



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2019 00874**

(22) Data de depozit: **06/12/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2020 BOPI nr. **6/2020**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA OVIDIUS DIN
CONSTANȚA, BULEVARDUL MAMAIA,
NR.124, CONSTANȚA, CT, RO**

(72) Inventatori:
• **POPOVICI VIOLETA,
STR.GHEORGHITENI, NR.108,
DORNA ARINI, SV, RO;**
• **BUCUR LAURA ADRIANA,
STR.PESCARILOR, NR.36, BL.BM 14,
SC.C, AP.34, CONSTANȚA, CT, RO;**
• **SCHRODER VERGINICA,
ALEEA GAROFIȚEI, NR.18, BL.L75B, SC.B,
AP.32, CONSTANȚA, CT, RO;**

• **POPESCU ANTOANELA,
STR.I.C.BRĂȚIANU, NR.30, CONSTANȚA,
CT, RO;**
• **COSTACHE TEODOR - ALEXANDRU,
STR.COZIA, NR.8D, BL.A30, SC.A, ET.3,
AP.10, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **VOCHIȚA GABRIELA, STR.NICOLINA,
NR.2, BL.C7, SC.C, AP.3, IAȘI, IS, RO;**
• **GHERGHEL DANIELA, BD.SOCOLA
NR.22, BL.T 1, AP.29, IAȘI, IS, RO;**
• **COSMIN TEODOR MIHAI, BVD.DACIA,
NR.3, BL.DA.2, ET.7, AP.23, IAȘI, IS, RO;**
• **CARAIANE AURELIANA, STR.CĂLĂRAȘI,
NR.20, CONSTANȚA, CT, RO;**
• **BADEA VICTORIA,
BVD.AL.LĂPUȘNEANU, NR.103, BL.LV 39,
AP.36, CONSTANȚA, CT, RO**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE, ANALIZĂ UHPLC
ȘI EVALUAREA ACTIVITĂȚILOR BIOLOGICE
ALE EXTRACTULUI ACETONIC USCAT
DIN USNEA BARBATA (L.) F.H.WIGG.**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui extract acetonic uscat din *Usnea barbata* (L.) F.H. Wigg., cu activitate biologică, utilizat în tratamentul afecțiunilor orale. Procedeu, conform invenției, constă în măcinarea *Usnea lichen* sub formă de pulbere, extracția pulberii cu acetonă, timp de 8 h, la temperatura de 70°C, într-o instalație de refluxare continuă de tip Soxhlet, după care extractul acetonic se supune îndepărtării solventului într-un evaporator rotativ, rezultând un extract acetonic uscat cu un conținut de acid usnic de 16,53±1,08, stabil în timpul conservării. Extractul

acetonic uscat are acțiune antitumorală pe carcinomul lingual cu celule scuamoase CAL 27, prin scăderea proteinelor totale, apoptoza celulelor tumorale și creșterea activității enzimelor antioxidante, precum și acțiune antibacteriană asupra speciilor patogene de tip *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa*, intens patogene și cu rezistență consacrată față de multe antibiotice.

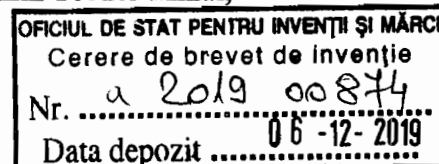
Revendicări: 6
Figuri: 18

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



**PROCEDEU DE OBTINERE, ANALIZA UHPLC ȘI EVALUAREA ACTIVITĂȚILOR
BIOLOGICE ALE EXTRACTULUI ACETONIC USCAT DIN
USNEA BARBATA (L.) F. H. WIGG.**

**Popovici Violeta, Bucur Laura Adriana, Schroder Verginica, Popescu Antoanela,
Costache Teodor, Vochita Gabriela, Gherghel Daniela, Cosmin Teodor Mihai,
Caraiane Aureliana, Badea Victoria**



I. Introducere

Invenția de față se referă la extractul acetonc uscat de *Usnea barbata* (L.) F. H. Wigg., la procedeul de obținere al acestuia, și la demonstrarea activitatilor biologice ale acestuia în vederea utilizării în tratamentul afecțiunilor orale.

Cancerul reprezintă o clasă eterogenă de afecțiuni, caracterizate prin diviziunea necontrolată a celulelor și abilitatea acestora de a invada, din aproape în aproape, țesuturile din vecinătate și de a metastaza, pe cale limfatică sau hematogenă, loco-regional sau la distanță, în alte țesuturi și organe; are o incidență globală estimată la 6 milioane de cazuri pe an, fiind a doua cauză majoră de deces, după bolile cardiovasculare. Este cunoscut faptul că majoritatea chimioterapicelor de sinteză utilizate în prezent în terapia antitumorală dezvoltă în timp rezistență și prezintă toxicitate neselectivă împotriva celulelor normale; aceste efectele secundare, cumulate cu reacțiile adverse și cu multiplele interacțiuni medicamentoase, constituie dezavantajele majore ale chimioterapicelor.

O alta problemă de interes medical mondial o constituie apariția rezistenței bacteriilor patogene la antibioticele uzuale; acest fenomen a impus realizarea de cercetări ample pentru descoperirea unor noi structuri cu efect antibacterian. În acest scop, echipe complexe de cercetători studiază mecanismele de apariție a rezistenței la antibiotice, urmărind, în același timp, noi modalități de obținere a unor remedii naturale alternative, cu acțiune antibacteriană.

Așadar, obținerea de noi medicamente antibacteriene și antitumorale rămâne o provocare clinică majoră. În acest context, plantele reprezintă o sursă valoroasă de compuși naturali biologic activi, iar cercetările se îndreaptă către utilizarea lor în terapia antiinfecțioasă și anticancerasă [Newman, D., Cragg, GM, J. Nat. Prod., 2012; 23 : 311-335, Mondal S, Bandyopadhyay S, Ghosh MK, Mukhopadhyay S, Roy S, Mandal C.. Anti-cancer agents in med chem 2012; 12: 49–75.]; constituenții izolați pot fi utili ca agenți terapeutici alternativi sau, ca nuclee de bază pentru noi produse de sinteză, cu activitate sporită și / sau toxicitate redusă.

În categoria plantelor care prezintă remarcabile proprietăți antitumorale, și antibacteriene și antioxidante se regăsesc și lichenii [Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V.. et al., Biologica Nyssana, 2011; 2(1): 1-6]. Aceștia constituie un grup unic în lumea plantelor și, în același timp, sunt cele mai răspândite organisme simbiote din natură, habitând mai mult de 8% din suprafața terestră a pământului [Ranković, B., Edition: Springer International Publishing, 2015; ISBN: 978-3-319-13374-4]. Un reprezentant important al lichenilor este genul *Usnea* Dill. ex. Adans., cu peste 350 specii răspândite pe întreaga suprafață a globului; în literatura de specialitate internațională accesată se arată clar, faptul că numeroase specii aparținând acestui gen, sunt utilizate în medicina tradițională de mii de ani, în tratarea diferitelor afecțiuni [Prateeksha, G., Paliya, B.S., Bajpai, R.. et al., RSC Adv., 2016; 6: 21672 –21696]. În Catalog of lichens in Romania, 1998, sunt menționate 31 specii ale genului *Usnea* Dill.ex Adans care habitează în țara noastră; dintre toate, *Usnea barbata* (L.) F.H. Wigg. prezintă aria cea mai largă de răspândire.

Usnea barbata (L.) F. H. Wigg prezintă o parte dintre constituenții chimici ai genului *Usnea*

Dill.ex.Adans.. Din categoria metaboliților primari, această specie conține polizaharide (lichenan, izolichenan), acizi grași (oleic, linoleic, arahidonic), aminoacizi esențiali, vitamine, caroteni [Ranković, B., Edition: Springer International Publishing, 2015; ISBN: 978-3-319-13374-4]. Prin tehnica UHPLC-ESI-OT-MS-MS, în *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg. s-au izolat următoarele grupe de metaboliți secundari [Salgado, F., Albornoz, L., Cortéz, C., Stashenko, E. et al., *Molecules*, 2018 ; 23(1): 54]: **depside**: acid barbatolic, acid thamnolic, acid haemathamnic, acid lecanoric, acid gyrophoric acid, acid diffractaic, methyl-8-hydroxy-4-*O*-acid divaricatic, acid barbatic, acid sekikaic, acid 8-hydroxybarbatic , atranorin și chloroatranorin; **depsidone**: acid salazinic, acid connorstictic, acid siphulellic, acid galbanic, acid norstictic, acid α -acetylconstictic, acid stictic, acid lobaric; **lipide**: acid tetrahydroyeicosanoic, acid tetrahydrodocosanoic acid tetrahydroxytricosanoic, acid tetrahydrodocosanoic, acid tetrahydroxyhexacosanoic, acid nonahydroxyoctacosanoic acid heptahydroxytricosatrienoic; **difenil-eteri**: acid β -alectoronic; **dibenzofurani**: acid usnic.

Aplicațiile fiterapeutice moderne pentru *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg. se bazează pe istoricul utilizării sale în medicina tradițională, pe cercetările fitochimice ample și pe studiile farmacologice. Astfel, în Germania, *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg figurează în monografiile Comisiei Europene și se administrează pe cale orală, sub formă de comprimate, în inflamații ușoare ale mucoasei buco-faringiene. (BAnz, 1998). În Statele Unite ale Americii, extractul etanolic din *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg, administrat sub formă de picături, se utilizează în tratamentul infecțiilor bacteriene respiratorii și urinare [Hobbs, C. , *Usnea: The Herbal Antibiotic*. Capitola, CA: Botanica Press, 1986]. De asemenea, *Usnea barbata* (L.) F. H. Wigg este inclusă în Farmacopeea homeopată din Statele Unite (HPUS) ca medicament OTC, sub formă de tinctură 1:10 (w / v), în 65% v / v alcool, și este utilizată în homeopatie ca remediu eficient în cefaleea congestivă și în caz de insolajie [The Homeopathic Pharmacopoeia of the United States (HPUS), 1992].

Deși extractele de *Usnea barbata* (L.) F. H. Wigg. au fost utilizate de mii de ani în medicina tradițională, există în prezent puține studii științifice privind potențialul lor terapeutic. Acidul usnic are structura dibenzofuranica și este menționat în literatura de specialitate accesată ca fiind responsabil de marea majoritate a activitatilor biologice ale lichenilor din genul *Usnea* (fig.1).

II. Obținerea extractului acetonc uscat din *Usneae lichen*

Material și metodă

Pentru obținerea extractului uscat, *Usneae lichen* a fost măcinat sub formă de pulbere și menținut timp de 8 ore cu acetonă, la 70° C, într-o instalație de refluxare continuă de tip Soxhlet. După finalizarea refluxării, pentru evaporarea solventului s-a folosit evaporatorul rotativ TURBOVAP 500 Caliper; extractul acetonc uscat a fost transferat într-un vas de sticlă cu capac etanș și păstrat la congelator, la o temperatură mai mică de -20° C, până la procesarea ulterioară.

