

**“VICTOR BABEȘ” UNIVERSITY OF MEDICINE AND
PHARMACY FROM TIMIȘOARA
FACULTY OF PHARMACY
IST DEPARTMENT**

DRĂGHICESCU P. ALINA-ARABELA



PhD THESIS

***JUNIPERUS COMMUNIS* L.: SOURCE OF
EXTRACTS AND FRACTIONS WITH
ANTIBACTERIAL AND ANTITUMOR POTENTIAL**

Scientific Coordinator
**PROF. UNIV. DR. DIANA SIMONA TCHIAKPE-
ANTAL**

Timișoara
2025

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS	II
ABSTRACT OF THE PhD THESIS.....	1
1. INTRODUCTION.....	1
2. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE.....	2
3. AIM AND OUTLINE	6
4. PERSONAL CONTRIBUTIONS.....	8
4.1. MICROSCOPIC AND HISTOCHEMICAL STUDY OF THE PLANT <i>JUNIPERUS COMMUNIS</i>	8
4.2. OBTAINING EXTRACTS AND FRACTIONS FROM JUNIPER PSEUDO-FRUITS	9
4.3. <i>JUNIPERI GALBULUS</i> : SCREENING OF PHYTOCHEMICAL COMPOUNDS AND INVESTIGATION OF BIOACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACT.....	10
4.4. ETHANOLIC EXTRACT OF <i>JUNIPERUS COMMUNIS</i> : ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND SELECTIVE CYTOTOXICITY ON PANCREATIC TUMOR CELLS (PANC-1) VERSUS HEPATOCYTES (HEPARG).....	12

ABSTRACT OF THE PhD THESIS

1. INTRODUCTION

Herbal medicine is quite widely used today, especially in developing countries, where a significant proportion of the population continues to use medicinal plants. The use of products rich in phytochemicals is a necessity for drug development and a current therapeutic approach.

Natural products are an important source for finding new drugs with anti-tumor effects. About 60% of all drugs currently in clinical trials for different types of cancer are based on natural products or compounds derived from natural products. Plant metabolites are important molecules in drug discovery, and optimization of extraction parameters ensures the best possible selectivity of the substances used, as the plant matrix usually contains several substances with minimal differences in chemical structure.

The use of herbal products often involves self-medication, either on its own or in combination with synthetic medicines, leading to beneficial results, but also to potentially harmful side effects or drug interactions.

To achieve effective therapy, the identification of herbal components in terms of pharmacological effects is as important as the correct diagnosis of the patient, hence the development of rational (evidence-based) phytotherapy, which consists in the use of those products whose therapeutic use is based on scientific research that has identified the active ingredients and effective dosage in both preclinical and clinical contexts.

In the context of the above, the present thesis aims to describe the complete phytochemical profile of some extracts obtained from juniper (*Juniperus communis*) pseudo-fruits. After identification and characterization of the bioactive compounds, the obtained aqueous and alcoholic extracts were evaluated in terms of biological and therapeutic effects on both healthy and tumor cell lines

2. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The genus *Juniperus* comprises about 75 species that are widespread mainly in cold and temperate regions, but also reach tropical areas. In Romania, juniper-based products (infusion, tincture, decoction) exploit the pseudo-fruits, bark, and aerial parts, as well as the whole plant, for both internal and external applications. The geographical distribution and morphological differences lead to the classification of the species into several subspecies and varieties. *Juniperus* typically grows to a height of 1 to 3 meters and has a compact, conical crown structure. The bark is characterized by a reddish-brown hue and has a coarse, scaly surface. The foliage consists of needle-shaped leaves, pointed at the tip, arranged in whorls of three, which have a bright green pigmentation. The pseudo-fruits are globose and short-stemmed. The volatile compounds that make up juniper essential oil include monoterpene hydrocarbons (α -pinene, β -pinene, myrcene, sabinene, limonene), oxygenated monoterpene derivatives (terpinen-4-ol, borneol), and sesquiterpenes (germacrene, β -caryophyllene). The content and composition of volatile substances in juniper pseudo-fruits vary widely, from below 0.5% to over 3.5%.

Historically, juniper has been used in folk medicine for its therapeutic effects, including the treatment of urinary tract infections, respiratory disorders, and digestive complications. Pseudo-fruits are traditionally used as flavoring agents in culinary practices, particularly in the production of alcoholic beverages such as gin and in various meat preparations, where they complement the flavor profile.

Many parts of *Juniperus communis* have been extensively studied following the extraction of their main ingredients; the medicinal and food-preserving effects of juniper are attributed to its chemical constituents. The exploitation of its biological effects, particularly in the food, cosmetics, and health industries, is a result of recent research trends. *In vitro* biological studies are a crucial element of scientific research on biologically active compounds from natural sources. They efficiently provide preliminary data on the safety and efficacy profiles of these compounds, facilitate a deeper understanding of their mechanisms of action, and allow optimization of drug design. *In vitro* studies allow the investigation of the complex interactions between active

compounds and biological systems at a level of detail that is often inaccessible in whole-body studies.

Assessment of safety and efficacy is also paramount when introducing new biologically active compounds. *In vitro* studies can be used to predict interactions between herbal medicines and conventional drugs, a crucial aspect of assessing the safety profile of newly discovered agents. This form of study clarifies whether a compound can induce or inhibit metabolic pathways that affect the pharmacokinetics of known drugs, thereby reducing the risks of adverse effects in clinical settings.

The ethanolic extract of juniper has potent antioxidant properties, indicating a strong free radical scavenging activity. This suggests that ethanolic extracts could be useful as natural antioxidants, which could be further validated by *in vitro* tests before moving to *in vivo* studies. The high levels of polyphenols and flavonoids identified in *Juniperus communis* extracts, which were characterized by phytochemical screening, contribute to the plant's genoprotective, antioxidant, and antifungal effects.

The antioxidant properties of *Juniperus* species are well documented and are due to their rich phytochemical composition. Flavonoids, phenolic acids, and terpenes are among the bioactive compounds found in these species that contribute to their antioxidant capacity. The antioxidant potential of *Juniperus* extracts has been tested by different methods to assess their effectiveness in scavenging free radicals and preventing oxidative processes.

Recent research on the antimicrobial and antifungal activity of *Juniperus communis* extracts indicates a potential to address various microbial and fungal infections through their bioactive compounds. Studies have shown the efficacy of methanolic extracts of *Juniperus communis* against *Staphylococcus aureus* (including multi-drug resistant bacteria) and other pathogenic bacteria, respectively against *Microsporum canis* and *Trichophyton rubrum*, confirming the efficacy of the extracts in traditional remedies for fungal infections.

