

UNIVERSITATEA “OVIDIUS” DIN CONSTANȚA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT MEDICINĂ DENTARĂ

TEZĂ DE DOCTORAT
REZUMAT

Conducător de doctorat

Prof. Univ. Dr. BADEA VICTORIA

Student doctorand

MIHAI SEBASTIAN

CONSTANȚA
2019

UNIVERSITATEA “OVIDIUS” DIN CONSTANȚA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT MEDICINĂ DENTARĂ

VALORIFICAREA SPECIEI VEGETALE *SEMPERVIVUM*
***RUTHENICUM* KOCH ÎN PRACTICA MEDICINEI DENTARE**

Conducător de doctorat

Prof. Univ. Dr. BADEA VICTORIA

Student doctorand

MIHAI SEBASTIAN

CONSTANȚA
2019

CUPRINS

Introducere	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
Capitolul I. Scurt istoric al utilizării plantelor medicinale	3
Capitolul II. Rezistența bacteriană la antibiotice.....	8
II.1 Date epidemiologice cu privire la răspândirea rezistenței bacteriene	9
II.2. Inhibiția enzimatică	11
II.3. Scăderea permeabilității membranelor bacteriene	11
II.4. Promovarea efluxului de antibiotic.....	11
II.5. Protejarea situsurilor țintă	12
II.6. Șuntarea inhibiției antibioticului	12
II.7. Mecanisme de rezistență multidrog	12
Capitolul III. Stresul oxidativ în afecțiunile orale.....	14
III.1. Definirea și generarea speciilor reactive ale oxigenului și azotului	14
III.2. Speciile reactive ale oxigenului în procesele celulare normale	16
III.3. Speciile reactive ale oxigenului în afecțiunile orale benigne.....	17
III.3. Peroxidarea lipidelor ca rezultat al infecțiilor	18
III.4. Influența infecțiilor orale asupra altor patologii.....	19
Capitolul IV. Caracteristici ale genului <i>Sempervivum</i>	21
IV.1. Distribuția genului <i>Sempervivum</i>	21
IV.2. Anatomia și morfologia genului.....	23
IV.2.1. Sistemul radicular	23
IV.2.2. Micorize	24
IV.2.3. Morfologia frunzei.....	25
IV.2.4. Piloșitate	27
IV.2.5. Tulpini	28
IV.2.6. Flori.....	28
IV.2.7. Ciclu anual de creștere.....	29
Capitolul V. Compoziția fitochimică și utilizarea medicinală a genului <i>Sempervivum</i>	31
V.1. Metabolismul și producții metabolici ai genului <i>Sempervivum</i>	31
V.2. Compoziția fitochimică a genului <i>Sempervivum</i>	31
V.3. Proprietățile cunoscute ale fitocompușilor raportați	34
V.3.1. Activitățile biologice ale quercetinei	34
V.3.2. Activitățile biologice ale acidului cafeic.....	35
V.3.3. Activitățile biologice ale kaempferolului.....	37

V.3.4. Activitățile biologice ale izorhamnetinei	38
V.3.5. Activitățile biologice ale astragalinei.....	39

STUDIUL I

I.1. Recoltarea și identificarea speciei <i>Sempervivum ruthenicum</i> Koch și obținerea extractelor	40
I.1.1. Recoltarea materialului vegetal	40
I.1.2. Particularități anatomice ale speciei vegetale studiate.....	42
I.1.3. Obținerea produsului vegetal uscat	42
I.1.4. Obținerea extractelor vegetale	43
I.2. Materiale și metodă	45
I.2.1. Determinarea polifenolilor totali.....	45
I.2.2. Determinarea flavonoidelor totale	47
I.2.3. Analiza componentelor extractelor vegetale prin cromatografia de lichide de înaltă performanță	48
I.2.4. Evaluarea capacității antioxidante prin metoda DPPH.....	57
I.3. Rezultate	60
I.3.1. Determinarea polifenolilor totali	60
I.3.2. Determinarea flavonoidelor totale	61
I.3.4. Evaluarea capacității antioxidante prin metoda DPPH.....	83
I.4. Discuții	87
I.5. Concluzii preliminare	91

STUDIUL II

II.1. Studii privind efectul antibacterian al unor extracte vegetale din <i>Sempervivum ruthenicum</i> Koch	92
II.1.1. Materiale și metode	92
II.1.2. Rezultate	96
II.1.3. Discuții	102
II.2. Studii privind efectul antifungic al unor extracte vegetale din <i>Sempervivum ruthenicum</i> Koch	103
II.2.1. Materiale și metode	104
II.2.2. Rezultate	105
II.2.3. Discuții	106
II.3. Evaluarea activității anti-inflamatorii prin inhibarea xantin oxidazei.....	107
II.3.1. Principiul metodei	107
II.3.2. Materiale și metode	108
II.2.3. Rezultate	109

II.2.4. Discuții	114
II.4. Evaluarea activității anti-inflamatorii prin inhibarea denaturării termice albuminei	114
II.4.1. Principiul metodei	115
II.4.2. Materiale și metode	116
II.4.3. Rezultate	117
II.4.4. Discuții	122
II.5. Concluzii preliminare	123
STUDIUL III	
III.1. Formularea și evaluarea <i>in vitro</i> a plasturilor mucoadezivi cu extract hidro-alcoolic din <i>Sempervivum ruthenicum</i> Koch	124
III.1.1. Materiale și metode	125
III.1.2. Rezultate	134
III.1.3. Discuții	140
III.2. Evaluarea activității antioxidante a plasturilor mucoadezivi <i>in vivo</i>	141
III.2.1. Pacienți și Metode	143
III.2.2. Rezultate	145
III.2.3. Discuții	150
III.3. Concluzii preliminare	152
ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATOARE ALE TEZEI	153
IMPACTUL REZULTATELOR OBTȚINUTE	155
CONCLUZII FINALE.....	157
BIBLIOGRAFIE	159
INDEX DE FIGURI ÎN TEXT	172
INDEX DE TABELE ÎN TEXT	176
LISTA ABREVIERILOR FOLOSITE ÎN TEZA DOCTORALĂ	178
LUCRARI PUBLICATE DIN DOMENIUL TEZEI DE DOCTORAT	179

INTRODUCERE

Încă de la începuturile medicinei, remediile vegetale au fost utilizate ca terapie primară pentru un spectru foarte larg de afecțiuni; utilizarea acestor remedii s-a făcut empiric, necunoscându-se compoziția exactă a materiei vegetale utilizate sau a extractelor obținute prin prelucrarea acestora.

În mod tipic, compușii bioactivi ai plantelor sunt produși ca și metaboliți secundari [1]. Fiecare organism viu, pornind de la bacterii până la organisme animale sau vegetale compuse din miliarde de celule, posedă diverși compuși chimici necesari supraviețuirii și subzistenței. Toți compușii unui sistem biologic pot fi împărțiți în două categorii mari. Una este formată din metaboliții primari, ce sunt substanțe chimice ce se leagă de creșterea și dezvoltarea organismului, precum carbohidrații, aminoacizii, proteinele și lipidele. În a doua categorie intră metaboliții secundari, ce sunt un grup de compuși diferiți de metaboliții primari ce au ca scop creșterea capacității organismului de a supraviețui și de a depăși obstacolele locale prin posibilitatea interacțiunii cu mediul înconjurător [2].

Din acești metaboliți secundari, unii au efecte asupra sistemelor biologice, fiind considerate compuși bioactivi. Astfel, o definiție simplă a compușilor bioactivi de origine vegetală este că aceștia reprezintă compuși vegetali ce elicită efecte farmacologice sau toxicologice atât la oameni cât și la animale [1].

În această perioadă, o direcție foarte importantă luată de cercetarea farmaceutică constă în utilizarea plantelor medicinale și a fitocompușilor bioactivi, pe toată suprafața globului. În ciuda concepției comune conform căreia toți fitocompușii sunt siguri, aceștia prezintă aceleași riscuri precum compușii sintetici. Astfel, este necesară elucidarea efectelor secundare, a dozelor corespunzătoare, identificarea fitocompușilor bioactivi și modalități eficiente de extracție și conservare a acestora.

