

UNIVERSITATEA “OVIDIUS” DIN CONSTANTA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE STOMATOLOGIE
DOMENIUL MEDICINĂ DENTARĂ
ANUL UNIVERSITAR 2023-2024

TEZĂ DE DOCTORAT

STUDII PRIVIND PROPRIETĂȚILE FIZICO- CHIMICE ȘI FARMACOBOTANICE ALE SPECIEI *LYSIMACHIA NUMMULARIA* L. CU POTENȚIAL TERAPEUTIC ÎN PATOLOGIA ORO-DENTARĂ

REZUMAT

Conducător de doctorat: Prof. univ. dr. Victoria Badea

Doctorand: Felicia Suci

CONSTANTA

2024

CUPRINS

ABREVIERI UTILIZATE ÎN TEXT.....	14
INTRODUCERE.....	17
CAPITOLUL 1. DATE GENERALE ALE SPECIEI LYSIMACHIA NUMMULARIA L.	
1.1. Genul LYSIMACHIA NUMMULARIA L. – descriere botanică.....	22
1.2. Clasificare.....	23
1.3. Răspândire geografică.....	24
1.3.1. Răspândire în lume.....	26
1.3.2. Răspândire în România.....	27
1.4. Etnofarmacologie	28
CAPITOLUL 2. PARTICULARITĂȚI FITOCHIMICE ALE SPECIEI LYSIMACHIA NUMMULARIA L.	
2.1. Metaboliti primari și secundari-generalitati.....	29
2.2. Compoziția fitochimică a speciilor genului Lysimachia sp.....	32
2.3. Proprietățile biologice ale fitocompușilor raportați.....	40
2.3.1. Activitățile biologice ale acidului p-cumaric.....	40
2.3.2. Activitățile biologice ale quercetolului.....	41
2.3.4. Activitățile biologice ale izoquercitinozidei.....	42
2.3.5. Activitățile biologice ale luteolului.....	42
2.3.6. Activitățile biologice ale rutozidei.....	42
2.3.8. Activitățile biologice ale kaemferolului.....	43
CAPITOLUL 3. PARTICULARITĂȚILE FARMACOLOGICE ALE SPECIEI LYSIMACHIA NUMMULARIA L.	
3.1. Proprietati antibacteriene	44
3.2. Proprietăți antioxidante și antiinflamatoare.....	46
3.3. Proprietăți antitumorale	47
CAPITOLUL 4. OBȚINEREA ȘI CONTROLUL CALITĂȚII MATERIEI PRIME VEGETALE	
4.1. OBȚINEREA PRODUSELOR VEGETALE.....	50
4.2. Determinarea identității speciei producătoare.....	51

4.3. Controlul purității produselor vegetale.....	60
4.3.1. Determinarea impurităților din aceeași planta.....	60
4.3.2. Determinarea corpurilor străine de planta producătoare.....	60
4.4. Controlul calității produselor vegetale.....	61
4.4.1. Determinări preliminare.....	61
4.5. Cercetarea compușilor polifenolici.....	64
4.5.1. Determinarea conținutului în polifenoli totali pentru produsele vegetale Lysimachiae herba, Lysimachiae radix, Lysimachiae flores.....	64
4.5.2. Analiza HPLC a compușilor fenolici.....	67
CAPITOLUL 5. DETERMINAREA CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE.....	75
CAPITOLUL 6. PROCEDEU TEHNOLOGIC DE LABORATOR PENTRU OBTINEREA UNUI EXTRACT USCAT FARMACOLOGIC ACTIV.....	79
6.1. Stabilirea parametrilor de extracție.....	79
6.2. Elaborarea procesul tehnologic de obținere a extractului uscat – fază de laborator.....	81
CAPITOLUL 7. METODOLOGIA DE CONTROL AL CALITĂȚII EXTRACTELOR USCATE ȘI STANDARDIZAREA LOR.	82
7.1. Determinarea caracterelor organoleptice.....	82
7.2. Identificarea principiilor active.....	82
7.3. Determinarea conținutului în principii active.....	83
7.3.1. Determinarea polifenolilor totali din extracte uscate obținute din Lysimachiae herba, Lysimachiae radix și Lysimachiae flores prin metodă fotometrică.....	83
7.3.2. Analiza HPLC a compușilor polifenolici din extractul obținut.....	83
CAPITOLUL 8. CERCETĂRI PRIVIND STUDIUL PROPRIETĂȚILOR ANTIBACTERIENE ȘI ANTIFUNGICE ALE EXTRACTELOR OBTINUTE DIN LYSIMACHIA NUMMULARIA L.	85
8.1. Produse patologice studiate și design de studiu.....	87
8.2. Însămânțarea pe medii de cultură.....	88
8.3. Identificarea în sistem Api a speciilor bacteriene izolate din produsele patologice luate în studiu.....	91
8.4. Testarea sensibilității bacteriene față de extratele luate în studiu comparativ cu antibioticele	94

CAPITOLUL 9. EVALUAREA IMPACTULUI CLINIC AL UNEI SOLUȚII DE LAVAJ BUCAL CU EXTRACT DIN LYSIMACHIA NUMMULARIA L. ÎN AFECȚIUNI ORO-DENTARE.....	106
9.1. Introducere.....	106
9.2. Ipoteza de lucru.....	108
9.3. Obiective și activități.....	108
9.4. Material și metode.....	109
9.4.1. Obținerea soluției de lavaj bucal.....	109
9.4.2. Delimitarea loturilor de studiu.....	110
9.4.3. Stabilirea protocolului de studio.....	114
9.4.4. Evaluarea nivelului NO prin efectuarea testul rapid semi-cantitativ Barkeley	115
9.4.5. Determinarea capacității antioxidante a probelor de salivă față de radicalul DPPH.....	116
9.5. Rezultate și discuții.....	117
9.5.1. Variația valorilor NO salivar evaluate prin testul Berekley in parodontită si peri-implantită	117
9.5.1.1. Parodontita.....	117
9.5.1.2. Peri-implantita.....	123
9.5.2. Rezultatele obținute la testul de determinare a capacității antioxidante...	127
ORIGINALITATEA SI CONTRIBUȚIILE INOVATOARE ALE TEZEI.....	131
IMPACTUL REZULTATELOR OBȚINUTE.....	132
INDEXUL FIGURILOR	135
INDEXUL TABELELOR.....	139
BIBLIOGRAFIE	140

INTRODUCERE

În contextul raportărilor OMS se apreciază că, sănătatea oro-dentară este parte integrantă a sănătății generale a organismului uman și că nu se poate vorbi despre sănătate la modul general decât în contextul sănătății oro-dentare; astfel, se subliniază că este extrem de important aportul stării de sănătate oro - dentară în bunăstarea și calitatea vieții.

Ca urmare a obsevrării tendinței generale de studiere a biocompușilor naturali, în cadrul tezei de doctorat am ales studierea plantei *Lysimachia nummularia* L. și a extractelor obținute din această plantă, în perspectiva generării unui produs cu aplicații terapeutice în patologia oro-dentară.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL 1. DATE GENERALE ALE SPECIEI *LYSIMACHIA NUMMULARIA* L.

1.1. Genul *LYSIMACHIA NUMMMULARIA* L. – descriere botanică

Lysimachia nummularia L. (Gălbioara) face parte din Familia *Primulaceae* și este o plantă erbacee perenă, chamefită, mezohidrofită, mezotermă la pH amfitolerant, cu tulpină repentă, lungă de 10-15 cm, glabră, simplă sau slab ramificată, tetramuchiata, cu frunze alterne, uneori opuse, lipsite de stipele.



Lysimachia nummularia L.

1.2. Clasificare

Genul *Lysimachia* aparține Familiei *Primulaceae*, Ordinul *Ericales*, conține aproximativ 180 de specii, cultivate și spontane, așa cum se vede în figura alăturată:

▶ Regnul	• <i>Plantae</i>
▶ Încregătura	• <i>Spermatophyta</i>
▶ Clasa	• <i>Angiospermae</i>
▶ Ordinul	• <i>Ericales</i>
▶ Familia	• <i>Primulaceae</i>
▶ Genul	• <i>Lysimachia</i>
▶ Specia	• <i>nummularia</i>

*Încadrare sistematică a speciei *Lysimachia**

1.3. Răspândire geografică

Speciile genului *Lysimachia* au fost identificate ca fiind intens răspândită în lume, existând date în literatura de specialitate accesată în care se consemnează prezența plantei pe toate continentele.

CAPITOLUL 2. PARTICULARITĂȚI FITOCHIMICE ALE SPECIEI *LYSIMACHIA NUMMULARIA L.*

2.1. Metaboliți primari și secundari-generalități

Acumularea metaboliților secundari se referă la acumularea substanțelor biogene în diferite organe ale plantei, dar și acumularea unui anumit metabolit secundar în anumite organe ale plantei.

De asemenea se cunoaște rolul de fitoalexine ale unor compuși fenolici consacrați, cum ar fi resveratrolul, care este menționat în specii ale genului *Lysimachia*, determinat și folosit ca și biomarker în cea ce privește calitatea extractelor obținute din organele speciei, *Lysimachia nummularia L.*

Flavonoidele reprezintă cea mai importantă și variată grupă de polifenoli naturali, cu peste 9.000 de structuri identificate până în prezent.

2.2.Compoziția fitochimică a speciilor genului *Lysimachia* sp.

Din literatura de specialitate s-a constatat că speciile genului *Lysimachia* sp. conțin următoarele clase de principii active:

- Acizi fenolici;
- Stilbenoide: resveratrol (*L. nummularia*)
- Flavonoide;
- Steroli și saponozide;

Compușii fenolici sunt cunoscuți pentru proprietățile lor antioxidante și antibacteriene.

2.3. Proprietățile biologice ale fitocompușilor raportați

2.3.1. Activitățile biologice ale acidului *p*-cumaric

Proprietățile antibacteriene, antifungice, antivirale antiinflamatoare și antitumorale ale acidul *p*-cumaric au fost demonstrate în timp și au stat la baza utilizării speciilor care conțin acest metabolit în medicina alopata.

2.3.2. Activitățile biologice ale quercetolului

Leziunile celulare induse de speciile reactive de oxigen sunt blocate de quercitol datorită acestei proprietăți antioxidante.

Quercetolul mai prezintă capacități antiinflamatorii pronunțate.

2.3.3. Activitățile biologice ale quercitrozidei

Proprietățile antiinflamatorii, antioxidante și regenerative ale quercitrozidei au fost studiate și în contextul bolii parodontale.

Aceste aspecte sugerează că quercitrozida poate fi privită ca o nouă moleculă bioactivă cu perspective deosebite în medicina dentară, dat fiind faptul că posibilitatea de regenerare a țesuturilor moi dar și a țesuturilor dure ale parodonțiului ar revoluționa tratamentul bolii parodontale.

2.3.4. Activitățile biologice ale izoquercitinozidei

Izoquercitiozida are proprietăți antitumorale, antiinflamatorii.

2.3.5. Activitățile biologice ale luteolului

Proprietățile antitumorale incontestabile ale luteolului s-au demonstrat în numeroase studii de specialitate.

2.3.6. Activitățile biologice ale rutozidei

Studii având ca scop evaluarea proprietăților rutozidei au arătat ca aceasta are activitate antiplachetară, antihipertensivă și antiinflamatoare.

