

UNIVERSITATEA DE MEDICINA ȘI FARMACIE  
„VICTOR BABEȘ TIMIȘOARA”  
FACULTATEA DE FARMACIE  
DEPARTMENTUL II

DOLGHI ALINA



# TEZĂ DE DOCTORAT

EVALUARE EXPERIMENTALĂ A UNOR ULEIURI  
ESENTIALE PENTRU A LE OBSERVA POTENȚIALUL  
ANTITUMORAL

REZUMAT

Coordonator științific:  
PROF. UNIV. DR. DEHELEAN CRISTINA ADRIANA

Timișoara  
2022

# CUPRINS

Lista lucrărilor publicate.....	V
Lista abrevieri.....	VI
Lista figuri.....	VIII
Lista tabele.....	XII
Dedicație.....	XIII
Mulțumiri.....	XIV
INTRODUCERE.....	XV

## PARTEA GENERALĂ

1. ULEIURILE ESENȚIALE ȘI ROLUL ACESTORA ÎN CANCER .....	1
1.1. Definiția și clasificarea uleiurilor esențiale. Efectul Biologic .....	1
1.2. Efectul antitumoral al uleiurilor esențiale.....	10
1.3. Efectul citotoxic al uleiurilor esențiale pe cancerul de colon .....	18
2. IMPORTANȚA MODELELOR EXPERIMENTALE ÎN EVALUAREA COMPUSILOR DIN PLANTE .....	24
2.1. Modele experimentale în evaluarea fitocompușilor .....	24
2.2. Modele de formulare pentru compușii vegetali.....	29
3. REGULI ȘI NORME DE ETICĂ APLICABILE TESTĂRILOR IN VITRO .....	31

## PARTEA SPECIALĂ

4.EVALUAREA FIZICO-CHIMICĂ A ULEIURILOR ESENȚIALE .....	35
4.1. Scopul studiului.....	35
4.2. Materiale și metode.....	35
4.3. Rezultate.....	36
4.4. Discuții .....	49
4.5. Concluzii .....	53
5. EVALUARE BIOLOGICĂ A ULEIURILOR TESTATE FIZICO-CHIMIC .....	54
5.1. Evaluarea potențialului citotoxic al uleiurilor esențiale asupra celulelor sănătoase .....	54
5.1.1. Scopul studiului .....	54
5.1.2. Materiale și metode .....	54
5.1.3. Rezultate .....	56
5.1.4. Discuții .....	60
5.1.5. Concluzii .....	61

5.2. Evaluarea potențialului terapeutic al uleiurilor esențiale asupra celulelor canceroase.....	61
5.2.1. Scopul studiului .....	61
5.2.2. Materiale și metode .....	62
5.2.3. Rezultate .....	65
5.2.4. Discuții.....	92
5.2.5. Concluzii.....	97
6. TESTAREA MICROBIOLOGICĂ A CELOR MAI UTILIZATE ULEIURI ESENTIALE .....	98
6.1. Scopul studiului .....	98
6.2. Materiale și metode .....	98
6.3. Rezultate .....	99
6.4. Discuții.....	102
6.5. Concluzii.....	103
7. EVALUAREA IN OVO A CELOR MAI POTENTE IN VITRO ULEIURI ESENTIALE .....	104
7.1. Scopul studiului.....	104
7.2. Materiae și metode .....	104
7.3. Rezultate.....	106
7.4. Discuții .....	107
7.5. Concluzii .....	108
CONCLUZII.....	109
BIBLIOGRAFIE .....	111
Anexe.....	I

# REZUMAT

## Introducere

Cancerul colorectal (CRC) este una dintre cele mai întâlnite forme de cancer, ocupând locul al treilea în ceea ce privește rata mortalității. Protocoalele terapeutice actuale, în special cele pentru stadiile avansate, sunt însoțite de o rată scăzută de supraviețuire și de multiple efecte adverse în ciuda progresului din ultimii ani. Prin urmare, în căutarea unor noi alternative terapeutice, eficiente, orientate către celulele afectate și fără efecte secundare asupra celulelor sănătoase, s-a atras atenția asupra plantelor medicinale.

Acest interes sporit se reflectă și în creșterea numărului de cercetări academice. Astfel, în cazul uleiurilor esențiale (EO) numărul publicațiilor a crescut continuu, de la câteva zeci în anii 2000 la peste 800 în 2022, cu o preocupare sporită în domeniile farmaceutic, biologic și medical.