Laboratoare din toată lumea au descoperit mii de compuși vegetali cu efecte inhibitorii asupra tuturor tipurilor de microorganisme *in vitro*. Mulți dintre aceștia trebuie supuși studiilor pe modele animale și umane pentru determinarea eficienței *in vivo*, interesând în mod particular studiile de toxicitate precum și efectele asupra florei saprofite endogene. Ar fi un măreț avantaj standardizarea metodelor de extracție și de testare *in vitro* pentru ca această căutare de noi compuși să fie mai bine sistematizată, iar rezultatele să prezinte o variabilitate cât mai mică.

Cavitatea orală este compusă din mai multe suprafețe, fiecare acoperită cu o pletoară de bacterii, reprezentând biofilmul bacterian. Unele dintre acestea sunt implicate în bolile orale precum cariile dentare și peridontitele, afecțiuni cu prevalență mare la populația umană. De exemplu, s-a estimat că cel puțin 35% din adulții cu vârste între 30 și 90 de ani din Statele Unite ale Americii suferă de parodontită. Mai mult, 3 specii bacteriene orale specifice au fost implicate într-o gamă largă de boli sistemice, precum endocardita bacteriană, pneumonia de aspirație osteomieliita infantilă și boli cardiovasculare [4].

Peste 700 de specii bacteriene (gram-pozitive, gram-negative și *archaea*) au fost identificate în cavitatea orală umană, majoritatea fiind asociate cu placa dentară, făcând astfel comunitatea microbiană orală una dintre cele mai complexe flore microbiene din corpul uman.

Am ales această temă în urma observării unei tendințe generale de cercetare în aria compușilor naturali, proveniți de la specii vegetale, atât în domeniul farmaceutic cât și în cel medical. De asemenea, am fost motivat de conștientizarea dezvoltării rapide a rezistenței microbiene la agenții chimioterapici existenți, fapt ce conduce la apariția tulpinilor microbiene multirezistente ce devin din ce în ce mai greu de eliminat. În opinia personală, acest fenomen poate fi combătut prin descoperirea de noi compuși față de care tulpinile bacteriene nu au dezvoltat încă rezistență, conducând la o îmbunătățire a rezultatelor terapiei antimicrobiene, dar și la potențiala dezvoltare de derivați ai acestor compuși ce poate asigura susținerea eficienței antimicrobiene pe o perioadă lungă de timp.

Teza doctorală este divizată în *PARTE GENERALĂ* și *STUDII PERSONALE*. Bibliografia accesată este prezentată în cadrul bibliografiei selective, aceasta fiind structurată în ordinea citării în text.

Realizarea acestei teze doctorale nu ar fi fost posibilă fără implicarea coordonatorului științific, Prof. univ. dr. Badea Victoria, căreia doresc să-i aduc mulțumiri sincere pe această cale. De asemenea aș dori să mulțumesc corpului didactic din cadrul Facultății de Farmacie Constanța, fără de care nu aș fi putut realiza cercetarea doctorală.

Nu în ultimul rând doresc să aduc mulțumiri familiei și apropiaților care s-au implicat în desfășurarea cercetării doctorale și care mi-au oferit susținerea necondiționată pe durata anilor de studiu.

Cuvinte cheie: *Sempervivum ruthenicum*, HPLC, DPPH, antioxidant.

PARTE GENERALĂ

În prima parte a tezei este descris un scurt istoric al utilizării plantelor medicinale, punându-se accent pe importanța remediilor vegetale în decursul istoriei omenirii, precum și pe actualitatea cercetărilor din acest domeniu, datorită potențialului mare de identificare a unor molecule noi care pot servi atât ca medicație cât și ca punct de plecare pentru obținerea unor substanțe active de semi-sinteză cu proprietăți farmacologice superioare. Capitolul II se referă la rezistența bacteriană la antibiotice și prevalența acestui fenomen la nivel European. Acest capitol trece în revistă mecanismele care stau la baza rezistenței bacteriene la antibiotice și subliniază necesitatea identificării unor molecule active noi la care microorganismele să nu fi dezvoltat încă rezistență. Al treilea capitol se referă la o consecință a colonizării bacteriene și anume stresul oxidativ. Acest capitol detaliază geneza radicalilor liberi la nivelul cavității bucale și subliniază efectele stresului oxidativ atât în patogenează cât și în fiziopatologia unor afecțiuni ale cavității bucale. În acest capitol mai este detaliată și influența stresului oxidativ de la nivel oral asupra altor patologii precum bolile cardiovasculare. Capitolul IV descrie caracteristicile genului *Sempervivum* având în vedere caracteristici morfologice ale genului și în particular asupra speciei *Sempervivum ruthenicum* Koch. Capitolul V. detaliază metabolismul și producții metabolici ai genului, punându-se accent pe producții metabolismului secundar al speciei *Sempervivum ruthenicum*. Acest capitol trece în revistă și cercetările actuale din domeniul medical și farmaceutic asupra speciei *S. ruthenicum* Koch, precum și acțiunile generale al fitocompușilor constituenți.

STUDIUL I.

IPOTEZA DE LUCRU - extractele obținute din *Sempervivum ruthenicum* Koch conțin fitocompuși care pot fi utilizați în practica medicală.

SCOPUL STUDIULUI - obținerea unor extracte din produsul vegetal în care să se identifice și să se caracterizeze cei mai reprezentativi fitocompuși cu acțiune farmacologică.

În acest studiu se descrie recoltarea și prepararea unor extracte vegetale din frunzele speciei *Sempervivum ruthenicum* Koch, punându-se accent pe caracterizarea morfologică a specimenelor colectate, precum și pe tehnicile folosite în scopul obținerii extractelor vegetale. Specia aleasă pentru cercetarea din cadrul acestei lucrări este *Sempervivum ruthenicum* Koch, denumită popular și “urechelniță”. Aceasta este o raritate florală, regăsită în zone stâncoase și aride din Dobrogea. Specia se caracterizează prin inflorescențe compuse, de culoare galbenă, ce prezintă la baza petalelor o colorație roșie distinctă, deosebindu-se de alte specii din genul *Sempervivum*.

În scopul obținerii unor extracte vegetale din specia *Sempervivum ruthenicum* Koch recoltată din arealul natural prezentat anterior, am folosit atât produs vegetal uscat cât și produs vegetal proaspăt recoltat.

În ambele cazuri am efectuat 3 tipuri de extracte, pentru fiecare tip de produs vegetal (uscat și proaspăt), utilizând ca solvenți etanol absolut, un amestec hidroetanolic (50% m/m) și apă dublu distilată. Pentru fiecare tip de extract am utilizat 10g produs vegetal și am completat până la 100 g cu solvent de extracție. În cazul extractelor realizate din produsul vegetal proaspăt, s-a ținut cont de pierderea prin uscare, calculându-se cantitatea necesară de material vegetal echivalentă cu 10 g produs uscat.

METODOLOGIA DE LUCRU

Determinarea polifenolilor totali - Metoda Folin-Ciocalteu (F-C) de analiză este cea mai simplă metodă disponibilă pentru determinarea conținutului fenolic din produsele vegetale sau alimentare. Pentru determinarea conținutului polifenolic total din extracte am utilizat metoda lui Shirazi și colab. [93], cu mici modificări în ceea privește utilizarea standardului de pirogalol.

Determinarea flavonoidelor totale - Evaluarea spectrofotometrică bazată pe formarea complexului de aluminiu este una dintre cele mai utilizate proceduri pentru determinarea flavonoidelor totale, deoarece acesta reprezintă un parametru important în evaluarea calității plantelor medicinale. În cadrul studiului personal am utilizat metoda propusa de Piyanete și colab. [96]. Quercetina a fost utilizată ca standard, iar conținutul de flavonoide a fost determinat ca echivalent al quercetinei.