Avantaje

Solventul folosit la extracție are un pret de cost redus; în acetona solubilitatea acidului usnic și în general, a metaboliților secundari lichenici este mare, asigurând o bună extracție a componentilor cu acțiune biologică iar instalația necesară este relativ simplă.

Rezultate

Din 100 g *Usneae lichen* s-au obținut 7,97 g extract uscat; acesta are o consistență păstoasă, colorație verde-brună, miros acetonc puternic și gust iute.

III. Analiza EUB prin UHPLC

Material si metodă

Identificarea și determinarea conținutului de acid usnic a fost efectuată prin metoda UHPLC, cu următoarele caracteristici:

- aparatura: UHPLC Perkin-Elmer FLEXAR, pompă binară, detector PDA plus, compartiment termostatic pentru coloană, sistem de degazare, autosemplator [19].
- condiții de lucru : coloană C18, 150 mm / 4,6 mm; 5 μm (Perkin-Elmer); faza mobilă într-un sistem izocratic: metanol: apă: acid acetic glacial = 80: 15: 5; detecție: UV = 282 nm; debit = 1,5 ml / min; temperatura în compartimentul coloanei = 25 ° C; volumul injecției = 20 μl; timpul de analiză: 6 minute.
- eșantion de analiză: EUB solubilizat în dimetilsulfoxid (DMSO) în concentrație de 0,2%, și apoi diluat 1 la 50 mL.

Solubilizarea în DMSO a fost realizată deoarece acetona nu este un solvent adecvat pentru analiza UHPLC (absoarbe puternic și deformează picul soluției de analizat); de asemenea, în vederea studiilor pe culturi celulare, DMSO, spre deosebire de acetonă, nu este toxic celular la concentrațiile folosite în cercetările citologice. Substanța de referință: acid usnic în DMSO la concentrații de 10, 20, 50, 100, 200 μg / mL, cu care a fost trasată curba de calibrare ($y = 4.84629E + 04x - 4.01679E + 04$; $r^2: 0.999877$). Următorii parametri au fost evaluați pentru validarea metodei: specificitate, acuratețe, repetabilitate, precizie, limită de detecție (LOD) și limită de cuantificare (LOQ).

Linearitatea metodei a fost verificată prin metoda celor mai mici pătrate, pe zona 10 μg / mL - 200 μg / mL, pentru o valoare de $R^2 > 0,99$ [*** EMEA, ICH Topic Q 2 (R1)/ CPMP/ICH/381/95, 1995, p.13]. Identificarea și cuantificarea acidului usnic a avut la baza substanța de referință pentru care timpul de retenție (RT) a fost determinat la $3,66 \pm 0,05$ min.

Rezultate

Proba de analizat are un peak la timpul de retenție (RT) = 3,70 minute; identificarea acidului usnic s-a realizat pe baza substanței de referință (acid usnic).

Metoda este reproductibilă cu $R^2 = 0.999877$; acuratețea este de 2,26%; precizia metodei, calculată ca repetabilitate la concentrația de 100 ppm, este de 1,16%; limita de detecție (LOD) este de 0,1 μg / mL. Limita de cuantificare (LOQ) este de 0,2 μg /mL cu un "zgomot" = 14:1 .

Determinarea UHPLC s-a realizat pe trei diluții din soluția 0,2% extract uscat de *Usneae lichen* în DMSO: 1 la 10, 1 la 20 și 1 la 50.

Conținutul de acid usnic determinat este de $16.53\% \pm 1.08$.

În cromatogramele soluțiilor diluate s-a observat și prezența altor compuși organici, încă neidentificați, care potențează efectul terapeutic al extractului uscat (fig.2).

IV. Evaluarea activității citotoxice a extractului uscat de *Usnea barbata* (L.) F. H. Wigg. pe *Artemia salina* L.

În studiul de față s-a evaluat efectul citotoxic al extractului acetonc uscat de *Usneae lichen* pe larvele de *Artemia salina* L. [Dvořák P., Žďárský M., Beňová K., Interdisc Toxicol., 2009; 2: 45–47]. Această metodă reprezintă un biotest de screening preliminar, eficient, rapid și ieftin pentru compușii

citotoxici; în timp, aplicabilitatea ei s-a extins și la extractele din plante, pentru a facilita evaluarea fitocompuenților activi biologic.

Avantaje: necesită cantități mici de substanțe, iar utilizarea tehnologiei microplăcilor facilitează testarea unui număr mare de probe și diluții.

Ipoteza de lucru: constituenții chimici existenți în EUB au acțiune citotoxică, care ar putea provoca moartea naupliilor de *Artemia salina* L. În primele 24-48 h, după eclozare, larvele trec prin etape succesive de creștere. Ca urmare, modificări citologice importante, asociate cu diviziunea și diferențierea celulară, pot fi urmărite sub influența constituenților extractului.

Scopul studiului: evaluarea preliminară a potențialului citotoxic al extractului uscat de *Usneae lichen* pe *Artemia salina* L.

Material și metodă

Acest studiu preliminar de citotoxicitate s-a realizat pe naupliile de *Artemia salina* L. S-au utilizat plăci cu godeuri, în fiecare godeu introducându-se câte 10 - 20 nauplii, care au fost puse în contact cu 6 diluții succesive (C1-C6) ale extractului uscat de *Usneae lichen* (EUB).

Pentru control, au fost urmărite naupliile de *Artemia salina* L. în soluția salină 3‰ și în solvențul în care a fost solubilizat extractul uscat de *Usneae lichen* (DMSO 0.1% , 100 μl/mL). Cuantificarea efectelor s-a realizat prin evaluarea nivelului de supraviețuire al naupliilor de *Artemia salina* L., în condițiile expunerii la concentrații diferite de extract uscat de *Usneae lichen* în DMSO 0.1%, timp de 24-72 h.

La nivel microscopic, au fost efectuate observații asupra larvelor vii, pentru a evidenția modificările celulare asociate cu citotoxicitatea posibilă a extractului.

Rezultate

După 24 ore de contact al larvelor de *Artemia salina* L. s-au evaluat și numărat larvele moarte pentru fiecare din cele 4 repetări T1-T4., Valorile obținute sunt sintetizate în fig. 3.

Studiile statistice au arătat că există o corelație pozitivă înaltă ($R^2=0,9269$) între concentrația EUB și mortalitatea naupliilor (fig. 3.).

Testul Probit indică efecte letale semnificative la valori mai mari de 100 μg/mL, LD50 fiind aproximat la valoarea de 164, 92 μg/mL (fig. 4.). Mortalități ce semnifică toxicitate moderată au fost înregistrate și la concentrații mai mici respectiv între 30-70 μL/mL.

Rezultatele arată că intensitatea efectului citotoxic este direct proporțională cu concentrația EUB.

V. Evaluarea acțiunii antitumorale a extractului acetonc uscat din *Usneae lichen* pe carcinomul lingual cu celule scuamoase, CAL 27 (ATCC® CRL-2095™)

În literatura de specialitate accesată există date cu privire la acțiunea antitumorală a extractelor de *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg și a altor specii de licheni din genul *Usnea* Dill.ex.Adans., precum și a acidului usnic [Kasimogullari SC, Oran S, Ari F, Ulukaya E, Aztopal N, Sarimahmut M, et al. Turk J Biol 2014; 38: 940-947., Dincsoy, AB, Cansaran-Duman, D, Turk J Biol., 2017; 41: 484-493].

De asemenea, rezultatele din studiul anterior au evidențiat acțiunea citotoxică a extractului uscat de *Usneae lichen* pe naupliile de *Artemia salina* L. Astfel, următorul pas al cercetării a fost evaluarea acțiunii antitumorale a extractului studiat, pe carcinomul lingual cu celule scuamoase CAL 27, datorită faptului că mai mult de 90% din cancerelor orale au origine epitelială și sunt numite

carcinoame cu celule scuamoase orale (OSCC). Limba și planșeul bucal sunt cele mai frecvente localizări ale acestor tipuri de carcinoame [El-Naggar AK, Chan J, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ., WHO Classification of Head and Neck Tumours. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2017].

Linia celulară tumorală CAL 27 (ATCC® CRL-2095™) a fost stabilizată în 1982 de către J. Gioanni (Centrul Antoine Lacassagne, Nisa Cedex, Franța) din țesut prelevat înainte de tratament de la un bărbat caucazian în vârstă de 56 de ani, cu o leziune în zona mediană a limbii. Celulele CAL 27 sunt celule epiteliale de formă poligonală, având ca particularitate distinctă citoplasma intens granulată. Această linie celulară a fost utilizată pe scară largă pentru a obține carcinomul oral cu celule scuamoase (OSCC) pentru studiile *in vitro* și *in vivo*, fiind considerată reprezentativă pentru studiul acestui tip de neoplazie. Celulele scuamoase carcinoatoase (CSC) din linia celulară CAL 27 sunt responsabile de rata de multiplicare crescută, rezistența la tratament, plasticitatea fenotipică, precum și de invazivitatea și capacitatea metastatică [***ATCC, Product Sheet CAL 27 (ATCC® CRL-2095™)].

Ipoteza de lucru: extractul uscat de *Usneae lichen* are acțiuni antitumorală pe carcinomul lingual cu celule scuamoase.

Scopul studiului: evaluarea acțiunii antitumorale în funcție de concentrația extractului și de timpul de expunere și determinarea mecanismelor posibile prin care se produce moartea celulelor tumorale CAL 27. Toate evaluările au fost repoetate de 3 ori, pentru verificarea repetabilității rezultatelor obținute.

Pregătirea materialului de lucru

Kitul de celule CAL 27 este un produs furnizat de American Type Culture Collection (ATCC) și a fost achiziționat de la distribuitorul autorizat LGC Standards GmbH – Germany. La nivel mondial, ATCC este considerat, cel mai important furnizor de resurse biologice și standarde de materiale biologice, oferind o colecție extinsă de produse și servicii fabricate în conformitate cu certificarea și acreditarea ISO. Celulele liniei tumorale umane CAL 27 (ATCC® CRL-2095™) sunt reprezentate de celule epiteliale scuamoase izolate din carcinomul lingual; au fost crescute într-un mediu special - Dulbecco modificat (DMEM, Biochrom AG, Germania care conține 10% ser fetal bovin (Sigma, Germania), 100 μg/ml streptomycină (Biochrom AG, Germania), 100 UI/ml penicilină (Biochrom AG, Germania) [***ATCC, Product Sheet CAL 27 (ATCC® CRL-2095™)].

Acestea au fost menținute într-un microclimat particular, la temperatura de 37 grade Celsius, în condițiile unui mediu cu 5% CO₂ și umiditate optimă, într-un incubator Binder.

