

**„VICTOR BABEȘ” UNIVERSITY OF MEDICINE AND
PHARMACY FROM TIMIȘOARA
FACULTY OF PHARMACY
ACADEMIC DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY-
PHYTOTHERAPY
DEPARTMENT II**

Fecker Ramona



ABSTRACT

Contributions to the pharmacognostic study of *Oenothera biennis* L.: molecular mechanisms and histopathological correlations

Scientific coordinator

Prof. Dr. CORINA DANCIU

**Timișoara
2025**

TABLE OF CONTENTS

1. INTRODUCTION	3
2. AIM AND OUTLINE.....	4
3. RESULTS	5
3.1. PREPARATION OF THE HYDROALCOHOLIC EXTRACT FROM THE AERIAL PARTS OF OB. DETERMINATION OF THE INDIVIDUAL POLYPHENOLS	5
3.2. DETERMINATION OF THE TOTAL POLYPHENOL CONTENT (TPC) AND TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY (TAC) OF THE OB EXTRACT	6
3.3. EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE OB EXTRACT	6
3.4. <i>IN VITRO</i> EVALUATION OF THE ANTIPROLIFERATIVE, ANTI- MIGRATORY, AND PRO-APOPTOTIC EFFECT OF THE OB EXTRACT ON THE HUMAN MELANOMA A375 CELL LINE	6
3.5. <i>IN OVO</i> EVALUATION OF THE EFFECT OF THE OB EXTRACT ON NORMAL ANGIOGENESIS AND TUMORAL ANGIOGENESIS.....	7
3.6. <i>IN VIVO</i> EVALUATION OF THE ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF THE OB EXTRACT IN A MOUSE MODEL OF INDUCED INFLAMMATION.....	8
3.7. DETERMINATION OF FATTY ACID CONTENT FOR OBO AND HAO. DETERMINATION OF LIPID OXIDATION DEGREE BY THE THIOBARBITURIC ACID (TBA) TEST	8
3.8. EVALUATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF THE OBO-HAO MIXTURE USING 3D SKIN TISSUE MODELS	9
3.9. EVALUATION OF THE OXIDATIVE STABILITY OF THE OBO-HAO MIXTURE BY DETERMINING PV, <i>p</i> -AV AND TOTOX	10
3.10. <i>IN OVO</i> EVALUATION OF THE BIOCOMPATIBILITY OF THE OBO-HAO MIXTURE BY THE HET-CAM TEST. ANALYSIS OF THE EFFECTS ON THE ANGIOGENESIS PROCESS.....	11
4. CONCLUSION.....	12

1. Introduction

In the current context of evidence-based medicine (EBM), herbal medicine is experiencing a scientific renaissance, supported by advances in pharmacognosy, phytochemistry, pharmacology and biotechnology. In this regard, *Oenothera biennis* L., also known by the common name of evening primrose, draws attention both for its therapeutic potential as well as for its nutritional value.

Different parts of the plant (roots, aerial parts, seeds, leaves) can be harnessed in the form of various types of extracts or by isolating active compounds, owing to its remarkable phytochemical profile (flavonoids, phenolic acids, tannins, polyunsaturated fatty acids) and the therapeutic actions that this species exhibits (antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic, anticancer, antimicrobial, hypolipidemic, antithrombotic). Moreover, the oil extracted from the seeds is known to be a rich source of polyunsaturated fatty acids (particularly linoleic and γ -linolenic acids) and antioxidant compounds. From an ethnobotanical point of view, the oil of *O. biennis* L. (OBO) has a remarkable history, being used by Native American tribes as a natural remedy for dermatological conditions, hemorrhoids, menstrual pain, fatigue, and convalescence. At present, numerous scientific studies highlight the remarkable therapeutic activities of this oil, such as its potent antioxidant action, antimicrobial effect, and anti-inflammatory capacity, aspects that justifies further investigation of this medicinal plant.

The ongoing scientific debate regarding its safety, along with current trends toward promoting an eco-friendly, health-oriented lifestyle, underlie the continuous search for safer alternatives to the synthetic additives frequently used (e.g. butylated hydroxytoluene), and the replacement of these with natural antioxidants that prevent lipid peroxidation and at the same time provide additional beneficial effects. The use of vegetable oils rich in unsaturated fats, such as sunflower oil

(*Helianthus annuus* L., family *Asteraceae*), in pharmaceutical, dermato-cosmetic, personal care, and food products raises the issue of oxidative stability, due to their susceptibility to lipid peroxidation and rancidity, which leads to the need for adding antioxidant compounds. OBO, rich in such compounds and known for its medicinal properties, stands out as a potential natural preservative for oil-based products.

Considering these aspects, the present research focused on the pharmacognostic study of *Oenothera biennis* L. in three complementary directions: (1) characterization of the phytochemical composition and evaluation of the biological activities of the *O. biennis* L. hydroalcoholic extract; (2) investigation of the oxidative stability and protective effects of a sunflower oil (HAO) and *O. biennis* L. oil (HAO-OBO) mixture on 3D skin tissue models; (3) evaluation of the potential of OBO as an additive with a natural preservative role for oil-based products, through *in vitro* and *in ovo* tests.

2. Aim and outline

The general aim of the research was to valorize the hydroalcoholic extract from the aerial parts of *O. biennis* (OB) and the oil obtained from its seeds in order to identify beneficial applications in the medical and technological fields.