Analiza componentelor extractelor vegetale prin cromatografia de lichide de înaltă performanță - Pentru separarea, identificarea și cuantificarea compușilor activi din extractele vegetale s-a adaptat o metodă HPLC standardizată de determinare a polifenolilor totali, descrisă de monografia USP 30-NF25 [97]. În acest scop a fost utilizată o cromatogramă HPLC Agilent 1200 cu pompă cuaternară, DAD, termostat, sistem de degazare și autosampler. Condițiile de lucru au inclus:

- coloană cromatografică tip C18, 250 mm × 4,6 mm; 5 μm (Zorbax XDB sau echivalentă);
- fază mobilă (eluție în gradient):
 - soluția A – acid fosforic 0,1%,
 - soluția B – acetonitril;
- temperatură: 35°C;
- debit: 1,5 mL/min;
- detecție UV: 310 nm, 335 nm, 360 nm;
- volum de injecție: 20 μL;
- timpul de analiză: 20 minute.

Identificarea și determinarea cantitativă a principiilor active din soluția de analizat s-au efectuat prin compararea cromatogramelor amestecului de standarde și a soluțiilor individuale de standard cu cromatogramele soluției de analizat.

Evaluarea capacității antioxidante prin metoda DPPH - Evaluarea DPPH este o metodă simplă și intens folosită pentru măsurarea abilității compușilor de a acționa ca scavengeri ai radicalilor liberi sau ca donatori de hidrogen și pentru a evalua activitatea antioxidantă a acestora. Aceasta poate fi utilizată și pentru cuantificarea antioxidantilor din sisteme biologice

complexe, atât pentru probe solide cât și pentru probe lichide. Această metodă este ușoară și se aplică pentru a măsura capacitatea antioxidantă totală și activitatea antiradicali a extractelor vegetale. Efectuarea evaluării DPPH a fost bazată pe metoda utilizată de Ravichandran și colab. [99] cu modificări. Soluția stoc de DPPH 4% a fost preparată în metanol absolut, absorbanta acesteia fiind măsurată la 517 nm, fiind stocată la întuneric. Toate analizele au fost efectuate în triplu exemplar, iar datele sunt raportate ca medie $\pm$ deviație standard (DS). Datele au fost supuse analizei variantei (ANOVA) ($P < 0.05$). Rezultatele au fost procesate cu ajutorul programului Microsoft Excel 360 (Microsoft Office 2016).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conform rezultatelor obținute în urma analizei cromatografice a extractelor vegetale preparate, s-a putut observa o varietate de compuși fenolici, fie de tipul acizilor liberi, fie de tipul flavonoidelor. În comparație cu alte rezultate din literatura de specialitate [61-67], analiza cromatografică efectuată a arătat că toți polifenolii identificați de Gomenyuk și colab. s-au regăsit în analiza proprie. Compușii polifenolici de tipul acizilor liberi au fost regăsiți în toate tipurile de extracte vegetale, deși cea mai mare varietate a acestora s-a putut observa în extractele hidroetanolicе, datorită puterii superioare de solvatare a amestecului de solvenți.

În ceea ce privește determinarea cantitativă a acizilor polifenolici liberi s-a putut observa o diferență marcată între extractele efectuate din produsul vegetal uscat și cele efectuate din produsul vegetal proaspăt. În cazul produsului vegetal proaspăt s-au observat cantități mai mici de acizi polifenolici, precum și lipsa unor compuși precum acidul cafeic, acidul cinamic, acidul clorogenic și Z-resveratol.

În privința celorlalți constituenți, am putut identifica toți compușii menționați în literatura de specialitate, cu excepția sedoheptulozei, care nu a putut fi identificată datorită condițiilor cromatografice.

Astragalina a fost cel mai proeminent fitocompus de tip heterozidic identificat, regăsinde-se în toate tipurile de extracte vegetale și putând fi determinată cantitativ. Cel mai complex profil al fitocompușilor s-a putut observa în cazul extractelor PVUET50 și PVPET50, datorită puterii mari de solvatare a amestecului de solvenți, acesta fiind capabil să extragă atât compușii lipofili

cât și pe cei hidrofilii. Cu toate acestea, rămân în continuare numeroși fitocompuși care nu au putut fi identificați prin metoda HPLC datorită numărului limitat de standarde utilizate.

În urma evaluării capacității antioxidante a extractelor, realizată prin metoda DPPH, rezultatele obținute sugerează o activitate antioxidantă bună a extractelor analizate. Se poate observa că extractele din produs vegetal uscat prezintă capacitate antioxidantă ridicată și o concentrație inhibitorie 50% mică. Dintre aceste extracte, cea mai bună activitate inhibitorie a prezentat-o extractul hidroetanolic, fapt ce poate fi explicat prin solubilitatea sporită în sistemul de solvenți a acizilor polifenolici liberi, principalii responsabili pentru această activitate.

În ceea ce privește extractele realizate din produsul vegetal proaspăt, rezultatele au fost mai slabe decât în cazul produselor anterior menționate. În acest caz, cea mai pronunțată activitate antioxidantă a fost prezentată de extractul hidroetanolic, fiind urmată de extractul etanolic. În cazul valorilor IC₅₀, extractul hidroetanolic a prezentat cea mai mică activitate inhibitorie. Cu toate acestea, valorile atât ale activității inhibitorii 50 cât și a activității inhibitorii totale au fost cu mult mai mari față de cele prezentate de extractele discutate anterior.

STUDIUL II

IPOTEZA DE LUCRU – extractele obținute din *Sempervivum ruthenicum* Koch conțin fitocompuși cu efect antibacterian și antiinflamator *in vitro*.

SCOPUL STUDIULUI – utilizarea extractelor vegetale pentru a demonstra acțiunea antibacteriană și antiinflamatorie *in vitro*.

Acest studiu a avut ca scop evaluarea efectelor antibacterian și antifungic a extractelor obținute anterior prin metode difuzimetrice, împotriva unor patogeni regăsiți la nivelul cavității bucale și implicați în cariogeneza. De asemenea, studiul a urmărit evaluarea *in vitro* a activității antiinflamatoare a extractelor obținute, prin inhibarea enzimei xantin oxidaza și prin inhibarea denaturării termice a albuminei.

METODOLOGIA DE LUCRU

Studii privind efectul antibacterian al unor extracte vegetale din *Sempervivum ruthenicum* Koch - În scopul desfășurării experimentului au fost selectate trei specii bacteriene saprofite, condiționat patogene izolate clinic din cavitatea bucală, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus citreus* și *Streptococcus sanguis* (viridans). Acestea au fost identificate utilizând kit-uri Api[®] 20 Strep (bioMérieux, Franța), respectiv Api[®] 20 Staph (bioMérieux, Franța). Plăcile utilizate pentru izolarea culturilor au fost de tip geloza sânge (REF 6378, Bio-Rad, Dubai) și Mueller Hinton (REF 63824, Bio-Rad, Dubai). Toate instrumentele utilizate au fost sterile, iar în scopul aprecierii turbidității a fost utilizat un spectrofotometru UV-VIS Varian Cary 50 (Agilent Technologies). Activitatea antibacteriană a extractelor vegetale a fost evaluată pornind de la o metodă standardizată, respectiv metoda difuzimetrică, care a fost adaptată [109]. Principiul metodei difuzimetrice se bazează pe o relație de directă proporționalitate între nivelul de sensibilitate și mărimea ariei de inhibiție a dezvoltării coloniilor de germeni în jurul comprimatului de antibiotic. Adaptarea realizată în cadrul studiului a constat în înlocuirea comprimatelor de antibiotic cu rondelle de hârtie de filtru saturate cu soluția de testat. Fiecare din tulpinile bacteriene identificate au fost inoculate în bulion proaspăt preparat, obținându-se o concentrație exprimată printr-o valoare a turbidității de 0.5 Mac Farland [109]. Aceste suspensii

au fost apoi, însămânțate pe medii de cultură Muller Hinton cu ajutorul unui tampon steril. Rondelele de hârtie de filtru sterile au fost saturate cu 10 μ L de extract cu concentrația de 500 mg/mL. Probele au fost aplicate pe suprafața mediilor însămânțate apoi, acestea au fost incubate timp de 24 de ore la o temperatură constantă de $36.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. După cele 24 ore de termostatare, plăcile au fost evaluate pentru determinarea ariilor de inhibiție. Toate experimentele au fost realizate în triplu exemplar rezultatele fiind exprimate ca medie $\pm$ deviație standard. Măsurarea ariilor de inhibiție s-a realizat prin utilizarea software-ului AutoCAD 2018, utilizând diametrul filtrelor impregnate cu extractele vegetale ca măsură de referință. Prelucrarea statistică a datelor a presupus determinarea indicelui de corelație Pearson cu ajutorul software-ului Microsoft Excel 360.