Dupa 24 de ore de la incubare, monostratul celular format a fost detașat cu o soluție de tripsină în EDTA; celulele au fost numărate cu ajutorul unui numărător automat de celule (CelometerMini-Nexcelom), evaluându-se în același timp și viabilitatea celulară, prin utilizarea testului de excluziune cu albastru de tripan. Din plăcile cu culturi celulare desprinse s-a prelevat o cantitate mică de produs și s-a repartizat pe o lamă cu godeuri, peste care s-a adădat o picătură de soluție de albastru de tripan, care colorează celulele moarte. Apoi, s-au adăugat 20 microlitri din amestecul din godeu într-una din camerele dispozitivului de numărare și ulterior acesta s-a introdus în celometru. Celometrul Mini-Nexcelom utilizează imagini pe câmp luminos și un software specific de recunoaștere a modelelor celulare, cu scopul de a identifica rapid și precis și de a număra celulele vii și celulele moarte; astfel, numărul celulelor vii și moarte, concentrația, diametrul și viabilitatea% au fost calculate automat și afișate.

Celulele din plăcile inițiale au fost repartizate în 2 plăci cu 96 godeuri (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Elveția) cu densitate celulară medie de 8 x 10³ celule/godeu (figura III.3.)

apoi au fost incubate în aceleași condiții de temperatură și umiditate în incubatorul Binder timp de 24 ore pentru formarea monostratului celular.

O parte din extractul uscat de *Usneae lichen* (EUB) a fost scos din congelator (-85°C) și lăsat la temperatura camerei; s-a dizolvat extractul uscat în dimetilsulfoxid (DMSO) soluție apoasă 0.2% obținându-se o soluție-stoc de concentrație 2 mg/mL. S-au realizat apoi următoarele concentrații finale exprimate în $\mu\text{g/mL}$: 12.5, 25, 50, 100, 200 și 400 $\mu\text{g/mL}$.

După aplicarea pe cele 2 plăci a celor șase soluții diluate din extractul uscat de *Usneae lichen*, celulele din plăcile cu godeuri au fost termostatate timp de 24 și respectiv 48 ore. A fost realizată o variantă martor netratată, precum și o variantă cu DMSO 0,2%, pentru a observa influența solventului asupra viabilității celulare.

Evaluarea acțiunii citotoxice s-a realizat prin determinarea modificărilor morfologice ale celulelor CAL 27 și prin metoda MTT, de determinare a viabilității celulare.

V.1. Determinarea modificărilor morfologice

Modificările morfologice ale celulelor CAL 27, după contactul cu concentrații diferite de EUB (12.5- 400 $\mu\text{g/ml}$), au fost detectate cu obiectivul 10x, la microscopul cu lumină inversată (NIKON Eclipse TS100), iar imaginile au fost obținute cu ajutorul camerei foto digitale NIKON.

Rezultate

Morfologia celulelor se modifică în funcție de vârsta culturii celulare, durata de expunere și concentrația de EUB folosită. După cum reiese din fig. 5. în momentul realizării efective a loturilor experimentale, celulele au un aspect globulos și nu aderă de substrat, fiind în mișcare browniană în mediul de cultura.

Studiul celulelor de control (în DMSO 0,2%) a indicat că aceste celule au o morfologie normală și sunt aderente la substrat (fig. 5. B).

Studiul morfologic al celulelor expuse la extract de EUB a arătat faptul că celulele CAL27 au prezentat diferite grade de modificări morfologice, după cum urmează: pierderea aderenței celulare, contracția membranei, formarea pliurilor celulare anormale, fragmentarea celulară, reducerea densității celulelor vii (fig.5., C-D și 6., E-H)

V.2. Determinarea viabilității celulare prin metoda MTT

Material și metodă

Principiul metodei: Metoda colorimetrică cu bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazoliu (MTT), modificată după Mosmann, 1983 și Laville et al., 2004, are la bază capacitatea dehidrogenazelor mitocondriale din celulele vii de a converti substratul hidrosolubil galben (MTT) în formazan, de culoare albastru închis, insolubil în apă; cantitatea de formazan produsă este direct proporțională cu numărul de celule vii.

Această metodă cantitativă, sensibilă și foarte precisă, evaluează efectul soluțiilor testate asupra viabilității celulare; ea se pretează foarte bine pentru culturile celulare care cresc aderente pe substrat, permițând procesarea unui număr mare de probe, absorbțiile înregistrate convertindu-se în număr de celule pe baza unor curbe standard construite cu diluții cunoscute de probe. După expirarea perioadei

de incubare, în prezența substanțelor de testat, culturilor de celule li s-a înlocuit mediul de incubare cu 100 μL de mediu proaspăt, peste care s-a adăugat 10 μL dintr-o soluție de MTT 5 mg/mL; a urmat o incubare la 37 grade Celsius timp de 3 ore, la incubatorul Binder, moment în care culoarea virează către galben-portocaliu (fig. 7).

După trecerea timpului de incubare, s-au îndepărtat 90 μL din amestec, iar precipitatul de formazan format s-a dizolvat în 100 μL soluție de DMSO; s-a lăsat la termostat 10 min pentru dizolvarea formazanului, care a dobândit nuanțe de violet (fig.7., B).

Screening-ul *in vitro* a vizat și contactul de 48 de ore cu extractul uscat din *Usneae lichen*, întrucât, unele lucrări din literatura de specialitate menționează evaluarea efectului antitumoral după un contact de 48 și chiar de 72 de ore, pentru a surprinde persistența în timp a efectului citotoxic indus de extractele obținute din diferite specii de licheni asupra culturilor celulare [Kasimogullari SC, Oran S, Ari F, Ulukaya E, Aztopal N, Sarimahmut M, et al. Turk J Biol 2014; 38: 940-947.]

Rezultate

Contactul de 48 de ore a celulelor neoplazice CAL 27 cu extractul acetoncic uscat din *Usneae lichen* a urmat un trend asemănător ca sens și amplitudine cu cel determinat de cel de 24 de ore (fig. 8., 9.). Se constată, comparativ cu martorul, interferența minimă a EUB cu viabilitatea celulară, în intervalul de concentrații 12,5–50 $\mu\text{g/mL}$ inclusiv, înregistrându-se un efect citotoxic redus, mai mic de 10%. Se observă scăderi ușoare ale viabilității celulare în cazul concentrațiilor de 100 și 200 $\mu\text{g/mL}$, care corespund unor efecte citotoxice ne semnificative, de 11,5% și respectiv 38,4% (calcul: martor 100 – viabilitate 61.6 = citotoxicitate 38.4) (fig 8.)

O reală și semnificativă diminuare a viabilității celulelor tumorale CAL 27 s-a instalat sub acțiunea extractului uscat de *Usneae lichen*. la doza de 400 $\mu\text{g/mL}$, corespunzătoare unui efect citotoxic de 62%.

Activitatea citotoxică a extractului uscat de *Usneae lichen* a fost evaluată și prin prisma valorii IC50; IC50 semnifică doza la care 50% din celulele din cultură mor consecutiv la contactul cu diferite concentrații ale soluțiilor testate (fig. 9). Cea mai intensă activitate citotoxică s-a manifestat la contactul de 24 de ore - IC50 = 232,17 $\mu\text{g/mL}$, comparativ cu cel de 48 de ore - IC50 = 310,67 $\mu\text{g/mL}$, după cum este ilustrat în fig. 9.

În ambele intervale de timp de contact s-a remarcat efectul non-citotoxic al solventului (DMSO 0,2%) folosit pentru dizolvarea EUB, asupra celulelor CAL 27 (fig.6, 8); pe aceasta observație se bazează concluzia că citotoxicitatea calculată este generată exclusiv de EUB.

S-a observat în studiul de față, faptul că efectul citotoxic maxim este indus la concentrația de 400 $\mu\text{g/mL}$ după 24 ore, respectiv 66,6%, valoare care se menține aproximativ constantă și după 48 de ore (62%). Acest proces este datorat probabil, faptului că celulele afectate își refac structurile proprii după care intră în diviziune, sau datorită diviziunii haotice a celulelor tumorale neafectate.

Rezultatele arată ca citotoxicitatea EUB pe celulele CAL 27 este direct proporțională cu concentrația extractului.

Următorul pas a fost demonstrarea mecanismelor prin care se produce moartea celulelor tumorale: scăderea proteinelor totale, apoptoza celulelor CAL 27 și stimularea activității enzimelor antioxidante, ca urmare a stresului oxidativ generat de EUB în celulele CAL 27.

V.3. Dozarea proteinelor totale prin metoda Bradford

Moartea celulelor tumorale este reală și, s-a încercat elucidarea mecanismelor prin care se produce acest fenomen. Dat fiind faptul că proteinele sunt elemente fundamentale menținerii vieții, se apreciază că scăderea cantității proteinelor totale conduce la moartea celulară. Pornind de la aceste considerente, ipoteza de lucru a acestui subcapitol este că aplicarea diferitelor concentrații de EUB generează moartea celulelor tumorale CAL 27 prin acest mecanism.

Material și metodă

Principiul metodei: În mediu puternic acid, colorantul Coomassie Brilliant Blue G (CBBG), se regăsește în 3 forme: în forma cationică total protonată, roșie, cu un maxim al absorbanței în jurul valorii de 465 nm; în forma de culoare verde, cu un maxim al absorbanței la 650 nm; în forma anionică de culoare albastră, cu un maxim al absorbanței la 590 nm, într-o mai mică măsură (fig. 10).

Dintre formele ionice ale colorantului, doar forma anionică se leagă la proteine la nivelul resturilor de lizină și arginină încărcate pozitiv, formând un complex de culoare albastră. Concomitent cu formarea complexului albastru are loc o modificare a capacității maxime de absorbție de la 465 nm la 595 nm (fig. 10.) [Aminian M., Nabatchian F., Vaisi-Raygani A., Torabi M. Analytical Biochemistry, 2013; 434(2): 287-291].

Rezultate

Rezultatele privind variația conținutului de proteine solubile în celulele CAL 27, după contactul cu diferite concentrații de EUB sunt prezentate în fig. 11.

Analizând aceste rezultate se observă că la concentrația de 100 μg/ml EUB, cantitatea de proteine solubile din celulele tumorale CAL 27 este asemănătoare valorii înregistrate la martor.

