicum* L.

Fungii testați: *Verticillium dahliae* și *Penicillium aurantiogriseum*.

În vederea realizării lotului experimental cu materialul biologic cultivat, pregătirea terenului s-a realizat, respectând tehnologia specifică aplicată culturilor medicinale având în vedere următoarele aspecte:

- realizarea unui câmp bine nivelat, mărunțit și uniform verigă tehnologică esențială în vederea realizării condițiilor optime de creștere și dezvoltare a culturilor;
- executarea lucrărilor de bază specifice și a pregătirii patului germinativ, fertilizarea cu îngrășăminte organice (mranită);
- respectarea variantelor tehnologice de cultivare a plantelor medicinale – distanța între rânduri și plante/rând, exprimă desimea de plantare, plante /m², mai ales cele cu privire la

înființarea culturilor (plantarea butașilor și a răsadurilor) pentru asigurarea unui spațiu de nutriție optim plantelor.

În câmpul experimental cultivat cu cele 6 specii de plante medicinale din familia *Lamiaceae* s-au aplicat, toate lucrările de întreținere impuse de agrotehnica culturii.

După plantare, timp de 10 zile s-au efectuat irigații dimineața pentru a asigura necesarul de umiditate pentru creșterea și dezvoltarea plantelor.

Metoda de lucru a cuprins următoarele etape: Recoltarea materialului vegetal, uscarea materialului vegetal, extracția uleiului esențial, determinarea compoziției chimice primare și a micro și macronutrienților din materialul vegetal proaspăt, determinarea compoziției chimice a uleiului esențial, pregătirea mediilor de cultură cu ulei esențial, inocularea fungilor pe mediu de cultură cu ulei esențial la diferite concentrații, evaluarea creșterii fungilor după 9 zile, reinocularea rondelilor de funghi nedezvoltate pe mediu proaspăt fără ulei esențial pentru determinarea concentrației fungicide.

Plantele medicinale studiate (*Lavandula angustifolia* Mill., *Mentha piperita* L. și *Mentha smithiana*, *Melissa officinalis* L. , *Rosmarinus officinalis* L.) au fost plantate în câmp la data de 1 Mai 2011 iar *Ocimum basilicum* L. singura specie anuală din cele 6 specii studiate în aceasta lucrare a fost plantată în luna Martie din anul 2014 . Recoltările pentru obținerea uleiurilor volatile au avut loc în anul 2014 la momentul de înflorire a 50 % din totalul florilor speciei respective.

Determinarea conținutului de lipide, proteine și carbohidrați a fost realizat folosind metodele oficiale AOAC (AOAC, 1997): proteina (metoda 954.01); lipide (920.39); cenușa (923.03) și umiditatea (925.09). Conținutul de carbohidrați a fost determinat prin diferența față de ceilalți macronutrienți. Fiecare rezultat este valoarea medie a 3 încercări.

Uleiurile esențiale au fost obținute prin hidrodistilare continuă (extracție Soxhlet).

Compoziția chimică a uleiurilor esențiale s-a determinat cu ajutorul unui gaz-cromatograf cu spectrometru de masă (GC/MS). S-a folosit cromatograful Agilent Technology 7820A (Agilent Scientific, USA) cuplat cu spectrometru de masă MSD 5975 și echipat cu o coloană capilară cu caracteristicile: DB 5: (30 m X 250 μm X 0.25 μm, Agilent, USA).

Testarea activității antifungice a uleiurilor volatile s-a făcut astfel:

Izolatul *Graminearum* F. a fost obținut prin recoltarea de semințe bolnave de grâu și punerea pe dextroză Agar (PDA), în vara anului 2012. Observațiile creșterii de *Fusarium* pe mediu proaspăt

a durat timp de 7 zile. Activitatea fiecărei concentrații a diferitelor uleiuri fost considerată fungicidă în cazul în care *Fusarium graminearum* nu a crescut sau fungistatic dacă a avut loc o creștere. Într-una din probe de mediu s-au adăugat tiofanat de metil, fungicid comercial care este recomandat în practicile agricole. Probele VOT au fost utilizate ca martor negativ. Experimentele au fost efectuate de două ori.

Rata de inhibare a fost calculată cu formula:

$$I\% = [C - V / C] \times 100,$$

unde C - diametru de creștere miceliu (mm) cu privire la controlul, cya cu nici un adaos,

V - diametrul de creștere miceliu (mm) la variantele (V1 pentru a V5)

Proba de grâu, natural contaminată cu 0,816 ppm deoxinivalenol, a fost cântărită (2000 g) și sterilizată chimic astfel încât mycoflora oportunistă să fie inactivate. Probele de grâu (100 g) au fost inoculate separat, cu EO la diferite niveluri. Toate experimentele au fost efectuate în triplicat. Probele de control au fost tratate, de asemenea, cu 1 ml etanol. Probele au fost incubate la 25 ° C timp de 22 de zile și aw probelor de semințe de grâu a fost menținut la 0,90 de cântărire și de pulverizare cu apă sterilă. Don a fost analizat folosind un test de imunosorbție legată de enzimă (ELISA). Cea mai scăzută concentrație de uleiuri esențiale care nu permit creșterea fungică vizibilă a fost luată ca MIC.