*Hippophae rhamnoides* L. (*H. rhamnoides*) *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (*C. citratus*), *Ocimum basilicum* L. (*O. basilicum*), *Mentha piperita* L. (*M. piperita*) și *Rosmarinus officinalis* (*R. officinalis*) contin surse importante de ulei esențial (EO), cu proprietati terapeutice cunoscute inca din cele mai vechi timpuri. Uleiul esențial de *H. rhamnoides* (Hr\_EO) exercită activități antioxidante, antiinflamatorii și anti-aterosclerotice. Diverse studii evidențiază un spectru larg anticancerigen pentru afecțiunile maligne ale sânelui, plămânilor, ficatului și sânelui [1–4]. Uleiul esențial de *C. citratus* (Cc\_EO) posedă o multitudine de efecte farmacologice variind de la proprietăți antibacteriene, antifungice, anti-amibice și antimalarice până la proprietăți antioxidante și antiinflamatorii [5]. Publicațiile recente se referă la activitatea antitumorală a extractelor de lemongrass împotriva carcinoamelor de sân, prostată, ficat, ovare și colon [6,7]. Uleiul esențial de *O. basilicum* (Ob\_EO) exercită proprietăți antimicrobiene, antiinflamatorii, antidiabetice, cardio-protectoare și anti-cancerigene, oferind multiple beneficii pentru sănătate [8]. Uleiul esențial de *M. piperita* (M\_EO) este cunoscut în mod obișnuit pentru ameliorarea simptomelor tusei și răcelii, tratează durerile nevralgice și durerile musculare și ameliorează tulburările gastrointestinale (ameliorarea flatulenței abdominale, durerii, constipației, repleției și diareei). Uleiul esențial de *R. officinalis* (R\_EO) este utilizat pentru a trata erupțiile cutanate și rănilor minore, durerile de cap și problemele de circulație, precum și tulburările precum problemele anti-dispeptice, diuretice și antispastice [9]. Efectul

anticancerigen al rozmarinului a fost confirmat pe celulele canceroase de sân, plămân, ficat, prostată și în cazul leucemiilor [10].

Toate cele cinci EO sunt utilizate pe scară largă în rândul populației și toate s-au dovedit a fi active asupra diferitelor tipuri de cancer, dar la nivelul CRC, acestea au fost mai puțin studiate. În plus, este importantă analiza formelor comerciale de uleiuri, la care are acces întreaga populație, pentru a stabili eficiența sau ineficiența într-un anumit domeniu.

Scopul prezentei teze a fost evaluarea compoziției fitochimice și investigarea capacității antitumorale in vitro a cinci uleiuri comerciale (Hr\_EO, Cc\_EO, Ob\_EO, M\_EO și R\_EO) ca potențiale alternative chimio-profilactice sau chimio-terapeutice în managementul CRC.

### **Obiective:**

- Evaluarea in vitro a EO cu privire la profilul fizico-chimic, antioxidant, anti-migrator și citotoxic;
- Evaluarea antibacteriană și antifungică a EO utilizate în mod curent;
- Evaluarea pre-in vivo a EO puternic citotoxice.

Contribuția personală constă într-o evaluare fizico-chimică a EO și analiza biologică in vitro pentru a identifica potențialul anticancerigen pe liniile de cancer de colon (HT-29, Caco-2 și HCT 116).

Cercetarea a fost divizată în cinci părți:

- Analiza fizico-chimică (prin cromatografie gazoasă) și antioxidantă (efectuând testul 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil) a Hr\_EO, Cc\_EO, Ob\_EO, M\_EO și R\_EO.
- Studiu in vitro asupra liniei celulare de keratinocite umane imortalizate (HaCaT), pentru a identifica nivelul de siguranță al EO. S-au urmărit modificările de morfologie și de confluență și s-a analizat viabilitatea celulară (folosind testul bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu).
- Test in vitro pentru analiza efectului citotoxic pe trei linii de celule CRC: liniile HT-29, Caco-2 și HCT 116. Celulele au fost observate în ceea ce privește modificările morfologice și de confluență, viabilitatea a fost analizată (prin metoda MTT), capacitatea de migrare a celulelor a fost urmărită îndeaproape (folosind testul de vindecare a rănilor) și a fost evaluată potențiala amplitudine apoptotică (prin testul Hoechst).

- Testarea microbiologică a M\_EO și R\_EO, cele mai consumate uleiuri esențiale (prin metoda difuziei pe disc) pentru a confirma potențialul antimicrobian și antifungic al uleiurilor comerciale.
- Evaluarea in ovo a celor mai puternice EO in vitro, Hr\_EO, Cc\_EO și B\_EO (prin testul membranei corioalantoice și testul membranei corioalantoice pe ouă de găină) pentru a analiza efectul iritant și profilul de toleranță în plexul vascular.