Several studies have reported the anti-inflammatory properties of *J. communis* extracts, noting in particular their efficacy in reducing inflammation in experimental laboratory models. *J. communis* essential oil has also been noted for its ability to relieve oxidative stress and inflammation. The bioactive components of *J. communis* play a crucial role in its therapeutic effects.

Specific terpenoids, especially compounds such as ferruginol and sugiol, exhibit potent anti-inflammatory actions, supporting claims of the plant's efficacy against inflammatory disorders. In addition, various phytochemicals, including flavonoids and polyphenols, have been implicated in the inhibition of pro-inflammatory cytokines, contributing to the use of juniper in the treatment of inflammatory conditions. In addition, *J. communis* extracts not only exert direct anti-inflammatory effects, but also modulate inflammatory pathways by activating proteins related to apoptosis and cell cycle regulation, increasing their therapeutic range against inflammatory diseases and cancers. Overall, juniper's anti-inflammatory activity is supported by scientific reports, demonstrating its potential as a versatile nutraceutical, also providing a basis for exploring its role in the treatment of various inflammatory conditions, respectively related to oxidative stress.

The anticancer activity of *Juniperus communis* extracts has also been explored, revealing significant potential against different types of cancer. *Juniperus communis* extract was claimed to induce cell cycle arrest and activate apoptotic pathways in esophageal squamous cell carcinoma cells through activation of the p53 pathway, emphasizing the role of the extract in triggering programmed cell death in cancer cells. Furthermore, juniper extracts also showed cytotoxic effects against colorectal carcinoma (Caco-2) and cervical cancer (HeLa) cell lines, suggesting a broad spectrum of anticancer activity. Biochemical constituents of *Juniperus communis* contribute to its antitumor effects.

The extracts are rich in terpenes and phenols such as α -pinene and limonene, known for their cytotoxic and apoptotic properties. Ferruginol, another constituent of juniper, has been noted for its ability to reduce tumor size and tumor cell number, highlighting the importance of isolating specific phytochemicals for therapeutic applications of the plant.

The evidence reported in the literature highlights the promising antitumor potential of *Juniperus communis* extracts through several mechanisms, including cell cycle regulation, induction of apoptosis, and inhibition of cell growth in different types of cancer. Continued exploration of its bioactive compounds and their mechanisms of action is essential to unlock therapeutic applications in oncology.

Studies on *Juniperus communis* have shown the presence of valuable secondary metabolites, such as diterpenes, lignans and biflavonoids, which have revealed a multitude of biological effects, including antidiabetic, antibacterial, antioxidant and anticarcinogenic effects; therefore, this species could be a reliable source of active compounds and standardized extracts that may offer therapeutic alternatives for several pathologies. In addition, *Juniperus* phytochemicals may exhibit poor pharmacokinetic profiles, making them possible candidates for technological manipulation, such as nanoformulations, capable of optimizing their potential as therapeutic tools.

Although juniper products offer many health benefits, they also pose some risks, particularly in terms of high doses or inappropriate use. Cases of toxicity related to juniper tar have been documented, highlighting the need for careful dosing in therapeutic applications. In particular, juniper may show interactions with certain drugs, requiring further research on safe consumption practices, especially for people with existing medical conditions.

Therefore, this thesis describes general concepts about the chemical composition of *J. communis* L., as well as the pharmacological effects and therapeutic benefits of extracts and selected pure compounds of the diterpene, lignan, and biflavonoid subclasses. Both preclinical and clinical data supporting their use in human therapies are presented. For some of the compounds presented (totarol, ferruginol), a large body of experimental evidence has accumulated that merits explanation. For other compounds (imbricatolic acid, pimaric acid, sandaracopimaric acid), promising bioactivity data are emerging. On the other hand, there have been advances in characterizing the bioactivity of juniper extracts. Studying the properties of the individual metabolites contained in these extracts allows us to better understand the effects of juniper extracts and to guide future research on this plant.

The second part of the thesis discloses the preparation and phytochemical characterization of two extracts (aqueous and alcoholic) based on juniper, as well as their *in vitro* biological impact on healthy and tumor cell lines, and *in ovo* evaluation of the extracts' irritative potential to complete the biosafety profile.

3. AIM AND OUTLINE

The aim of this PhD thesis was the preparation and evaluation of aqueous and ethanolic extracts obtained from juniper (*Juniperus communis*) pseudo-fruits to determine their *in vitro* biological potential on cancer cells and to highlight the biosafety profile of the extracts obtained.

The first objective to fulfill the research goal was the microscopic and histochemical analysis of the *Juniperus* plant, using specific reagents, to determine the localization of different groups of secondary metabolites present in juniper.

The second objective concerns the method of preparation as well as the phytochemical investigation of both extracts to establish the chemical profile of the bioactive compounds. Concerning the choice of solvents in the extraction process of phytochemicals, the idea was based on the choice of solvents in which the biologically active compounds in the plant show high solubility, taking into account the biocompatibility of these solvents, for future *in vitro* and *in ovo* tests. The functional groups of the compounds present in each extract were identified by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), and the total polyphenolic content (TPC) was determined by the Folin-Ciocalteu method. The phytochemical profile of the plant extracts was validated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Therefore, we consider that the establishment of the presented complete pharmacological profile will underline a significant scientific contribution to the potential use of juniper extracts (aqueous and ethanolic) obtained from the pseudo-fruits of *Juniperus communis* L., which is a mandatory step for future biomedical applications of these extracts.

The third objective of the PhD thesis was to investigate the fundamental activities underlying the overall therapeutic potential, namely, the antioxidant potency and antimicrobial capacity of aqueous and ethanolic extracts obtained from juniper pseudo-fruit extracts.

The fourth objective set to achieve the aim of this thesis was the preliminary *in vitro* biological screening of both extracts in terms of the antitumor effect of juniper pseudo-fruit extracts on human melanoma (A 375 cell lines) and pancreatic cancer (PANC-1), respectively, in terms of the safety

of using these extracts on a healthy human primary hepatocyte cell line (HepaRG).

Although no direct experimental evidence on pancreatic cell lines is reported in the available literature, several research studies report pharmacologically relevant effects underlying the anticarcinogenic effects, including antioxidant and anti-inflammatory activities. Therefore, we consider that this aim of the PhD thesis represents ***the novelty and originality aspect of the thesis***.

In addition, ***another element of novelty and originality*** is represented by ***the fifth objective*** set for the thesis - the safe use of juniper extracts based on pseudo-fruits, applying the HET-CAM (hen embryonated egg chorioallantoic membrane test), a semi-quantitative method for analyzing the inflammatory responses of the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM), suitable for assessing the tissue response to the compounds contained in both extracts. To our knowledge, none of the juniper extracts has been investigated for a possible irritative effect, in particular on the chorioallantoic membrane of the embryonated hen egg.