The general part of the doctoral thesis comprises recent scientific data regarding 21st-century phytotherapy; the *Onagraceae* family and the genus *Oenothera*; a comprehensive characterization of the species *Oenothera biennis* L. (botanical description, phytochemical composition, notable pharmacological actions, effects on the skin); and it concludes with a detailed description of the skin and hematoxylin and eosin staining assay. The special part is focused on the three directions mentioned above:

(i) *Evaluation of the phytochemical composition and the biological activities of the OB hydroalcoholic extract.* This direction aimed at identifying the main chemical

compounds, determining the antioxidant potential, as well as testing the *in vitro*, *in ovo*, and *in vivo* biological effects of the extract (antimicrobial activity; antiproliferative, anti-migratory, and pro-apoptotic effect on A375 human melanoma cells; impact on angiogenesis; and anti-inflammatory action in a mouse model of induced inflammation);

(ii) *Investigation of the oxidative stability and protective effects of a HAO–OBO oil mixture on 3D skin tissue models*. This research direction aimed to evaluate the stability of sunflower oil by supplementing it with evening primrose oil, while also analyzing the compatibility of the mixture at the cutaneous level. The fatty acid composition of both oils was determined, the oxidation resistance of the mixture under controlled storage conditions was tested, and the irritant and phototoxic potential of the mixture was examined on 3D skin tissue models;

(iii) *Evaluation of OBO's potential as a natural alternative to synthetic preservatives in oil-based products*. The investigation of the OBO–HAO mixture was extended by including tests specific to the food and pharmaceutical industries: determination of oxidation indices (peroxide value PV, *p*-anisidine value *p*-AV, and total oxidation index TOTOX) for HAO with and without added OBO, as well as evaluation of the biological safety of this mixture through *in ovo* tests on the chick chorioallantoic membrane (CAM).

3. Results

3.1. PREPARATION OF THE HYDROALCOHOLIC EXTRACT FROM THE AERIAL PARTS OF OB. DETERMINATION OF THE INDIVIDUAL POLYPHENOLS

The extract from the dried aerial parts of *Oenothera biennis* L. was obtained by extracting 10 g of pulverized plant material with 50 mL of 70% ethanol in an

ultrasonic bath (30 min, 40 kHz, 50 °C), followed by vacuum filtration and evaporation with a rotavapor (250 bar, 60 °C, 150 rpm), then storage at –2 °C until use. The plant material originated from the southern part of Tunisia (Djerba). The phytochemical profile determined by LC indicated the presence of the following polyphenols: gallic acid (1.064 mg/g), caffeic acid (11.525 mg/g), epicatechin (78.40 mg/g), *p*-coumaric acid (0.26 mg/g), ferulic acid (1.250 mg/g), rutin (3.528 mg/g), and rosmarinic acid (1.601 mg/g).

3.2. DETERMINATION OF THE TOTAL POLYPHENOL CONTENT (TPC) AND TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY (TAC) OF THE OB EXTRACT

The total polyphenol content, evaluated by the Folin–Ciocâlteu method, was 631.496 µg GAE/mL extract, and the antioxidant activity of the extract, determined by the CUPRAC method, was 7258.67 µmol Trolox/g extract.

3.3. EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE OB EXTRACT

The antimicrobial activity of the OB extract was evaluated on cultures of Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*), Gram-negative bacteria (*Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*), and fungi (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*), using disk diffusion and microdilution methods. A bacteriostatic effect was observed against all tested bacterial strains (MIC = 200 µg/mL). The OB extract exhibited bactericidal action only against *Staphylococcus aureus* (MBC = 200 µg/mL) and fungicidal action against *Candida* spp. (MFC = 100 µg/mL).

3.4. IN VITRO EVALUATION OF THE ANTIPROLIFERATIVE, ANTI-MIGRATORY, AND PRO-APOPTOTIC EFFECT OF THE OB EXTRACT ON THE HUMAN MELANOMA A375 CELL LINE

The anticancer effects of the OB extract were investigated on the human melanoma A375 cell line, using concentrations of 10, 30, and 60 µg/mL.

The antiproliferative effect was tested by the MTT assay. The OB extract induced a significant inhibition of cell viability at the highest concentration tested (60 µg/mL), causing a $34.82 \pm 2.721\%$ inhibition of cell growth.

Additionally, the extract's potential to inhibit cell migration was evaluated by the scratch assay. It was demonstrated that the extract inhibits the migratory capacity of A375 cells in a dose-dependent manner. After 24 hours, the 60 µg/mL dose of OB extract resulted in a wound closure rate of $55.32 \pm 3.09\%$.

In line with the decrease in viability, at higher concentrations, the extract also showed a pro-apoptotic effect. DAPI nuclear staining revealed the appearance of morphological features of apoptosis (chromatin condensation, nuclear fragmentation).

High-resolution respirometry studies were also conducted to evaluate mitochondrial respiratory function. It was found that treatment with the highest dose impaired the mitochondrial function of the tumor cells, resulting in an inhibitory effect on active respiration and a reduction of the maximal respiratory capacity.

3.5. *IN OVO* EVALUATION OF THE EFFECT OF THE OB EXTRACT ON NORMAL ANGIOGENESIS AND TUMORAL ANGIOGENESIS

The antiangiogenic effects of the OB extract (60 µg/mL) were evaluated *in ovo* using the chick chorioallantoic membrane (CAM) assay. Signs of vascular impairment manifested as a reduction in capillary caliber and the observation of fewer honeycomb-shaped interconnections (characteristic of that developmental stage). This effect became even more pronounced at 72 hours, leading to a subtle, irregular architecture of the vasculature. After inoculating A375 melanoma cells on developing CAMs, the tumor cell distribution and the vascular response to exposure

to the OB extract were assessed. Initial observations were possible at 24 hours post-inoculation, but significant changes were noted at 48 and 72 hours post-inoculation. In the OB extract-treated group, a limited tumor cell distribution, a moderate angiogenic reaction, and a reduced number of newly formed capillaries were observed. In conclusion, the OB extract inhibits both the growth of normal blood vessels and that stimulated by tumor cells, suggesting an antiangiogenic potential.