Concluzii

- Compoziția proximată a arătat că plantele medicinale studiate sunt bune surse de carbohidrați și substanțe nutritive, conținut ridicat de K, urmată de Ca, Mg, Fe și Zn. Având în vedere acest aspect, plantele medicinale aparținând familiei *Lamiaceae* cultivate în partea de vest ale României reprezintă o sursă de principii nutriționale și terapeutice cu efecte pozitive asupra sănătății umane. Aceste date sunt importante pentru evaluarea nutrițională și farmacologică, etichetarea plantelor medicinale și educarea consumatorilor.
- În ceea ce privește activitatea antimicrobiană a extractelor alcoolice din plantele medicinale doar RO a prezentat activitate împotriva bacteriilor Gram pozitive și Gram negative. Extractul RO prezintă un efect antibacterian mai mare împotriva *L.monocytogenes* și mai puțin pe *Escherichia coli*

- Rezultatele obținute în prezența a două concentrații de acid rozmarinic (RS) au indicat că acest compus nu este responsabil pentru activitatea antimicrobiană a extractelor vegetale analizate.
- Continutul cel mai ridicat de polifenoli totali (TP) s-a regăsit în RO și în OB.
- Activitate antioxidantă ridicată, exprimată prin valorile FRAP, au înregistrat extractele de MP, MS și OB, în timp ce MO, RO și LA se situează sub medie.
- Dintre acizii hidroxicinnamici (HCAs) analizați cafeic (CA), p-cumaric (CU), ferulic (FE) și acid rozmarinic (RS), cel din urmă se regăsește în cantitatea cea mai mare în extractele de plante medicinale analizate.
- MO se caracterizează printr-un conținut ridicat de acid rozmarinic și ferulic, RO prin conținut ridicat de cumaric și rozmarinic, OB conține preponderent acid rozmarinic, LA conține acid cafeic peste medie, iar MP și MS conține acid cumaric peste media înregistrată.
- Uleiul esențial de *Lavandula angustifolia* Mill. cultivată în condițiile pedologice și agrotehnice specific câmpului experimental al Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului “Regele Mihai I al României” din Timisoara prezintă, ca și compuși chimici majori *Linalool* (43.32 %), *linalyl antranilat* (12.57%) și *alfa-terpineol* (12.69%). Același profil a fost identificat pentru *Lavandula angustifolia* Mill. comercială.
- Din punct de vedere a compoziției chimice a uleiului esențial de *Rosmarinus officinalis* L. principalii compuși chimici detectați au fost alfa-pinene (48.589%) urmat de eucaliptol (16.252%).
- Principalul chemotip identificat în *Mentha piperita* L. este mentol (42.353%), urmat de menton (29.100%) și eucaliptol (5.649%).
- Compoziția chimică a uleiului esențial de *Melissa officinalis* L. (MO) este caracterizată prin prezența unor chemotipuri majoritare ca sabinene (26,45%) și b-caryophilene (12,243%), chemotipuri mai puțin reprezentative pentru celelalte specii analizate.
- Compoziția chimică reprezentată pentru compușii în concentrație mai mare de 10% în fiecare din uleiurile analizate indică faptul că MP, RO și LA conțin mai mult de un compus în proporție de peste 10%, iar natura chemotipurilor reprezentative este diferită pentru fiecare specie astfel: linaloolul este compusul reprezentativ pentru LA și MS,

mentholul pentru MP, sabinen pentru MO, beta-bergamoten si linalool pentru OB, alfa-pinen pentru RO.

- In ceea ce privește activitatea antifungică MCM pentru *Mentha piperita* L. fost de 0,5%, dar efectul fungicid (CFE) a fost relativ mai mic.
- Activitatea antifungică poate fi atribuită prezenței nucleului aromatic care conține o grupare fenolică polară din structura chemotipurilor majoritare a speciilor analizate.
- Efectul uleiurilor esențiale împotriva producției DON dezvăluie o putere tot mai mare asupra inhibării dezvoltării micotoxinei proporțională cu concentrația uleiuri.
- Având în vedere efectele antifungice, corelate cu lipsa de toxicitate, uleiurile esențiale ar fi recomandate ca un conservant natural pentru produse alimentare depozitate.