Therefore, we consider that the results presented in the PhD thesis will make important contributions to the scientific literature and will support the importance of water-soluble and ethanolic compounds in juniper pseudo-fruits, thus complementing the already available experimental knowledge on volatile compounds.

The results obtained in this research will serve as a fundamental basis for future research, indicating a logical transition from preliminary *in vitro* analysis to practical *in vivo* testing of selected extracts. Therefore, the results obtained will highlight the importance of validating not only the therapeutic efficacy but also the safety in the use of these extracts obtained from juniper pseudo-fruits, which is crucial in the context of developing potential therapeutic interventions.

4. PERSONAL CONTRIBUTIONS

4.1. MICROSCOPIC AND HISTOCHEMICAL STUDY OF THE PLANT *JUNIPERUS COMMUNIS*

The results of this study are presented in the dissertation in the special part, **Chapter 2**, and relate to the determination and localization of different groups of secondary metabolites in the juniper plant using histochemical methods of analysis. The samples collected from the juniper plant were processed on microscope slides for examination using an Olympus BH-2 binocular optical microscope. Manual cross-sections of the stem, leaf, and pseudo-fruit were created by hand using a razor blade.

The results showed the presence of terpenoids in phloem, cortex, and pith of the branches, after the juniper stem section was treated with vanillin-sulfuric acid reagent.

As for the juniper leaf, the cross section was clarified and stained with toluidine blue. The epidermis of the juniper leaf showed cells with a very thickened, cutinized, and wax-coated outer wall. In some places, stomata with very narrow suprabasilar chambers were found. The leading fascicles had xylem consisting only of tracheids with areolate pits, and the phloem consisted only of radially arranged sieve cells. At the periphery of the phloem, some elements of sclerenchyma were evident.

Using the Folin-Ciocalteu reagent, the presence of reducing polyphenols was revealed, leading to blue staining of the section. The presence of terpenoids was evidenced in the cuticle, following the application of vanillin-sulfuric acid reagent.

As for juniper pseudo-fruits, within the fleshy part, idioblasts, extremely large, elongated cells with thickened walls, could be identified. In addition, clear resin bundles are present, the largest of which are located in the central part. Terpenoids were evidenced in the cuticle of pseudofruits, as well as in idioblasts in the fundamental parenchyma of conical berries.

4.2. OBTAINING EXTRACTS AND FRACTIONS FROM JUNIPER PSEUDO-FRUITS

In **Chapter 3**, the detailed protocol on the extraction process was described. We chose to use successive extraction steps using a large amount of solvent (1 L of ethanol). The plant product together with the solvent was initially macerated for 24 hours, after which the mixture was sonicated, followed by filtration of the extracts and finally concentrated to a viscous paste containing the active chemical compounds from the juniper pseudo-fruits.

Although we obtained several extracts based on juniper pseudo-fruit using different solvents (ethyl acetate, butanol, diethyl ether, and petroleum ether), only two of them were investigated and evaluated in detail (ethanolic and aqueous extracts). They were chosen because of their biocompatibility with living organisms (for subsequent *in vitro* and *in ovo* biological screening), as well as because of the high content of extracted phytochemicals.

Both extracts obtained from juniper pseudo-fruits were investigated phytochemically to establish the chemical profile of bioactive compounds. First, the organic fingerprint of the functional groups of the phytochemicals present in each extract was identified by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), and the total polyphenolic content (TPC) was determined based on the Folin-Ciocalteu method. Further, the phytochemical fingerprint of the plant extracts was validated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The complete phytochemical profile will emphasize the scientific biological potential of juniper extracts (aqueous and ethanolic) obtained from the pseudo-fruits of *Juniperus communis* L., and is a mandatory step for future biomedical applications.

In terms of extraction efficiency, the results showed different amounts of solvent extracted from each composite fraction. For example, considering the water-soluble fraction, we obtained a solid, viscous slurry of 4.65 g compared to 56.69 g of ethanolic crude extract.

4.3. *JUNIPERI GALBULUS*: SCREENING OF PHYTOCHEMICAL COMPOUNDS AND INVESTIGATION OF BIOACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACT

Chapter 4 presents the antitumor effect of juniper-based aqueous extract on a skin cancer cell line. In the study, we aimed to investigate the antiproliferative activity against melanoma (A375 cell line), namely cell viability, cell morphology, cell confluency and cell number, lactate dehydrogenase (LDH) leakage, and the influence of the extract on cell nuclear shape. In addition, we also investigated the effect of the water-soluble fraction on different microorganisms (Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as *Candida*), since antimicrobial effects have been explored mainly for essential oil or extracts containing volatile substances (ethanol, acetone).

The results showed the absence of toxic elements in the plant product, using X-ray fluorescence (XRF). We demonstrated that aqueous extracts (including herbal teas and decoctions) can take up a significant part of the minerals contained in the plant parts. The XRF analysis shows that toxic elements (Cd, Hg, Tl, U) are below the detection limit in the analyzed pseudo-fruits, while several macroelements (potassium, calcium) and micronutrients are present (Mn, Zn, Ni, Cu, Cr, Mo) and may confer favorable health effects.

Regarding the total polyphenol content, we found that the water-soluble fraction contained 70.75 ± 8.8 mg chlorogenic acid equivalents (CAE)/g extract, concluding that the low polyphenol content could be responsible for the poor antioxidant activity obtained.

As regards the antibacterial effect of the investigated extract on two Gram-positive, two Gram-negative, and one fungal strain, it can be stated that the aqueous extract showed a notable inhibition only on *Streptococcus pyogenes* (a Gram-positive bacterium) and had a weak activity on the other tested organisms.

In vitro biological investigations showed that, in terms of cell viability, the results reported a concentration-dependent effect; the most significant decreases in viability were recorded at the highest tested concentration of 150 µg/mL. In addition, the impact on the morphology of A375 cells was assessed 24 hours after treatment.

The data confirmed that the aqueous extract obtained from juniper pseudo-fruits caused a toxic effect on human melanoma A375 cells. At the highest concentrations, cell alteration (cell elongation) was observed. In addition, cells detached from the plaque and cell debris were visible, as well as decreased confluency compared to untreated control cells.

To demonstrate the cytotoxic effect of the aqueous extract, the effect on cell membrane integrity and permeability was analyzed by quantification of LDH release in the medium. The results showed significant decreases recorded at concentrations of 75, 100, and 150 $\mu\text{g/mL}$ compared to the control. Therefore, it appears that juniper aqueous extract has a concentration-dependent action, reaching cytotoxicity percentages of about 60%.