## Rezultate

Folosind Gaz-Cromatografia cuplată cu echipamentele de spectrometria de masă, s-a observat că Hr\_EO conține 13 compuși, cel mai abundent fiind estragolul, reprezentând 63,1% din compoziția totală a uleiului, în Cc\_EO cei mai abundenți compuși dintre cei 33 detectați au fost alfa- și beta- citralul, reprezentând 66,2% din compoziția totală a uleiului, în cazul Ob\_EO, similar cu Hr\_EO, estragolul a fost principalul compus majoritar dintre cei 31 identificați, cu un procent total de 45,9%, în M\_EO s-au numărat 27 de compuși, iar compusul principal a fost mentonă, iar în R\_EO 23 de compuși au fost identificați cu eucaliptol pe locul principal (33,592%).

Analizând capacitatea antioxidantă, se poate observa din grafice (Figura 1) faptul că toate cele cinci uleiuri esențiale au activitate antioxidantă comparabilă cu standardul (soluție metanolică de acid ascorbic). În ceea ce privește concentrația cea mai mare testată (0,2 mg/mL), potențialul antioxidant al fiecărui ulei esențial respectă liniaritatea: Cc\_EO > M\_EO > Ob\_EO > Hr\_EO > R\_EO.

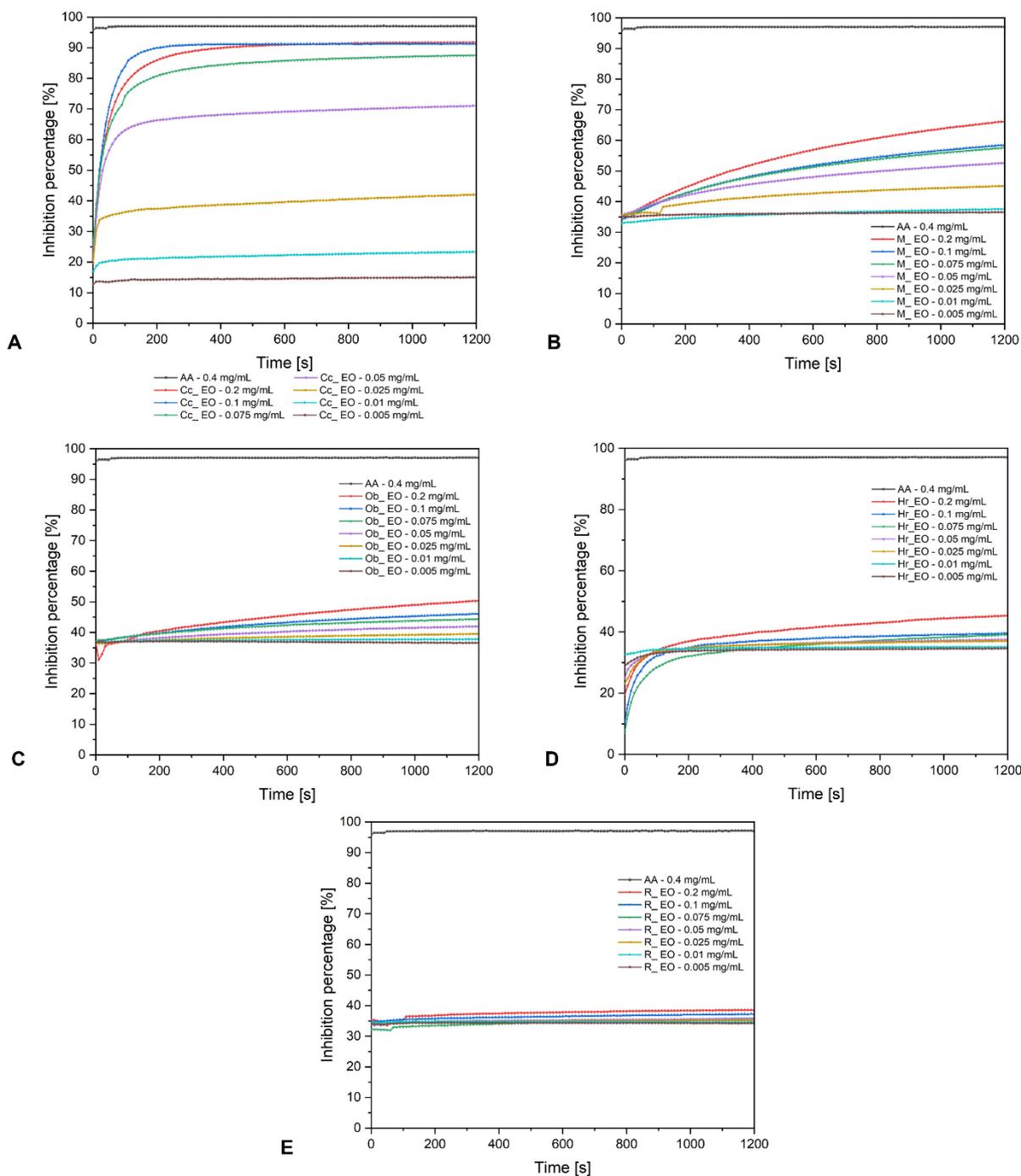


Figura 1. Procentul de inhibiție dependent de timp al uleiurilor esențiale testate A – Cc\_EO vs. AA; B – M\_EO vs. AA; C – Ob\_EO vs. AA; D – Hr\_EO vs. AA și E – R\_EO vs. AA.