În schimb, **la doza maximă testată (400 μg/ml), conținutul proteic a scăzut semnificativ, fiind de aproape 3 ori mai mic comparativ cu martorul, dovedindu-se astfel efectul citotoxic al EUB testat.**

V.4. Evaluarea apoptozei celulare prin tehnica citometriei în flux

Material și metodă

Principiul metodei: Apoptoza sau moartea celulară programată este un proces fiziologic normal. Unul dintre evenimentele anterioare apoptozei este translocarea fosfatidilserinei (PS) membranare din interiorul membranei plasmactice către suprafață. De asemenea, apoptoza este caracterizată printr-un număr de fenomene intracelulare, cum ar fi: formarea de vezicule pe suprafața membranei celulare, condensarea cromatinei și fragmentarea ADN-ului nuclear. Iodura de propidiu (PI) este utilizată pentru diferențierea celulelor moarte de cele vii, permițând de asemenea separarea dintre celulele preapoptotice și apoptotice în combinație cu Anexina V; aceasta este o proteină de legare a fosfolipidelor dependentă de Ca²⁺, cu afinitate ridicată pentru PS [Vermees I., Haanen C., Reutelingsperger, C., J Immunol Methods, 2000; 243, 167-190]. Anexina V marcată cu fluorocrom este utilizată pentru detectarea PS expusă la suprafața membranei celulare cu ajutorul citometriei în flux. Conjugarea dintre Anexina V și fluoresceină (FITC - Fluorescein isothiocyanat) facilitează cuantificarea rapidă a celulelor apoptotice marcate fluorescent. La începutul procesului de apoptoză, fosfatidilserina (PS) devine expusă pe suprafața celulară prin trecerea de pe partea internă spre cea



externă a membranei citoplasmatică. Acest eveniment este considerat a fi important pentru recunoașterea celulelor supuse apoptozei de către macrofage - care au receptori specifici pentru fosfatidilserină, permițând astfel inițierea rapidă a procesului de fagocitoză.

Apoptoza celulară a fost investigată după de 6 și 24 de ore de contact cu *EUB* prin testul cu anexină V-FITC și iodură de propidiu (PI).

Determinarea apoptozei prin utilizarea Anexinei V-FITC și a iodurii de propidiu are la bază afinitatea puternică a Anexinei V pentru reziduurile de fosfatidilserină (în mod normal, ascunse în membrana plasmatică) de la suprafața membranei celulare.

Etape de lucru:

Pentru evaluarea apoptozei celulare s-au folosit celulele cultivate în plăci cu 24 godeuri și o densitate de 50.000 celule/godeu.

După 24 de ore de la incubare și formarea monostratului celular s-a aplicat extractul acetonc de *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg. în DMSO 0.2%, în doze de 100 μg/ml și, respectiv, 200 μg/ml, timpul de contact fiind de 6 ore și 24 ore. Ulterior, s-a realizat prelucrarea celulelor în vederea evaluării rezultatelor, utilizând kit-ul eBioscience™ Annexin V-FITC Apoptosis Detection [Pozarowski P., Grabarek J., Darzynkiewicz Z., Current Protocols in Cytometry, (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), 2003; Chapter 7, Unit 7.19.].

Interpretarea rezultatelor:

Rezultatele au fost interpretate pe baza reactivității celulare la iodura de propidiu și la complexul anexina V-FITC, astfel:

- celulele care au fost negative la iodură de propidiu (PI) și negative la Anexina V, sunt considerate *sănătoase*,
- celulele negative la PI și pozitive la Anexina V sunt considerate *apoptotice*,
- celulele pozitive pentru PI și Anexina V sunt considerate *necrotice*.

Analiza apoptozei a fost efectuată cu citometrul în flux QuantaS Beckman Coulter Cell, echipat cu un laser de 488 nm; fluorescența a fost evaluată la lungimi de undă diferite: 525 nm (FL 1) pentru FITC și 670 nm (FL 3) pentru PI.

Toate datele au fost exportate ca fișiere de imagine LMD și analizate prin software FCSalyzer Version 0.9.17-alpha (aplicație pentru prelucrarea datelor furnizate de flow-citometru). Toate studiile pe celulele tumorale CAL 27 au fost efectuate pe baza a trei repetiții și au fost analizate statistic cu ajutorul testului "t" Student [Cann A.J., Jon Willey & Sons Ltd.2002].

Rezultate

Evaluarea procesului de apoptoză a fost realizată la 6 ore și respectiv 24 ore de la momentul contactului celulelor CAL 27 cu cele 2 soluții EUB. Datele obținute sunt reprezentate în fig. 12, 13. În fig. 12. se regăsesc citogramele înregistrate la determinarea apoptozei prin tehnica citometriei în flux pe celulele CAL 27, după 6 și 24 ore de contact cu soluții EUB - la concentrații de 100 μg/mL și respectiv 200 μg/mL.

Rezultatele prezentului studiu arată că extractul acetonc uscat de *Usneae lichen* induce apoptoza celulelor direct proporțional cu concentrația soluției utilizate și cu timpul de expunere.

V. 5. Evaluarea acțiunii EUB asupra activității enzimelor antioxidante din celulele tumorale CAL 27

În studiul de față s-a urmărit evaluarea acțiunii extractului acetonc uscat de *Usneae lichen*, in vitro, asupra enzimelor antioxidante din celulele tumorale CAL 27.

Ipoteza de lucru: extractul acetonic uscat de *Usneae lichen* are acțiune de stimulare a enzimelor antioxidante din celulele CAL 27, datorita stresului oxidativ intens indus in celulele tumorale de catre EUB.

Scopul studiului: determinarea activității principalelor enzime antioxidante din celulele CAL 27 : SOD, CAT și POD și evaluarea nivelului de stimulare a acestora de către extractul uscat de *Usneae lichen*, în contextul efectului citotoxic exercitat de EUB pe celulele tumorale și în corelație cu concentrația extractului și cu timpul de contact.

Material și metodă

V.5.1. Determinarea activității superoxid-dismutazei

Principiul metodei: Activitatea superoxid-dismutazei (SOD) se determină pe baza capacității enzimei de a inhiba reducerea Nitro Blue Tetrazoliului (NBT) de către radicalii superoxid generați în mediul de reacție prin fotoreducerea riboflavinei.

Gradul de inhibiție produs de enzimă în condiții standard s-a estimat prin determinarea extincțiilor probei și martorului la 562 nm, față de apa distilată. [Artenie V., Ungureanu E., Negură Anca Mihaela, 2008; Editura Pim, Iași: 97-99, 100-102, 108-110.]

V.5.2. Determinarea spectrofotometrică a activității catalazei

Principiul metodei: Catalaza (CAT) este lăsată să acționeze asupra apei oxigenate o perioadă fixă de timp, după care enzima este inactivată prin adăugarea unui amestec de bicromat de potasiu – acid acetic. [Artenie V., Ungureanu E., Negură Anca Mihaela, 2008; Editura Pim, Iași: 97-99, 100-102, 108-110.] Cantitatea de apă oxigenată, rămasă nedescompusă după stoparea acțiunii catalazei, reduce în mediul acid bicromatul de potasiu la acetat cromic, care a putut fi determinat spectrofotometric la 570 nm. Realizând diferența între cantitatea inițială și cea finală de apă oxigenată din mediul de reacție, s-a calculat cantitatea de apă oxigenată descompusă de catalază.

V.5.3. Determinarea activității peroxidazei

Principiul metodei: Metoda se bazează pe măsurarea intensității culorii produsului de oxidare a orto-dianisidinei cu ajutorul apei oxigenate, sub acțiunea peroxidazei (POD), la lungimea de undă de 562 nm. [Artenie V., Ungureanu E., Negură Anca Mihaela, 2008; Editura Pim, Iași: 97-99, 100-102, 108-110.]

Rezultate

Rezultatele evaluării activității SOD, exprimată în unități SOD/g proteină, se regăsesc în fig. 14. Se remarcă o stimulare ușoară a activității SOD de către EUB, valorile înregistrate la 100 μg/mL și la 400 μg/mL fiind foarte apropiate și de aproximativ 1,25 ori mai mari față de martor.

Urmărirea reactivității catalazice la tratamentul cu extractul lichenic a condus la înregistrarea unor rezultate evidențiate în fig. 15. Se remarcă diferențe semnificative la stimularea CAT, la cele 2 concentrații de EUB, comparativ cu martorul: la 100 μg/mL, aceasta este de aproximativ 1,5 ori mai mare, în timp ce, la 400 μg/mL, activitatea de stimulare a crescut de aproape 4 ori.

Interferența extractului acetonic de Usneae lichen cu peroxidaza (POD) din celulele canceroase CAL 27 a fost urmată de o activare enzimatică ridicată, aproape dublă - la doza de 100 μg/mL și de peste 2 ori mai mare - în cazul dozei de 400 μg/mL, comparativ cu martorul (fig. 16.).

Analizând rezultatele obținute se observă că **extractele de EUB luate în lucru - 100 μg/mL respectiv 400 μg/mL, stimulează slab activitatea SOD**, iar valorile corespunzătoare acțiunii soluțiilor EUB folosite sunt foarte apropiate. **În cazul activității CAT, stimularea este semnificativă**, valorile diferă foarte mult - atât între cele 2 concentrații de EUB, cât și în comparație cu martorul. **Stimularea activității POD este semnificativă** la acțiunea EUB 100 μg/mL față de martor, creșterea de 4 ori a

concentrației EUB având în acest caz o influență mai redusă. Fiind enzime antioxidante care neutralizează radicalii liberi ai oxigenului (SRO), activitatea lor crește atunci când nivelul SRO atinge valori mari, instalându-se starea de stres oxidativ.

S-a analizat efectul EUB pe enzimele antioxidante, în strânsă legătură cu citotoxicitatea sa pe celulele CAL 27 și cu influența sa asupra concentrației de proteine totale din celulele CAL 27, determinări realizate în cadrul aceluiași studiu (subcapitolele III.4. și III.5.). Astfel, la 24 ore de contact, citotoxicitatea EUB 100 μg/mL este de 11.5% iar cea a EUB 400 μg/mL de 66.6% (IC₅₀ = 232,17 μg/mL); la 48 ore, valorile citotoxicității înregistrate sunt apropiate, dar ușor mai mici decât cele înregistrate la 24 ore - EUB 400 μg/mL are citotoxicitate 62% (IC₅₀ = 310,67 μg/mL). Tot la EUB 400 μg/mL și valoarea proteinelor totale s-a diminuat cel mai mult.

VI. Evaluarea acțiunii antibacteriene a extractelor de *Usnea barbata* (L.) F. H. Wigg. pe specii de bacterii izolate din produsele biologice recoltate din oro-faringe și zonele învecinate

Material și metoda

Principiul metodei: Metoda antibiogrammei difuzimetrice se bazează pe existența unei relații de directă proporționalitate între sensibilitatea bacteriilor testate și mărimea ariei de inhibiție a coloniei bacteriene dezvoltate în jurul comprimatului de antibiotic.

Această metodă standard a fost adaptată la specificul studiului de față, înlocuind comprimatul de antibiotic cu un disc de hârtie de filtru cu diametru egal cu al acestuia, impregnat cu diferitele extracte de *Usnea lichen* utilizate [Cansaran, D. et al. Z. Naturforsch., 2006; 61(c): 773-776]. S-au luat în studiu produse biologice prelevate din cavitatea oro-dentară și faringiană: exsudatul faringian, puroiul din punge parodontală, dentina ramolită din caria dentară, exsudatul nazal și secreția otică (conductul auditiv și fosele nazale au rapoarte de vecinătate cu cavitatea oro-faringiană). Tulpinile bacteriene au fost izolate după cum urmează: *Staphylococcus epidermidis* și *Staphylococcus aureus* din secreția otică, *Streptococcus intermedius* și *Streptococcus oralis* din caria dentară, *Pseudomonas aeruginosa* din exsudatul faringian al unui pacient imunodeprimat, iar *Escherichia coli* din exsudatul nazal. Identificarea acestora din produsele biologice recoltate s-a realizat în sistemul API.