The nuclei of A375 cells, especially at concentrations of 75, 100, and 150 $\mu\text{g/mL}$, showed a reduction in their size, fragmentation with the formation of apoptotic bodies, and condensation compared to the control. These visible aspects indicated the presence of apoptotic signs after exposure to the aqueous extract for 24 hours.

Therefore, it can be stated that the anticarcinogenic activity of the water-soluble fraction from juniper pseudo-fruits against human melanoma A375 cells has been demonstrated. However, further investigations on the isolation and structure elucidation of the active compound(s) should be of interest in the identification of candidates for new drug candidates from this plant product.

4.4. ETHANOLIC EXTRACT OF *JUNIPERUS COMMUNIS*: ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND SELECTIVE CYTOTOXICITY ON PANCREATIC TUMOR CELLS (PANC-1) VERSUS HEPATOCYTES (HEPARG)

In **Chapter 5**, we set out to explore the ethanolic extract of *Juniperus communis* in terms of its phytochemical analysis and its cytotoxic effects on a pancreatic cancer cell line (PANC-1), while testing its biosafety on a healthy cell line (HepaRG). The objective was to further correlate its chemical profile with the observed pharmacological effects and to provide deeper insight into its potential pharmaceutical applications. In addition to *in vitro* evaluations, *in ovo* bioassays were performed to investigate the irritant potential of the ethanolic extract of *Juniperus communis* at the vascular level to complete the safety profile of the tested plant.

The results showed some differences from the reported studies, regarding the quantification and identification of compounds by LC-MS analysis. It can be stated that these differences are related to the geographical area from which the plant was harvested, the extraction technique, and the solvent used in the extraction process.

The ethanolic extract of *Juniperus* showed significant antimicrobial potential against Gram-positive *Streptococcus pyogenes*, while it was not determined against the other strains tested. Negative controls (EtOH/H₂O, DMSO) showed no inhibition, confirming the antimicrobial activity of the extract.

The MTT assay was used to determine whether the ethanolic extract of juniper exerts cytotoxic activity against malignant and healthy cell lines. Different concentrations (150 µg/mL, 175 µg/mL, and 200 µg/mL) were evaluated in the treatment of pancreatic cancer on the PANC-1 cell line, as well as on a non-cancerous cell line, HepaRG (human hepatocytes), to assess the selectivity of the extract. In PANC-1 cells, the extract showed a slight stimulatory effect at the lowest concentration tested (150 µg/mL), but then cell viability was gradually reduced in a dose-dependent manner. At the intermediate concentration (175 µg/mL), cell viability decreased slightly, decreasing to approximately 80% at the highest concentration (200 µg/mL). Regarding the treatment of the healthy liver cell line HepaRG, the ethanolic

extract significantly stimulated the cells at 150 µg/mL, with a slight increase observed at 175 µg/mL. However, at 200 µg/mL, cell viability began to decrease, although it remained at approximately 130%.

The effect of the ethanolic extract at the same concentrations was evaluated morphologically after 24 h of treatment. In the case of the pancreatic cell line (PANC-1), the plant extract showed a slight decrease in confluence, which was observed in a dose-dependent manner, and at the highest concentration (200 µg/mL), the cells appeared to suffer morphological alterations, such as cell shrinkage and traces of cellular debris. In the case of the healthy liver cell line (HepaRG), the juniper extract visibly stimulated cell growth, with an apparent increase in cell number at both 150 µg/mL and 175 µg/mL. However, the ethanolic extract did not show any signs of dysmorphology in the tested range.

We further examined the appearance of the nuclei in PANC-1 cells by the Hoechst method, commonly used in various fields to observe changes in nuclear structure. The results obtained after 24 h of treatment indicate that the ethanolic extract of juniper induces insignificant dysmorphologies at 150 µg/mL compared to the control. At concentrations of 175 µg/mL and 200 µg/mL, the nuclei appear smaller, and some mild nuclear changes, such as chromatin condensation, are also present, which marks apoptosis.

Changes in mitochondria were assessed by immunofluorescence staining. The lowest concentration (150 µg/mL) did not induce any visible changes in mitochondria compared to the control. At the intermediate concentration (175 µg/mL), some slight changes at the mitochondrial level, such as mitochondrial condensation, could be observed. However, at the highest dose (200 µg/mL), the ethanolic extract produced a massive condensation of mitochondria and reduced their confluence.

The HET-CAM test performed demonstrated that the ethanolic extract of *Juniperus communis* presents a favorable biosafety profile at a concentration of 200 µg/mL in the *in ovo* model, as evidenced by the absence of irritation of the chorioallantoic membrane vasculature (SI=0.07).

The doctoral thesis is based on the original results obtained from three research articles, in which the undersigned is the main author (first author on two publications and corresponding author on one publication), as follows:

- The data presented in the theoretical part of the doctoral thesis are the subject of an ISI article, published in the Plants Journal (MDPI), Journal Rank Q1 (I.F. = 4).

The most important findings in this study are based on valuable secondary metabolites of juniper, such as diterpenes, lignans, and biflavonoids, which have revealed a multitude of biological effects. Therefore, this species could be a reliable source of active compounds and standardized extracts that can offer therapeutic alternatives for several pathologies. Juniper phytochemicals can present poor pharmacokinetic profiles, which makes them candidates for technological manipulation, enabling them to optimize their potential as therapeutic tools. To our knowledge, nanoformulations based on juniper extracts have not yet been achieved.

- The data presented in Chapter 4, from the PhD special part, are the subject of another ISI article, published in the Pharmacy Journal, Journal Rank Q3 (I.F. = 1.4).

In this study, we showed that the aqueous extract exhibited notable inhibition only on *Streptococcus pyogenes*, with weak activity on the other organisms tested. Furthermore, the aqueous extract of juniper pseudo-fruits exhibited a toxic effect on A375 human melanoma cells in a concentration-dependent manner, underlining the antitumor activity of the water-soluble fraction against human melanoma.

- The data presented in Chapter 5 are the subject of the third ISI article, published in the Pharmacy Journal, Journal Rank Q3 (I.F. = 1.4).

In this study, the results presented show that *Juniperus communis* can be used as a promising alternative for the treatment of pancreatic cancer. Juniper extract selectively reduced the viability of pancreatic cancer cells (PANC-1), while stimulating healthy liver cells (HepaRG). These results provide a basis for further investigation into the therapeutic potential of juniper, highlighting the need for further mechanistic studies, in vivo efficacy tests, and pharmacodynamic evaluations to fully validate its clinical applicability.