Studii privind efectul antifungic al unor extracte vegetale din *Sempervivum ruthenicum* Koch - În scopul acestui experiment s-a utilizat o tulpină de referință *Candida albicans* ATCC 10231, care a fost crescută pe un mediu de cultură Sabouraud timp de 96 de ore la o temperatură de 32°C . Confirmarea patogenului a fost efectuată în urma analizării coloniilor formate. Activitatea antifungică a extractelor vegetale a fost determinată prin metoda difuzimetrică [109], conform metodologiei prezentată anterior, cu mici modificări. Ariile de inhibiție ale extractelor vegetale au fost evaluate la 24 și la 48 de ore de la începerea incubării mediilor de cultură. Toate experimentele au fost realizate în triplu exemplar rezultatele fiind exprimate ca medie $\pm$ deviație standard. Măsurarea ariilor de inhibiție s-a realizat prin utilizarea software-ului AutoCAD 2018, utilizând diametrul filtrelor impregnate cu extractele vegetale ca măsură de referință.

Evaluarea activității anti-inflamatorii prin inhibarea xantin oxidazei - Metoda utilizată în acest studiu a fost propusă de către Isa și colab. [118]. Această metodă presupune utilizarea extractelor vegetale în diferite concentrații pentru a determina, spectrofotometric, gradul de inhibare al xantin oxidazei în funcție de cantitatea de acid uric formată în prezența sa. Allopurinolul este utilizat ca standard pozitiv datorită inhibării competitive a xantin oxidazei la doze mici.

Evaluarea activității anti-inflamatorii prin inhibarea denaturării termice albuminei

- Determinarea procentului de inhibare a denaturării albuminei reprezintă o metodă des utilizată în screening-ul extractelor vegetale, fiind des menționată în literatura de specialitate [121-129]. În scopul determinării capacității de inhibare a denaturării albuminei, a fost aplicată metoda propusă de către Kahn și colab. [24]. Valorile IC₅₀ pentru fiecare extract au fost calculate prin interpolare, utilizându-se ecuația dreptei rezultate din trasarea procentului de inhibiție față de concentrație.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În urma analizării corelațiilor stabilite între activitatea antibacteriană a extractelor vegetale și profilul fitochimic al acestora, se poate observa că există o corelație puternică între conținutul polifenolic total, determinat prin metoda Folin Ciocâlțu, conținutul polifenolic determinat prin HPLC, precum și între cantitatea de fitocompuși determinați și fitocompuși totali, cuantificați prin HPLC și activitatea antibacteriană asupra speciei *Staphylococcus aureus*. În cazul celorlalte specii bacteriene, există corelații bune între profilul fitochimic și activitatea antibacteriană a extractelor asupra stafilococului citrin, dar există o singură corelație între conținutul polifenolic determinat prin HPLC și activitatea antibacteriană împotriva streptococului viridans.

Ariile de inhibiție demonstrate de extractele vegetale efectuate din *Sempervivum ruthenicum* Koch asupra unei tulpini de referință *Candida albicans* au fost slabe în comparație cu rezultatele obținute de acestea împotriva unor specii bacteriene. Pe lângă faptul că ariile de inhibiție au fost demonstrate doar de 2 extracte efectuate din produs vegetal uscat, eficacitatea împotriva microorganismului a fost limitată, observându-se la 48 de ore scăderea acestei arii de inhibiție. Dimensiunea mică a ariilor de inhibiție obținute pe tulpina de *Candida albicans* a condus la luarea deciziei de a nu continua evaluările pe acest tip de microorganism.

Inhibarea xantin oxidazei de către extractele vegetale reprezintă o acțiune favorabilă a acestora, venind în completarea activității sale antioxidante cu reducerea producerii de radicali superoxid [117]. Extractele vegetale hidroetanolicе au demonstrat cea mai bună activitate inhibitorie conform valorilor IC₅₀ deși aceasta este mai scăzută decât în cazul allopurinolului. În ciuda faptului că alte specii ale genului *Sempervivum* au fost studiate de către alți autori, nu am

putut identifica în literatura de specialitate evaluarea activității inhibitorii asupra xantin oxidazei a altor specii vegetale înrudite, aceasta evaluare a extractelor din *Sempervivum* reprezentând un element de noutate.

Din datele prezentate, se poate observa că toate extractele vegetale prezintă o activitate inhibitorie semnificativă la doze mari (1000 $\mu\text{g/mL}$), cu valori comparabile cu cele demonstrate de standard (<90%). Este de asemenea, de notat că și extractul hidroetanolic realizat din produsul vegetal proaspăt prezintă o valoare IC_{50} similară, sugerând un conținut ridicat de compuși responsabili de această acțiune. În contrast, extractele apoase au demonstrat cea mai slabă acțiune inhibitorie a denaturării albuminei, fiind urmate de extractul etanolic realizat din produs vegetal uscat. În mod surprinzător, extractul alcoolic realizat din produs vegetal proaspăt a prezentat un grad ridicat de inhibare a denaturării proteinei la toate concentrațiile testate, având o valoare IC_{50} mai mică decât cea a standardului utilizat ($192.14 \pm 4.433 \mu\text{g/mL}$).

STUDIUL III

IPOTEZA DE LUCRU – Extractele hidro-etanolice realizate din produs vegetal uscat și produs vegetal proaspăt pot fi formulate ca plasturi mucoadezivi destinați administrării pe mucoasa bucală.

SCOPUL STUDIULUI – Formularea și evaluarea *in vitro* a unor preparate mucoadezive destinate administrării bucale, încărcate cu principiile active din extractele vegetale realizate.

Acest studiu prezintă formularea și evaluarea farmaco-tehnică a unor plasturi mucoadezivi destinați administrării în cavitatea orală, încărcăți cu extractele vegetale hidroetanolic realizate din produs vegetal uscat și produs vegetal proaspăt. În urma evaluării farmacotehnice a plasturilor obținuți, s-a evaluat impactul acestora asupra stresului oxidativ de la nivelul cavității bucale cu ajutorul unui lot de 48 de voluntari sănătoși fumători și nefumători.

METODOLOGIA DE LUCRU

Formularea și evaluarea *in vitro* a plasturilor mucoadezivi cu extract hidro-alcoolic din *Sempervivum ruthenicum* Koch - Extractele filtrate au fost apoi supuse eliminării solventului prin încălzire la presiune redusă, cu ajutorul unui evaporator rotativ IKA RV10, la o temperatură de 70°C. În urma eliminării solventului, au fost obținute extractele vegetale uscate, care au fost triturate și stocate într-un desicator pentru utilizare. Polimerii utilizați pentru formularea plasturilor au constatat în gelatină, pectină obținută din măr, polivinil pirolidona și metilceluloză. Toți polimerii au fost procurați de la Sigma, fiind de calitate analitică. Plasturii mucoadezivi orali încărcăți cu extractele uscate de *Sempervivum* au fost preparați conform metodei propuse de Hashemi [137], cu mici modificări. Evaluările farmacotehnice efectuate au inclus: uniformitatea masei, grosimii și a flexibilității plasturilor obținuți, măsurarea pH-ului suprafeței filmelor, uniformitatea conținutului, determinarea indicelui de umflare, determinarea forței mucoadezive și stabilirea profilului de eliberare *in vitro* a principiilor active din forma farmaceutică.

Evaluarea activității antioxidante a plasturilor mucoadezivi *in vivo* - Studiul a inclus 48 de voluntari clinic sănătoși cu vârste cuprinse între 20 și 35 de ani, care și-au exprimat consimțământul scris, liber informat conform prevederilor Declarației Asociației Medicale Mondiale de la Helsinki (revizuită în 2000, Edinburg), cu aprobarea Comisiei de Bioetică a Universității “Ovidius” din Constanța nr. 17712/12.11.2018.