În faza următoare, uleiurile analizate fizico-chimic au fost testate pe HaCaT și au fost monitorizate modificările de morfologie, confluență și viabilitate. Astfel, s-a observat că 5, 10, 25, 50 și 75  $\mu\text{g/mL}$  concentrație de EO testat nu au avut un impact semnificativ asupra formei și confluenței celulelor. Mai mult, EO de mentă și rozmarin au fost testate până la 500  $\mu\text{g/mL}$  (100, 150, 200, 250 și 500  $\mu\text{g/mL}$ ),

datorită rezistenței manifestate și pe liniile de celule canceroase, cu aceleași rezultate ne semnificative pe HaCaT. Testul MTT a evidențiat că, chiar și la cele mai mari concentrații, viabilitatea nu a scăzut sub 90% (Figura 2).

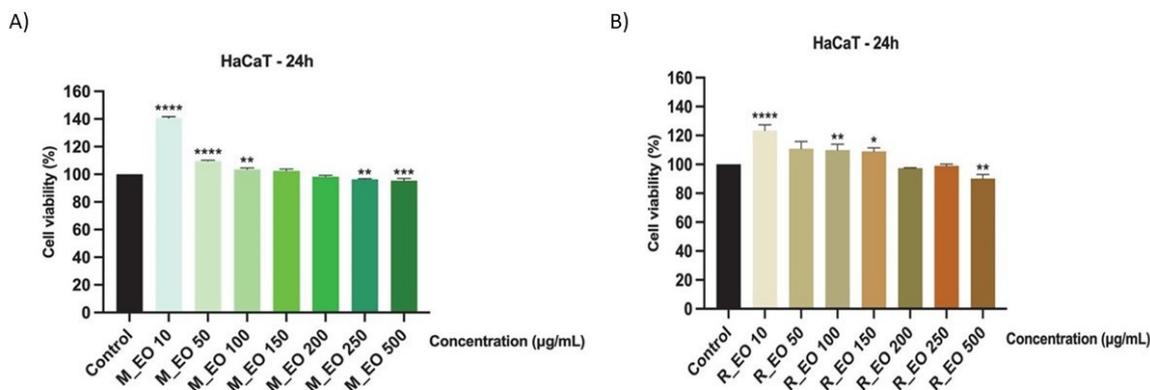


Figura 2. Evaluarea prin intermediul testului MTT a viabilității uleiurilor esențiale de A) *Mentha piperita* L. și B) *Rosmarinus officinalis* L. (10, 50, 100, 150, 200, 250 and 500 µg/mL) pe celule de HaCaT la 24 h post-stimulare. Rezultatele sunt prezentate ca procent de viabilitate celulară (%) normalizat la celulele de control (nestimulate). Aceste date reprezintă valorile medii ± SD a trei experimente independente efectuate în trei exemplare. Testul ANOVA unidirecțional a fost efectuat pentru a determina diferențele statistice în raportul cu grupul de control, urmat de comparațiile multiple ale Dunnett post-test (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01 și \*\*\*\* p < 0,0001).