2.3.7. Activitățile biologice ale miricetolului

Yasaman T. și colaboratorii săi au demonstrat în studiile realizate privind proprietățile miricetolului efecte prooxidante traduse prin reducerea fierului trivalent în fier bivalent și reducerea producerii de SRO.

2.3.8. Activitățile biologice ale kaemferolului

Sudiile recente realizate de Waqas A. și colaboratorii săi demonstrează proprietățile antiinflamatoare.

CAPITOLUL 3. PARTICULARITĂȚILE FARMACOLOGICE ALE SPECIEI *LYSIMACHIA NUMMULARIA* L.

3.1. Proprietăți antibacteriene

Dintre mecanismele antibacteriene menționăm efectul antibacterian prin stimularea generării de apă oxigenată, modificarea permeabilității membranei citoplasmatică, blocarea semnalelor de multiplicare a bacteriilor în cadrul biofilmelor.

3.2. Proprietăți antioxidante și antiinflamatoare

Studii similare privind proprietățile antioxidante ale extractelor obținute din *Lysimachia numularia* L. au fost realizate și de alți autori; astfel, Anita Toth și colaboratorii săi care au analizat proprietățile antioxidante a trei specii de *Lysimachia*, respectiv, *nummularia*, *punctata* și *vulgaris* și au arătat ca cea mai puternică activitate antioxidantă o are specia *nummularia*.

3.3. Proprietăți antitumorale

În literatura de specialitate accesată există puține date legate de proprietățile antitumorale ale extractelor obținute din specii ale genului *Lysimachia*.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

CAPITOLUL 4. OBȚINEREA ȘI CONTROLUL CALITĂȚII MATERIEI PRIME VEGETALE

4.1. OBȚINEREA PRODUSELOR VEGETALE

Recoltarea. Materialul de lucru a fost reprezentat de planta *Lysimachia nummularia* L., recoltată în luna Iulie 2020, de pe marginea lacului Tău-Brazi din zona Roșia Montană.



Asociație vegetală cu drepte Lysimachia nummularia L.



Lysimachia nummularia L.

4.2. Determinarea identității speciei producătoare

Identitatea speciei a fost verificată atât prin examen macro și microscopic, cât și prin screening chimic.

Materiale și metode

Examenul macroscopic

Examenul macroscopic s-a efectuat prin examinarea întregii plante cu ochiul liber sau cu o lupă observând: aspectul, dimensiunile, culoarea, gustul și mirosul lor. În vederea efectuării examenului microscopic s-au practicat secțiuni transversale prin tulpină și frunză.

Examenul microscopic în pulbere

S-a efectuat cu cloral hidrat 50% conform analizei farmacognostice.

Grupele de principii active aparținute produselor vegetale pot fi identificate prin examenul chimic calitativ general, care presupune extracția succesivă și selectivă a principiilor active, cu solvenți de polarități diferite (eter etilic, alcool și apă) urmate de efectuarea unor reacții specifice cu ajutorul cărora să poată fi identificate diferite grupe de principii active sau anumiți constituenți chimici.

Rezultate și discuții

Toate caracterele sunt conforme cu cele descrise în literatura de specialitate, pentru specia *Lysimachia nummularia* L.

Secțiunea transversală prin rădăcină

Se disting următoarele caractere:

- ✓ conturul secțiunii este circular, ușor ondulat;
- ✓ structura este primară cu început de structură secundară;

Secțiunea transversală prin tulpină

Secțiunea transversală prin tulpină prezintă următoarele caractere:

- ✓ conturul secțiunii transversale este eliptic-oval;
- ✓ cilindrul central, este format din țesuturi conducătoare de origine secundară, dispuse inelar și reprezentate de un inel extern de liber secundar și unul intern, de lemn secundar;
- ✓ măduva este groasă, parenchimatic-celulozică, de tip meatic.

Secțiunea transversală prin frunză

Secțiunea transversală prin frunză prezintă următoarele caractere:

- ✓ la nivelul nervurii se evidențiază un singur strat hipodermic de colenchim, parenchim fundamental, iar central, un fascicul mare, libero-lemnos cu structură primară, alături de care apare și un fascicul de dimensiuni foarte mici;
- ✓ limbul are o structură bifacială dorsoventrală.

Examen microscopic în pulbere

Examenul microscopic în pulbere pentru produsul vegetal *Lysimachiae herba* prezintă următoarele elemente: grăuncioare de polen, parenchim clorofilian, fibre, stomate, rari peri tectori unicelulari.

Pulberea din rădăcină se caracterizează prin prezența vaselor de lemn de calibru mare (reticulate), însoțite de fragmente de parenchim cu celule mari și fibre însoțite ascuțite alungite.

În pulberea de floare s-au evidențiat următoarele elemente: endoteciu, grăuncioare de polen, fragment de parenchim.

În urma analizei chimice generale realizată, au fost identificate următoarele tipuri de principii active astfel:

În rădăcinile speciei *Lysimachia nummularia* L. s-au identificat: ulei volatil, steroli (triterpene), agliconi flavonici, carotenoide, cumarine, taninuri (taninuri galice, taninuri catehice), flavonozide, cumarine heterozidate, heterozide triterpenice, ODP, compuși reducători, oze, polioze, poliuronide, saponozide.

În produsul vegetal *Lysimachiae herba* s-au identificat următoarele clase de principii active: ulei volatil, steroli (triterpene), agliconi flavonici, carotenoide, acizi grași, cumarine, taninuri (taninuri galice, taninuri catehice), flavonozide, cumarine heterozidate, heterozide triterpenice, ODP, compuși reducători, oze, polioze, poliuronide, saponozide.

În urma analizei chimice calitative, florile speciei *Lysimachia nummularia* L. conțin: ulei volatil, steroli (triterpene), agliconi flavonici, carotenoide, acizi grași,

cumarine, taninuri (taninuri galice, taninuri catehice), flavonozide, cumarine heterozidate, heterozide triterpenice, ODP, compuși reducători, oze, polioze, poliuronide.

Astfel identificarea constituenților din grupele de principii active evidențiate în produsul vegetal cercetat va fi posibilă și prin corelația dintre metabolism și filogenie.

Concluzii preliminare

1. Analiza caracterelor macroscopice ale speciei luate în studiu confirmă că planta este *Lyzimachia nummularia* L. din familia *Primulaceae*.
2. Analiza secțiunilor transversale prin organele vegetative ale speciei *Lysimachia nummularia* L.
3. Examenul microscopic în pulbere a pus în evidență elemente comune și elemente caracteristice.
4. Prezența mai multor grupe de principii active în toate organele speciei *Lysimachia nummularia* L., ne conduce la concluzia că specia prezintă interes și poate fi cercetată în vederea valorificării terapeutice.

4.3. Controlul purității produselor vegetale

4.3.1. Determinarea impurităților din aceeași plantă

Aceste impurități pot fi constituite, din produsele vegetale degradate în timpul uscării sau atacate de insecte, dăunători.

Material și metodă

Astfel, în vederea, determinării impurităților din aceeași plantă, se procedează conform analizei farmacognostice.

4.3.2. Determinarea corpurilor străine de planta producătoare

Normele calitative farmacognostice privind evaluarea preliminară a produselor vegetale, prevăd sau exclud prezența în produsele vegetale a unor corpuri străine de planta producătoare (părți din alte plante, substanțe minerale, pământ, nisip, etc.).

Material și metodă

Se procedează conform determinărilor farmacognostice

Concluzii preliminare

Materia primă vegetală reprezentată de cele trei produse vegetale: *Lysimachiae herba*; *Lysimachiae radix* și *Lysimachiae flores*, nu conține impurități sau corpuri străine.

4.4. Controlul calității produselor vegetale

În vederea efectuării controlului calității produselor vegetale s-au folosit cele trei produse vegetale obținute de la specia *Lysimachia nummularia* L., și anume: *Lysimachiae herba*; *Lysimachiae radix* și *Lysimachiae flores*.

4.4.1. Determinări preliminare

4.4.1.1. Pierdere prin uscare

S-a efectuat conform Farmacopeei Române ediția a X-a.

4.4.1.2. Determinarea substanțelor solubile

Tinând cont de solubilitatea principiilor active cunoscute din literatura de specialitate, precum și de posibilitățile de extracție, am folosit în această determinare trei solvenți și anume: etanol 40% (v/v), etanol 96% (v/v) și apă..

4.4.1.3. Controlul limitei de fier și metale grele

Controlul limitei de fier

Ionul fier (III) formează cu hexacianoferatul (II) de potasiu un complex de culoare albastră sau un precipitat albastru, funcție de concentrație.

Controlul limitei de metale grele

Ionul plumb formează cu sulfura de sodiu, în funcție de concentrație, o colorație brună sau un precipitat negru.

Concluzii preliminare

1. Valorile pierderii prin uscare arată că produsele vegetale luate în lucru corespund din punct de vedere al conservabilității lor.
2. Deoarece cantitatea cea mai mare de substanțe sunt solubile în etanol 40%, ne determină în cercetările următoare să luăm în lucru extracte obținute în etanolul 40%.

4. 5. Cercetarea compușilor polifenolici

4.5.1. Determinarea conținutului în polifenoli totali pentru produsele vegetale *Lysimachiae herba*, *Lysimachiae radix*, *Lysimachiae flores*.

Principiul metodei

Se bazează pe determinarea intensității colorației albastre a oxizilor de molibden formați prin reducerea de către polifenoli a reactivul Folin-Ciocalteu (acidul fosfomolibdowolframic).

Materiale și metodă:

Determinarea s-a efectuat pe toate produsele vegetale conform protocolului de determinare a taninurilor prezentat în Farmacopeea Europeană.

Rezultate

În soluțiile alcoolice în alcool 40% am determinat o cantitate mai mare de polifenoli totali a produselor vegetale *Lysimachiae herba* și *Lysimachiae flores*.

Concluzii

1. Conținutul în polifenoli totali din produsele vegetale *Lysimachiae herba*, *Lysimachiae radix*, *Lysimachiae flores* este mare, comparativ cu alte produse vegetale.

2. Pentru toate cele trei produse vegetale, *Lysimachiae herba*, *Lysimachiae radix*, *Lysimachiae flores* cantitatea de polifenoli care s-a extras în alcool concentrat este mai mică comparativ cu ceilalți doi solvenți.

4.5.2. Analiza HPLC a compușilor fenolici

Pentru separarea, identificarea și cuantificarea compușilor fenolici s-a adaptat o metodă HPLC standardizată de determinare a polifenolilor totali, descrisă de monografia USP 30-NF25.

Pentru analiza statistică a diferențelor dintre variabile a rezultatelor obținute, au fost utilizate testul „t” Student și testul ANOVA unidirecțional cu testul „post-hoc” al lui Tukey, care permite comparații multiple între perechi de date, folosind GraphPad Software 9, Inc., San Diego, CA, SUA. Reproducibilitatea metodei s-a apreciat prin pătratul coeficienților de corelare.

Rezultate

Dintre substanțele identificate în urma analizei HPLC, au fost cuantificate o serie de substanțe.