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE FARMACIE
DEPARTAMENTUL I

DRĂGHICESCU P. ALINA-ARABELA



TEZĂ DE DOCTORAT

*JUNIPERUS COMMUNIS L.: SURSĂ DE
EXTRACTE ȘI FRAȚII CU POTENȚIAL
ANTIBACTERIAN ȘI ANTITUMORAL*

Coordonator Științific
PROF. UNIV. DR. DIANA SIMONA TCHIAKPE-
ANTAL

Timișoara
2025

CUPRINS

CUPRINS	II
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT	1
1. INTRODUCERE	1
2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	2
3. SCOP ȘI OBIECTIVE	6
4. CONTRIBUȚII PERSONALE	8
4.1. STUDIU MICROSCOPIC ȘI HISTOOCIMIC AL plantei <i>JUNIPERUS COMMUNIS</i>	8
4.2. OBTINEREA DE EXTRACTE ȘI FRAȚII DIN PSEUDO-FRUCTELE DE IENUPĂR	9
4.3. <i>JUNIPERI GALBULUS</i> : SCREENINGUL COMPUȘILOR FITOCHIMICI ȘI INVESTIGAREA BIOACTIVITĂȚII EXTRACTULUI APOS	10
4.4. EXTRACTUL ETANOLIC DE <i>JUNIPERUS COMMUNIS</i> : ACTIVITATE ANTIMICROBIANĂ ȘI CITOTOXICITATE SELECTIVĂ PE CELULE TUMORALE DE PANCREAS (PANC-1) COMPARATIV CU HEPATOCITELE (HEPARG)	12

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

1. INTRODUCERE

Medicina pe bază de plante este destul de utilizată în prezent, în special în țările în curs de dezvoltare, unde o proporție semnificativă a populației continuă să utilizeze plantele medicinale. Utilizarea produselor bogate în compuși fitochimici este o necesitate pentru dezvoltarea medicamentelor și o abordare terapeutică actuală. Produsele naturale sunt o sursă importantă pentru găsirea de noi medicamente cu efecte antitumorale. Aproximativ 60% din toate medicamentele aflate în prezent în studii clinice pentru diferite tipuri de cancer sunt bazate pe produse naturale sau compuși derivați din produse naturale. Metaboliții vegetali sunt molecule importante în descoperirea de medicamente, iar optimizarea parametrilor de extracție asigură cea mai bună selectivitate posibilă a substanțelor utilizate, având în vedere că în matricea vegetală există, de obicei, o serie de substanțe cu diferențe minime în structura chimică. Utilizarea produselor pe bază de plante implică adesea automedicația, ca atare sau în combinație cu medicamente sintetice, ducând la rezultate benefice, dar și la efecte secundare potențial dăunătoare sau la interacțiuni farmacologice. Pentru a realiza o terapie eficientă, identificarea componentelor vegetale din punct de vedere al efectelor farmacologice este la fel de importantă ca și diagnosticarea corectă a pacientului, prin urmare, s-a dezvoltat fitoterapia rațională (bazată pe dovezi) care constă în utilizarea acelor produse a căror utilizare terapeutică se bazează pe cercetări științifice care au identificat ingredientele active și dozajul eficient atât în context preclinic, cât și clinic.

În contextul celor de mai sus, prezenta teză își propune să descrie profilul fitochimic complet al unor extracte obținute din pseudo-fructe de ienupăr (*Juniperus communis*). După identificarea și caracterizarea compușilor bioactivi, extractele apoase și alcoolice obținute au fost evaluate din punct de vedere al efectului biologic și terapeutic, atât pe linii celulare sănătoase, cât și tumorale.

2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Genul *Juniperus* cuprinde aproximativ 75 de specii larg răspândite mai ales în regiunile reci și temperate, dar ajunge și în zonele tropicale. În România, produsele pe bază de ienupăr (infuzie, tinctură, decoct) exploatează pseudo-fructele, scoarța și părțile aeriene, precum și planta întreagă, atât în aplicații interne, cât și externe. Distribuția geografică și diferențele morfologice determină clasificarea speciei în mai multe subspecii și varietăți. Specia *Juniperus* atinge de obicei o înălțime de 1 până la 3 metri și prezintă o structură compactă, conică a coroanei. Scoarța este caracterizată de o nuanță brun-roșcată și posedă o suprafață grosieră, solzoasă. Frunzișul este format din frunze în formă de ace, ascuțite la vârf, dispuse în spirale de câte trei, care prezintă o pigmentare verde aprins. Pseudo-fructele sunt globuloase și cu tulpină scurtă. Compușii volatili care alcătuiesc uleiul esențial de ienupăr includ hidrocarburi monoterpenice (α -pinene, β -pinene, mircene, sabinene, limonene), derivați monoterpenici oxigenați (terpinen-4-ol, borneol) și sesquiterpene (germacrene, β -cariofilene). Conținutul și compoziția substanțelor volatile din pseudo-fructele de ienupăr variază foarte mult, de la sub 0,5% la peste 3,5%.

Din punct de vedere istoric, ienupărul a fost utilizat în medicina populară pentru efectele sale terapeutice, inclusiv în tratamentul infecțiilor tractului urinar, al tulburărilor respiratorii și al complicațiilor digestive. Pseudo-fructele sunt utilizate în mod tradițional ca agenți aromatizanți în practicile culinare, în special în producția de băuturi alcoolice precum ginul și în diverse preparate din carne, unde completează profilul de aromă.

Multe părți ale *Juniperus communis* au fost studiate pe larg în urma extragerii principalelor lor ingrediente; efectele medicinale și de conservare a alimentelor ale ienupărului sunt atribuite constituenților săi chimici. Exploatarea efectelor sale biologice, în special în industria alimentară, cosmetică și a sănătății, este un rezultat al tendințelor recente de cercetare. Studiile biologice *in vitro* sunt un element crucial al cercetării științifice privind compușii biologic activi din surse naturale. Acestea furnizează în mod eficient date preliminare privind profilurile de siguranță și eficacitate ale acestor compuși, facilitează o înțelegere mai profundă a mecanismelor lor de acțiune și permit optimizarea proiectării medicamentelor. Studiile *in vitro* permit investigarea interacțiunilor

complexe dintre compușii activi și sistemele biologice la un nivel de detaliu care este adesea inaccesibil în studiile efectuate pe întregul organism.

Evaluarea siguranței și eficacității sunt, de asemenea, primordiale atunci când se introduc noi compuși biologic activi. Studiile *in vitro* pot fi utilizate pentru a prezice interacțiunile dintre medicamentele pe bază de plante și medicamentele convenționale, un aspect crucial al evaluării profilului de siguranță al agenților nou descoperiți. Această formă de studiu clarifică dacă un compus poate induce sau inhiba căile metabolice care afectează farmacocinetica medicamentelor cunoscute, reducând astfel riscurile de efecte adverse în contexte clinice.