3.6. *IN VIVO* EVALUATION OF THE ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF THE OB EXTRACT IN A MOUSE MODEL OF INDUCED INFLAMMATION

The anti-inflammatory activity of the OB extract was examined in an *in vivo* skin inflammation model. An auricular inflammation was induced with TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) in SKH1 laboratory mice. The results demonstrated that the extract exerts a local anti-inflammatory effect, evidenced by a reduction in edema and cellular infiltration in the treated ear tissue. This effect was also confirmed histologically. The tissues showed reduced tissue thickening and a moderate inflammatory infiltrate, indicating a diminution of the inflammation signs.

3.7. DETERMINATION OF FATTY ACID CONTENT FOR OBO AND HAO. DETERMINATION OF LIPID OXIDATION DEGREE BY THE THIOBARBITURIC ACID (TBA) TEST

The fatty acid composition of each oil was characterized by gas chromatography. For HAO, the detected saturated fatty acids (SFA) were palmitic acid (7.179%), stearic acid (3.586%), eicosanoic acid (0.138%), and docosanoic acid (0.548%). The monounsaturated fatty acids (MUFA) included palmitoleic acid (0.158%) and oleic acid (28.249%), while the polyunsaturated fatty acids (PUFA) included linoleic acid (59.941%) and linolenic acid (0.208%).

For OBO, the detected SFA were myristic acid (0.325%), pentadecylic acid (0.281%), palmitic acid (7.2%), stearic acid (2.88%), and arachidic acid (0.275%). Regarding MUFA, a lower proportion was observed (8.196%), the predominant ones being cis-oleic acid (7.175%), oleic acid (0.558%), and 11-eicosenoic acid (0.210%). The highest content was recorded for PUFA (82.247%), with the most important proportions being linoleic acid (72.093%), arachidonic acid (9.812%), and linolenic acid (0.233%).

To assess oxidative stability, the measurement of oxidation products formed over time in stored oils was carried out using the TBA test. Sunflower oil samples were prepared: pure HAO, HAO + BHT 200 ppm, HAO + OBO 100, 200, 300, and 500 ppm. All samples were stored at room temperature, and at regular intervals (1, 5, 10, 20, 25, and 30 days), the content of thiobarbituric acid-reactive substances was determined, expressed in malondialdehyde (MDA) equivalents, as an indicator of the degree of lipid peroxidation. The results showed that the addition of OBO provides the mixture with significant and dose-dependent antioxidant protection. For the HAO + OBO 500 ppm sample, the oxidation level after 30 days was similar to that of the HAO + BHT 200 ppm sample (24.517 μg MDA/g and 24.583 μg MDA/g, respectively), indicating the possibility of using 500 ppm doses of OBO to replace the synthetic antioxidant BHT.

3.8. EVALUATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF THE OBO-HAO MIXTURE USING 3D SKIN TISSUE MODELS

To evaluate the protective effect of the OBO–HAO mixture, 3D skin tissue models (EpiDerm) were used. The protocol included two standardized OECD tests: the skin irritation test (OECD TG 439) and the phototoxicity test (OECD TG 498). The tested samples were: HAO, OBO, HAO + BHT 200 ppm, HAO + OBO 200 ppm.

For the phototoxicity test, the same samples were analyzed in the presence and absence of UVA irradiation.

The results obtained indicated very good biocompatibility of the oil mixture with the skin tissue. All tested samples showed viability above 50%, which confirms the absence of an irritant effect, according to the OECD 439 protocol. The photoprotective effect of the OBO–HAO mixture was also evaluated. In the phototoxicity test, the 3D tissues treated with HAO + OBO 200 ppm and exposed to UV radiation did not show significant decreases in viability (98.7%); a similar result was observed for the HAO + BHT 200 ppm mixture (96.1%). On the other hand, tissues treated with HAO and exposed to UVA exhibited a phototoxic effect, with cell viability decreasing to 30.9%.

The histopathological observations of the treated EpiDerm tissues support the results mentioned above. In the irritation model, the specimen treated with HAO + OBO 200 ppm produced slight parakeratosis, and the specimen treated with OBO showed a slight increase in the layer of protective granular cells. In the phototoxicity model, the specimen exposed to HAO + OBO 200 ppm + UVA exhibited thickening of the stratum corneum along with hypertrophy. Similar effects were observed in the specimen exposed to HAO + BHT 200 ppm + UVA. As expected based on the viability results, the specimen exposed to HAO + UVA showed necrosis of the granular and spinous layers, while the one exposed to OBO + UVA led to thickening of the stratum corneum and hypertrophy.

In conclusion, the study confirms the protective effect of the mixture of tested oils on the 3D skin tissue models used for the evaluation of irritation and phototoxicity.

3.9. EVALUATION OF THE OXIDATIVE STABILITY OF THE OBO-HAO MIXTURE BY DETERMINING PV, *p*-AV AND TOTOX

Tests were conducted to analyze the oxidative stability of the OBO–HAO mixture by determining the peroxide value (PV), the *p*-anisidine value (*p*-AV), and the total oxidation index (TOTOX). Sunflower oil samples were prepared as follows: pure HAO, HAO + BHT 200 ppm, HAO + OBO at 100, 200, 300, and 500 ppm. Once again, a strong antioxidant effect of OBO was observed. The PV decreased as the added dose of OBO increased. At 500 ppm OBO, the PV measured after 30 days was similar to that of the HAO + BHT 200 ppm sample (12.583 meq O₂/kg oil, respectively 12.246 meq O₂/kg oil). The same trend was observed for *p*-AV and, implicitly, for TOTOX. The higher the OBO dose, the lower the TOTOX values. In conclusion, at the maximum tested concentration (500 ppm), OBO was able to exert a preservative effect on HAO comparable to that of the synthetic antioxidant.