Tehnica de lucru

Pe suprafețele uscate ale mediilor de cultură Muller-Hinton s-au însămânțat uniform suspensiile bacteriene în ser fiziologic, cu turbiditate 0.5 Mac Farland, și ulterior s-au aplicat discurile de hârtie de filtru sterilă, saturate în extractele de *Usnea lichen* testate. Cantitatea de extract aplicată pe fiecare disc a fost de 10 μL. Ținând cont că etanolul și acetona au efecte antibacteriene proprii, după saturarea discurilor de hârtie de filtru sterilă cu extractele corespunzătoare, rondellele au fost lăsate 15 secunde pentru evaporarea solventului, înainte de aplicarea pe suprafața mediilor cu tulpinile bacteriene testate. Ulterior, plăcile Petri au fost incubate timp de 24 de ore la 37 °C, iar la finalul acestei perioade s-a trecut la citirea rezultatelor.

Citirea și exprimarea rezultatelor

Citirea rezultatelor s-a realizat prin măsurarea diametrului zonelor de inhibiție în milimetri, pentru fiecare bacterie testată și pentru fiecare tip de extract luat în lucru.

Exprimarea rezultatelor obținute s-a efectuat utilizând calificativele „sensibil”, „intermediar” și „rezistent” față de acțiunea extractelor de *Usnea lichen* testate.

Rezultate

Rezultatele obținute în urma evaluării acțiunii antibacteriene a extractelor acetonică, etanolică și apoasă din *Usnea barbata* L. sunt sintetizate în fig. 17., în care S1-S6 reprezintă extractele de *Usnea*

barbata (L.)F.H.Wigg testate: S1 – extract acetonice 20%, S2 - extract acetonice 5% , S4 - extract etanolic 20%, S6 – extract apos 20%; S3 – extractul acetonice 5% și S5 – extractul etanolic 5% - sunt preparate cu aproximativ 1 an în urmă și utilizate în determinările preliminare.

- ❖ Analizând acțiunea extractelor de *Usneae lichen* pe cele 2 specii de *Streptococcus*, s-au observat o serie de particularități, după cum urmează:
 - *Extractele acetonice* proaspete, S1 și S2 au zone de inhibiție egale și mai mari la *Streptococcus oralis* decât la *Streptococcus intermedius*.
 - *Extractul acetonice* S3, conservat timp de 1 an, are zone inhibitorii egale pentru ambele tulpini și mai mari decât ale extractelor acetonice preparate proaspăt.
 - *Extractul etanolic* proaspăt preparat, S4, are diametre de inhibiție egale cu S5 (extractul etanolic conservat 1 an) pentru fiecare dintre speciile de streptococi; ambele sunt mai active pe *Streptococcus intermedius* decât pe *Streptococcus oralis*.
 - *Extractul apos* este lipsit de activitate antibacteriană, pentru ambele specii de streptococi.
- ❖ Acțiunea inhibitorie a extractelor de *Usneae lichen* S1-S6 pe speciile de *Staphylococcus*, are următoarele particularități:
 - *Extractele acetonice* proaspete S1 și S2 au zone de inhibiție egale, pentru fiecare specie de stafilococi. *Extractele etanolice* S4 și S5 au zone de inhibiție diferite. Diametrul zonelor de inhibiție, atât la extractele acetonice, cât și la cele etanolice, este mai mare pentru *Staphylococcus epidermidis* decât pentru *Staphylococcus aureus*.
 - *Extractul apos* generează o zonă de inhibiție mult mai mică decât a extractelor acetonice și etanolice, doar la *Staphylococcus epidermidis*, pe care se dezvoltă însă mutante rezistente.
 - În cazul *Staphylococcus aureus*, extractul apos de *Usneae lichen* nu inhibă deloc dezvoltarea tulpinilor microbiene.
- ❖ Pentru *bacilii Gram negativi* observăm următoarele:
 - În cazul *Pseudomonas aeruginosa*, extractele acetonice dau zone inhibitorii mai mici decât *extractele etanolice*; în niciunul dintre cazuri nu s-a observat dezvoltarea de mutante rezistente.
 - Pentru toate extractele *acetonice și etanolice* S1-S5, în zonele de inhibiție inițiale, la *Escherichia coli*, s-au dezvoltat a mutante rezistente, chiar dacă, inițial, au fost mai mari ca dimensiuni decât pentru *Pseudomonas aeruginosa*.

Comparând acțiunea antibacteriană a extractelor acetonice și etanolice de *Usneae lichen* pe ambele genuri de coci Gram-pozitivi testate, s-a observat că zonele de inhibiție sunt foarte apropiate ca dimensiuni în cazul *Staphylococcus aureus* și *Streptococcus oralis*, în timp ce la *Staphylococcus epidermidis* sunt considerabil mai mari.

În determinările preliminare s-au identificat și cuantificat în extractele de *Usneae lichen* acid usnic și polifenoli, care au acțiune antibacteriană [Çobanoğlu, G. et.al., Modern Phytomorphology, 2016; 10: 19–24]; în extractele acetonice și etanolice, acești constituenți se regăsesc în cantități mai mari, astfel încât justifică activitatea inhibitorie superioară a extractelor S1-S5 față de S6 .Soluțiile S1, S2, S3 sunt extracte acetonice în care este prezent doar acidul usnic, iar S4, S5 sunt extracte etanolice 20% și 5%, care, pe lângă acidul usnic, conțin și polifenoli; toți acizii polifenolici identificați prin HPLC în extractele de *Usnea barbata* [L.] F. H. Wigg. au acțiune antibacteriană. S-au luat lucru și extractele acetonice și etanolice de *Usneae lichen* conservate timp de 1 an, pe care s-au efectuat toate determinările preliminare; prin compararea acțiunii acestora cu a soluțiilor extractive proaspăt preparate, s-a evaluat stabilitatea compușilor activi antibacterieni conținuți.

Rezultatele studiului de față au arătat că acțiunea antibacteriană a extractelor conservate timp de 1 an este similară cu a celor proaspete. Soluțiile S3 și S5 sunt extracte 5% acetonice, respectiv etanolice, preparate cu un an înainte și utilizate în toate studiile preliminare; ariile mai mari de inhibiție a dezvoltării tulpinilor bacteriene pot fi explicate prin faptul că, în timpul perioadei de conservare și utilizare la diferite alte determinări, solvenții s-au evaporat în timp, iar concentrația soluțiilor rămase este mai mare decât a celor proaspăt preparate. Soluția S6 este un extract apos 20 % proaspăt preparat, în care atât acidul usnic cât și polifenolii sunt în cantități mici. În majoritatea cazurilor nu are acțiune antibacteriană; doar la *Staphylococcus epidermidis* apare o zonă de inhibiție inițială, pe care se observa dezvoltarea de mutante rezistente.

Diametrul zonelor de inhibiție este mare în cazul bacteriilor saprofite, condiționat patogene, deoarece și sensibilitatea lor la agenții antibacterieni este mare.

Dintre bacilii Gram-negativi, *Escherichia coli* este parțial sensibil, deoarece pe zonele de inhibiție existente se dezvoltă tulpini mutante rezistente. *Pseudomonas aeruginosa*, însă, renumit prin rezistența sa la agenți antibacterieni, a înregistrat nivele mari de sensibilitate comparativ cu *Escherichia coli*.

Putem considera astfel, că sensibilitatea cea mai mare la extractele acetonice și etanolice o au două specii bacteriene cu patogenicitate crescută, recunoscută: *Staphylococcus aureus* dintre cocii Gram-pozitivi și *Pseudomonas aeruginosa* dintre bacilii Gram-negativi (fig.18).

VII. Concluzii finale

1. **Extractul acetonice uscat din *Usneae lichen* prezintă un continut de acid usnic de $16.53\% \pm 1.08$.**
2. **Extractul acetonice uscat de *Usnea barbata* (L.) F. H. Wigg. prezintă acțiune citotoxică evidentă, cuantificată prin procentul mare de mortalitate al naupliilor de *Artemia salina* L. direct proporțională cu doza și cu timpul de contact.**
3. **Extractul acetonice uscat de *Usnea barbata* (L.) F. H. Wigg. are efect citotoxic pe linia celulară tumorală CAL27, direct proporțional cu concentrația soluțiilor folosite.**

Citotoxicitatea EUB poate fi explicată și prin scăderea proteinelor totale, dependentă de concentrația extractului;

Citotoxicitatea indusă de EUB este mai mare după 24 ore, comparativ cu cea înregistrată după 48 ore – ușor mai scăzută; această mică diferență se datorează, probabil, fenomenelor reparatorii intracelulare.

4. **Inducerea apoptozei este direct proporțională cu concentrația EUB și cu timpul de contact.**
5. **EUB stimulează activitatea principalelor enzime antioxidante: activitatea SOD este stimulată ușor, în timp de activitățile CAT și POD cresc semnificativ; creșterea semnificativă a activității CAT și POD comparativ cu SOD s-ar putea justifica prin creșterea producției de H₂O₂ (substratul pe care acționează ambele enzime) cauzată de declanșarea de către EUB a procesului de formare a SRO în mitocondrii.**
6. **Extractele acetonice și etanolice din *Usneae lichen* au efect antibacterian pe specii bacteriene intens patogene, cu rezistența consacrată la antibioticele clasice: *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa*.**
7. **Rezultatele privind acțiunea antibacteriană a extractelor acetonice și etanolice conservate timp de 1 an sunt similare cu ale celor proaspăt preparate, demonstrând stabilitatea în timp a metaboliților secundari cu acțiune antibacteriană din *Usnea barbata* (L.) F.H.Wigg.**

**PROCEDEU DE OBȚINERE, ANALIZA UHPLC ȘI EVALUAREA ACTIVITĂȚILOR
BIOLOGICE ALE EXTRACTULUI ACETONIC USCAT DIN
USNEA BARBATA (L.) F. H. WIGG.**

**Popovici Violeta, Bucur Laura Adriana, Schroder Verginica, Popescu Antoanela,
Costache Teodor, Vochita Gabriela, Gherghel Daniela, Cosmin Teodor Mihai,
Caraiane Aureliana, Badea Victoria**

REVENDICĂRI

Revendicări depuse conform art. 47 alin. 7 din legea nr. 64 / 1991 la data de <u>17 -01- 2020</u>