1. Metoda HPLC-DAD a fost aplicată pentru investigarea compușilor de tip fenolic, cu analiza cantitativă a șapte componente din extractele de plante de *Lysimachia nummularia* L.
2. Noutatea acestui studiu este reprezentată de identificarea și cuantificarea compușilor fenolici prin metoda HPLC;
3. Principiile active, determinate prin analiză HPLC, demonstrează posibilitatea utilizării celor trei produse vegetale (*Lysimachiae radix*, *Lysimachiae herba*, *Lysimachiae flores*) în fitoterapie iar prezența resveratrolului constituie un atu, în ceea ce privește proprietățile antioxidante ale produselor vegetale.
4. Cantitatea maximă decelată, în jur de 18 mg% g de produs vegetal uscat este o cantitate relativ mică, dar ținând cont că un litru de vin Saugvinion are doar 2 mg de

resveratrol /litru de vin, am putea spune că rădăcinile speciei noastre sunt chiar bogate în resveratrol.

CAPITOLUL 5. DETERMINAREA CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE

Materiale și metode

Metoda se bazează pe decolorarea radicalului stabil DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil), și având absorbția la 517 nm de către substanțe cu caracter antioxidant.

Metoda ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic acid) este o tehnică utilizată în chimia analitică pentru a determina activitatea antioxidantă a compușilor.

Metoda FRAP constă în reducerea, în mediu acid, a complexului feric 2,4,6-tripiridil-triazină $[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ complexului feros $[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ de culoare albastru intens în prezența speciilor antioxidante.

Metoda CUPRAC evaluează culoarea unui complex de cupru cu neocupreină (2,9-dimetil-1,10-fenantrolină). Reducerea ionului de cupru (II) la fierul de cupru (I) determină schimbarea culorii de la verde deschis la portocaliu roșiatic.

Rezultate

În prezenta cercetare a fost evaluată activitatea antioxidantă a extractelor obținute prin cele patru metode *in vitro*: metodele DPPH, ABTS, FRAP și CUPRAC.

Concluzii preliminare

Produsele vegetale *Lysimachiae herba*, *Lysimachiae radix* și *Lysimachiae flores* prezintă proprietăți antioxidante marcante corelate cu conținutul în polifenoli totali și compuși fenolici conținuți, dar mai ales cu prezența compușilor polifenolici și a resveratrolului.

CAPITOLUL 6. PROCEDEU TEHNOLOGIC DE LABORATOR PENTRU OBȚINEREA UNUI EXTRACT USCAT FARMACOLOGIC ACTIV

6.1. Stabilirea parametrilor de extracție

Procedeul de extracție clasică, folosit la obținerea extractelor uscate este de obicei macerarea. Etanolul 40% respectă toate condițiile pe care trebuie să le îndeplinească un solvent pentru a fi ales în obținerea de preparate farmaceutice cu un bogat conținut în principii active.

Material și metode

Pentru obținerea extractelor am utilizat ca produse vegetale *Lysimachiae herba*, *Lysimachiae radix* și *Lysimachiae flores*.

Rezultate

Cantitatea cea mai scăzută de extract s-a obținut din produsul vegetal *Lysimachiae herba*. Din *Lysimachiae radix* s-a obținut o cantitate apropiată de extract.

Concluzii preliminare

Deoarece polifenolii sunt solubili în etanol, s-a dedus că metodologia optimă de obținere a extractului uscat constă în macerarea timp de 14 zile cu etanol 40%, timp care nu afectează stabilitatea polifenolilor.

6.2. Elaborarea procesul tehnologic de obținere a extractului uscat – fază de laborator

Prin urmare procesul tehnologic (fază de laborator) de obținere a extractului selectiv constă în macerare, timp de 14 zile cu etanol 40%, control interfazic (prin reacții specifice polifenolilor și determinarea cantitativă a acestora, reunirea celor două extracte și concentrarea la un rotaevaporator până la stadiul de sirop, apoi transvazarea într-un exicator și continuarea distilării solventului sub presiune redusă până la stadiu de extract uscat.

CAPITOLUL 7. METODOLOGIA DE CONTROL AL CALITĂȚII EXTRACTELOR USCATE ȘI STANDARDIZAREA LOR.

Material și metodă

Conform FR X se urmăresc caractere organoleptice (aspect, miros, culoare, consistență), solubilitatea în solventul folosit la preparare, limitele de fier și metale grele, pierderea prin uscare și conținutul în principii active.

7.1. Determinarea caracterelor organoleptice

Se apreciază: aspectul și culoarea, prin analiza cu ochiul liber a extractului, gustul și mirosul.

Pierderea prin uscare se determină pe 1 g extract uscat prin menținerea la etuvă la 105°C timp de aproximativ 3 ore, pentru aducerea la masă constantă și raportarea la 100 g extract.

7.2. Identificarea principiilor active

Deoarece din produsul vegetal studiat pot fi extrase cu alcool 50% derivați polifenolici (flavonozide, proantocianozide, stilbenoide, taninuri, acizi fenolici) am considerat necesară identificarea lor, prin următoarele reacții: reducerea reactivului Folin-Ciocalteu (pentru polifenoli totali), reacția Schibatta (pentru flavone), și colorarea cu FeCl₃ (taninuri).

Cercetări preliminare privind standardizarea extractelor

În vederea standardizării unor extracte uscate am considerat că determinarea conținutului în polifenoli totali și acid cafeic și clorogenic precum și determinarea resveratrolului din *Lysimachiae herba* și *Lysimachiae radix* ar fi reprezentativă pentru acțiunea farmacodinamică.

7.3. Determinarea conținutului în principii active

Ațiunea terapeutică a extractului fiind imprimată de polifenoli, am considerat ca reprezentativă determinarea polifenolilor totali (fotocolorimetric și prin HPLC).

7.3.1. Determinarea polifenolilor totali din extracte uscate obținute din *Lysimachiae herba*, *Lysimachiae radix* și *Lysimachiae flores* prin metodă fotometrică

Materiale și metode

S-a efectuat conform metodei descrise anterior.

7.3.2. Analiza HPLC a compușilor polifenolici din extractul obținut

Analiza a fost efectuată conform metodei descrise anterior.

Rezultate

Prin diferitele metode de extracție din 100 g produs vegetal s-au obținut extracte uscate în cantitățile și cu caracteristici organoleptice menționate în tabelul de mai jos.

Tabel : Caracterile organoleptice ale extractelor obținute prin diverse procedee de extracție

<i>Cod extract</i>	<i>Solvent</i>	<i>Caractere organoleptice extract obținut</i>			
		<i>Aspect</i>	<i>Culoare</i>	<i>Miros</i>	<i>Gust</i>
1	<i>Lysimachiae herba</i>	<i>pulvere</i>	<i>brun roșcat</i>	<i>plăcut</i>	<i>plăcut</i>
2	<i>Lysimachiae radix</i>	<i>pulvere</i>	<i>brun roșcat</i>	<i>plăcut</i>	<i>plăcut</i>
3	<i>Lysimachiae flores</i>	<i>pulvere</i>	<i>brun cu reflexe aurii</i>	<i>plăcut</i>	<i>plăcut</i>

Concluzii preliminare

1. Metoda HPLC de determinare a polifenolilor poate fi folosită la standardizarea extractelor.
2. Cantitatea de polifenoli totali ar putea fi luată în considerare pentru standardizarea extractului respectiv.

CAPITOLUL 8. CERCETĂRI PRIVIND STUDIUL PROPRIETĂȚILOR ANTIBACTERIENE ȘI ANTIFUNGICE ALE EXTRACTELOR OBȚINUTE DIN *LYSIMACHIA NUMMULARIA* L.

Ipoteza de lucru

Rezultatele privind proprietățile fizico - chimice ale extractelor obținute din *Lysimachia nummularia* L. prezentate în capitolul precedent arată că acestea conțin polifenoli totali în concentrații mari.

Ipoteza de lucru este că extractele obținute din *Lysimachia nummularia* L.. au proprietăți antibacteriene și antifungice.

Scopul studiului este de a implementa rezultatele efectelor antibacterian și antifungic într-un produs terapeutic utilizabil în patologia infecțioasă și fungică a cavității bucale.

Obiectivele studiului au fost:

1. Evaluarea proprietăților antibacteriene;
2. Evaluarea proprietăților antifungice.

Motivația selectării extractelor evaluate în prezentul studiu

Am ales pentru evaluarea proprietăților antibacteriene și antifungice, extractul alcoolic 40%, obținut din partea aeriană a plantei (frunze, tulpina, flori), flori și rădăcini, pentru ca acestea au avut cel mai mare continut în polifenoli totali, componenți care susțin posibilele efecte antibacteriene și antifungice.

Materiale și metode

8.1. Produse patologice studiate și design de studiu

Produsele patologice folosite în cadrul acestui pilon de cercetare au fost recoltate de la pacienți cu carii dentare și parodontoză, infecții ondodontice, faringo-amigdalită acută, după examinarea clinica oro-dentară prealabilă.

Probele prelevate conform metodelor standard au fost: dentina prelevată din dentina ramolită a cariei dentare, puroi parodontal, produs din alveolita post-extracțională, produs din canalele radiculare, exudat faringian.

Studiul a fost realizat în doua etape distincte:

- testarea extractului alcoolic 40%, obținut din produsul uscat din din *Lysimachia nummularia* L. pe tulpini bacteriene și fungice de referință liofilizate, stabilizate și viabile de tipul American Type of Culture Collection (ATCC).
- testarea activității antibacteriene a extractului alcoolic 40%, obținut din produsul uscat din din *Lysimachia nummularia* L. (*herba, flores și radix*) pe tulpini bacteriene și fungice identificate din produsele patologice examinate, comparativ cu antibiotic și antifungice uzuale folosite în afecțiunile din cadrul cărora s-au generat produsele patologice luate în studiu.

8.2. Însămânțarea pe medii de cultură

Tulpinile bacteriene de referință și mediile de cultură pe care s-a efectuat însămânțarea inițială, sunt prezentate în Tabelul de mai jos, după cum urmează:

Tabel - Specii bacteriene utilizate în etapa I

SPECII BACTERIENE	SURSA DE REFERINȚĂ	MEDIU DE CULTIVARE
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	geloză-sânge
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 46619	geloză-sânge
<i>Enterococcus sp.</i>	ATCC 23212	geloză-sânge
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	geloză-sânge
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	geloză-sânge
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	geloză-sânge
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	geloză-sânge
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Sabouraud

8.3. Identificarea în sistem Api a speciilor bacteriene izolate din produsele patologice luate în studiu

Produsele patologice au fost însămânțate pe mediu geloza-sânge, iar identificarea speciilor bacteriene s-a facut în sistem Api-ident.

Reacțiile sunt interpretate în conformitate cu profilului analitic, așa cum este prevăzut de fiecare kit de identificare.

8.4. Testarea sensibilității bacteriene față de extratele luate în studiu comparativ cu antibioticele

Principiul metodei vizează însămânțarea unei suspensii bacteriene de testat pe suprafața unui mediu de cultură gelozat, urmând ca ulterior să se depună microcomprimate cu diferite antibiotice sau chimioterapice. După o incubare de 24 de ore la 37°C se face interpretarea, care constă în măsurarea zonei de inhibiție, în care bacteria nu s-a dezvoltat, dimensiunile acestei zone fiind în raport cu directa proporționalitate cu sensibilitatea bacteriei față de antibioticul respectiv.