Extractul etanolic de ienupăr prezintă proprietăți antioxidante puternice, indicând o activitate puternică de absorbție a radicalilor liberi. Acest lucru sugerează că extractele etanolice ar putea fi utile ca antioxidanți naturali, care ar putea fi validați în continuare prin teste *in vitro* înainte de a trece la studii *in vivo*. Nivelurile ridicate de polifenoli și flavonoide identificate în extractele de *Juniperus communis*, care au fost caracterizate prin screening fitochimic, contribuie la efectele genoprotective, antioxidante și antifungice ale plantei.

Proprietățile antioxidante ale speciilor *Juniperus* sunt bine documentate și se datorează compoziției lor fitochimice bogate. Flavonoidele, acizii fenolici și terpenii se numără printre compușii bioactivi găsiți în aceste specii care contribuie la capacitatea lor antioxidantă. Potențialul antioxidant al extractelor de *Juniperus* a fost testat prin diferite metode pentru a evalua eficacitatea lor în captarea radicalilor liberi și prevenirea proceselor oxidative.

Cercetările recente privind activitatea antimicrobiană și antifungică a extractelor de *Juniperus communis* indică un potențial de abordare a diferitelor infecții microbiene și fungice prin intermediul compușilor bioactivi ai acestora. Studiile au evidențiat eficacitatea extractelor metanolice de *Juniperus communis* împotriva *Staphylococcus aureus* (inclusiv bacteriile multirezistente) și a altor bacterii patogene, respectiv împotriva *Microsporum canis* și *Trichophyton rubrum*, confirmând eficacitatea extractelor în remediile tradiționale pentru infecțiile fungice.

Mai multe studii au raportat proprietățile antiinflamatorii ale extractelor de *J. communis*, remarcând în special eficacitatea acestora în reducerea inflamației în modelele experimentale de laborator. De asemenea, uleiul esențial de *J. communis* s-a remarcat pentru capacitatea sa de a ameliora

stresul oxidativ și inflamația. Componentele bioactive ale *J. communis* joacă un rol crucial în efectele sale terapeutice. Terpenoidele specifice, în special compuși precum ferruginolul și sugiolul, prezintă acțiuni antiinflamatorii puternice, susținând afirmațiile privind eficacitatea plantei împotriva tulburărilor inflamatorii. În plus, diverse substanțe fitochimice, inclusiv flavonoide și polifenoli au fost implicate în inhibarea citokinelor pro-inflamatorii, contribuind la utilizarea ienupărului în tratarea afecțiunilor inflamatorii. În plus, extractele din *J. communis* nu numai că exercită efecte antiinflamatorii directe, ci și modulează căile inflamatorii prin activarea proteinelor legate de apoptoză și de reglarea ciclului celular, sporind sfera lor terapeutică împotriva bolilor inflamatorii și a cancerelor. În general, activitatea antiinflamatorie a ienupărului este susținută de rapoartele științifice, demonstrând potențialul său ca nutraceutic versatil, oferind de asemenea, o bază pentru explorarea rolului său în tratarea diferitelor afecțiuni inflamatorii, respectiv legate de stresul oxidativ.

Activitatea anticancer a extractelor de *Juniperus communis* a fost de asemenea explorată, dezvăluind un potențial semnificativ pe diferite tipuri de cancer. S-a afirmat că extractul de *Juniperus communis* induce oprirea ciclului celular și activează căile apoptotice în celulele carcinomului esofagian cu celule scuamoase prin activarea căii p53, subliniind rolul extractului în declanșarea morții celulare programate în celulele canceroase. Mai mult, extractele de ienupăr au arătat și efecte citotoxice împotriva liniilor celulare de carcinom colorectal (Caco-2) și de cancer de col uterin (HeLa), sugerând un spectru larg de activitate anticancer. Constituenții biochimici ai *Juniperus communis* contribuie la efectele sale antitumorale. Extractele sunt bogate în terpeni și fenoli, precum α -pinena și limonena, cunoscute pentru proprietățile lor citotoxice și apoptotice. Ferruginolul, un alt constituent al ienupărului, a fost remarcat pentru capacitatea lui de a reduce dimensiunea tumorii și numărul de celule tumorale, subliniind importanța izolării compușilor fitochimici specifici pentru aplicații terapeutice ale plantei.

Dovezile raportate în literatura de specialitate evidențiază potențialul antitumoral promițător al extractelor de *Juniperus communis* prin mai multe mecanisme, inclusiv reglarea ciclului celular, inducerea apoptozei și inhibarea creșterii celulelor în diferite tipuri de cancer. Explorarea continuă a compușilor săi bioactivi și a mecanismelor lor de acțiune este esențială pentru deblocarea aplicațiilor terapeutice în oncologie.

Studiile privind *Juniperus communis* au arătat prezența unor metaboliți secundari valoroși, cum ar fi diterpene, lignani și biflavonoide, care au dezvăluit o multitudine de efecte biologice, inclusiv efecte antidiabetice, antibacteriene, antioxidante și anticancerigene; prin urmare, această specie ar putea fi o sursă fiabilă de compuși activi și extracte standardizate care pot oferi alternative terapeutice pentru mai multe patologii. În plus, substanțele fitochimice din *Juniperus* pot prezenta profiluri farmacocinetice slabe, ceea ce le face posibili candidați pentru manipularea tehnologică, cum ar fi nanoformulările, capabile să optimizeze potențialul lor ca instrumente terapeutice.

Deși produsele din ienupăr oferă multe beneficii pentru sănătate, acestea prezintă și unele riscuri, în special în ceea ce privește dozele mari sau utilizarea necorespunzătoare. Au fost documentate cazuri de toxicitate legate de gudronul de ienupăr, subliniind necesitatea unei dozări atente în aplicațiile terapeutice. În special, ienupărul poate prezenta interacțiuni cu anumite medicamente, necesitând cercetări suplimentare privind practicile sigure de consum, în special pentru persoanele cu afecțiuni medicale existente.