- 1. Metoda de obtinere a extractului acetonice uscat din *Usnea barbata* (L.) F. H. Wigg. (EUB).**
Metoda constă în extracția pulberii de *Usnea lichen* cu acetonă, timp de 8 ore, într-o instalație de refluxare continuă, tip Soxhlet. Extractul acetonice se supune îndepărtării solventului într-un evaporator rotativ TURBOVAP 500 Caliper. Extractul acetonice uscat se păstrează la congelator, la temperatura de -20°C.
- 2. Analiza UHPLC a extractului acetonice uscat din *Usnea barbata* (L.) F. H. Wigg. (EUB) solubilizat în DMSO.**
Extractul acetonice uscat, solubilizat în DMSO, este analizat prin cromatografie de lichide de ultra înaltă performanță, față de substanța de referință acid usnic. Extractul acetonice uscat prezintă un pic la timpul de retenție 3,70 min. identificat ca acid usnic, deoarece substanța de referință, acid usnic, analizată în aceleași condiții, are timpul de retenție 3,64±0,07 min. Metoda este validată prin linearitate ($r^2 = 0,999877$), acuratețe (2,26%), precizie (1,16%) și valorile LOD (0,04 μg / mL) și LOQ (0,20 μg / mL).
EUB prezintă un continut de acid usnic de 16,53% ± 1,08.
- 3. Determinarea acțiunii citotoxice a extractului acetonice uscat din *Usnea barbata* (L.) F. H. Wigg. (EUB) pe biotesterul *Artemia salina* (L.).**
Studiul de citotoxicitate s-a realizat pe naupliile de *Artemia salina* L. S-au utilizat plăci cu godeuri, în fiecare godeu introducându-se câte 10 - 20 nauplii, care au fost puse în contact cu 6 diluții succesive (C1-C6) ale extractului uscat de EUB.
Pentru control, au fost urmărite naupliile de *Artemia salina* L. în soluția salină 3‰ și în solventul în care a fost solubilizat EUB (DMSO 0,1% , 100 μl/mL). Cuantificarea efectelor s-a realizat prin evaluarea nivelului de supraviețuire al naupliilor de *Artemia salina* L., în condițiile expunerii la concentrații diferite de extract uscat de *Usneae lichen* în DMSO 0,1%, timp de 24-72 h.
La nivel microscopic, au fost efectuate observații asupra larvelor vii, pentru a evidenția modificările celulare asociate cu citotoxicitatea posibilă a extractului.
EUB prezintă acțiune citotoxică evidentă, cuantificată prin procentul mare de mortalitate al naupliilor de *Artemia salina* L. direct proporțională cu doza și cu timpul de contact.
- 4. Determinarea acțiunii antitumorale a extractului acetonice uscat din *Usnea barbata* (L.) F. H. Wigg. (EUB) pe linia de celule tumorale CAL 27.**
Kitul de celule CAL 27 este un produs furnizat de American Type Culture Collection (ATCC) și a fost achiziționat de la distribuitorul autorizat LGC Standards GmbH – Germany. Celulele

liniei tumorale umane CAL 27 (ATCC® CRL-2095™) sunt reprezentate de celule epiteliale scuamoase izolate din carcinomul lingual; au fost crescute într-un mediu special - Dulbecco modificat (DMEM, Biochrom AG, Germania care conține 10% ser fetal bovin (Sigma, Germania), 100 µg/ml streptomycină (Biochrom AG, Germania), 100 UI/ml penicilină (Biochrom AG, Germania) [***ATCC, Product Sheet CAL 27 (ATCC® CRL-2095™)].

Celulele au fost menținute într-un microclimat particular, la temperatura de 37 grade Celsius, în condițiile unui mediu cu 5% CO₂ și umiditate optimă, într-un incubator Binder.

Dupa 24 de ore de la incubare, monostratul celular format a fost detașat cu o soluție de tripsină în EDTA; celulele au fost numărate cu ajutorul unui numărător automat de celule (CelometerMini-Nexcelom), evaluându-se în același timp și viabilitatea celulară, prin utilizarea testului de exclusiune cu albastru de tripan.

Din plăcile cu culturi celulare desprinse s-a prelevat o cantitate mică de produs și s-a repartizat pe o lamă cu godeuri, peste care s-a adădat o picătură de soluție de albastru de tripan, care colorează celulele moarte. Apoi, s-au adăugat 20 microlitri din amestecul din godeu într-una din camerele dispozitivului de numărare și ulterior acesta s-a introdus în celometru. Celometrul Mini-Nexcelom utilizează imagini pe câmp luminos și un software specific de recunoaștere a modelelor celulare, cu scopul de a identifica rapid și precis și de a număra celulele vii și celulele moarte; astfel, numărul celulelor vii și moarte, concentrația, diametrul și viabilitatea% au fost calculate automat și afișate. Celulele din plăcile inițiale au fost repartizate în 2 plăci cu 96 godeuri (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Elveția) cu densitate celulară medie de 8 x 10³ celule/godeu (figura III.3.) apoi au fost incubate în aceleași condiții de temperatură și umiditate în incubatorul Binder timp de 24 ore pentru formarea monostratului celular.

O parte din EUB a fost scos din congelator (-85°C) și lăsat la temperatura camerei; s-a dizolvat extractul uscat în dimetilsulfoxid (DMSO) soluție apoasă 0.2% obținându-se o soluție-stoc de concentrație 2 mg/mL. S-au realizat apoi următoarele concentrații finale exprimate în µg/mL: 12.5, 25, 50, 100, 200 și 400 µg/ML. După aplicarea pe cele 2 plăci a celor șase soluții diluate din extractul uscat de *Usneae lichen*, celulele din plăcile cu godeuri au fost termostate timp de 24 și respectiv 48 ore. A fost realizată o variantă martor netratată, precum și o variantă cu DMSO 0,2%, pentru a observa influența solventului asupra viabilității celulare.

Evaluarea acțiunii citotoxice s-a realizat prin determinarea modificărilor morfologice ale celulelor CAL 27 și prin metoda MTT, de determinare a viabilității celulare.

EUB are efect citotoxic pe linia celulară tumorală CAL27, direct proporțional cu concentrația soluțiilor folosite.

Citotoxicitatea EUB poate fi explicată și prin scăderea proteinelor totale, dependentă de concentrația extractului. Citotoxicitatea indusă de EUB este mai mare după 24 ore, comparativ cu cea înregistrată după 48 ore – ușor mai scăzută; această mică diferență se datorează, probabil, fenomenelor reparatorii intracelulare.

5. Demonstrarea celor 3 mecanisme prin care are loc moartea celulelor tumorale CAL 27 expuse la extractul acetonc uscat din *Usnea barbata* (L.) F. H. Wigg. (EUB).

Mecanismele prin care se produce moartea celulelor tumorale sunt: scaderea proteinelor totale, apoptoza celulelor CAL 27 și stimularea activității enzimelor antioxidante, ca urmare a stresului oxidativ generat de EUB în celulele CAL 27.

Dozarea proteinelor totale s-a realizat prin metoda Bradford și s-a constatat că la doza maximă

testată (400 µg/ml), conţinutul proteic a scăzut semnificativ, fiind de aproape 3 ori mai mic comparativ cu martorul, dovedindu-se astfel efectul citotoxic al EUB testat.

Evaluarea apoptozei celulare s-a realizat prin tehnica citometriei în flux şi s-a constatat că EUB induce apoptoza celulelor direct proporţional cu concentraţia soluţiei utilizate şi cu timpul de expunere.

Evaluarea acţiunii EUB asupra activităţii enzimelor antioxidante din celulele tumorale CAL 27 s-a realizat pe superoxid-dismutază (SOD), catalază (CAT) şi peroxidază (POD).

Rezultatele arată că EUB stimulează activitatea principalelor enzime antioxidante: activitatea SOD este stimulată uşor, în timp de activităţile CAT şi POD cresc semnificativ; creşterea semnificativă a activităţii CAT şi POD comparativ cu SOD s-ar putea justifica prin creşterea producţiei de H₂O₂ (substratul pe care acţionează ambele enzime) cauzată de declanşarea de către EUB a procesului de formare a speciilor reactive ale oxigenului (SRO) în mitocondrii.

6. Determinarea activităţii antibacteriene a extractelor de *Usnea barbata* (L.) F. H. Wigg. pe specii bacteriene izolate din produsele patologice recoltate din oro-faringe si zonele invecinate.

Evaluarea activităţii antibacteriene a extractelor acetonice, etanolice şi apoase de *Usnea barbata* (L.) F. H. Wigg. s-a realizat prin metoda antibiogrammei difuzimetrice pe produse biologice prelevate din cavitatea oro-dentară şi faringiană: exsudatul faringian, puroiul din pungea parodontală, dentina ramolită din caria dentară, exsudatul nazal şi secreţia otică (conductul auditiv şi fosele nazale au rapoarte de vecinătate cu cavitatea oro-faringiană). Tulpinile bacteriene au fost izolate după cum urmează: *Staphylococcus epidermidis* şi *Staphylococcus aureus* din secreţia otică, *Streptococcus intermedius* şi *Streptococcus oralis* din caria dentară, *Pseudomonas aeruginosa* din exsudatul faringian al unui pacient imunodeprimat, iar *Esherichia coli* din exsudatul nazal. Identificarea acestora din produsele biologice recoltate s-a realizat în sistemul API.

Extractele acetonice si etanolice din *Usnea barbata* (L.) F. H. Wigg. au efect antibacterian pe specii bacteriene intens patogene, cu rezistenţă consacrată la antibioticele clasice: *Staphylococcus aureus* şi *Pseudomonas aeruginosa*. Rezultatele privind acţiunea antibacteriană a extractelor acetonice si etanolice conservate timp de 1 an sunt similare cu ale celor proaspăt preparate, demonstrând stabilitatea în timp a metaboliţilor secundari cu acţiune antibacteriană din *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg.