Dat fiind faptul ca în prezentul studiu am dorit să apreciez nivelul de sensibilitate a unor tulpini bacteriene față de extratele obținute, am adaptat metoda difuzimetrică.

Tabel. Specii bacteriene și antibiotice/chimioterapice folosite în studiul II

SPECII BACTERIENE SĂLBATICE	MEDIU DE TESTARE	Martor pozitiv-ANTIBIOTICE / ANTIMICOTICE	Martor negativ
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>geloză-sânge</i>	<i>Penicilină G (P)</i>	<i>Apă distilată</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>geloză-sânge</i>	<i>Penicilină G (P)</i>	<i>Apă distilată</i>
<i>Enterococ</i>	<i>Mueller-Hinton</i>	<i>Ampicilină (AMP)</i>	<i>Apă distilată</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Mueller-Hinton</i>	<i>Gentamicină (CN)</i>	<i>Apă distilată</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Mueller-Hinton</i>	<i>Gentamicină (CN)</i>	<i>Apă distilată</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Sabouraud</i>	<i>Fluconazol (FCA), Voriconazol (VOR)</i>	<i>Apă distilată</i>

Rezultate

Etapa 1.

Rezultatele studiului bacteriologic realizat pe tulpini de referință ATCC pentru cele trei extracte luate în studiu și antibiotice sunt prezentate în teză.

Etapa 2.

Rezultatele studiului bacteriologic în etapa II s-a efectuat pe un grup de cinci tulpini bacteriene selectate atât din cadrulul speciilor bacteriene Gram pozitive, dar și Gram negative, tulpini izolate din produse patologice prelevate de la pacienți cu diferite afecțiuni dentare.

Exprimarea rezultatelor s-a efectuat utilizând indicativele S – sensibil, I – intermediar și R – rezistent față de antibioticele specifice fiecărei tulpini bacteriene folosite la testare.

Concluzii preliminare

1. Extractele de *Lysimachia nummularia* L. au efecte antibacteriene atât pe tulpinile de referință, cât și pe tulpinile de bacterii izolate din produse patologice.
2. Cele trei extracte au demonstrat absența efectelor antifungice, atât pe tulpinile de referință, cât și pe tulpinile izolate din produse patologice.
3. Dintre tulpinile de referință, cele mai sensibile s-au dovedit a fi cele din grupul cocilor *Gram pozitivi*.
4. Cel mai eficient extract pe tulpinile de referință s-a dovedit a fi cel extras din partea aeriană a plantei, atât pentru tulpinile de referință, cât și pentru tulpinile izolate din produse patologice.
5. Valoarea deosebită privind acțiunea antibacteriană a acestor extracte testată pe tulpinile de referință este dovedită de efectul antibacterian pe specii cu rezistență consacrată, cum ar fi bacilul *Piocianic*, *Enterococ* și *Stafilococul aurii*.
6. Toate tulpinile izolate din produse patologice au fost sensibile la diferite extracte, cu excepția *stafilococului* care a fost sensibil egal la toate cele trei tipuri de extracte.
7. Efectele antibacteriene aproximativ egale cu ale antibioticelor folosite în paralel s-a dovedit a fi prezente în cazul florei cariogene reprezentată în prezentul studiu de *S. mitis* la care s-a identificat sensibilitate aproximativ egală cu a Penicilinei.

8. Efectele preponderent bacteriostatice ale celor trei extracte pe specii bacteriene implicate în patologia cavității bucale susțin realizarea de studii clinice în perspectiva de utilizare a acestui extract ca bază pentru obținerea de produse farmaceutice cu largă utilizare în practica medicinei dentare.

Capitolul 9. EVALUAREA IMPACTULUI CLINIC AL UNEI SOLUȚII DE LAVAJ BUCAL CU EXTRACT DIN *LYSIMACHIA NUMMULARIA* L. ÎN AFECȚIUNI ORO-DENTARE

9.1. Ipoteza de lucru

Parodontita și peri-implantita sunt două afecțiuni ale cavității bucale cu valențe comune în ceea ce privește etiologia bacteriană, mecanismele patogenice în care stresul oxidativ are rol important; din aceste considerente ipoteza de lucru este ca o soluție de lavaj bucal care conține extract din *Lysimachia nummularia* L. ar avea efecte benefice, ameliorând cele două afecțiuni luate în studiu.

9.2. Obiective și activități

Obiectivul prioritar al acestui studiu este demonstrarea posibilelor efecte benefice ale metaboliților secundari conținuți în soluția de lavaj bucal în contextul parodontitei și a peri-implantitei.

Activitățile desfășurate în cadrul acestui modul de cercetare au fost:

- Formularea unei soluții de lavaj bucal cu extract vegetal hidro-alcoolic obținut din specia *Lysimachia nummularia* L.;
- Examen clinic al pacienților și delimitarea loturilor de studiu;
- Stabilirea protocolului de studiu;
- Evaluarea nivelului NO prin efectuarea testul rapid semi-cantitativ Barkeley la pacienți care au efectuat lavaj bucal cu o soluție care conține extract din *Lysimachia nummularia* L. 10 zile, comparativ cu un lot martor care s-a clătit cu soluție de lavaj bucal fără extract vegetal.
- Demonstrarea creșterii capacității antioxidante la nivelul cavității bucale în urma utilizării soluției de lavaj bucal cu o soluție care conține extract obținut din specia

Lysimachia nummularia L. prin determinarea activității inhibitorii a salivei față de radicalul liber DPPH.

9.3. Material și metode

9.4.1. Obținerea soluției de lavaj bucal

Soluția de lavaj bucal cu extract vegetal în compoziție a fost preparată prin amestecarea a 1000 g extract uscat în 2000 mL apă bidistilată; s-au preparat soluție de lavaj bucal cu 10% extract uscat și s-au repartizat în 80 de flacoane brune.

9.4.2. Delimitarea loturilor de studiu

Pentru pacienții care s-au prezentat pentru control stomatologic în vederea tratamentului parodontal sau pentru inserția de implante dentare, s-a efectuat un consult inițial oro-dentar; apoi s-au detaliat antecedentele heredo-colaterale și cele personale patologice, axându-se pe afecțiunile încadrate la contraindicații relative și absolute. Examinarea pacienților s-a făcut apreciindu-se următorii indici parodontali:

1. Evaluarea țesutului gingival (prin evaluarea culorii, formei și aspectului gingiei, a consistenței și tonusului, a conturului, a texturii și a existenței sângerării), elemente care se estimează în vederea aprecierii semnelor de inflamație gingivală;
2. Prezența sângerării la sondare;
3. Gradul de recesiune gingivală;
4. Determinarea existenței lipsei de atașament gingival;
5. Sondarea zonei furcației la dinții pluriradiculari (pentru a determina dacă punga parodontală s-a extins interradicular), poziția, numărul și dimensiunea furcațiilor;
6. Evaluarea gradului de mobilitate al dinților;
7. Evaluarea restaurărilor existente, pentru a se constata dacă și în ce măsură contribuie la favorizarea inflamației gingivale;
8. Evaluarea plăcii bacteriene
9. Examinarea radiologică;

Pentru realizarea loturilor de studiu în cadrul peri-implantitei am urmărit clasificarea de mai jos:

1. Pacienți cu *evoluție favorabilă a implantului dentar*: adâncimea șantului peri-implantar < 3 mm; indicele de sângerare absent; supurație absentă; fără modificări radiologice.
2. Pacienți cu *mucozită*: adâncimea șantului peri-implantar ≤ 4 mm; indicele de sângerare absent/prezent; supurație absentă/prezentă; fără modificări radiologice.
3. Pacienți cu *peri-implantită*, forma precoce: adâncimea șantului peri-implantar ≥ 4 mm; indicele de sângerare prezent; supurație absentă/prezentă; radiologic – pierdere osoasă $\leq 25\%$ din lungimea implantului.

9.4.4. Evaluarea nivelului NO prin efectuarea testului rapid semi-cantitativ Barkeley

Testul Berkeley Nitric Oxide Saliva Test Strips (Berkeley, CA, USA) utilizează benzi cu oxid nitric pentru a indica nivelul de oxid nitric din salivă; stripurile se plasează pe suprafața limbii 10 secunde și apoi se pliază, se apasă cele două laturi ale benzii și se lasă în contact timp de încă 5 secunde. Exprimarea rezultatelor se face semicantitativ, în funcție de intensitatea virajului de culoare existând echivalent matematic exprimat în $\mu\text{mol/L}$.

9.4.5. Determinarea capacității antioxidante a probelor de salivă față de radicalul DPPH

9.4.5.1. Colectarea salivei

Probele de salivă s-au prelevat printr-o metodă non-invazivă în ziua 1 și după 10 zile de tratament. În continuare, fiecare probă de salivă a fost centrifugată la 14000 rpm timp de 10 minute, iar supernatantul a fost transferat în tuburi etanșe sterile și depozitate fără cicluri de îngheț-dezghet la -20°C până la analiză.

9.5. Rezultate

9.5.1. Variația valorilor NO salivar evaluate prin testul Berekley in parodontită si peri-implantită

9.5.1.1. Parodontita

Lotul inițial de pacienți din care a fost selectat lotul de studiu a fost reprezentat de un total de 215 pacienți evaluați clinic oro-dentar. Lotul de studiu reprezentat de 55 pacienți și a fost împărțit în două grupuri, după cum urmează:

- 41 de pacienți au reprezentat grupul de studiu/ control - care au realizat lavaj bucal cu extract vegetal obținut din *Lysimachia nummularia* L.
- 14 pacienți grup martor – care au efectuat lavaj bucal fără extract vegetal.

În urma examenului clinic oro-dentar, conform parametrilor clinici prezențați au fost delimitate 4 subgrupuri după cum urmează:

- ✓ parodontita acută localizată;
- ✓ parodontita acută generalizată;
- ✓ parodontita cronică localizată;
- ✓ parodontita cronică generalizată.

Concluzii preliminare

1. La 68% din pacienții cu parodontită acută localizată s-a înregistrat o îmbunătățire a statusului clinic oro-dentar; la 32% din pacienți nu s-a înregistrat nici o modificare a cantității de NO între cele două momente ale studiului.
2. La toți pacienții cu parodontită acută generalizată s-au observat scăderi ale concentrației de NO.
3. In grupul de pacienții cu parodontită cronică localizată: la 50% din pacienți s-a observat o scădere a concentrației de NO iar la 50% din pacienți nu s-a înregistrat nici o modificare a cantității de NO între cele două momente ale studiului.
4. La pacienții cu parodontită cronică generalizată valoarea concentrației de NO a rămas constantă.

❖ Igiena orală

Obiectiv

Dat fiind faptul că igiena orală reprezintă un parametru extrem de important urmărit în monitorizarea pacienților cu boală parodontală, am realizat un studiu în care am încercat să identificăm posibila legătura dintre acest parametru și nivelul de NO, ca indicator de evaluarea al stresului oxidativ generat de bacteriile parodonto-patogene.

S-au studiat indicii de igienă orală a pacienților cu diferite forme de afectare parodontală.