Prin urmare, prezenta teză descrie concepte generale despre compoziția chimică a *J. communis* L., precum și efectele farmacologice și beneficiile terapeutice ale extractelor și ale compușilor puri selectați din subclasele diterpenelor, lignanilor și biflavonoidelor. Sunt prezentate atât date preclinice, cât și clinice, care susțin utilizarea lor în terapiile umane. Pentru unii dintre compușii prezentați (tatarol, ferruginol), s-a acumulat un număr mare de dovezi experimentale care merită să fie explicate. Pentru alți compuși (acid imbricatolic, acid pimaric, acid sandaracopimaric), apar date promițătoare privind bioactivitatea. Pe de altă parte, au existat progrese în caracterizarea bioactivității extractelor de ienupăr. Studiarea proprietăților pe care le au metaboliții individuali conținuți în aceste extracte ne permite să înțelegem mai bine efectele extractelor de ienupăr, dar și să orientăm cercetările viitoare asupra acestei plante.

Cea de-a doua parte a tezei dezvăluie prepararea și caracterizarea fitochimică a două extracte (apos și alcoolic) pe bază de ienupăr, precum și impactul lor biologic *in vitro* asupra unor linii celulare sănătoase și tumorale, dar și evaluarea *in ovo*, privind evaluarea potențialului iritativ al extractelor, pentru a completa profilul de biosiguranță.

3. SCOP ȘI OBIECTIVE

Scopul acestei teze de doctorat a fost pregătirea și evaluarea extractelor apoase și etanolice obținute din pseudo-fructele de ienupăr (*Juniperus communis*), pentru a stabili potențialul biologic *in vitro* asupra unor celule canceroase, precum și pentru a evidenția profilul de utilizare în condiții de biosecuritate al extractelor obținute.

Primul obiectiv pentru îndeplinirea scopului cercetării a fost analiza microscopică și histochimică a plantei *Juniperus*, utilizând reactivi specifici, pentru a determina localizarea diferitelor grupe de metaboliți secundari prezenți în ienupăr.

Al doilea obiectiv se referă la metoda de preparare, precum și la cercetarea fitochimică a ambelor extracte pentru a stabili profilul chimic al compușilor bioactivi. În ceea ce privește alegerea solvenților în procesul de extracție a substanțelor fitochimice, ideea s-a bazat pe alegerea solvenților în care compușii biologic activi din plantă prezintă o solubilitate ridicată, luând în considerare biocompatibilitatea acestor solvenți, pentru viitoarele teste *in vitro* și *in ovo*. Grupele funcționale ale compușilor prezenți în fiecare extract au fost identificate prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR), iar conținutul polifenolic total (CPT) a fost stabilit pe baza metodei Folin-Ciocalteu. Profilul fitochimic al extractelor de plante a fost validat prin cromatografie de lichide cu spectrometrie de masă în tandem (LC-MS/MS). Prin urmare, considerăm că stabilirea profilului farmacologic complet prezentat va sublinia o contribuție științifică semnificativă în ceea ce privește utilizarea potențială a extractelor de ienupăr (apoase și etanolice), obținute din pseudo-fructele de *Juniperus communis* L., ceea ce reprezintă un pas obligatoriu pentru viitoarele aplicații biomedicale ale acestor extracte.

Cel de-al treilea obiectiv al tezei de doctorat a fost investigarea activităților fundamentale care stau la baza potențialului terapeutic general, și anume, puterea antioxidantă și capacitatea antimicrobiană a extractelor apoase și etanolice obținute din extractele de pseudo-fructe de ienupăr.

Cel de-al patrulea obiectiv stabilit pentru atingerea scopului prezentei teze a fost screeningul biologic preliminar *in vitro* al ambelor extracte, din punct de vedere al efectului antitumoral ale extractelor de pseudo-fructe de ienupăr asupra melanomului uman (linii celulare A 375), precum și asupra cancerului

pancreatic (PANC-1), respectiv, din punct de vedere al siguranței utilizării acestor extracte pe o linie celulară de hepatocite primare umane sănătoase (HepaRG).

Deși în literatura disponibilă nu sunt raportate dovezi experimentale directe privind liniile celulare pancreatice, mai multe studii de cercetare raportează efecte farmacologice relevante care stau la baza efectelor anticancerigene, inclusiv activități antioxidante și antiinflamatorii. Prin urmare, considerăm că acest obiectiv al tezei de doctorat reprezintă **aspectul de noutate și originalitate al tezei de doctorat**.

În plus, **un alt element de noutate și originalitate** este reprezentat de **cel de-al cincilea obiectiv** stabilit pentru îndeplinirea scopului tezei - utilizarea în condiții de siguranță a extractelor de ienupăr pe bază de pseudo-fructe, aplicând testul HET-CAM (testul membranei corioallantoice a oului embrionat de găină), o metodă semi-cantitativă de analiză privind răspunsurile inflamatorii ale membranei corioallantoice a embrionului de pui (CAM), adecvată pentru evaluarea răspunsului țesuturilor la compușii conținuți de ambele extracte. Din cunoștințele noastre, niciunul dintre extractele de ienupăr nu a fost investigat în ceea ce privește un posibil efect iritativ, în special asupra membranei corioallantoice a oului de găină embrionat.

Prin urmare, considerăm că rezultatele prezentate în teza de doctorat vor aduce contribuții importante în literatura științifică și vor susține importanța compușilor hidrosolubili și etanolici din pseudo-fructele de ienupăr, completând astfel cunoștințele experimentale deja disponibile, privind compușii volatili. Rezultatele obținute în această cercetare vor servi ca bază fundamentală pentru cercetările viitoare, indicând o tranziție logică de la analiza preliminară *in vitro* la testarea practică *in vivo* a extractelor selectate. Prin urmare, rezultatele obținute vor evidenția importanța validării nu numai a eficacității terapeutice, ci și a siguranței în utilizarea acestor extracte obținute din pseudo-fructele de ienupăr, ceea ce este crucial în contextul dezvoltării unor potențiale intervenții terapeutice.

4. CONTRIBUȚII PERSONALE

4.1. STUDIU MICROSCOPIC ȘI HISTOOCIMIC AL PLANTEI *JUNIPERUS COMMUNIS*

Rezultatele acestui studiu sunt prezentate în teza de doctorat la partea specială, în **Capitolul 2** și se referă la determinarea și localizarea diferitelor grupuri de metaboliți secundari în planta de ienupăr utilizând metode histochimice de analiză. Probele recoltate din planta de ienupăr, au fost prelucrate pe lame de microscop pentru examinare cu ajutorul unui microscop optic binocular Olympus BH-2. Au fost create secțiuni transversale manuale din tulpină, frunză și pseudo-fruct, cu ajutorul unei lame de ras.

Rezultatele au arătat prezența terpenoidelor în floem, cortex și măduva ramurilor, după ce secțiunea tulpinii de ienupăr a fost tratată cu reactiv pe bază de acid vanilin-sulfuric.