În urma testării pe celulele canceroase, rezultatele au prezentat un alt profil. Cele mai mici (5 µg/mL) și cele mai mari (75 µg/mL) concentrații au fost selectate pentru analiza morfologică și de confluență. Hr\_EO, Cc\_EO, Ob\_EO au indus o pierdere semnificativă în confluența și aderența celulelor la 75 µg/mL, în timp ce la 5 µg/mL nu au fost observate modificări în comparație cu proba martor (celule netratate), atât pe liniile celulare HT-29, cât și pe cele Caco-2. Pe HCT 116, Cc\_EO a indus modificări și la cea mai mică concentrație. M\_EO și R\_EO nu au afectat morfologia și confluența la 75 µg/mL pe toate cele trei linii celulare. Pe HCT116, au fost observate mai multe celule rotunjite și detașate, dar aderența a rămas nemodificată la 150 și 200 µg/mL, în schimb cele mai mari concentrații — 250 și 500 µg/mL au indus modificări morfologice semnificative, deoarece s-au identificat celule rotunde care pluteau, s-a observat pierderea adeziunii celulă-celulă, confluență redusă, pierderea aderenței și prezența de resturi celulare, semne specifice de citotoxicitate.

În urma testului MTT, procentele de viabilitate ale tuturor uleiurilor au variat într-o manieră dependentă de concentrație. Pe linia celulară Caco-2 s-a observat că Hr\_EO a exercitat un efect important la concentrația de 75 µg/mL, când procentele

de viabilitate au atins valorile de 87,83%. Cc\_EO a scăzut viabilitatea celulelor Caco-2 la 62,69% (la 75 µg/mL). Ob\_EO a redus semnificativ viabilitatea celulară (53,36%) la 75 µg/mL, în timp ce la concentrații mai mici a fost observat un efect stimulator. În ceea ce privește M\_EO și R\_EO, la concentrațiile testate, viabilitatea nu a fost modificată semnificativ. Rezultatele pe HT-29 au fost asemănătoare, cu excepția Cc\_EO care a redus semnificativ viabilitatea celulară începând cu 50 µg/mL (64,09%), urmată de 75 µg/mL (46,58%). Ob\_EO în cazul tuturor celor cinci concentrații, a stimulat viabilitatea celulelor HT-29 (Figura 3).

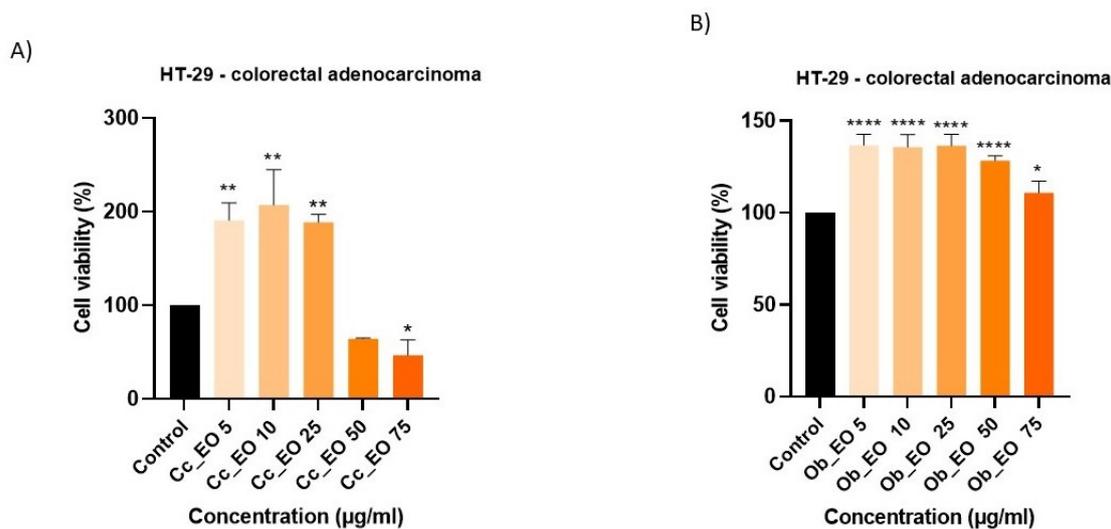


Figura 3. Evaluarea in vitro a efectului pe care Cc\_EO și Ob\_EO îl exercită asupra viabilității celulelor de adenocarcinom colorectal HT-29 după 48 de ore de tratament prin aplicarea testului MTT. Datele sunt prezentate ca procente de viabilitate (%) normalizate la martor (celule netratate) și exprimate ca valori medii ± SD a trei experimente independente efectuate în trei exemplare. Diferențele statistice dintre grupul de control și grupul tratat au fost identificate prin aplicarea analizei ANOVA unidirecțională urmată de comparațiile multiple ale Dunnett post-test (\* p < 0,1; \*\* p < 0,01; \*\*\* < 0,001; \*\*\*\* < 0,0001).