Concluzii preliminare

1. La finalul experimentului, în ziua 11 a studiului s-a observat că la 85.36% din pacienții grupului control a scăzut valoarea de NO, în acest procent ponderea cea mai mare având-o pacienții cu igienă orală precară și pacienți cu igienă orală bună.
2. La 14.63% pacienți a rămas nemodificată concentrația de NO între cele două momente ale experimentului, aceștia aparținând loturilor cu igiena foarte bună și absentă.

❖ Fumatul

Obiectiv

Dat fiind unanim acceptat de specialiștii în domeniu faptul că fumatul este un important factor de risc în inițierea și întreținerea bolii parodontale, am realizat un studiu în care am încercat să identificăm posibila legătură între valorile NO și statusul de fumător/nefumător.

9.5.1.2. Peri-implantita

Lotul de studiu a fost reprezentat de 102 pacienți, cu o pondere aproximativ egală între sexe (54 femei; 48 bărbați), cu vârste între 25 și 58 ani, la care au fost inserate 2-4 implanturi pe aceeași hemiarcadă mandibulară.

Lotul de studiu a fost format din 6 pacienți aleși aleator din grupul celor cu evoluție favorabilă și cei 10 pacienți cu evoluție nefavorabilă, respectiv cu mucozită și peri-

implantită. Cu ocazia acestei prime evaluări a pacienților s-a făcut și prima determinare a valorii NO (oxid nitric), după care cei din grupul cu mucozită și peri-implantită au efectuat lavaj de două ori pe zi timp de 10 zile cu soluția care conține extract din *Lysimachia nummularia* L., conform protocolului de lucru.

Valorile NO obținute la pacienții cu cele două afecțiuni: mucozită și peri-implantită, pentru cele două momente ale evaluării sunt prezentate în teză.

Concluzii preliminare

1. Dat fiind faptul ca există diferențe cu semnificație statistică mică între valorile NO cuantificate la pacienților cu evoluție favorabilă și a la cei cu mucozită la 10 zile după lavaj cu soluția de testat putem afirma că aceasta a avut efecte benefice privind evoluția pacienților din lotul diagnosticați cu mucozită.
2. Persistența diferențelor cu semnificație statistică mare privind valorile NO la pacienții cu peri-implantită comparativ ce cei cu evoluție favorabilă, arată că în cazul peri-implantitei soluția testată nu are efect.
3. Există corelație înaltă între adâncimea șanțului peri-implantar la pacienții cu peri-implantită și valoarea NO, astfel încât putem afirma că NO poate fi util în aprecierea statusului clinic la acest grup de pacienți cu grad mai ridicat de evoluție nefavorabilă.
4. Prin conținutul bogat în metaboliți secundari cu efecte antibacteriene, antioxidante și antiinflamatoare demonstrate, soluția care conține extract din *Lysimachia nummularia* L poate fi folosită ca adjuvant terapeutic în complicațiile ușoare care pot să apară după inserarea de implanturi dentare.

9.5.2. Rezultatele obținute la testul de determinare a capacității antioxidante

La pacienții care au făcut parte din lotul martor care nu au utilizat soluția de lavaj bucal cu extract vegetal, procentul de activitate inhibitorie nu a variat.

Procesarea statistică a datelor arată ca există o diferență semnificativă statistic între mediile categoriilor cercetate la cele 2 momente ziua 1 a studiului și ziua 11 ale studiului la pacienții care au efectuat lavaj bucal cu soluție cu extract obținut din *Lysimachia nummularia* L.

Concluzii preliminare

1. Rezultatele evaluării a capacității antioxidante a salivei față de radicalul DPPH arată că există diferențe cu semnificație statistică între cele 2 determinări pentru fiecare din tipurile de parodontite, cu mențiunea că la pacienții cu parodontită acută localizată s-a înregistrat cea mai bună evoluție după efectuarea lavajului cu *Lysimchia nummularia* L
2. Pacienții cu igienă orală foarte bună au răspuns cel mai bine după lavaj bucal cu *Lysimchia nummularia* L
3. Pacienții cu boală parodontală, nefumători au înregistrat cea mai bună activitate inhibitorie DPPH
4. Rezultatele obținute arată că toate grupurile de pacienți luați în studiu, în funcție de nivelul de afectare parodontală, nivel de igienă și status fumator/nefumator au răspuns pozitiv, în grade diferite, la acțiunea extractului cu *Lysimchia nummularia* L., îmbunătățindu-se proprietățile antioxidante ale salivei.

ORIGINALITATEA SI CONTRIBUȚIILE INOVATOARE ALE TEZEI

Apreciez că teza de doctorat are următoarele elemente de originalitate:

1. **Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici** prin metoda HPLC, respectiv acid galic în *Lysimachia radix*, prezența acidului 3-O-metilgalic și a acidului ferulic la nivelul tuturor părților studiate ale plantei *Lysimachia nummularia* L., acid cafeic la *Lysimachia flores* și *trans-resveratrol* în produsele vegetale *Lysimachia radix* și *Lysimachia herba* – date care nu au fost menționate în literatura de specialitate până în prezent.
2. Teza este originală prin elementele de noutate legate de **descrierea particularităților botanice** ale speciei *Lysimachia nummularia* L. prezentă în arealul național, adaptată la condițiile geoclimatice ale țării noastre.
3. Un alt element de originalitate este legat de **descrierea proprietăților fizico-chimice** ale extractelor din *Lysimachia nummularia* L. și identificarea calitativă și cantitativă a metaboliților secundari ca importanță deosebită în păstrarea homeostaziei organismului uman.

4. Teza este originală și prin demonstrarea și evaluarea *in vitro* a **proprietăților antibacteriene și antioxidante** ale extractelor obținute din *Lysimachia nummularia* L.
5. Evaluarea *in vivo* a proprietăților antibacteriene ale speciei *Lysimachia nummularia* L. în contextul unor afecțiuni oro-dentare grave și cu incidența mare atât în plan național, cât și în plan mondial, respectiv **boala parodontală, peri-implantită**.

IMPACTUL REZULTATELOR OBȚINUTE

Apreciez că rezultatele obținute pot avea impact deosebit în mai multe domenii, după cum urmează:

1. Metaboliții secundari identificați în extractele obținute din *Lysimachia nummularia* L., pot optimiza tratamentul unor **afecțiuni oro-dentare**, respectiv în formele ușoare de parodontită și peri-implantită.
2. Rezultatele obținute susțin posibilitatea de utilizare a acestora în vederea obținerii unor formulări farmaceutice, respectiv un **produs farmaceutic tip - apă de gură**, utilă în afecțiuni ale cavității oro-dentare generate de stres oxidativ în prezența speciilor bacteriene.
3. Rezultatele obținute privind studiul macroscopic și microscopic al speciei *Lysimachia nummularia* L. vor contribui la **dezvoltarea cunoașterii în domeniul botanicii**.
4. Metaboliții secundari, fitocompuși cu natură polifenolică cunoscuți pentru potențialul terapeutic, identificați calitativ și cantitativ în extractele de *Lysimachia nummularia* L. vor **îmbogății cunoștințele în domeniul farmacognoziei**.
5. Identificarea proprietăților antibacteriene ale extractelor obținute din *Lysimachia nummularia* L., isi pot aduce contribuția la eforturile globale de rezolvare a problemelor legate de antibio rezistență; extinderea și aprofundarea cercetărilor din prezenta teza de doctorat ar putea fi un punct de plecare în **obținerea unor formulări farmaceutice complementare antibioticelor**.

CONCLUZII GENERALE

1. Produsele vegetale *Lysimachiae herba*, *Lysimachiae radix* și *Lysimachiae flores* prezintă proprietăți antioxidante marcante corelate cu conținutul în polifenoli totali și compuși fenolici conținuți.
2. Deoarece polifenolii sunt solubili în etanol, s-a dedus că metodologia optimă de obținere a extractului uscat constă în macerarea timp de 14 zile cu etanol 40%, timp care nu afectează stabilitatea polifenolilor.
3. Extractele de *Lysimachia nummularia* L. au efecte antibacteriene atât pe tulpinile de referință, cât și pe tulpinile de bacterii izolate din produse patologice.
4. Cel mai eficient extract s-a dovedit a fi cel extras din partea aeriană a plantei, atât pentru tulpinile de referință, cât și pentru tulpinile izolate din produse patologice.
5. Cele trei extracte au demonstrat absența efectelor antifungice, atât pe tulpinile de referință, cât și pe tulpinile izolate din produse patologice.
6. În urma utilizării soluției de lavaj bucal cu extract vegetal, din *Lysimachia nummularia* L. s-a demonstrat creșterea capacității antioxidante a salivei la pacienții cu diverse forme de parodontită la fumători și nefumători, atât la cei cu igienă orală precară cât și cu igienă bună.
7. Valorile crescute de NO din salivă pot fi asociate bolii parodontale și peri-implantitei, afecțiuni în patogenia cărora stresul oxidativ joacă un rol important.
8. Testul rapid semicantitativ Berkeley de testare a nivelului stresului oxidativ prin cuantificarea NO este o metodă simplă și neinvazivă care poate fi folosită cu ușurință în cabinetul de stomatologie ca marker pentru evaluarea pacienților cu procese inflamatorii în cavitatea oro-dentară.
9. Soluția de lavaj bucal realizată cu extract din *Lysimachia nummularia* L. poate fi utilizată pentru menținerea capacității antioxidante a salivei astfel încât să poată fi preîntâmpinate procesele distructive ale proceselor moi și dure în contextual parodontitei și a mucozitei.

10. Rezultatele prezentului studiu susțin continuarea cercetării în vederea obținerii unui produs farmaceutic standardizat cu largă utilizare în practica medicinei dentare.

BIBLIOGRAFIE

1. WHO, Oral Health, 2018, *apud* <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>, accesat 30.06.2020.
2. Newman, M. G., Takei, H., Klokkevold, P. R., & Carranza, F. A. (2018). Newman and Carranza's Clinical Periodontology E-Book: Newman and Carranza's Clinical Periodontology E-Book. Elsevier Health Sciences.
3. Devisha, Dharendra Kumar Singh & Sonali Sarkar, recent advancement in periodontics, I.J.S.N., VOL. 10 (1) 2019, 1-10.
4. ALENCAR, C. R. B. D., SILVA, O. L. D., MENDONÇA, F. L., & ANDRADE, F. J. P. D. (2016). Strategies for control and treatment of carious lesions in deciduous molars: a review of the literature. RGO-Revista Gaúcha de Odontologia, 64, 62-69.
5. Iuliu Morariu, Ioan Todor, Botanică sistematică, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1992, pp. 336-337.
6. Constantin Pârvu, Universul Plantelor Mica Enciclopedie, Editura Enciclopedică, Ed. a-III-a rev. și completată, București, 2000, p. 192.
7. Kodela, P., & Jobson, R. W. (2016). *Lysimachia nummularia* (Primulaceae) Naturalised in New South Wales, Australia. Telopea, 19, 153-157.
8. Iuliu Morariu, Ioan Todor, Botanică sistematică, Editură Didactică și Pedagogică, București, 1992, p. 336-337.
9. Pârvu, C. (2000). Universul plantelor–Mică enciclopedie, ediția III. Editura Enciclopedică, București, 251(328), p. 192.
10. ***Flora d'Italia, S. Pignatti, vol. 3, Editura Edagricole – New Business ,Media 2018, p. 39.
11. Karataş, M., & Aasim, M. (2015). In vitro plantlet regeneration from nodal segments of creeping jenny (*Lysimachia nummularia* L.)-A medicinal aquatic plant. Fresenius Environmental Bulletin, 24(4), 1263-1268.
12. Temelie, M. (2017). Enciclopedia plantelor medicinale spontane din România. Rovimed Publishers.
13. Karataş, M., & Aasim, M., *op. cit.*
14. ***Flora d'Italia, S. Pignatti, vol. 3, Editura Edagricole – New Business Media, 2018, p. 39.
15. 1. Podolak, I., Koczurkiewicz, P., Galanty, A., & Michalik, M. (2013). Cytotoxic triterpene saponins from the underground parts of six *Lysimachia* L. species. Biochemical Systematics and Ecology, 47, 116-120.
16. Kokubugata, G., Nakamura, K., Shinohara, W., Saito, Y., Peng, C. I., & Yokota, M. (2010). Evidence of three parallel evolutions of leaf dwarfism and phytogeography in *Lysimachia* sect. *Nummularia* in Japan and Taiwan. Molecular phylogenetics and evolution, 54(2), 657-663.