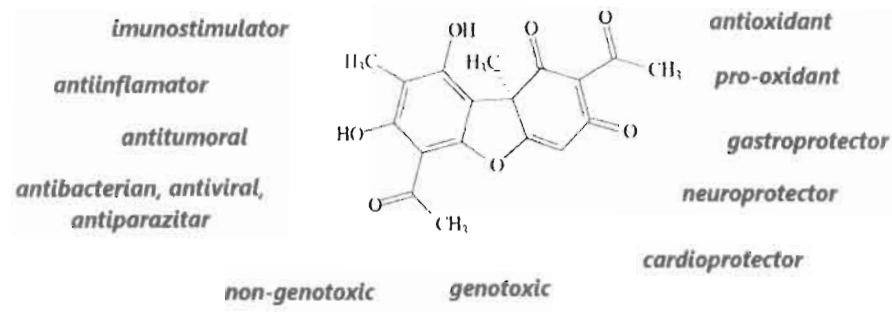


Figura 1. Acidul usnic – structura chimica si actiuni biologice [White, P., Oliveira, R., Oliveira, AP et.al., *Molecules*, 2014; 19(9):14496-14527]

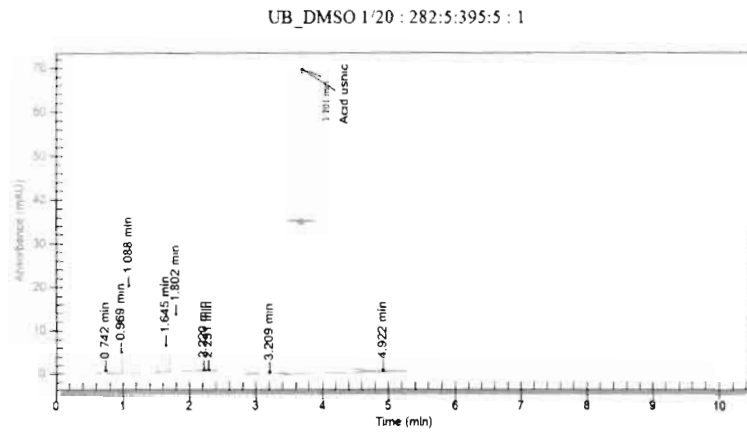


Figura 2. Cromatograma soluției 1 la 50 a extractului uscat de *Usnea lichen*

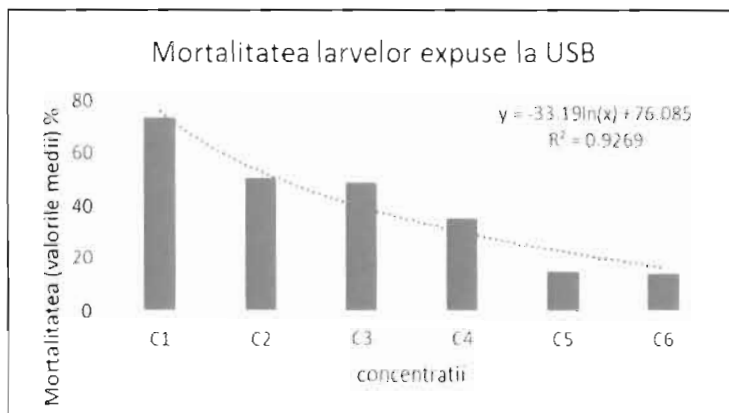


Figura 3. Mortalitatea (%) larvelor de *Artemia salina* L. expuse la concentrațiile EUB (C1-C6), după 24 h

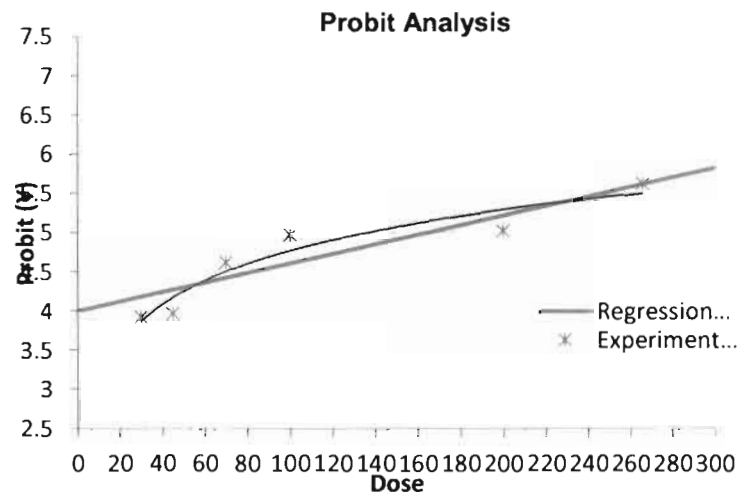


Figura 4. Evidențierea corelației doza- efect prin testul Probit pentru testarea EUB pe larvele de *Artemia salina* L.

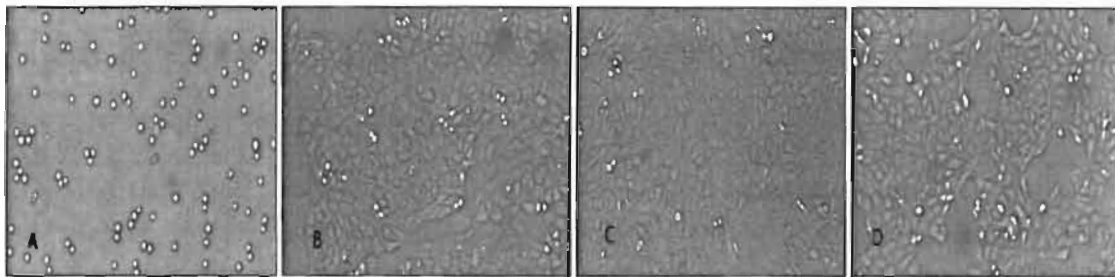


Figura 5. Morfologia celulelor CAL 27 în faza de inocul inițial (A), după 24 ore de contact cu DMSO 0.2% (B), după contactul cu soluțiile testate de EUB: 12.25 $\mu\text{g/mL}$ (C); 25 $\mu\text{g/mL}$ (D)

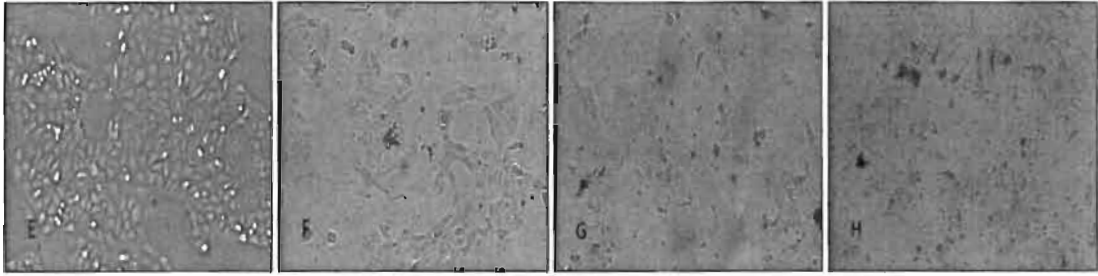


Figura 6. Morfologia celulelor CAL 27, după contactul cu soluțiile testate de EUB: 50 µg/mL (E); 100 µg/mL (F) ; 200 µg/mL(G); 400 µg/mL (H)

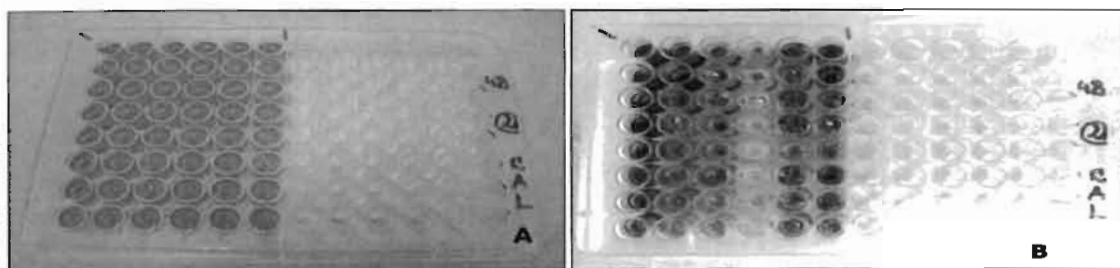


Figura 7. A. Colorație portocalie după adăugarea de MTT și incubare timp de 3 ore **B.** Colorație violet apărută la dizolvarea precipitatului de formazan în DMSO (la 24 și 48 ore)

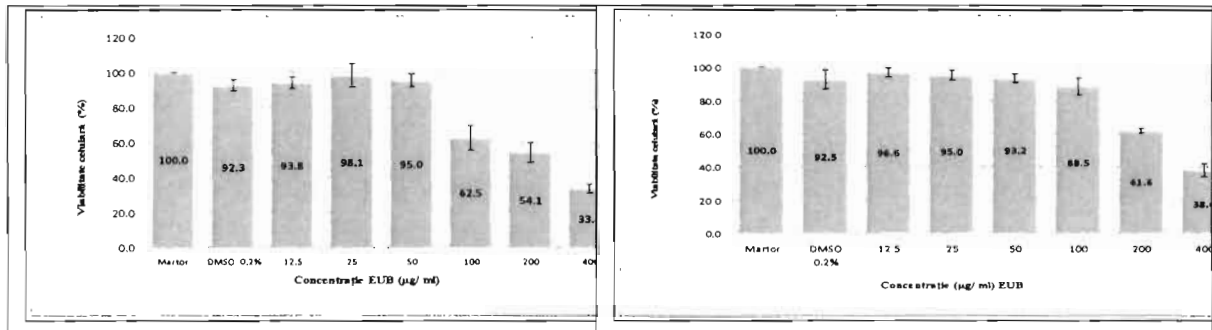
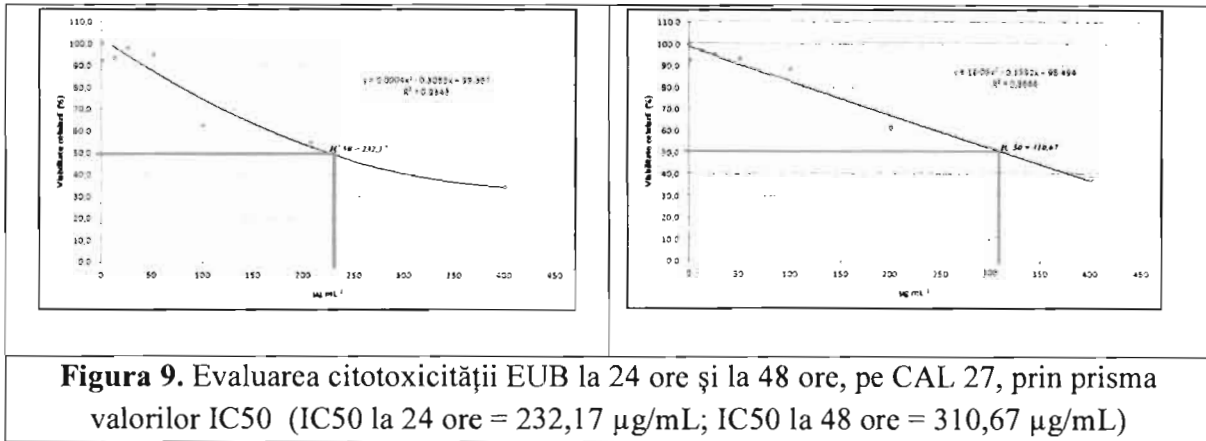


Figura 8. Efectul EUB asupra viabilității culturilor celulare CAL 27 la 24 ore și 48 ore



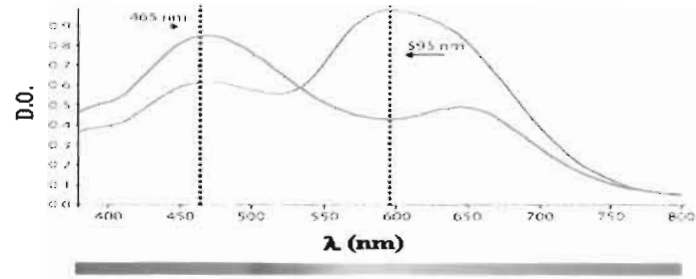


Figura 10. Modificarea intervalului maxim de absorbție a colorantului CBBG în prezența proteinelor de la 465 nm la 595 nm