Pe HCT 116, Cc\_EO la concentrația de 5 µg/mL a modificat viabilitatea cu 16% (84,14%) și s-a observat tendința semnificativă de a scădea procentul de viabilitate odată cu creșterea concentrației, astfel încât la cea mai mare concentrație, viabilitatea a fost redusă la 7,8%. Pe de altă parte, uleiurile Hr\_EO și Ob\_EO nu au afectat viabilitatea celulară, mai mult decât atât, se pare că au stimulat proliferarea celulară (Figura 4). În urma analizei M\_EO, s-a observat o scădere a ratelor de viabilitate celulară începând cu concentrația de 150 µg/mL, iar cea mai mare scădere a fost calculată pentru cea mai mare concentrație testată—500 µg/mL (81,15%). Aceste rezultate indică o citotoxicitate ușoară/scăzută indusă de M\_EO în celulele cancerului colorectal. R\_EO a indus o reducere mai puternică a procentului

de viabilitate celulară în celulele canceroase în comparație cu M\_EO. R\_EO a indus o scădere dependentă de doză a procentului de viabilitate celulară, cel mai mic procent de celule viabile (50,25%) fiind calculat pentru cea mai mare concentrație testată - 500 µg/mL.

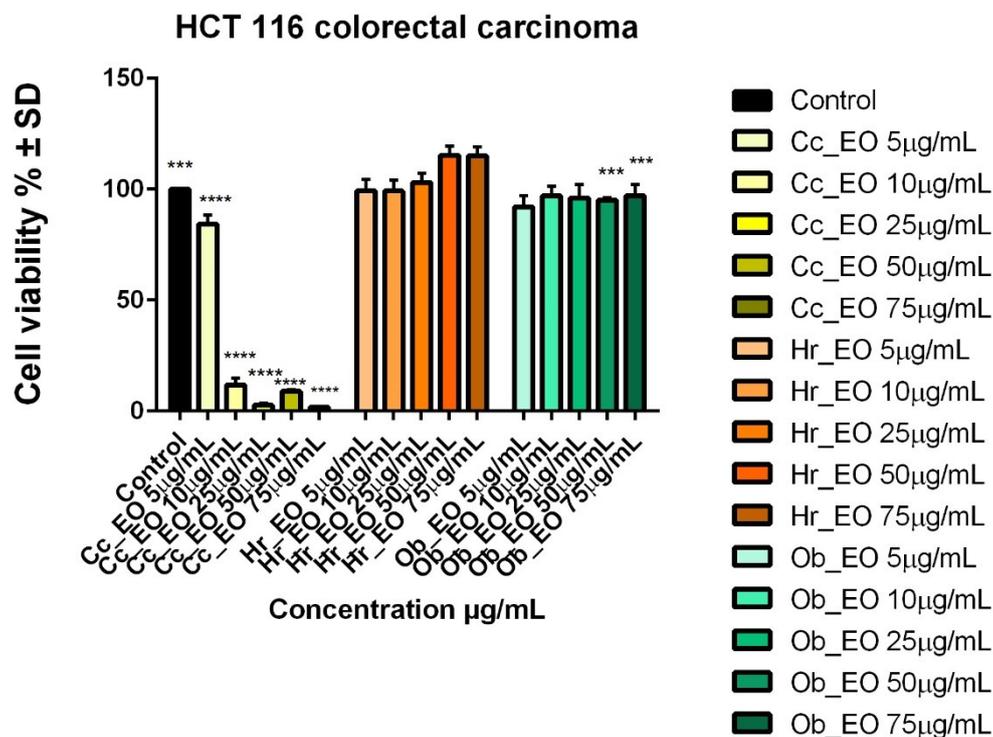


Figura 4. Evaluarea in vitro a efectului Cc\_EO, Hr\_EO și Ob\_EO (5, 10, 25, 50 și 75 µg/mL) pe care îl exercită asupra viabilității liniei celulare HCT 116 după 48 de ore de tratament prin aplicarea testului MTT. Diferențele statistice dintre grupul martor și grupul tratat au fost analizate prin aplicarea analizei ANOVA unidirecțională urmată de comparațiile multiple ale Dunett după testul (\*\*p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001)