Criteriile de includere în studiu au cuprins:

- Vârste cuprinse între 18 și 35 ani;
- Statut clinic sănătos;
- Statut de fumător și nefumător;
- Lipsa reacțiilor alergice la excipienții utilizați pentru formularea plasturilor;

Extractele vegetale utilizate au fost testate pentru prezența alcaloizilor prin reacția Dragendorff, aceasta fiind negativă în ambele cazuri. De asemenea, în urma screening-ului HPLC nu s-au putut determina urme de alcaloizi sau fitocompuși cunoscuți cu potențial toxic. Literatura de specialitate accesată nu a adus în discuție compuși cu potențial toxic sau reacții adverse asociate cu utilizarea extractelor vegetale realizate din plantele genului *Sempervivum* [58-60, 102, 104].

Voluntarii au fost împărțiți în două grupuri egale în funcție de statutul de fumător. Fiecare grup a fost împărțit în mod aleator în 3 sub-grupuri în funcție de tipul de formulare mucoadezivă aplicată: fără extract vegetal (grup de control), cu extract vegetal realizat din produs vegetal uscat (PVU) și cu extract realizat din produs vegetal proaspăt (PVP).

Voluntarii au fost instruiți să nu efectueze periajul dentar zilnic în ziua efectuării experimentului, având restricție la utilizarea produselor precum guma de mestecat, apa de gură și drops-uri orale. De asemenea, pacienții din grupul de fumători nu au consumat produse pe bază de tutun sau hrană în ziua respectivă, până la finalizarea evaluării. Voluntarii au consumat 350 mL apă plată la fiecare oră pe perioada experimentului.

Probele de salivă au fost prelevate în recipiente sterile la intervale fixe de timp, prin programarea unor cronometre digitale. Plasturii mucoadezivi au fost aplicați tuturor pacienților pe mucoasa din regiunea plasneului bucal prin presarea ușoară a acestora timp de 20 de secunde. În urma colectării probelor, acestea au fost supuse centrifugării cu ajutorul unei centrifuge Eppendorf 5415C, la 13,000 rpm timp de 10 minute, în vederea eliminării sedimentelor.

Evaluarea capacității antioxidante a salivei a fost efectuată cu ajutorul radicalului liber DPPH, într-o manieră similară cu cea descrisă anterior.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

După aplicarea plasturilor mucoadezivi s-a putut observa inițial o scădere a activității inhibitorii a salivei la toate subgrupurile studiate, urmată de o creștere constantă a activității inhibitorii față de DPPH, cu până la 25.7% față de valorile inițiale. În ceea ce privește comparația între tipurile de extract folosite, s-au putut observa o creștere mai accentuată a activității inhibitorii față de DPPH la voluntarii tratați cu plasturi PVU, în comparație cu cei tratați cu plasturi PVP. Timpul de rezidență orală a depășit timpul total de eliberare determinat *in vitro*, dar cu toate acestea, s-au putut trasa corelații directe, semnificative din punct de vedere statistic între rezultatele evaluării capacității antioxidante a salivei față de DPPH și profilul de eliberare determinat *in vitro*.

CONCLUZII FINALE

1. Rezultatele obținute prin analiza HPLC a extractelor vegetale au relevat existența unor concentrații mari de fitocompuși cu natură polifenolică și cu potențial terapeutic, precum acizi polifenolici liberi, flavonoide, heterozide și flavonoli.
2. Toate extractele vegetale evaluate au prezentat o capacitate antioxidantă ridicată, exprimată prin inhibarea radicalului liber DPPH. Dintre acestea, extractul hidroetanolic realizat din produs vegetal uscat a prezentat cea mai mare capacitate inhibitorie a radicalului DPPH.
3. Extractele vegetale studiate prezintă acțiune antibacteriană *in vitro*, cel mai eficient fiind extractul hidroetanolic realizat din produs vegetal uscat.
4. Extractele vegetale studiate prezintă acțiune antifungică neglijabilă față de *Candida albicans*.
5. Toate extractele vegetale posedă capacitatea de inhibare a xantin oxidazei în mod eficient, corelându-se cu conținutul total de flavonoide al acestora.
6. Conform rezultatelor obținute, extractul hidroetanolic realizat din produs vegetal proaspăt prezintă cea mai pronunțată activitate inhibitorie față de xantin oxidază.
7. Toate extractele vegetale posedă capacitatea de inhibare a denaturării termice a albuminei, rezultatele corelându-se cu conținutul flavonoidic al acestora.
8. Conform rezultatelor obținute, extractul hidroetanolic realizat din produs vegetal uscat prezintă cea mai pronunțată activitate inhibitorie față de denaturarea termică a albuminei.
9. Extractele vegetale hidroetanolice obținute din *Sempervivum ruthenicum* Koch se pretează încorporării într-un matrix polimeric în scopul formulării unor plasturi mucoadezivi cu proprietăți farmaco-tehnice corespunzătoare exigențelor farmaceutice.
10. Plasturii mucoadezivi în care a fost încorporat extractul realizat din produs vegetal uscat au condus la cea mai pronunțată creștere a capacității antioxidante totale atât la voluntarii fumători cât și la cei nefumători.

BIBLIOGRAFIE

1. Bernhoft A, A brief review on bioactive compounds in plants. In: Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters. Oslo. Norway. 2010.
2. Vinatoriu M, An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry* 2001; 8(3): 303–313.
3. Kisagau et al. In vitro antimicrobial assay of plants used in traditional medicine in Bukoba Rural district, Tanzania. *Afr. J. Trad. Cam* 2007; 4(4): 510-523.
4. He et al, Oral Microbiology: Past, Present and Future, *International Journal of Oral Science* 2009; 1(2): 47-58.
5. Paulsen BS; Highlights through the history of plant medicine. In: Proceedings from a Symposium Held at The Norwegian Academy of Science and Letters. Oslo. Norway. 2010.
6. Akerele O; Importance of medicinal plants: WHO's programme. In: *Natural Resources and Human Health: plants of medicinal and nutritional value*; Elsevier, Amsterdam, Netherlands.1992; pp. 63-77.
7. Farnsworth NR, Soejarto DD. Global importance of medicinal plants. In: *Conservation of Medicinal Plants*; Cambridge University Press. 1999; pp 25-52.
8. Kelly K. History of medicine. New York: Facts on file; 2009. pp. 29–50.
9. Fransworth NR. Preclinical assessment of medicinal plants. *Natural Resources and Human Health*. Elsevier Science Publishers BV, 1992. pp.87-91.
10. Bijana Bauer Petrovska, Historical review of medicinal plants' usage, *Pharmacogn Rev.* 2012; pp.1-5.
11. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, Mendell, Douglass, and Bernett's Principles and Practice of Infectious Diseases Eight Edition, Elsevier Saunders, 2015; pp.238-251.
- 12.http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antiicrobial_resistance/database/pages/map_reports.asp
x
13. http://www.who.int/drugresistance/global_action_plan/en/
14. http://www.who.int/drugresistance/global_action_plan/en/

15. Weldhagen GF, Integrons and beta-lactamases—a novel perspective on resistance, *Int J Antimicrob Agents*. 2004; 23: 556-562.
16. Hawkey PM, Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. *Br J Pharmacol*, 2008; 153: S406-S413.
17. Babic M, Hujer AM, Bonomo RA, What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases, *Drug Resist Updat*. 2006; 9:142-156.
18. Ben-Ami R, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, et al., Influx of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae into the hospital, *Clin Infect Dis*. 2006; 42: 925-934.
19. Canton R, Coque TM, The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*. 2006; 9: 466-475.
20. Pitout JDD, Laupland KB, Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 2008; 8:159-166.
21. Johnson JR, Johnston B, Clabots C, et al., Escherichia coli sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant E. coli infections in the United States, *Clin Infect Dis*. 2010; 51:286-294. Livermore DM..
22. Landman D, Bratu S, Kochar S, et al., Evolution of antimicrobial resistance among Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, and Klebsiella pneumoniae in Brooklyn, NY. *J Antimicrob Chemother*, 2007; 60:78-82.
23. Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, et al., Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity?, *Clin Infect Dis*. 2007; 45:1171-1178.
24. Walsh TR. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2005; 11(suppl 6):2-9.
25. Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al., Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India, *Antimicrob. Agents. Chemother*. 2009; 53:5046-5054.
26. Ardia N, Sareyyupoglu B, Ozyurt M, et al., Investigation of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin-resistant staphylococci, *Microbiol Res*. 2006; 161:49-56.

27. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby EA, et al., Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase, *Nat Med*. 2006; 12:83-88
28. Unemo M, Nicholas RA, Emergence of multidrug resistant, extensively drug resistant and untreatable gonorrhea, *Future Microbiol*. 2012;7:1401-1422.
29. Canton R, Morosini MI, Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics, *FEMS Microbiol Rev*. 2011; 35:977-991B
30. Luo Y, Li J, Meng Y, et al., Joint effects of topoisomerase alteration and plasmid-mediated, quinolone-resistant determinants in *Salmonella enterica* Typhimurium, *Microb Drug Resist*. 2011; 17:1-5
31. Kesarwala AH, Krishna MC, Mitchell JB, Oxidative Stress in Oral Diseases, *Oral Dis*. 2016; 22(1):9-18.
32. Schrader M, Fahimi HD, Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1763:1755–1766.
33. Reczek CR, Chandel NS. ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. 2014; 33C:8–13.
34. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005; 120:483–495.
35. Lee YH, Kim GE, Song YB, Paudel U, Lee NH, Yun BS, Yu MK, Yi HK. Davallialactone reduces inflammation and repairs dentinogenesis on glucose oxidase-induced stress in dental pulp cells. *J Endod*. 2013; 39:1401–1406.
36. Kassebaum MJ, Smith AGC, Bernabe E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, et. al., Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990-2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors, *J. Dent. Res*. 2017; 96:380-387.
37. Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, Otomo-Corgel J, Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: a call for global action, *J. Clin. Periodontol*. 2017; 44:456-462.
38. Shin JE, Baek KJ, Choi YS, Choi Y, A periodontal pathogen *Treponema denticola* hijacks the *Fusobacterium nucleatum*-driven host response. *Immunol Cell Biol*. 2013; 91:503–510.

- 39.** Kanzaki H, Wada S, Narimiya T, Yamaguchi, Y, Katsumata Y, Itohiya K, et al., Pathways that regulate ROS scavenging enzymes, and their role in defense against tissue destruction in periodontitis, *Front. Physiol.* 2017; 8:351.
- 40.** Ahmadi-Motamayel F, Goodarzi MT, Jamshidi Z, Kebriaei R, Evaluation of salivary and serum antioxidant and oxidative stress statuses in patients with chronic periodontitis: a case-control study, *Front. Physiol.* 2017; 8:189.
- 41.** Pradeep AR, Rao NS, Bajaj P, Agarwal E, 8-Isoprostane: a lipid peroxidation product in gingival crevicular fluid in healthy, gingivitis and chronic periodontitis subjects, *Arch. Oral Biol.* 2013; 58, 500–504.
- 42.** Canakci CF, Tatar A, Canakci V, Cicek Y, Oztas S, and Orbak R, New evidence of premature oxidative DNA damage: mitochondrial DNA deletion in gingival tissue of patients with periodontitis, *J. Periodontol.* 2006; 77, 1894–1900.
- 43.** Tamaki N, Hayashida H, Fukui M, Kitamura M, Kawasaki K, Nakazato M et al., Oxidative stress and antibody levels to periodontal bacteria in adults: the Nagasaki Islands study, *Oral Dis.* 2014; 20, e49–e56.
- 44.** Ambati M, Rani KR, Reddy PV, Suryaprasanna J, Dasari R, Gireddy H, Evaluation of oxidative stress in chronic periodontitis patients following systemic antioxidant supplementation: a clinical and biochemical study, *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 2017; 8, 99–103.
- 45.** Manoharan S, Kolanjiappan K, Suresh K, Panjamurthy K, Lipid peroxidation & antioxidants status in patients with oral squamous cell carcinoma, *Indian J. Med. Res.* 2005; 122, 529–534.
- 46.** Tagawa T, Hiraku Y, Murata M, Ding X, Kawanishi S, 8-Nitroguanine formation in oral leukoplakia, a premalignant lesion, *Nitric Oxide* 2006; 14, 137–143.
- 47.** Kaya S, Sutcu R, Cetin ES, Aridogan BC, Delibas N, Demirci M, Lipid peroxidation level and antioxidant enzyme activities in the blood of patients with acute and chronic fascioliasis, *Int. J. Infect. Dis.* 2007; 11, 251–255.
- 48.** Trivedi S, Lal N, Mahdi AA, Singh B, Pandey S, Association of salivary lipid peroxidation levels, antioxidant enzymes, and chronic periodontitis, *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 2015; 35, e14–e19.

49. Kumar J, Teoh SL, Das S, Mahaknaukrauh P, Oxidative stress in oral diseases: understanding it's relation with other systemic diseases, *Front. Physiol.* 2017; (8):1-15.
50. Ketabi M, Meybodi FR, Asgari MR, The association between periodontal disease parameters and severity of atherosclerosis, *Dent. Res. J.* 2016; 13, 250–255.
51. Calapkorur MU, Alkan BA, Tasdemir Z, Akcali Y, Saatci E, Association of peripheral arterial disease with periodontal disease: analysis of inflammatory cytokines and an acute phase protein in gingival crevicular fluid and serum, *J. Periodont. Res.* 2017; 52, 532–539.
52. Kholy KE, Genco RJ, Van Dyke, TE, Oral infections and cardiovascular disease, *Trends Endocrinol. Metab.* 2015; 26, 315–321.
53. Chukkapalli SS, Easwaran M, Rivera-Kweh MF, Velsko IM, Ambadapadi S, Dai J et al., Sequential colonization of periodontal pathogens in induction of periodontal disease and atherosclerosis in LDLRnull mice, *Pathog. Dis.* 2017;75:ftx003.
54. Bozoglan A, Ertugrul AS, Taspinar M, Yuzbasioglu B, Determining the relationship between atherosclerosis and periodontopathogenic microorganisms in chronic periodontitis patients, *Acta Odontol. Scand.* 2017; 75, 233–242.
55. Miyauchi S, Maekawa T, Aoki Y, Miyazawa H, Tabeta K, Nakajima T, et al., Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and systemic cytokine profile in C57BL/6.KOR-Apo^{Eshl} mice, *J. Periodont. Res.* 2012; 47, 402–408.
56. Kampits C, Montenegro MM, Ribeiro IW, Furtado MV, Polanczyk CA, Rosing CK et al., Periodontal disease and inflammatory blood cytokines in patients with stable coronary artery disease, *J. Appl. Oral Sci.* 2016; 24, 352–358.
57. http://www.parcmacin.ro/cadrul-natural/-/asset_publisher/jU7Y/content/relatii-si-procese-ecologice
58. http://stalikez.info/fsm/semper/site/roum_gb.php?clc=76&zc=Ae1f1a1b1g1f1f1iAdMzu1g
59. Willis H, Willis S, An introduction to *Sempervivum* and *Jovibarba* species and cultivars, Howard and Sarah Willis, Great Britain, 2004.
60. Kertesz-Dobos E, Laszlo-Bencsik A, Danos B, In vitro culture and the production of secondary metabolites by *Sempervivum* Spp (Houseleek), Research Institute for Medicinal Plants, Budakalasz, 2011.