17. Anderberg, A. A., Manns, U., & Källersjö, M. (2007). Phylogeny and floral evolution of the Lysimachieae (Ericales, Myrsinaceae): evidence from *ndhF* sequence data. *Willdenowia*, 37(2), 407-421.
18. Goro Kokubugata, Koh Nakamura, Wataru Shionohara, Yukiko Saito, Ching-I Peng, Masatsugu Yokota, Evidence of three parallel evolutions of leaf dwarfism and phytogeography in *Lysimachia* sect. *Nummularia* in Japan and Taiwan, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54 (2010) 657-663
19. Peng, C. I., & Hu, C. M. (1999). *Lysimachia chingshuiensis* (Primulaceae), a new species from eastern Taiwan. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 40.
20. Douglas Ladd (2017), *Journal of the Missouri Native Plant Society*, Volume 34, 27-28.
21. Slezák, M., Jarolímek, I., Kochjarová, J., & Hrivnák, R. (2020). Floodplain forest vegetation in the northern part of the Western Carpathians. *Biologia*, 75, 1789-1799.
22. Ciocarlan V.(2009), *Flora ilustrată a României*, Ceres, Bucuresti, 353-410.
23. Anderberg, A. A., Manns, U., & Källersjö, M. (2007). Phylogeny and floral evolution of the Lysimachieae (Ericales, Myrsinaceae): evidence from *ndhF* sequence data. *Willdenowia*, 37(2), 407-421.
24. Kokubugata, G., Nakamura, K., Shinohara, W., Saito, Y., Peng, C. I., & Yokota, M. (2010). Evidence of three parallel evolutions of leaf dwarfism and phytogeography in *Lysimachia* sect. *Nummularia* in Japan and Taiwan. *Molecular phylogenetics and evolution*, 54(2), 657-663.
25. Peng, C. I., & Hu, C. M. (1999). *Lysimachia chingshuiensis* (Primulaceae), a new species from eastern Taiwan. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 40.
26. Kokubugata, G., Nakamura, K., Shinohara, W., Saito, Y., Peng, C. I., & Yokota, M. (2010). Evidence of three parallel evolutions of leaf dwarfism and phytogeography in *Lysimachia* sect. *Nummularia* in Japan and Taiwan. *Molecular phylogenetics and evolution*, 54(2), 657-663.
27. Douglas Ladd, *op.cit.*
28. Karataş, M., & Aasim, M. (2015). In vitro plantlet regeneration from nodal segments of creeping jenny (*Lysimachia nummularia* L.)-A medicinal aquatic plant. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24(4), 1263-1268.
29. Kodela, P., & Jobson, R. W. (2016). *Lysimachia nummularia* (Primulaceae) Naturalised in New South Wales, Australia. *Telopea*, 19, 153-157.
30. Slezák, M., Jarolímek, I., Kochjarová, J., & Hrivnák, R. (2020). Floodplain forest vegetation in the northern part of the Western Carpathians. *Biologia*, 75, 1789-1799.
31. Ciocarlan V.(2009), *Flora ilustrată a României*, Ceres, Bucuresti, 353-410.
32. Dorian Cojoacă F., Niculescu M. (2018), *Diversity, Distribution and ecology of the forest natural habitats in the Bratovoieşti Forest, Dolj County*, 453-455.

33. Tănase C., Ștefan N. (2010), Contribution to the study of flora and vegetation from basin Valea Morîșca, *Analele științifice ale Universității „Al. I. Cuza” Iași*, Tomul LVI, fasc. 1, s. II.a, Biologie vegetală, 87.
34. Oroian, S., Sămărghișan, M., Coșarcă, S., Hirițiu, M., Oroian, F., & Tanase, C. (2019). Botanical survey of medicinal plants used in the traditional treatment of human disease in mountain hay meadows from Gurghiului mountains. *Acta Biologica Marisiensis*, 2(1), 38-46.
35. Făgăraș, M., Skolka, M., Anastasiu, P., Cogălniceanu, P., Negrean, G., Bănică, G., ... & Samoilă, C. (2008). Biodiversitatea zonei costiere a Dobrogei dintre Capul Midia și Capul Kaliacra. Constanța: Edit. Ex Ponto.
36. Mihai Doroftei și Silviu Covaliov (2013), Ghid pentru personalul de teren al administrației rezervației biosferei Delta Dunării și gării de mediu, Editura Centrul de informare tehnologică Delta Dunării – Tulcea 2013, 241, 269, 499.
37. Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Khoei, H. (2017). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of herbmed pharmacology*, 7(1), 1-7.
38. Oroian, S., *op. cit.*
39. Temelie M. (2017), *Enciclopedia plantelor medicinale spontane din România*, Editura Rovimed, p. 127.
40. Mihăiescu E. et.al. (2008), *Dicționarul plantelor de leac*, Editura Călin, ed. a II-a, rev., București, 53.
41. Drăgulescu Constantin (1992) *Plante medicinale-alimentare din flora spontană*. Editura Ceres, București, 19.
42. Stănescu U., Hâncianu M., Gîrd C. E. et.al (2020) *Farmacognozie, Produse vegetale cu substanțe bioactive*, Editura Polirom, Iași, 14-37.
43. Cristea A. N. (2018), *Farmacologie, Tratat de Farmacologie*, Ediția I, Editura Medicală, 839, 955, 1059.
44. Stănescu U., *op. cit.* 14-37.
45. Abdel, H. I., & Mansour, M. S. (2017). Polyphenols: Properties, occurrence, content in food and potential effects. *Environmental Science and Engineering*, 6, 232-61.
46. Luca, S. V., Macovei, I., Bujor, A., Miron, A., Skalicka-Woźniak, K., Aprotosoiaie, A. C., & Trifan, A. (2020). Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(4), 626-659.
47. Faggio, C., Sureda, A., Morabito, S., Sanches-Silva, A., Mocan, A., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M. (2017). Flavonoids and platelet aggregation: A brief review. *European journal of pharmacology*, 807, 91-101.
48. Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47.
49. Perez-Vizcaino, F., & Fraga, C. G. (2018). Research trends in flavonoids and health. *Archives of biochemistry and biophysics*, 646, 107-112.

50. ŞENER, S. Ö., BADEM, M., ÖZGEN, U., Korkmaz, N. U. R. İ. Y. E., KANBOLAT, Ş., KERİMOĞLU, G., ... & KARAOĞLAN, E. S. (2022). Antidiabetic and Antioxidant Effect of the Aerial Parts of *Lysimachia verticillaris* and its Isolated Phenolic Compounds on Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Bezmialem Science*, 10(4).
51. Suciu, F., Stoicescu, I., Lupu, E. C., Musuc, A. M., Popescu, A., Mititelu, M., ... & Badea, V. (2023). HPLC Analysis of Polyphenolic Compounds in *Lysimachia nummularia* L. and Comparative Determination of Antioxidant Capacity. *Applied Sciences*, 13(4), 2159.
52. Tóth, A., Riethmüller, E., Alberti, Á., Végh, K., & Kéry, Á. (2012). Comparative phytochemical screening of phenoloids in *Lysimachia* species. *Extraction*, 2, 0-10.
53. Toth, A., Toth, G., & Kery, A. (2014). Polyphenol composition and antioxidant capacity of three *Lysimachia* species. *Natural product communications*, 9(10), 1934578X1400901017.
54. 김진숙, 김형자, & 박호균. (1993). Studies on the chemical constituents of *Lysimachia clethroides*. *Yakhak Hoeji*, 37(4), 325-330.
55. Ding, L., Guo, Y., WU, X., & MA, Y. (1992). Chemical constituents of flavonoids in *Lysimachia clethroides*. *Chinese Traditional Patent Medicine*.
56. Gao, F., Zhao, D. & Deng, J. (2013). Noi flavonoide de la *Lysimachia christinae* Hance. *Helvetica Chimica Acta*, 96 (5), 985-989.
57. Wei, J. F., Chang, X., Wang, W. & Kang, W. Y. (2013). Constituenți chimici din *Lysimachia circaeoides*. *Zhong yao cai= Zhongyao cai = Jurnalul materialelor medicinale chinezești*, 36 (9), 1441-1443.
58. Şener, S. Ö. *Lysimachia verticillaris* üzerinde farmakognozik araştırmalar (Master's thesis, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
59. Wei, J. F., Chang, X., Wang, W. & Kang, W. Y. *op. cit.*
60. Zhihui, D., Yunping, H., & Jingkai, D. (1993). The chemical constituents of *Lysimachia microcarpa*. *Acta Botanica Yunnanica*, 15(2), 201-204.
61. Jingkui, T., Zhongmei, Z., Lizhen, X., & Shilin, Y. (2001). Studies on chemical constituents of *Lysimachia davurica*. *Zhong cao yao= Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 32(11), 967-969.
62. Podolak, I., Koczurkiewicz, P., Michalik, M., Galanty, A., Zajdel, P., & Janeczko, Z. (2013). A new cytotoxic triterpene saponin from *Lysimachia nummularia* L. *Carbohydrate research*, 375, 16-20.
63. Seo, J. B., Park, S. W., Choe, S. S., Jeong, H. W., Park, J. Y., Choi, E. W., ... & Lee, T. G. (2012). Foenumoside B from *Lysimachia foenum-graecum* inhibits adipocyte differentiation and obesity induced by high-fat diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(2), 800-806.
64. Nguyen, Q. H., Nguyen, T. T., Nguyen, V. T., Le, M. H., & Ain, R. A. A. L. (2022). Microscopical characteristics, phytochemical investigation and

biological activities of different *Lysimachia* species growing in Vietnam. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 50(2), 12692-12692.