Experimentul Hoechst a fost efectuat pentru a identifica dacă moartea celulară a avut loc prin apoptoză sau necroză. Prin urmare, celulele HT-29 și Caco-2 au fost stimulate timp de 48 de ore cu două concentrații diferite (5 și 75 µg/mL) de Hr\_EO, Cc\_EO și Ob\_EO, iar câteva modificări în aspectul nucleilor celulari au fost observate numai la cea mai mare concentrație testată—75 µg/mL. Hr\_EO a indus fragmentarea nucleară în celulele Caco-2 și deteriorarea membranei în celulele HT-29. Cc\_EO a indus dismorfologie vizibilă numai în celulele HT-29 (condensare și fragmentare nucleară). În celulele Caco-2, Ob\_EO a provocat fragmentarea nucleară, condensarea cromatinei și creșterea nucleară masivă, în timp ce în celulele HT-29 s-a observat condensarea cromatinei și fragmentarea nucleelor. Pe

HCT 116, cele mai mari concentrații din toate cele trei EO tind să inducă modificări ale formei nucleului celular, cu semne de fragmentare, în special în cazul Cc\_EO, unde celulele par a fi cel mai afectate. M\_EO și R\_EO au fost testate la 10 și 150  $\mu\text{g/mL}$ . Nucleii celulelor HCT 116 nu au fost afectați de cea mai scăzută concentrație a ambelor EO, totuși concentrația de 150  $\mu\text{g/mL}$  a declanșat unele semne specifice apoptotice (micșorare nucleară și fragmentare) precum cele descrise pentru soluția de staurosporină (control pozitiv pentru apoptoza).

După testul Scratch, s-a observat o inhibare semnificativă a migrației celulelor în cazul Hr\_EO, în urma tratamentului acestora cu o concentrație de 50  $\mu\text{g/mL}$  cu rate de vindecare a rănilor de 11,78% (HT-29) și 27,61% (Caco-2) care sunt mai mici în comparație cu rezultatele pe celulele martor (25,20%—HT-29 și 40,73%—Caco-2). Aceeași tendință a fost observată și în cazul Cc\_EO, însă la cea mai mare concentrație testată (50  $\mu\text{g/mL}$ ) acesta a prezentat o capacitate mult mai bună de inhibiție migratorie, în special pe celulele HT-29, cu o rată de vindecare a rănilor (WHR) de 3,40% . Ob\_EO nu a inhibat migrarea celulelor. După tratamentul cu M\_EO și R\_EO, inhibarea migrării celulelor a fost măsurată în urma tratamentului acestora cu M\_EO 5  $\mu\text{g/mL}$  pe HT-29 și Caco-2 și cu R\_EO pentru 50  $\mu\text{g/mL}$  pe HCT 116. Celelalte concentrații au prezentat tendință de stimulare, în special M\_EO 50  $\mu\text{g/mL}$  pe HCT 116 (35% mai puternic decât controlul-celule netratate).

Metoda de difuzie pe disc a fost efectuată pentru a evalua potențialul antimicrobian al M\_EO și R\_EO, iar datele au arătat că M\_EO, utilizat în concentrații de 10  $\mu\text{g/mL}$  (M\_EO\_1), 5  $\mu\text{g/mL}$  (M\_EO\_2) și 2,5  $\mu\text{g/mL}$  (M\_EO\_3) a manifestat importante capacități antimicrobiene. Activitatea antimicrobiană a M\_EO a fost mult mai pronunțată, în comparație cu R\_EO (testat la aceleași concentrații), în special pe bacteriile Gram-pozitive. Cel mai notabil efect antibacterian exercitat de M\_EO a fost împotriva bacteriilor Gram pozitive *Streptococcus pyogenes* [zona de inhibiție (IZ) = 33,33 mm, MIC (concentrație minimă inhibitorie) și MBC (concentrație minimă bactericidă) 1,25  $\mu\text{g/mL}$ , la 10  $\mu\text{g/mL}$ ] . R\_EO, utilizat în concentrație de 10  $\mu\text{g/mL}$ , a prezentat un efect mai pronunțat decât controlul pozitiv împotriva *Pseudomonas aeruginosa* (IZ = 20,33 mm, MIC și MBC 5  $\mu\text{g/mL}$  la 10  $\mu\text{g/mL}$ ).