3.10. *IN OVO* EVALUATION OF THE BIOCOMPATIBILITY OF THE OBO-HAO MIXTURE BY THE HET-CAM TEST. ANALYSIS OF THE EFFECTS ON THE ANGIOGENESIS PROCESS

The biocompatibility of the HAO + OBO 500 ppm mixture, as well as of the individual samples, was evaluated by the HET-CAM test. The results showed that the samples containing OBO do not induce an irritant effect on the CAM. Both OBO and the OBO–HAO combination presented an irritation score of 0, highlighting the absence of any toxic reaction, compared to the 0.5% SLS solution used as a positive control, which recorded an irritation score of 17.5 and the immediate appearance of diffuse hemorrhages. Therefore, OBO at a concentration of 500 ppm is non-toxic and non-irritant for CAM, suggesting good *in vivo* tolerability.

The evaluation of the effect on angiogenesis showed that HAO did not induce significant changes in vascular development, maintaining an intense and normal angiogenic process. HAO + BHT 200 ppm led to normal vascularization, but with isolated areas showing less pronounced ramifications and mild hyperemic

reactions. OBO 500 ppm produced a slight reduction in the number of ramifications and a narrower appearance of the capillaries. In contrast, HAO + OBO 500 ppm generated functional angiogenesis, with minor modifications and newly formed capillaries, indicating good vascular tolerability.

Histopathological analysis of the CAM was then performed. Treatment with HAO did not produce alterations in the CAM structure, with only slight thinning of the mesenchymal layer observed. In contrast, the application of HAO + BHT 200 ppm induced a slight irritant effect — thickening of the mesodermal layer due to edema and increased intravascular influx of inflammatory cells was observed. Treatment with OBO 500 ppm caused a significant decrease in the number of blood vessels in the CAM sections and changes in the architecture of the mesodermal layer. On the other hand, treatment with HAO + OBO 500 ppm did not affect the architecture of the mesodermal layer and caused a slight decrease in the number of blood vessels.

4. Conclusion

The presented research provides a comprehensive perspective on the valorization of *Oenothera biennis* L. as a source of bioactive compounds with multiple applications. The hydroalcoholic extract from the aerial parts of OB proved to be rich in antioxidant polyphenols and exhibited a wide range of important biological activities *in vitro*, *in ovo*, and *in vivo*. These results may serve as a premise for the future development of extended preclinical studies and, possibly, clinical trials, in order to capitalize on the potential of this extract.

The oil obtained from OB seeds proved valuable as a potential natural additive for the prevention of oxidative degradation of vegetable oils. It was demonstrated that supplementation of sunflower oil with evening primrose oil significantly delays its oxidation, with an effect comparable to that of a synthetic antioxidant. Moreover, its use is safe and well-tolerated.

These conclusions highlight the versatility and added value of both the extract as well as the fat oil obtained from *Oenothera biennis* L. The line of research presented in this thesis contributes to the consolidation of scientific data on this species and opens perspectives for the extensive use of this plant in industries such as pharmaceutical, dermato-cosmetic and food.

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „VICTOR
BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE FARMACIE
CATEDRA UNIVERSITARĂ DE FARMACOGNOZIE-
FITOTERAPIE
DEPARTAMENT II

Fecker Ramona



REZUMAT

Contribuții la studiul farmacognostic al speciei *Oenothera biennis*
L.: mecanisme moleculare și corelații histopatologice

Conducător de doctorat

Prof. Univ. Dr. CORINA DANCIU

Timișoara
2025

Cuprins

1. INTRODUCERE	3
2. SCOP ȘI CONTRIBUȚII.....	4
3. REZULTATE	5
3.1. REALIZAREA EXTRACTULUI HIDROALCOOLIC DIN PĂRȚILE AERIENE ALE OB. DETERMINAREA POLIFENOLILOR INDIVIDUALI	5
3.2. DETERMINAREA CONȚINUTULUI TOTAL DE POLIFENOLI (TPC) ȘI A CAPACITĂȚII TOTALE ANTIOXIDANTE (TAC) A EXTRACTULUI OB	6
3.3. EVALUAREA ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A EXTRACTULUI OB...	6
3.4. EVALUAREA <i>IN VITRO</i> A EFECTULUI ANTIPROLIFERATIV, ANTI-MIGRATOR ȘI PRO-APOTOTIC A EXTRACULUI OB ASUPRA LINIEI CELULARE DE MELANOM UMAN A375	6
3.5. EVALUAREA <i>IN OVO</i> A EFECTULUI EXTRACTULUI OB ASUPRA PROCESULUI NORMAL DE ANGIOGENEZĂ, RESPECTIV ASUPRA ANGIOGENEZEI ÎN CONDIȚII TUMORALE.....	7
3.6. EVALUAREA <i>IN VIVO</i> A EFECTULUI ANTIINFLAMATOR AL EXTRACTULUI OB ÎN CONDIȚII DE INFLAMAȚIE INDUSĂ PE ȘOARECI DE LABORATOR	8
3.7. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE ACIZI GRAȘI PENTRU OBO, RESPECTIV HAO. DETERMINAREA GRADULUI DE OXIDARE A LIPIDELOR PRIN TESTUL ACIDULUI TIOBARBITURIC (TBA).....	8
3.8. EVALUAREA EFECTULUI PROTECTIV AL AMESTECULUI OBO-HAO FOLOSIND MODELE 3D DE ȚESUT CUTANAT	9
3.9. EVALUAREA STABILITĂȚII OXIDATIVE A AMESTECULUI OBO-HAO PRIN DETERMINAREA PV, <i>p</i> -AV ȘI TOTOX	11
3.10. EVALUAREA <i>IN OVO</i> A BIOCOMPATIBILITĂȚII AMESTECULUI OBO-HAO PRIN TESTUL HET-CAM. ANALIZA EFECTELOR ASUPRA PROCESULUI DE ANGIOGENEZĂ	11
4. CONCLUZII.....	12

1. Introducere

În contextul actual al medicinei bazate pe dovezi (EBM – Evidence-Based Medicine), fitoterapia cunoaște o renaștere științifică, susținută de progresele în farmacognozie, fitochimie, farmacologie și biotehnologie. În acest sens, *Oenothera biennis* L., cunoscută și sub numele popular de luminița-noptii, atrage atenția atât prin potențialul său terapeutic, cât și prin valoarea nutrițională.