61. Gumenyuk LA, Gnedokov PA, Batyuk VS, Astragalin from *Sempervivum ruthenicum*, *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 1971, pp. 202.
62. Gumenyuk LA, Batuk VS, Dykhanov NN, Phenolic Compounds of *Sempervivum ruthenicum*, *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 1972, pp. 244.
63. Gumenyuk LA, Komissarenko NF, Batyuk VS, Gnedkov PA, Coumarins of some species of the genera *Sempervivum* and *Sedum*, *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 1971, pp. 369.
64. Gumenyuk LA, Scutellarein 7-rutinoside from *Sempervivum ruthenicum*, *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 1975, pp. 428-429.
65. Gumenyuk LA, Dykhanov NN, Sbatyuk VS, Flavonoid Compounds From the Flowers of *Sempervivum ruthenicum*, *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 1972, pp. 391-392.
66. Gumenyuk LA, Phenolic Carboxylic Acids From *Sempervivum ruthenicum*, *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 1971, pp. 525.
67. Gumenyuk LA, Gnedkov PA, Batyuk VS, Kaempferol and Quercetin from *Sempervivum ruthenicum*, *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 1970, pp. 630.
68. Wang W, Sun C, Mao L, Ma P, Liu F, Yang J, Gao Y, The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: a Review, *Trends in Food Science & Technology*, 2016, pp. 21-38.
69. N.R. Prasad, A.S. Karthikeyan, B.V. Karthikeyan, Reddy, Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibro sarcoma cell line, *Mol. Cell Biochem.*, 2011, pp. 11-19.
70. Lima VN, Oliveria-Tintino DM, Santos ES, Morais LP, Tintino SR, Freitas TS, Geraldo YS, Pereira LS, Cruz RP, Menezes IRA, Coutinho HDM, Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol, *Microbial Pathogenesis*, 2016, pp. 56-61.
71. Chen YA, Chen YC, A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention, *Food Chemistry*, 2013, pp. 2099-2107.
72. Yang JH, Kim SC, Kim KM, Janf HC, Cho SS, Kim SJ, Cho IJ, Ki SH, Isorhamnetin attenuates liver fibrosis by inhibiting TGF- β /Smad signaling and relieving oxidative stress, *European Journal of Pharmacology*, 2016, pp. 92-102.

73. Soromou LW, Chen N, Jiang L, Huo M, Wei M, Chu X, Millimouno MF, Feng H, Sklime Y, Deng X, Astragalin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by down-regulating NF- κ B signaling pathway, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, pp. 256-261.
74. http://stalikez.info/fsm/sempr/site/bibli_gb.php?clc=132&zc=Ae1f1a1b1g1f1f1i1r1zuH
75. Farmacopeea Română Ediția a X-a, Editura Medicală, București, 2008.
76. Sukhdev SH, Suman PSK, Gennaro L, Dev DR, Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, International centre for science and high technology, 2008.
77. Folin O, Ciocâlțeu V, Tyrosine and tryptophan determinations in proteins, *J Biol Chem*, 1927, 73:627-650.
78. Agbor G, Vinson J, Donnelly PE, Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay, *IJFS*, 2014, 3:1-10.
79. Singleton VL, Rossi JA, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents., *Am J Enol Vitic*, 1965, 16:144-158.
80. Vinson JA, Su XH, Zubik L, Bose P, Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits, *J Agric Food Chem*, 2001, 49:5315-5321.
81. Vinson JA, Zubik L, Bose P, Samman N, Proch J,) Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants, *Am Coll Nutr*, 2005, 24:44-50.
82. Stratil P, Klejdus B, Kubán V, Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals, *Talanta*, 2007, 71:1741-1751.
83. Vinson JA, Hao Y, Su X, Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Vegetables, *J Agric Food Chem*, 1998, 46:3630-3634.
84. Stratil P, Klejdus B, Kubán V, Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables--evaluation of spectrophotometric methods, *J Agric Food Chem* 2006, 54:607-616.
85. Vinson JA, Flavonoids in foods as in vitro and in vivo antioxidants, *Adv Exp Med Biol*, 1998, 439:151-164.
86. Vinson JA, Liang X, Proch J, Hontz BA, Dancel J, et al, Polyphenol antioxidant in citrus juices: in vitro and in vivo studies relevant to heart disease In: Buslig BS, Mantney JA,

- editors. *Flavonoids in Cell Function*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2002, p. 113-122.
- 87.** Vinson JA, Bose P, Proch J, Al Kharrat H, Samman N, Cranberries and cranberry products: powerful in vitro, ex vivo and in vivo sources of antioxidants, *J Agric. Food Chem*, 2008, 56:5884-5891.
 - 88.** Vinson JA, Proch J, Bose P, MegaNatural® gold grapeseed extract: in vitro antioxidant and in vivo human supplementation studies, *J Med Food*, 2001, 4:17-26
 - 89.** Vinson JA, Dabbagh YA, Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins, *Nutr Res*, 1998, 18:1067-1075.
 - 90.** Bonita JS, Mandarano M, Shuta D, Vinson J, Coffee and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies, *J Pharmacol Res*, 2007, 55:187-198.
 - 91.** Vinson JA, Hontz BA, Phenol Antioxidant Index: Comparative Antioxidant Effectiveness of Red and White Wines, *J Agric Food Chem*, 1995, 43:401-403.
 - 92.** Vinson JA, Mandarano M, Hirst M, Trevithick JR, Bose P, Phenol antioxidant quantity and quality in foods: beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis, *J Agric Food Chem*, 2003 51:5528-5533.
 - 93.** Shirazi OU, Khattak MAK, Shukri NAM, Nasyriq MNA, Determination of total phenolic, flavonoid content and free radical scavenging activities of common herbs and spices, *J Pharmacog Phytochem*, 2014, 3:104-108.
 - 94.** Christ B, Müller KH, Zur serienmaessigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen, *Arch Pharm*, 1960, 293:1033–1042
 - 95.** Pekal A, Pyrzynska K, Evaluation of Aluminium Complexation reaction for Flavonoid Content Assay, *Food Anal Methods*, 2014, 7:1776-1782.
 - 96.** Piyanete C, Meechai P, Nakbanpotec W, Antioxidant activities and phenolic contents of extracts from *Salvinia molesta* and *Eichornia crassipes*, *Res J Biol Sci* 2009, 4:1113-1117.
 - 97.** United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 30-NF 25), vol 28 (4), Rockville, MD: United States Pharmacopeia Convention, 2007, p. 914.
 - 98.** Kedare SB, Singh RP, Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *J Food Sci Technol*, 2011, 48:412-422.

99. Ravichandran K, Saw TMMN, Mohdaly AAA, Gabr MMA, Kastell A, Riedel H, Zhenzhen C, Knorr D, Smetanska I, Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity, *Food Res Int*, 2013, 50:670-675.
100. Malterud KE, Farbrot TL, Huse AE, Sund RB, Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones, *Pharmacology*, 1993, 47:77-85
101. Wangenstein H, Samuelsen AB, Malterud KE, Antioxidant activity in extracts from coriander, *Food Chem*, 2004, 88:293-297.
102. Stojcovic D, Barros L, Petrovic J, Glamoclija J, Santos-Buelga C, Ferreira CFRI, Sokovic M, Enthnopharmaceutical uses of *Sempervivum tectorum*L in southern Serbia: Scientific confirmation for the use against otitis linked bacteria, *J Ethnopharm*, 2015, 176:397-304.
103. Barros L, Pereira E, Calhelha RC, Dueñas M, Carvalho AM, Santos-BuelgaC, Ferreira I.C.F.R, Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L, *J Funct Foods*, 2013, 5:1732–1740.
104. Alberti A, Beni S, Lacko E, Riba P, Al-Khrasani M, Keri A, Characterization of phenolic compounds and antiniociceptive activity of *Sempervivum tectorum* L. leaf juice, *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 70:143-150.
105. Gegiu G, Brânză AD, Bucur L, Grigorian M, Tache T, Badea V. Contributions to the antimicrobial and antifungal study of the aqueous extract of *Prunus spinosa* L. *Farmacia* 63(2). 2015; pp. 275-279.
106. Choi JG, Kang OH, Lee YS, Chae HS et al. In vitro and in vivo antibacterial activita of *Punica granatum* peel ethanol extract against *Salmonella*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011; pp. 1-8.
107. Alviano WS, Alviano DS, Diniz GC et. al. *In vitro* antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Archives of Oral Biology* 53(6). 2008; pp. 545-552.
108. Jayaraman S, Manoharan MS, Illanchezian S. In vitro antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (*Asteraceae*) leaf extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7(4). 2008; pp. 1143-1149.
109. Buiuc D, Negut M. *Tratat de microbiologie clinică*, Editura Medicală. 1999.