Testul membranei corioalantoice pe ou de găină a fost aplicat pentru cele mai citotoxice trei uleiuri volatile (Hr\_EO, Cc\_EO și Ob\_EO) utilizate în cea mai mare concentrație (75  $\mu\text{g/mL}$ ), evaluate anterior in vitro cu ajutorul testului de viabilitate celulară. Se pot observa imaginile realizate membranei corioalantoidiană înainte și

după aplicarea substanțelor (Figura 5). În cazul dodecil sulfat de sodiu (SDS), în primul minut de la aplicare, s-au înregistrat efecte iritante puternice, precum liză, coagulare și hemoragie vasculară la nivelul membranei corioalantoide. În cazul uleiurilor volatile, acestea nu au provocat modificări majore la nivelul plexului vascular, singurul efect înregistrat fiind o ușoară coagulare intravasculară, înregistrată la sfârșitul celor cinci minute.

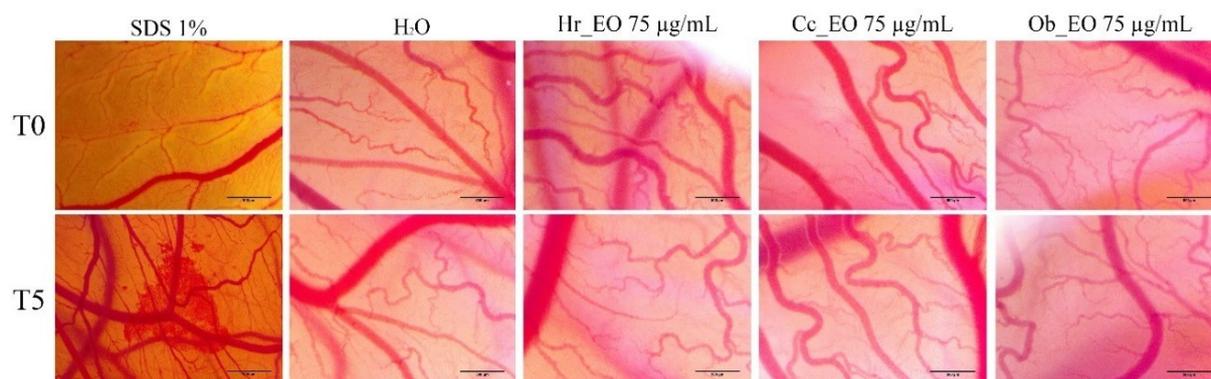


Figura 5. Imagini stereoscopice ale CAM-urilor inoculate cu martor negativ (apă distilată - H<sub>2</sub>O), control pozitiv (dodecil sulfat de sodiu - SDS) și probe de testare a uleiurilor esențiale (Hr\_EO, Cc\_EO și Ob\_EO).

## CONCLUZII

Obiectivul principal al prezentei teze a fost investigarea compoziției chimice, a activității antioxidante, antimicrobiene și anticancerigene a uleiurilor esențiale cumpărate din comerț, derivate din speciile de *H. rhamnoides*, *C. citratus*, *O. basilicum*, *M. piperita* și *R. officinalis*.

Rezultatele indică prezența fitocompușilor activi (estragol principalul compus identificat în Hr\_EO și Ob\_EO, alfa și beta-citral principalii compuși din Cc\_EO, mentol și mentonă în M\_EO și eucaliptol în R\_EO) cu o potență antioxidantă semnificativă, într-o concentrație- mod dependent de doză.

Pentru a identifica potențialul citotoxic, EO au fost testate pe celule sănătoase, pentru a dovedi nivelul de siguranță pe celulele non-canceroase. În urma studiilor efectuate se poate concluziona că EO luate în studiu nu interferează semnificativ cu morfologia și viabilitatea celulelor HaCaT, deci pot fi considerate sigure de utilizat.

În urma analizării eficienței pe celulele adenocarcinomului colorectal uman și a carcinomului, s-a observat că EO au scăzut viabilitatea, au redus confluența și au

indus caracteristici nucleare specifice apoptotice în celulele CRC; Hr\_EO și Cc\_EO au exercitat cel mai puternic efect anti-migrator.

Testul antimicrobian oferă dovezi că *M. piperita* EO a exercitat o activitate antimicrobiană puternică asupra *S. pyogenes*. În ceea ce privește *R. officinalis* EO, acesta a prezentat efecte antimicrobiene scăzute.

Rezultatele obținute pe membrana corioalantoică indică faptul că Hr\_EO, Cc\_EO și Ob\_EO au un impact relativ scăzut, ceea ce indică faptul că compușii analizați prezintă un profil ridicat de biosecuritate și toleranță crescută în plexul vascular.

Astfel, putem concluziona faptul că uleiurile analizate au potențial antioxidant, antibacterian și citotoxic și merită să fie analizate îndeaproape în vederea unei posibile îmbunătățiri a medicamentelor clasice utilizate în cazul CRC.