Diferite părți ale plantei (rădăcini, partea aeriană, semințe, frunze) pot fi valorificate sub forma diverselor tipuri de extracte sau prin izolarea compușilor activi, datorită profilului fitochimic remarcabil (flavonoide, acizi fenolici, taninuri, acizi grași polinesaturați) și a acțiunilor terapeutice pe care această specie le prezintă (antioxidantă, antiinflamatoare, antidiabetică, anticanceroasă, antimicrobiană, hipolipemiantă, antitrombotică).

Mai mult, uleiul extras din semințe este cunoscut ca fiind o sursă bogată de acizi grași polinesaturați (cu precădere acizii linoleic și γ -linolenic) și compuși antioxidanți. Din punct de vedere etnobotanic, uleiul de *O. biennis* L. (OBO) are o istorie remarcabilă, fiind folosit de triburile nativ americane ca remediu natural în afecțiuni dermatologice, hemoroizi, dureri menstruale, oboseală și convalescență. În prezent, sunt numeroase studii științifice care evidențiază activitățile terapeutice remarcabile ale acestui ulei, cum ar fi acțiunea antioxidantă, efectul antimicrobian și capacitatea antiinflamatoare, aspect ce justifică continuarea investigării sale.

Dezbaterea la nivel științific privind siguranța, alături de tendințele actuale legate de promovarea unui stil de viață ecologic și orientat spre sănătate, stau la baza căutării continue a unor alternative mai sigure pentru aditivii sintetici utilizați frecvent, precum butilhidroxitoluenul (BHT), și a înlocuirii acestora cu antioxidanți naturali care previn peroxidarea lipidelor și, totodată, oferă efecte benefice suplimentare. Folosirea în produse farmaceutice, dermato-cosmetice, alimentare, a

uleiurilor vegetale bogate în grăsimi nesaturate, cum este uleiul de floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L., familia *Asteraceae*) ridică problema stabilității oxidative, din cauza susceptibilității la peroxidare lipidică și râncezire, ceea ce conduce la necesitatea adăugării de compuși cu rol antioxidant. OBO, bogat în astfel de compuși și recunoscut pentru proprietățile sale medicinale, se remarcă drept un posibil conservant natural pentru produsele pe bază de ulei.

Având în vedere aceste aspecte, cercetarea de față s-a concentrat pe studiul farmacognostic al speciei *Oenothera biennis* L. în trei direcții complementare: (1) caracterizarea compoziției fitochimice și evaluarea activităților biologice ale extractului hidroalcoolic de *O. biennis* L.; (2) investigarea stabilității oxidative și a efectelor protectoare ale unui amestec de ulei de floarea-soarelui (HAO) și ulei de *O. biennis* L. (HAO-OBO) pe modele 3D de țesuturi cutanate; (3) evaluarea potențialului OBO ca aditiv cu rol de conservant natural pentru produse uleioase, prin teste *in vitro* și *in ovo*.

2. Scop și contribuții

Studiul farmacognostic al speciei *Oenothera biennis* L. a fost reprezentat de valorificarea extractului hidroalcoolic din părțile aeriene de OB și a uleiului obținut din semințele de OB în vederea identificării unor aplicații benefice în domeniul medical și tehnologic.

Partea generală a tezei de doctorat cuprinde date științifice recente cu privire la fitoterapia în secolul XXI; familia *Onagraceae* și genul *Oenothera*; caracterizarea speciei *Oenothera biennis* L.: descriere botanică, compoziția fitochimică, acțiunile farmacologice remarcabile, efectele la nivelul pielii; și se încheie cu descrierea detaliată a histologiei tegumentului și prezentarea tehnicii HE.

Partea specială se axează pe cele trei direcții menționate anterior:

(i) *Evaluarea compoziției fitochimice și a activităților biologice ale extractului hidroalcoolic de OB.* S-a urmărit identificarea principalilor compuși chimici, determinarea potențialului antioxidant, precum și testarea efectelor biologice *in vitro*, *in ovo* și *in vivo* (activitatea antimicrobiană, efectul antiproliferativ, anti-migrator, și pro-apoptotic asupra celulelor de melanom uman A375, impactul asupra angiogenezei și acțiunea antiinflamatoare într-un model de inflamație indusă șoarecilor de laborator;

(ii) *Evaluarea stabilității oxidative și a biocompatibilității amestecului OBO-HAO.* Această direcție de cercetare își propune evaluarea stabilității uleiului de floarea-soarelui prin suplimentarea cu ulei de luminița-noptii, analizând în același timp și compatibilitatea amestecului la nivel cutanat. S-a determinat compoziția în acizi grași a celor două uleiuri, testarea rezistenței la oxidare a amestecului în condiții de stocare controlată și examinarea potențialului iritant și fototoxic pe modele 3D de țesut cutanat;

(iii) *Utilizarea OBO ca alternativă naturală pentru conservanții sintetici în produse pe bază de ulei.*

S-a extins investigarea amestecului OBO-HAO, prin includerea de teste specifice industriei alimentare și farmaceutice: determinarea indicilor de oxidare (valoarea peroxidică PV, valoarea *p*-anisidinei *p*-AV și indicele de oxidare totală TOTOX) ai HAO cu și fără adaos de OBO, precum și evaluarea siguranței biologice a acestui amestec prin teste *in ovo* pe membrana corioalantoidiană (CAM) a oului de găină.