65. Podolak, I., Koczurkiewicz, P., Galanty, A., & Michalik, M. (2013). Cytotoxic triterpene saponins from the underground parts of six *Lysimachia* L. species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 47, 116-120.
66. *Ibidem*.
67. Boz, H. (2015). p- Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(11), 2323-2328.
68. Boots, A. W., Li, H., Schins, R. P., Duffin, R., Heemskerk, J. W., Bast, A., & Haenen, G. R. (2007). The quercetin paradox. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222(1), 89-96.
69. Erlund, I., Kosonen, T., Alfthan, G., Mäenpää, J., Perttunen, K., Kenraali, J., ... & Aro, A. (2000). Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European journal of clinical pharmacology*, 56, 545-553.
70. Mbikay, M., & Chrétien, M. (2022). Isoquercetin as an anti-COVID-19 medication: A potential to realize. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 830205.
71. Khorsandi, K., Hosseinzadeh, R., & Chamani, E. (2020). Molecular interaction and cellular studies on combination photodynamic therapy with rutoside for melanoma A375 cancer cells: An in vitro study. *Cancer cell international*, 20(1), 1-15.
72. Lin, Y., Shi, R., Wang, X., & Shen, H. M. (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current cancer drug targets*, 8(7), 634-646.
73. Song, X., Tan, L., Wang, M., Ren, C., Guo, C., Yang, B., ... & Pei, J. (2021). Myricetin: A review of the most recent research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 134, 111017.
74. Imran, M., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Aslam Gondal, T., Saeed, F., Imran, A., ... & Estevinho, L. M. (2019). Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential. *Molecules*, 24(12), 2277.
75. Pei, K., Ou, J., Huang, J., & Ou, S. (2016). p- Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 2952-2962.
76. Kim, J. H., Kang, S. I., Shin, H. S., Yoon, S. A., Kang, S. W., Ko, H. C., & Kim, S. J. (2013). Sasa quelpaertensis and p-coumaric acid attenuate oleic acid-induced lipid accumulation in HepG2 cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77(7), 1595-1598.

77. Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2014). Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Molecular and cellular endocrinology*, 389(1-2), 71-83.
78. Hartman ML, Czyz M (2020). "BCL-w: apoptotic and non-apoptotic role in health and disease". *Cell Death & Disease*. 11 (4): 2260. doi:10.1038/s41419-020-2417-0. PMC 7174325. PMID 32317622
79. Tang, J., Diao, P., Shu, X., Li, L., & Xiong, L. (2019). Quercetin and quercitrin attenuates the inflammatory response and oxidative stress in LPS-induced RAW264. 7 cells: in vitro assessment and a theoretical model. *BioMed research international*, 2019.
80. Lister, C. E., Lancaster, J. E., Sutton, K. H., & Walker, J. R. (1994). Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 64(2), 155-161.
81. Gómez-Florit, M., Monjo, M., & Ramis, J. M. (2015). Quercitrin for periodontal regeneration: effects on human gingival fibroblasts and mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*, 5(1), 16593.
82. Valentová, K., Vrba, J., Bancířová, M., Ulrichová, J., & Křen, V. (2014). Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 267-282.
83. Bondonno, N. P., Bondonno, C. P., Ward, N. C., Woodman, R. J., Hodgson, J. M., & Croft, K. D. (2020). Enzymatically modified isoquercitrin improves endothelial function in volunteers at risk of cardiovascular disease. *British Journal of Nutrition*, 123(2), 182-189.
84. Lin, Y., Shi, R., Wang, X., & Shen, H. M. (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current cancer drug targets*, 8(7), 634-646.
85. Kang, K. A., Piao, M. J., Hyun, Y. J., Zhen, A. X., Cho, S. J., Ahn, M. J., ... & Hyun, J. W. (2019). Luteolin promotes apoptotic cell death via upregulation of Nrf2 expression by DNA demethylase and the interaction of Nrf2 with p53 in human colon cancer cells. *Experimental & molecular medicine*, 51(4), 1-14.
86. Taheri, Y., Suleria, H. A. R., Martins, N., Sytar, O., Beyatli, A., Yeskaliyeva, B., ... & Sharifi-Rad, J. (2020). Myricetin bioactive effects: Moving from preclinical evidence to potential clinical applications. *BMC complementary medicine and therapies*, 20(1), 1-14.
87. Holland, T. M., Agarwal, P., Wang, Y., Leurgans, S. E., Bennett, D. A., Booth, S. L., & Morris, M. C. (2020). Dietary flavonols and risk of Alzheimer dementia. *Neurology*, 94(16), e1749-e1756.
88. Alam, W., Khan, H., Shah, M. A., Cauli, O., & Saso, L. (2020). Kaempferol as a dietary anti-inflammatory agent: current therapeutic standing. *Molecules*, 25(18), 4073.

89. *Ibidem*.
90. Biharee, A., Sharma, A., Kumar, A., & Jaitak, V. (2020). Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. *Fitoterapia*, 146, 104720.
91. Smullen, J., Koutsou, G. A., Foster, H. A., Zumbé, A., & Storey, D. M. (2007). The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries research*, 41(5), 342-349.
92. Yoo, H., Ku, S. K., Baek, Y. D., & Bae, J. S. (2014). Anti-inflammatory effects of rutin on HMGB1-induced inflammatory responses in vitro and in vivo. *Inflammation Research*, 63, 197-206.
93. *Ibidem*.
94. Csepregi, R., Temesfői, V., Das, S., Alberti, Á., Tóth, C. A., Herczeg, R., ... & Kőszegi, T. (2020). Cytotoxic, antimicrobial, antioxidant properties and effects on cell migration of phenolic compounds of selected transylvanian medicinal plants. *Antioxidants*, 9(2), 166.
95. *Ibidem*.
96. Khan, H., Ullah, H., Tundis, R., Belwal, T., Devkota, H. P., Daglia, M., ... & Xiao, J. (2020). Dietary flavonoids in the management of huntington's disease: Mechanism and clinical perspective. *EFood*, 1(1), 38-52.
97. Li, G., Ding, K., Qiao, Y., Zhang, L., Zheng, L., Pan, T., & Zhang, L. (2020). Flavonoids regulate inflammation and oxidative stress in cancer. *Molecules*, 25(23), 5628.
98. Patil, V. M., & Masand, N. (2018). Anticancer potential of flavonoids: chemistry, biological activities, and future perspectives. *Studies in natural products chemistry*, 59, 401-430.
99. Toros, P., Şen, B., Sönmez, P. K., Özkut, M., Öztürk, Ş., Çöllü, F., ... & Tuğlu, İ. (2017, November). The Effect of Herbal Medicine on Colon Cancer Cells in Culture. In *Proceedings* (Vol. 1, No. 10, p. 1033). MDPI.
100. *** - Flora României, 1952-1976, vol. VII, Editura Acad. R.P.R.-R.S.R. 42-46.
101. Ciocârlan V., (2009), Flora ilustrată a României. Pteridophyta et Spermatophyta, ed. a 3-a, Editura Ceres. Bucureşti, p. 1067.
102. Sârbu, I., Ştefan, N., & Oprea, A. (2013). Plante vasculare din România: determinant ilustrat de teren. *Victor B victor*, 554.
103. Bucur L., Istudor V., Sava C., Jianu L., Vameşu S., (2002), *Analiza farmacognostică, instrument de determinare a identităţii, purităţii şi calităţii produselor vegetale*, Editura „Ovidius” University Press, Constanţa, 8.
104. *Ibidem*, p. 17.
105. *Ibidem*, p. 23.
106. *Ibidem*, p. 52.
107. *Ibidem*, p. 52.

108. *Ibidem*, p. 52.
109. *Ibidem* p. 53.
110. *Ibidem* p. 53.
111. ****Farmacopeea Română* (ediția X) (2000), Editura Medicală, București, 1016.
112. *** European Pharmacopoeia (2008), 6th ed. Strasbourg, France: Council of Europe; 1023.
113. ****Farmacopeea Română* (ediția X), *op. cit.*, p. 1013.
114. Li, H. Y., Hao, Z. B., Wang, X. L., Huang, L., & Li, J. P. (2009). Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance. *Bioresource technology*, 100(2), 970-974.
115. Tóth, A., Riethmüller, E., Alberti, Á., Végh, K., & Kéry, Á. (2012). Comparative phytochemical screening of phenoloids in *Lysimachia* species. *Extraction*, 2, 0-10.
116. Toth, A., Toth, G., & Kery, A. (2014). Polyphenol composition and antioxidant capacity of three *Lysimachia* species. *Natural product communications*, 9(10), 1934578X1400901017.
117. *** United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 30-NF 25), 2007, vol 28. (4), Rockville, MD: United States Pharmacopeia Convention, 914.
118. Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., ... & Iseki, K. (2011). In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International journal of pharmaceutics*, 403(1-2), 136-138.
119. Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., & Hu, Y. (2013). Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2013.
120. Chen, Z., Yang, Y., Mi, S., Fan, Q., Sun, X., Deng, B., ... & Ruan, Z. (2019). Hepatoprotective effect of chlorogenic acid against chronic liver injury in inflammatory rats. *Journal of Functional Foods*, 62, 103540.
121. Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., & Wang, Z. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *Journal of food science*, 76(6), M398-M403.
122. Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., ... & XiaoHui, Z. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 67-74.
123. Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., & Wang, Z. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *Journal of food science*, 76(6), M398-M403.

124. WANG, H. J., WU, G. J., & JIANG, H. (2003). Extraction of chlorogenic acid from flos *Ionicerae* and its antibacterial activity [J]. *Journal of Beijing Agricultural College*, 4.
125. Ding, Y., Cao, Z., Cao, L., Ding, G., Wang, Z., & Xiao, W. (2017). Antiviral activity of chlorogenic acid against influenza A (H1N1/H3N2) virus and its inhibition of neuraminidase. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
126. Toth, A., Toth, G., & Kery, A. (2014). Polyphenol composition and antioxidant capacity of three *Lysimachia* species. *Natural product communications*, 9(10), 1934578X1400901017.
127. Gülçin, İ. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217(2-3), 213-220.
128. Nardini, M., D'Aquino, M., Tomassi, G., Gentili, V., Di Felice, M., & Scaccini, C. (1995). Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(5), 541-552.
129. Kępa, M., Mikłasińska-Majdanik, M., Wojtyczka, R. D., Idzik, D., Korzeniowski, K., Smoleń-Dzirba, J., & Wąsik, T. J. (2018). Antimicrobial potential of caffeic acid against *Staphylococcus aureus* clinical strains. *BioMed research international*, 2018.
130. Erdemli, H. K., Akyol, S., Armutcu, F., & Akyol, O. (2015). Antiviral properties of caffeic acid phenethyl ester and its potential application. *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 4(4), 344.
131. Haslam, E., & Cai, Y. (1994). Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Natural product reports*, 11, 41-66.
132. Yen, G. C., Duh, P. D., & Tsai, H. L. (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food chemistry*, 79(3), 307-313.
133. Choubey, S., Varughese, L. R., Kumar, V., & Beniwal, V. (2015). Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review. *Pharmaceutical patent analyst*, 4(4), 305-315.
134. Özgen, U., Şener, S. Ö., Šmejkal, K., Vaclavik, J., Deniz, F. S. Ş., Orhan, İ. E., ... & Žemlička, M. (2020). Cholinesterase and Tyrosinase Inhibitory Potential and Antioxidant Capacity of *Lysimachia verticillaris* L. and Isolation of the Major Compounds. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(5), 528.
135. Son, Y. J., Shin, J. M., Kim, M., Yoo, G., & Nho, C. W. (2021). Yellow loosestrife (*Lysimachia vulgaris* var. *davurica*) ameliorates liver fibrosis in db/db mice with methionine-and choline-deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 1-11.
136. Djoko, B., Chiou, R. Y. Y., Shee, J. J., & Liu, Y. W. (2007). Characterization of immunological activities of peanut stilbenoids, arachidin-1,

piceatannol, and resveratrol on lipopolysaccharide-induced inflammation of RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2376-2383.