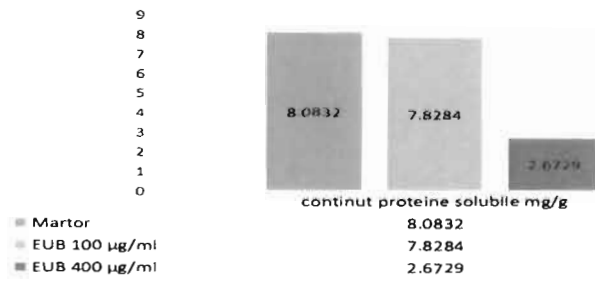


Figura 11. Variația conținutului de proteine solubile în celulele tumorale CAL 27, după contactul cu diferite concentrații de EUB

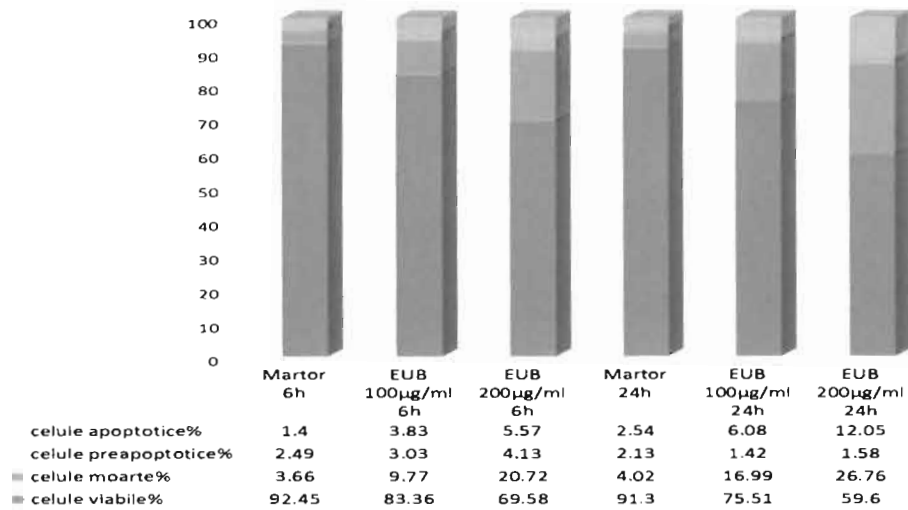


Figura 12. Distribuția frecvenței celulelor viabile, moarte, preapoptotice și apoptotice, în culturile de celule tumorale CAL 27 tratate cu EUB, în concentrații de 100 µg/ml și 200 µg/ml

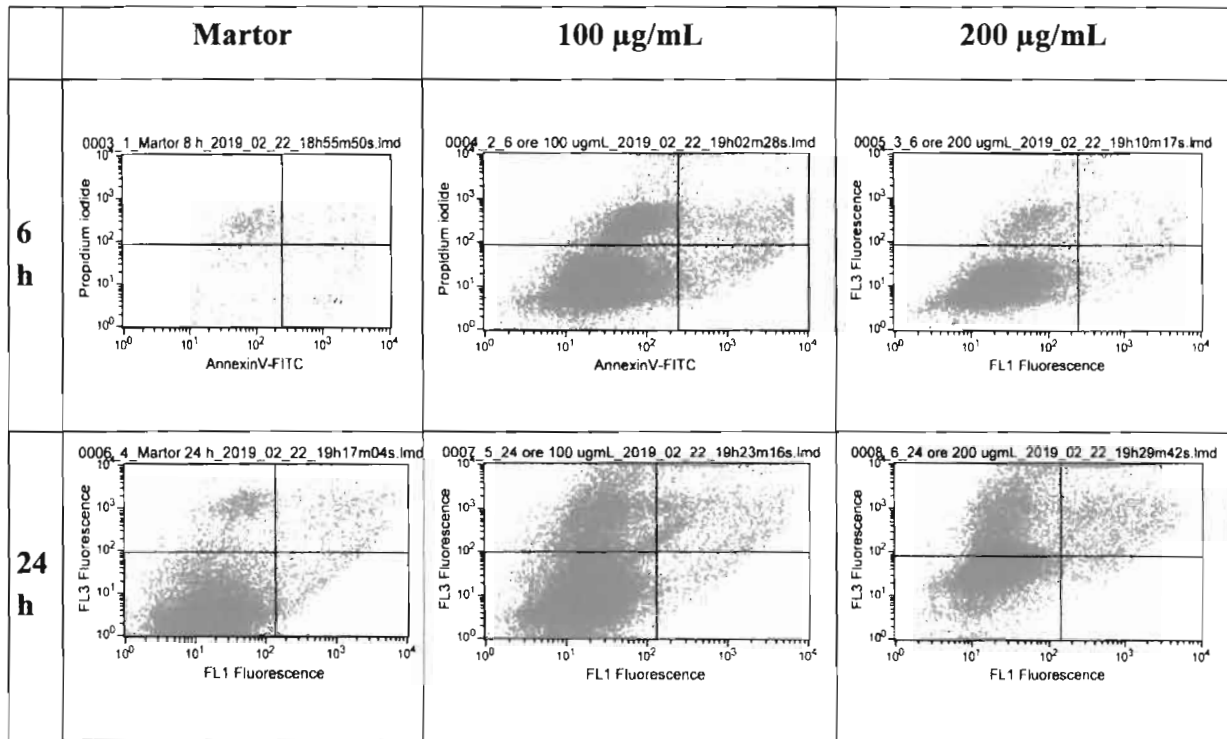


Figura 13. Citogramele corespunzătoare determinării apoptozei prin citometrie în flux

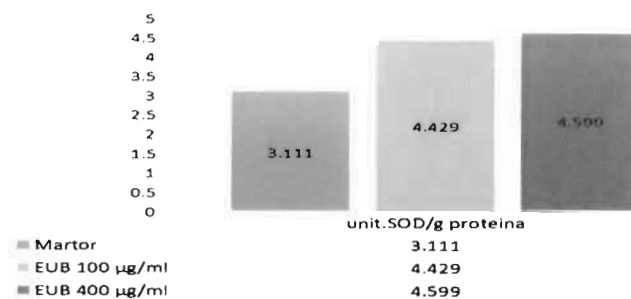


Figura 14. Evaluarea activității SOD (U SOD/ g proteină), înregistrată pe cultura celulară CAL 27, la diferite concentrații al extractului acetonic uscat de *Usneae lichen*.

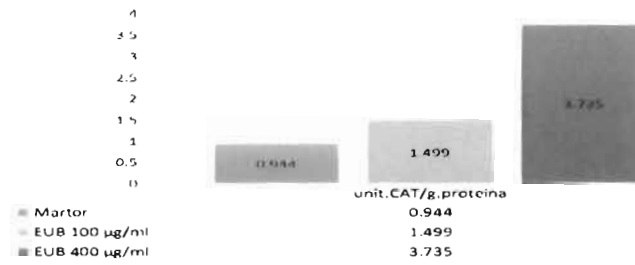


Figura 15. Evaluarea activității CAT (U CAT/ g proteină), sub acțiunea extractului de *Usneae lichen* la diferite concentrații pe cultura de celule tumorale CAL 27

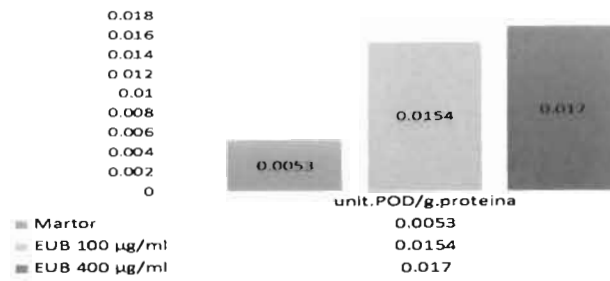


Figura 16. Evaluarea activității POD (U POD/ g proteină) în urma contactului cu diferite concentrații de EUB din celulele tumorale CAL 27

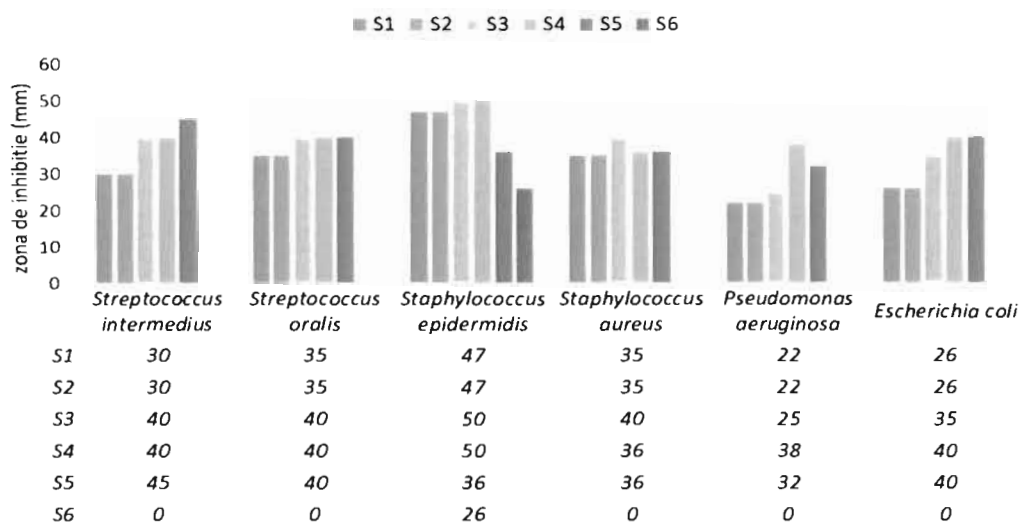


Figura 17. Mărimea zonelor de inhibiție (mm) a creșterii bacteriene în funcție de tipul de extract de *Usneae lichen* testat (S1-S6) și de specia bacteriană utilizată

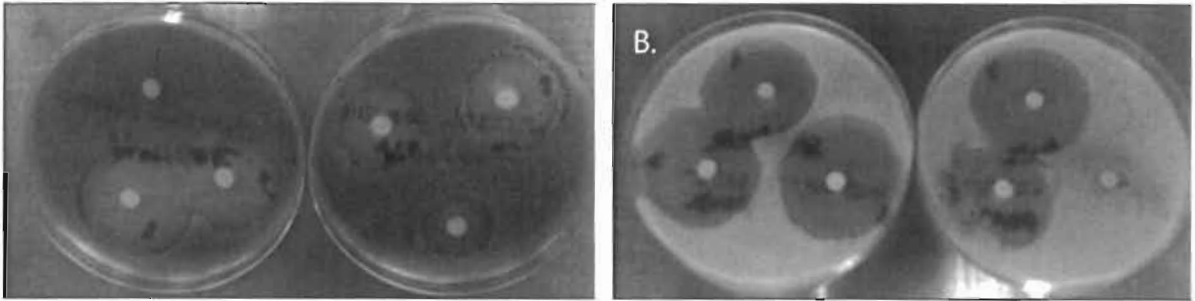


Figura 18. Acțiunea extractelor de *Usneae lichen* pe *Pseudomonas aeruginosa* (A) și *Staphylococcus aureus* (B)