În elaborarea acestei teze de doctorat au fost utilizate metode experimentale de actualitate, validate și recunoscute la nivel internațional de comunitatea științifică.

3. Rezultate

3.1. REALIZAREA EXTRACTULUI HIDROALCOOLIC DIN PĂRȚILE AERIENE ALE OB. DETERMINAREA POLIFENOLILOR INDIVIDUALI

Extractul din părțile aeriene uscate de *Oenothera biennis* L. a fost obținut prin extracția a 10 g produs vegetal pulverizat cu 50 mL cu etanol 70% în baie ultrasonică (30 min, 40 kHz, 50 °C), urmată de filtrare sub vid și evaporare la rotavapor (250 bari, 60 °C, 150 rpm), apoi păstrare la -2 °C până la utilizare. Materialul vegetal (identificat în cadrul laboratorului de farmacognozie) provine din partea de sud a Tunisiei, de pe insula Djerba.

Profilul fitochimic determinat prin LC a indicat prezența următorilor polifenoli: acid galic (1.064 mg/g), acid cafeic (11.525 mg/g), epicatechina (78.40 mg/g), acid cumaric (0.26 mg/g), acid ferulic (1.250 mg/g), rutin (3.528 mg/g) și acid rozmarinic (1.601 mg/g).

3.2. DETERMINAREA CONȚINUTULUI TOTAL DE POLIFENOLI (TPC) ȘI A CAPACITĂȚII TOTALE ANTIOXIDANTE (TAC) A EXTRACTULUI OB

Conținutul total de polifenoli, evaluat prin metoda Folin-Ciocalteu, a fost de 631.496 μg GAE/mL extract, iar activitatea antioxidantă a extractului, determinată prin metoda CUPRAC, a fost de 7258,67 μmol Trolox/g extract.

3.3. EVALUAREA ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A EXTRACTULUI OB

Activitatea antimicrobiană a extractului OB a fost evaluată pe culturi de bacterii Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*), Gram-negative (*Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) și fungi (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*), utilizând metodele standard de difuziune pe disc și microdiluție. S-a

observat un efect bacteriostatic asupra tuturor tulpinilor bacteriene testate (MIC = 200 $\mu\text{g/mL}$). Extractul OB a prezentat acțiune bactericidă doar împotriva *Staphylococcus aureus* (MBC = 200 $\mu\text{g/mL}$) și fungicidă împotriva *Candida* spp. (MFC = 100 $\mu\text{g/mL}$).

3.4. EVALUAREA *IN VITRO* A EFECTULUI ANTIPROLIFERATIV, ANTI-MIGRATOR ȘI PRO-APOTOTIC A EXTRACULUI OB ASUPRA LINIEI CELULARE DE MELANOM UMAN A375

Efectul anticanceros *in vitro* al extractului OB a fost investigat pe linia celulară de melanom uman A375, folosind concentrațiile 10, 30 și 60 $\mu\text{g/mL}$.

Efectul antiproliferativ a fost testat prin metoda MTT. Extractul OB a indus o inhibare semnificativă a viabilității celulare la cea mai mare concentrație testată (60 $\mu\text{g/mL}$), determinând o inhibare a creșterii celulare de $34.82 \pm 2.721\%$.

Totodată, s-a evaluat potențialul de inhibare a migrării celulare prin metoda Scratch assay. S-a demonstrat că extractul inhibă capacitatea de migrare a celulelor A375 în mod dependent de doză. După 24 de ore, doza de 60 $\mu\text{g/mL}$ extract OB a determinat o rată de închidere a rănii de $55.32 \pm 3.09\%$.

În concordanță cu scăderea viabilității, la concentrații crescute extractul a prezentat și efect pro-apoptotic. Colorarea nucleară DAPI a evidențiat apariția caracteristicilor morfologice ale apoptozei (condensare de cromatină, fragmentarea nucleilor).

S-au realizat și studii de respirometrie de înaltă rezoluție pentru evaluarea funcției respirației mitocondriale. S-a constatat că tratamentul cu doza cea mai crescută afectează funcția mitocondrială a celulelor tumorale, determinând un efect inhibitor asupra respirației active și o reducere a capacității respiratorii maxime.

3.5. EVALUAREA *IN OVO* A EFECTULUI EXTRACTULUI OB ASUPRA PROCESULUI NORMAL DE ANGIOGENEZĂ, RESPECTIV ASUPRA ANGIOGENEZEI ÎN CONDIȚII TUMORALE

Efectele antiangiogenice ale extractului OB (60 µg/mL) au fost evaluate *in ovo* folosind testul pe membrana corioalantoidă de găină (CAM). Semnele de afectare vasculară s-au manifestat prin reducerea calibrului capilarelor și observarea unui număr mai mic de interconexiuni în formă de fagure (caracteristice acestui stadiu de dezvoltare). Efectul progresiv a fost perceput ca fiind și mai accentuat la 72 de ore, inducând un aspect discret, neregulat al arhitecturii vasculare. După inocularea celulelor de melanom A375 pe membranele CAM în curs de dezvoltare, s-a evaluat distribuția celulară tumorală și reacția vasculară rezultată în urma expunerii la extractul OB. Primele observații au putut fi realizate la 24 de ore de la inoculare, însă modificări semnificative au fost remarcate la 48 și 72 de ore post-inoculare. În cazul tratamentului cu extractul OB s-a observat o distribuție celulară limitată, o reacție angiogenă moderată și un număr redus de capilare nou formate. În concluzie, extractul OB inhibă atât creșterea vaselor sanguine normale, cât și pe cea stimulată de celulele tumorale, sugerând potențial antiangiogenic.