137. Chalal, M., Klinguer, A., Echairi, A., Meunier, P., Vervandier-Fasseur, D., & Adrian, M. (2014). Antimicrobial activity of resveratrol analogues. *Molecules*, 19(6), 7679-7688.
138. Pei, K., Ou, J., Huang, J., & Ou, S. (2016). p- Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 2952-2962.
139. Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., & Van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*, 85(2), 231-237.
140. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
141. Benzie, I.F.F.; Tulpina, J.J. (1996), Capacitatea ferică de reducere a plasmiei (FRAP) ca măsură a "puterii antioxidante": testul FRAP, *Anal. Biochimie* 1996, 239, 70-76.
142. Han, J. H., Lee, H. J., Cho, M. R., Chang, N., Kim, Y., Oh, S. Y., & Kang, M. H. (2014). Total antioxidant capacity of the Korean diet. *Nutrition Research and Practice*, 8(2), 183-191.
143. Csepregi, K., Neugart, S., Schreiner, M., & Hideg, É. (2016). Comparative evaluation of total antioxidant capacities of plant polyphenols. *Molecules*, 21(2), 208.
144. Farmacopeea Română ediția a X-a, Supliment 2006, Editura Medicală, București, 2006, p. 419.
145. Farmacopeea Română ediția a X-a, Supliment 2006, Editura Medicală, București, 2006, p. 224.
146. ***British, Pharmacopoeia (2003), Volume III, London, The Stationery Office, 2018.
147. Farmacopeea Română ediția a X-a, *op. cit.*, p. 419, 420.
148. *** Farmacopeea Română Ediția a X-a, *op.cit.*, p. 420-421.
149. McAllister, R. A. (1969). Observations on the Folin-Ciocalteu reaction. *The Journal of medical laboratory technology*, 26(1), 1-10.
150. Nichita C., (2006), *Extrakte selective de principii bioactive cu aplicații în farmacologie și cosmetică*, teză de doctorat, Universitatea Politehnică, București, 115-142.
151. Colombo, A. P. V., & Tanner, A. C. R. (2019). The role of bacterial biofilms in dental caries and periodontal and peri-implant diseases: a historical perspective. *Journal of Dental Research*, 98(4), 373-385.

152. Marsh, P. D., & Zaura, E. (2017). Dental biofilm: ecological interactions în health and disease. *Journal of clinical periodontology*, 44, S12-S22.
153. Diaz, P. I., & Valm, A. M. (2020). Microbial interactions în oral communities mediate emergent biofilm properties. *Journal of Dental Research*, 99(1), 18-25.
154. Colombo, A. P. V., & Tanner, A. C. R. (2019). The role of bacterial biofilms în dental caries and periodontal and peri-implant diseases: a historical perspective. *Journal of Dental Research*, 98(4), 373-385.
155. Manji, F., Dahlen, G., & Fejerskov, O. (2018). Caries and periodontitis: contesting the conventional wisdom on their aetiology. *Caries Research*, 52(6), 548-564.
156. *Ibidem.*
157. Loesche, W. J. (1996), *Microbiology of dental decay and periodontal disease*. Medical Microbiology. 4th edition.
158. <https://www.cdc.gov/oralhealth/conditions/periodontal-disease.html> accesat 25.02.2021.
159. World Health Organization, *apud*, <https://www.euro.who.int/en/health-topics/diseaseprevention/oral-health/data-and-statistics>, 2021, accesat 24.01.2022.
160. *Ibidem.*
161. Buiuc D., Neguț M. (2009) ,Tratat de microbiologie clinică, ed. a III-a, Editura Medicală, București, 461-470, 563-567, 586-591, 695-703, 711-717, 740-743, 765-786, 961-991.
162. CLSI/NCCLS – M 100-S 16, 2020, accesat 20.03.2021.
163. *Ibidem.*
164. Buiuc D., Neguț M. Tratat de microbiologie clinică, ed. a III-a, Editura Medicală, București, 2009, pp. 461-470, 563-567, 586-591, 695-703, 711-717, 740-743, 765-786, 961-991.
165. Alibi, S., Crespo, D., & Navas, J. (2021), Plant-derivatives small molecules with antibacterial activity. *Antibiotics*, 10(3), 231.
166. *Ibidem.*
167. Merlani, M., Barbakadze, V., Amiranashvili, L., Gogilashvili, L., Poroikov, V., Petrou, A., & Sokovic, M. (2019). New caffeic acid derivatives as antimicrobial agents: Design, synthesis, evaluation and docking. *Current Topics în Medicinal Chemistry*, 19(4), 292-304.
168. Li, Z., Chen, K., Peng, C., Chi, F., Yu, C., & Yang, Q. (2022). Antibacterial and antibiofilm activities of chlorogenic acid against *Yersinia enterocolitica*. *Frontiers în Microbiology*, 1178.
169. Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial drug resistance*, 19(4), 256-265.

170. Albano, M., Crulhas, B. P., Alves, F. C. B., Pereira, A. F. M., Andrade, B. F. M. T., Barbosa, L. N., ... & Júnior, A. F. (2019). Antibacterial and anti-biofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermidis*. *Microbial pathogenesis*, 126, 231-238.
171. Alibi, S., Crespo, D., & Navas, J. (2021). Plant-derivatives small molecules with antibacterial activity. *Antibiotics*, 10(3), 231.
172. Singh Hallan, S., Sguizzato, M., Pavoni, G., Baldisserotto, A., Drechsler, M., Mariani, P., ... & Cortesi, R. (2020). Ellagic acid containing nanostructured lipid carriers for topical application: A preliminary study. *Molecules*, 25(6), 1449.
173. Antonopoulou, I., Sapountzaki, E., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2021). Ferulic Acid From Plant Biomass: A Phytochemical With Promising Antiviral Properties. *Frontiers in Nutrition*, 8.
174. Pernin, A., Bosc, V., Maillard, M. N., & Dubois-Brissonnet, F. (2019). Ferulic acid and eugenol have different abilities to maintain their inhibitory activity against *Listeria monocytogenes* in emulsified systems. *Frontiers in Microbiology*, 10, 137.
175. Yildirim, A. B., Guner, B., Karakas, F. P., & Turker, A. U. (2017). Evaluation of antibacterial, antitumor, antioxidant activities and phenolic constituents of field-grown and in vitro-grown *Lysimachia vulgaris* L. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(2), 177-187.
176. Csepregi, R., Temesfői, V., Das, S., Alberti, Á., Tóth, C. A., Herczeg, R., ... & Kőszegi, T. (2020). Cytotoxic, antimicrobial, antioxidant properties and effects on cell migration of phenolic compounds of selected transylvanian medicinal plants. *Antioxidants*, 9(2), 166.
177. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061484> *apud* WHO global-oral-health-status-report-2030.pdf
178. Sargolzaie, N., Moeintaghavi, A., & Shojaie, H. (2017). Comparing the quality of life of patients requesting dental implants before and after implant. *The open dentistry journal*, 11, 485.
179. *Ibidem*.
180. Rosen, P., Clem, D., Cochran, D., Froum, S., McAllister, B., Renvert, S., & Wang, H. L. (2013). Peri-implant mucositis and peri-implantitis: a current understanding of their diagnoses and clinical implications. *Journal of periodontology*, 84(4), 436-443.
181. Lindhe, J., Meyle, J., & Group D of the European Workshop on Periodontology. (2008). Peri- implant diseases: consensus report of the sixth European workshop on periodontology. *Journal of clinical periodontology*, 35, 282-285.

182. Samaranayake, L. (2012). Essential microbiology for dentistry 4th ed. Churchill Livingstone Elsevier, 2012, 279-81.
183. Dumitriu, H. T., Dumitriu, S., & Dumitriu, A. S. (2015). Tratat de parodontologie. Bucharest: Ed. Viața Medicală Românească, 112-148
184. Newman, M. G., Takei, H. H., & Klokkevold, P. R. (2015). Carranza's Clinical Periodontology 12th Edition (Canada).
185. Parwani, S. R., Chitnis, P. J., & Parwani, R. N. (2012). Salivary nitric oxide levels in inflammatory periodontal disease—A case- control and interventional study. International journal of dental hygiene, 10(1), 67-73.
186. Clodfelter, W. H., Basu, S., Bolden, C., Dos Santos, P. C., King, S. B., & Kim-Shapiro, D. B. (2015). The relationship between plasma and salivary NOx. Nitric Oxide, 47, 85-90.
187. Lundberg, J. O., & Weitzberg, E. (2022). Nitric oxide signaling in health and disease. Cell, 185(16), 2853-2878.
188. Parwani, S. R., Chitnis, P. J., & Parwani, R. N. (2012). Salivary nitric oxide levels in inflammatory periodontal disease—A case- control and interventional study. International journal of dental hygiene, 10(1), 67-73.
189. Wang, Y., Huang, X., & He, F. (2019). Mechanism and role of nitric oxide signaling in periodontitis. Experimental and Therapeutic Medicine, 18(5), 3929-3935.
190. Tang, L., Liang, X., Moore, R., & Dong, T. G. (2015). Commentary: the icmF3 locus is involved in multiple adaptation-and virulence-related characteristics in Pseudomonas aeruginosa PAO1. Frontiers in cellular and infection microbiology, 5, 83.
191. Salman, A. U. R., Hyrve, S. M., Regli, S. K., Zubair, M., Enger, B. C., Lødeng, R., ... & Rønning, M. (2019). Catalytic Oxidation of NO over LaCo_{1-x}B_xO₃ (B= Mn, Ni) Perovskites for Nitric Acid Production. Catalysts, 9(5), 429.
192. Hong, Z., Wang, Z., & Li, X. (2017). Catalytic oxidation of nitric oxide (NO) over different catalysts: an overview. Catalysis Science & Technology, 7(16), 3440-3452.
193. Wang, Y., Huang, X., & He, F., *op. cit.* 3929-3935.
194. Aksit-Bicak, D., Emekli-Alturfan, E., Ustundag, U. V., & Akyuz, S. (2019). Assessment of dental caries and salivary nitric oxide levels in children with dyspepsia. BMC Oral Health, 19(1), 1-7.
195. Serreli, G., & Deiana, M. (2023). Role of Dietary Polyphenols in the Activity and Expression of Nitric Oxide Synthases: A Review. Antioxidants, 12(1), 147.
196. Aksit-Bicak, D., Emekli-Alturfan, E., Ustundag, U. V., & Akyuz, S. (2019). Assessment of dental caries and salivary nitric oxide levels in children with dyspepsia. BMC Oral Health, 19(1), 1-7.

- 197.** Tang, L., Liang, X., Moore, R., & Dong, T. G. (2015). Commentary: the *icmF3* locus is involved in multiple adaptation-and virulence-related characteristics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, 83.
- 198.** Tóthová, L. U., Kamodyova, N., Červenka, T., & Celec, P. (2015). Salivary markers of oxidative stress in oral diseases. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, 73.