- 110.** Coppo E, Marchese A. Antibacterial activity of polyphenols. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 15. 2014; pp. 380-390.
- 111.** Taguri T, Tanaka T, Kouno I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol. Pharm. Bull.* 27(12), 2004; pp.1965-1969.
- 112.** Nett JE, Andes DR. Antifungal agents – Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infect Dis Clin N Am.* 2015; pp.1-33.
- 113.** Ramallo IA, Zacchino SA, Furlan RLE. A rapid TLC autographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers. *Phytochemical Analysis* 17 (1), 2006; pp. 15-19.
- 114.** Rohman A, Riyanto S, Yuniarti N, Saputra WR, Utami R, Mulatsih W. Antioxidant activity, total phenolic, and total flavonoid of extracts and fractions of red fruit (*Pandanus conoideus* Lam). *International Food Research Journal* 17. 2010; pp. 97-106.
- 115.** Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: Renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacology Reviews* 58(1). 2006; pp. 87-114.
- 116.** Guarnieri C, Zucchelli G, Bernardi F, Scheda M, Valentini AF, Calandriello M. Enhanced superoxide production with on change of the antioxidant activity in gingival fluid of patients with chronic adult periodontitis. *Free Radical Research Communications* 15(1). 1991; pp. 11-16.
- 117.** Kelley EE, Khoo NKH, Hundley NJ, Malik UZ, Freeman BA, Tarpey MM, Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radical Biology and Medicine* 48(4). 2010; pp. 493–498.
- 118.** Isa SSPM, Ablat A, Mohamad J. The antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of *plumeria rubra* flowers. *Molecules* 23(400). 2018; pp. 1-18.
- 119.** Umamaheswari M, Madeswaran A, Asokkumar K. Virtual screening analysis and in vitro xanthine oxidase inhibitory activity of some commercially available flavonoids. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 12(3). 2013; pp. 317-323.
- 120.** Kapoor N, Saxena S. Potential xanthine oxidase inhibitory activity of endophytic *Lasidiplodia pseudotheobromae*, *Applied Biochemical Biotechnology*. 2014; pp. 1-15.

121. Adarsh VM, Ajay KP, Kavitha D. Anurag KB. Anti-Denaturation and antioxidant activities of *Annona cherimola* in vitro. International Journal of Pharma and Bio Sciences 2(2). 2011; pp. 1-6.
122. Manvar MN, Desai TR. Exploration of possible mechanisms for anti-inflammatory activity of *Ipomoea aquatica* Forsk. (*Convolvulaceae*). International Journal of Phytopharmacy 5(5). 2015; pp. 108-113.
123. Moualek I, Iratni G, Guechoaoui NM, Lahcene S, Houali K. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Arbutus unedo* aqueous extract. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 6(11). 2016; pp. 937-944.
124. Khan H, Khan MA, Rauf A, Haleemi A, Fuloria S, Fuloria NK. Inhibition on urease and thermal induced protein denaturation of commonly used antiulcer herbal products. Study based on *in-vitro* assays. Phcog J 7(3). 2015; pp. 147-152.
125. Chopade AR, Somade PM, Sayyad FJ. Membrane stabilizing activity and protein denaturation: a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Phyllanthus amarus*. JKIMSU 1(1). 2012; pp. 67-72.
126. Leelaprakash G, Dass MS. In vitro anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. International Journal of Drug Development & Research 3(3). 2011; pp. 189-196.
127. Kiranmayi GVN, Anusha V, Chandrika Y, Priya IVS, Swetha S, Krishna VY. Preliminary phytochemical screening and *in vitro* evaluation of anti-inflammatory antiarthritic, and thrombolytic activities of ethanolic leaf extract of *Bauhinia purpurea*. International Journal of Green pharmacy 12(1). 2018; pp. 248.
128. Chandra S, Chatterjee P, Dey P, Bhattacharya S. Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of coffee against denaturation of protein. Asian Pacific Journal of tropical biomedicine. 2012; pp. 178-180.
129. Marrassini C, Peralta I, Anesini C. Comparative study of the polyphenol content-related anti-inflammatory and antioxidant activities of two *Urera aurantiaca* specimens from different geographical areas. Chinese Medicine. 2018; pp. 13-22.
130. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN, Periodontal diseases, Nat. Rev. Dis. Primers 2017; 3:17038.

- 131.** Kinane DF, Preshaw PM, Loos BG, Working Group 2 of Seventh European Workshop on Periodontology, Hostresponse: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions–consensus of the seventh European workshop on periodontology, *J. Clin. Periodontol.* 2011; 38(Supl. 11):44–48.
- 132.** Laine ML, Crielaard W, Loos BG, Genetic susceptibility to periodontitis, *Periodontol* 2000 2012; 58:37–68.
- 133.** Chapple IL, Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases, *J. Clin. Periodontol.* 1997; 24, 287–296.
- 134.** Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB, Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury, *Antioxid. Redox Sig.* 2014; 20:1126–1167.
- 135.** Wang Y, Andrukhov O, Rausch-Fan X, Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis, *Front. Physiol.* 2017; 8: 910.
- 136.** Li C, Bhatt PP, Johnston TP, Transmucosal delivery of oxytocin to rabbits using a mucoadhesive buccal patch, *Pharm. Dev. Technol.* 1997; 2(3):265-274.
- 137.** Hasemi M, Ramezani V, Seydabadi M, Ranjbar AM, Jafari H, et. al., Formulation and optimization of oral mucoadhesive parches of *Myrtus Communis* by Box Behnken design, *Adv. Pharm. Bull.* 2017; 7(3):441-450.
- 138.** Bottenberg P, Cleymaet R, Muynck C, Remon JP, Coomans D, Michotte Y et al., Development and testing of bioadhesive, fluoride-containing slow-release tablets for oral use, *J Pharm Pharmacol* 1991; 43(7):457-64.
- 139.** Gupta A, Garg S, Khre RK, Measurement of bioadhesive strength of mucoadhesive buccal tablet: Design of an in vitro assembly, *Indian Drugs* 1992; 30:152–155.
- 140.** Council of Europe, *European pharmacopoeia* 9th Edition, 2018.
- 141.** Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P, Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems, *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* 2010, 67(3):217-229.
- 142.** Ramineni K, Mucoadhesive films for treatment of local oral disorders: development, characterization and in vivo testing, *Theses and Dissertations--Biomedical Engineering* 2014, 19.

- 143.** Halliwell B, Whiteman M, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *Br J Pharmacol* 2004; 142:231-255.
- 144.** Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A, Biomarkers of oxidative damage in human disease, *Clin Chem* 2006; 52:601-623.
- 145.** Geerts SO, Nys M, De MP, Charpentier J, Albert A, Legrand V, et al., Systemic release of endotoxins induced by gentle mastication: association with periodontitis severity, *J. Periodontol.* 2002; 73: 73–78.
- 146.** Baltacioglu E, Yuva P, Aydin G, Alver A, Kahraman C, Karabulut E, et al., Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease?, *J. Periodontol.* 2014; 85: 1432–1441.
- 147.** Konopka T, Krol K, Kopec W, Gerber H, Total antioxidant status and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in gingival and peripheral blood of periodontitis patients, *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2007; 55: 417–422.
- 148.** Tsao R, Li H, “Antioxidant properties in vitro and in vivo: realistic assessments of efficacy of plant extracts,” in *Plant Sciences Reviews* 2012, ed D. Hemming (Boston, MA: CABI International), 11–20.
- 149.** Hori JI, Zamboni DS, Carrao DB, Goldman GH, Berretta AA, The Inhibition of Inflammasome by Brazilian Propolis (EPP-AF), *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013; 2013:418508.
- 150.** Vogel CF, Khan EM, Leung PS, Gershwin ME, Chang WL, Wu D, et al., Cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and the inflammatory response: a role for nuclear factor- κ B, *J. Biol. Chem.* 2014; 289: 1866–1875.
- 151.** Azadbakht M, Sariri R, Soltani FM, Ghafoori H, Aghamaali MR, Erfani KTA, Salivary antioxidant power of passive smokers, *J. Nanomedicine. Biotherapeutic. Discov.* 2016; 6(2):1000142.
- 152.** Nosratabadi SF, Sariri R, Yaghmaei P, Taheri M, Ghadimi A, Ghafoori H, Alternations of antioxidant activity in saliva in smokers, *J. Phys. Theor. Chem.* 2012; 8(4): 305-310.