3.6. EVALUAREA *IN VIVO* A EFECTULUI ANTIINFLAMATOR AL EXTRACTULUI OB ÎN CONDIȚII DE INFLEMAȚIE INDUSĂ PE ȘOARECI DE LABORATOR

S-a examinat activitatea antiinflamatoare a extractului OB într-un model *in vivo* de inflamație cutanată. S-a utilizat un protocol de inflamație auriculară indusă cu TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat) la șoareci de laborator SKH1. Rezultatele au demonstrat că extractul exercită un efect antiinflamator local, concretizat prin reducerea edemului și a infiltrației celulare în țesutul urechii tratate.

Acest efect a fost confirmat și histologic. Țesuturile au prezentat diminuarea semnelor de inflamație—îngroșare tisulară redusă și infiltrat inflamator moderat.

3.7. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE ACIZI GRAȘI PENTRU OBO, RESPECTIV HAO. DETERMINAREA GRADULUI DE OXIDARE A LIPIDELOR PRIN TESTUL ACIDULUI TIOBARBITURIC (TBA)

S-a caracterizat compoziția în acizi grași a fiecărui ulei prin cromatografie gazoasă. Pentru uleiul de floarea-soarelui (HAO), acizii grași saturați (SFA) detectați au fost acidul palmitic (7.179%), acidul stearic (3.586%), acidul eicosanoic (0.138%) și acidul docosanoic (0.548%). Acizii grași mononesaturați (MUFA) au inclus acidul palmitoleic (0.158%) și acidul oleic (28.249%), iar acizii grași polinesaturați (PUFA) au cuprins acidul linoleic (59.941%) și acidul linolenic (0.208%).

Pentru uleiul de luminița-noptii (OBO), SFA detectați au fost acidul miristic (0.325%), acidul pentadecilic (0.281%), acidul palmitic (7.2%), acidul stearic (2.88%) și acidul arahidic (0.275%). În ceea ce privește MUFA, s-a observat o proporție mai redusă (8.196%), predominanți fiind acidul oleic în formă cis (7.175%), acidul oleic (0.558%) și acidul 11-eicosenoic (0.210%). Conținutul cel mai ridicat a fost înregistrat pentru PUFA (82.247%), cele mai importante proporții fiind cele de acid linoleic (72.093%), acid arahidonic (9.812%) și acid linolenic (0.233%).

Pentru aprecierea stabilității oxidative, s-a recurs la măsurarea produșilor de oxidare formați în timp în uleiurile depozitate (testul TBA). S-au pregătit probele de ulei de floarea-soarelui: HAO pur, HAO + BHT 200 ppm, HAO + OBO 100, 200, 300 și 500 ppm. Toate probele au fost stocate la temperatura camerei, iar la intervale regulate (1, 5, 10, 20, 25 și 30 zile) s-a determinat conținutul de substanțe reactive cu acidul tiobarbituric, exprimat în echivalenți de malondialdehidă (MDA), ca indicator al gradului de peroxidare lipidică. Rezultatele au arătat că adăugarea OBO

conferă amestecului o protecție antioxidantă semnificativă și doză-dependentă. Pentru proba HAO + OBO 500 ppm, gradul de oxidare după 30 de zile a fost similar cu al probei HAO + BHT 200 ppm (24.517 μg MDA/g, respectiv 24.583 μg MDA/g), ceea ce indică posibilitatea de folosire a dozelor de 500 ppm OBO pentru înlocuirea antioxidantului sintetic BHT.

3.8. EVALUAREA EFECTULUI PROTECTIV AL AMESTECULUI OBO-HAO FOLOSIND MODELE 3D DE ȚESUT CUTANAT

Pentru evaluarea efectului protectiv al amestecului OBO-HAO, s-au utilizat modele de țesuturi cutanate 3D (EpiDerm). Protocolul a inclus două teste standardizate OECD: testul de iritație cutanată (OECD TG 439) și testul de fototoxicitate (OECD TG 498). Probele testate au fost: HAO, OBO, HAO + BHT 200 ppm, HAO + OBO 200 ppm. Pentru testul de fototoxicitate, aceleași probe au fost analizate în prezența, respectiv în absența iradiației cu UVA.

Rezultatele obținute au indicat o biocompatibilitate foarte bună a amestecului de uleiuri cu țesutul cutanat. Toate probele testate au prezentat o viabilitate peste 50%, lucru ce confirmă lipsa efectului iritant, conform protocolului OECD 439. De asemenea, a fost evaluat și efectul fotoprotector al amestecului OBO-HAO. În cazul testului de fototoxicitate, țesuturile 3D tratate cu HAO + OBO 200 ppm și expuse la radiație UV nu au prezentat scăderi semnificative ale viabilității (98.7%); în mod similar s-a prezentat și amestecul HAO + BHT 200 ppm (96.1%). În schimb, țesuturile tratate cu HAO și expuse la UVA au exercitat efect fototoxic, viabilitatea celulelor ajungând la 30.9%.

Observațiile histopatologice ale țesuturilor EpiDerm tratate susțin rezultatele expuse mai sus. În cazul modelului de iritație, specimenul tratat cu HAO + OBO 200 ppm a produs o ușoară parakeratoză, iar specimenul tratat cu OBO a arătat o ușoară creștere a stratului de celule granulare cu rol protector. În cazul modelului

de fototoxicitate, specimenul expus la HAO + OBO 200 ppm + UVA a prezentat o îngroșare a stratului cornos, alături de hipertrofie. Efecte similare s-au observat și pentru specimenul expus la HAO + BHT 200 ppm + UVA. Specimenul expus la HAO + UVA a prezentat necroza stratului granulos și a celui spinos, pe când cel expus la OBO + UVA a determinat îngroșarea stratului cornos și hipertrofie.

În concluzie, studiul confirmă efectul protector al amestecului dintre uleiurile testate asupra modelelor 3D de țesut cutanat utilizate pentru evaluarea iritației și fototoxicității.

3.9. EVALUAREA STABILITĂȚII OXIDATIVE A AMESTECULUI OBO-HAO PRIN DETERMINAREA PV, *p*-AV ȘI TOTOX

S-au efectuat teste în vederea analizării stabilității oxidative a amestecului OBO-HAO prin determinarea valorii peroxidului (PV), a valorii *p*-anisidinei (*p*-AV) și a indicelui oxidare totală TOTOX. S-au pregătit probele de ulei de floarea-soarelui: HAO pur, HAO + BHT 200 ppm, HAO + OBO 100, 200, 300 și 500 ppm. S-a constatat din nou un efect antioxidant puternic al OBO. PV a scăzut pe măsură ce doza de OBO adăugată a crescut. La 500 ppm OBO, PV măsurat după 30 de zile a fost similar cu cel al probei HAO + BHT 200 ppm (12.583 meq O₂/kg ulei, respectiv 12.246 meq O₂/kg ulei). Aceeași tendință s-a observat și pentru *p*-AV și, implicit, pentru TOTOX. Cu cât doza de OBO este mai mare, cu atât valorile TOTOX sunt mai mici. În concluzie, la concentrația maximă testată (500 ppm), OBO a reușit să exercite un efect conservant asupra HAO similar cu cel al antioxidantul sintetic.

3.10. EVALUAREA *IN OVO* A BIOCOMPATIBILITĂȚII AMESTECULUI OBO-HAO PRIN TESTUL HET-CAM. ANALIZA EFECTELOR ASUPRA PROCESULUI DE ANGIOGENEZĂ

Biocompatibilitatea amestecului HAO + OBO 500 ppm, respectiv a probelor individuale, a fost evaluată prin testul HET-CAM. Rezultatele au arătat că probele ce conțin OBO nu induc efect iritant asupra CAM. Atât OBO, cât și combinația OBO-HAO au prezentat un scor de iritație de 0, evidențiind absența oricărei reacții toxice, comparativ cu soluția SLS 0.5% folosită drept control pozitiv, care a înregistrat un scor de iritație de 17.5 și apariția imediată de hemoragii difuze. Prin urmare, OBO în concentrație de 500 ppm este netoxic și neiritant pentru CAM, ceea ce sugerează o bună tolerabilitate *in vivo*.

Evaluarea efectului asupra angiogenezei prin testul CAM a evidențiat că HAO nu a indus modificări semnificative ale dezvoltării vasculare, menținând un proces angiogenic intens și normal. HAO + BHT 200 ppm a determinat o vascularizație normală, dar cu zone izolate cu ramificații mai puțin pronunțate și reacții hiperemice ușoare. OBO 500 ppm, a produs o ușoară reducere a numărului de ramificații și un aspect mai îngust al capilarelor. În schimb, HAO + OBO 500 ppm a generat o angieneză funcțională, cu modificări minore și capilare nou formate, indicând o tolerabilitate vasculară bună.

S-a realizat apoi analiza histopatologică a CAM. Tratamentul cu HAO nu a produs alterări în structura CAM, evidențiindu-se doar o ușoară subțiere a stratului mezenchimal. În schimb, aplicarea HAO + BHT 200 ppm a indus un efect iritativ discret—s-a observat îngroșarea stratului mezodermic prin edem și un influx intravascular crescut de celule inflamatorii. Tratamentul cu OBO 500 ppm a determinat scăderea semnificativă a numărului de vase sanguine în secțiunile CAM și schimbări în arhitectura stratului mezodermic. În schimb, tratamentul cu HAO + OBO 500 ppm nu a afectat arhitectura stratului mezodermic și a determinat o scădere discretă a numărului de vase de sânge.

4. Concluzii

Cercetările prezentate oferă o perspectivă comprehensivă asupra valorificării *Oenothera biennis* L. ca sursă de compuși bioactivi cu aplicații multiple. Extractul hidroalcoolic din părțile aeriene de OB s-a dovedit a fi bogat în polifenoli antioxidanți și a manifestat o gamă largă de activități biologice importante *in vitro*, *in ovo* și *in vivo*. Aceste rezultate pot constitui o premisă pentru viitoarea dezvoltarea de studii preclinice extinse și, posibil, a unor teste clinice, în vederea valorificării potențialului acestui extract.

Uleiul obținut din semințele de OB s-a dovedit valoros ca posibil aditiv natural pentru prevenirea degradării oxidative a uleiurilor vegetale. S-a demonstrat că suplimentarea cu ulei de luminița-noapții a uleiului de floarea-soarelui întârzie considerabil oxidarea acestuia, efect comparabil cu cel al antioxidantului sintetic butilhidroxitoluen. Mai mult, utilizarea sa este sigură și bine tolerată.

Aceste concluzii subliniază versatilitatea și valoarea adăugată a extractului și uleiului provenite de la specia *Oenothera biennis* L. Linia de cercetare prezentată în cadrul acestei teze contribuie la consolidarea datelor științifice asupra acestei specii și deschid perspective pentru utilizarea extinsă a acestei plante în industrii precum cea farmaceutică, dermato-cosmetică și alimentară