În ceea ce privește frunza de ienupăr, secțiunea transversală a fost clarificată și colorată cu albastru de toluidină. Epiderma frunzei de ienupăr prezenta celule cu peretele extern foarte îngroșat, cutinizat și acoperit cu ceară. În anumite locuri, s-au găsit stomate cu camere suprastomatice foarte înguste. Fasciculele conducătoare aveau xilemul format numai din traheide cu gropi areolate, iar floemul era format numai din celule sită dispuse radial. La periferia floemului, au fost evidențiate unele elemente de sclerenchima.

Cu ajutorul reactivului Folin-Ciocalteu, a fost evidențiată prezența polifenolilor reducători, ceea ce a dus la colorarea în albastru a secțiunii. Prezența terpenoidelor a fost evidențiată în cuticulă, în urma aplicării reactivului pe bază de acid vanilin-sulfuric.

În ceea ce privește pseudo-fructele de ienupăr, în interiorul părții cărnoase, s-au putut identifica idioblaste, celule extrem de mari, cu formă alungită și pereți îngroșați. În plus, sunt prezente și fascicule de rășină cu conținut limpede, cele mai mari fiind situate în partea centrală. Terpenoidele au fost evidențiate în cuticula pseudo-fructelor, precum și în idioblastele din parenchimul fundamental al boabelor conice.

4.2. OBȚINEREA DE EXTRACTE ȘI FRAȚȚII DIN PSEUDO-FRUCTELE DE IENUPĂR

În **Capitolul 3** au fost descris protocolul detaliat privind procesul de extracție. Am ales să utilizăm etape succesive de extracție, folosind o cantitate mare de solvent (1 L de etanol). Produsul vegetal împreună cu solventul au stat inițial la macerat, timp de 24 ore, după care amestecul a fost supus procesului de sonicare, urmată de filtrarea extractelor și, în final, concentrarea, până la obținerea unei paste vâscoase care conține compușii chimici activi din pseudo-fructele de ienupăr. Deși am obținut mai multe extracte pe bază de pseudofructe de ienupăr folosind diferiți solvenți (acetat de etil, butanol, eter dietilic și eter de petrol), doar două dintre acestea au fost investigate și evaluate în detaliu (extractul etanolic și cel apos). Acestea au fost alese datorită biocompatibilității lor cu organismele vii (pentru screeningul biologic ulterior *in vitro* și *in ovo*), precum și datorită conținutului ridicat de fitochimicale extrase.

Ambele extracte obținute din pseudo-fructe de ienupăr au fost investigate din punct de vedere fitochimic pentru a stabili profilul chimic al compușilor bioactivi. În primul rând, amprenta organică a grupelor funcționale ale substanțelor fitochimice prezente în fiecare extract a fost identificată prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR), iar conținutul polifenolic total (CPT) a fost stabilit pe baza metodei Folin-Ciocalteu. În continuare, amprenta fitochimică a extractelor de plante a fost validată prin cromatografie lichidă cu spectrometrie de masă în tandem (LC-MS/MS). Profilul fitochimic complet va sublinia potențialul științific biologic al extractelor de ienupăr (apoase și etanolice), obținute din pseudo-fructele de *Juniperus communis* L., și reprezintă un pas obligatoriu pentru viitoarele aplicații biomedicale.

În ceea ce privește eficiența extracției, rezultatele au arătat cantități diferite de partiții extrase cu solvent din fiecare fracțiune compusă. De exemplu, luând în considerare fracțiunea solubilă în apă, am obținut o pastă solidă, vâscoasă de 4,65 g, comparativ cu 56,69 g de extract brut etanolic.

4.3. *JUNIPERI GALBULUS*: SCREENINGUL COMPUȘILOR FITOCHIMICI ȘI INVESTIGAREA BIOACTIVITĂȚII EXTRACTULUI APOS

Capitolul 4 prezintă efectul antitumoral al extractului apos pe bază de ienupăr asupra unei linii celulare de cancer de piele. În studiu, ne-am propus să investigăm activitatea antiproliferativă împotriva melanomului (linia celulară A375), și anume viabilitatea celulară, morfologia celulară, confluența celulelor și numărului de celule, scurgerea de lactat dehidrogenază (LDH) și influența extractului asupra formei nucleare celulare. În plus, am investigat și efectul fracțiunii solubile în apă asupra diferitelor microorganisme (bacterii Gram-pozitive și Gram-negative, precum și *Candida*), deoarece efectele antimicrobiene au fost explorate în principal pentru uleiul esențial sau extractele care conțin substanțe volatile (etanol, acetonă).

Rezultatele au arătat absența elementelor toxice din produsul vegetal, folosind fluorescența cu raze X (XRF). Am demonstrat că extractele apoase (inclusiv ceaiurile din plante și decocturile) pot prelua o parte semnificativă din mineralele pe care le conțin părțile vegetale. Analiza XRF arată că, în pseudo-fructele analizate, elementele toxice (Cd, Hg, Tl, U) sunt sub limita de detecție, în timp ce o serie de macroelemente (potasiu, calciu) și micronutrienți sunt prezenți (Mn, Zn, Ni, Cu, Cr, Mo) și pot conferi efecte favorabile asupra sănătății.

În ceea ce privește conținutul total de polifenoli, am constatat că, fracțiunea solubilă în apă conținea $70,75 \pm 8,8$ mg echivalenți acid clorogenic (CAE)/g de extract, concluzionând că, conținutul redus de polifenoli ar putea fi responsabil pentru activitatea antioxidantă slabă obținută.

În ceea ce privește efectul antibacterian al extractului investigat asupra a două tulpini Gram-pozitive, două Gram-negative și o tulpină fungică, se poate afirma că extractul apos a prezentat o inhibiție notabilă numai asupra *Streptococcus pyogenes* (o bacterie Gram-pozitivă) și a avut o activitate slabă asupra celorlalte organisme testate.

Investigațiile biologice *in vitro* au arătat că, în ceea ce privește viabilitatea celulară, rezultatele au raportat un efect dependent de concentrație; cele mai semnificative scăderi ale viabilității au fost înregistrate la cea mai mare concentrație testată de 150 $\mu\text{g/mL}$. În plus, a fost evaluat

impactul asupra morfologiei celulelor A375 la 24 de ore după tratament. Datele au confirmat că extractul apos obținut din pseudo-fructe de ienupăr a provocat un efect toxic asupra celulelor melanomului uman A375. La cele mai mari concentrații, s-a observat o modificare a celulelor (o alungire a celulelor). În plus, celulele s-au desprins de pe placă și au fost vizibile resturi celulare, precum și o confluență scăzută în comparație cu celulele de control netratate.

Pentru a demonstra efectul citotoxic al extractului apos, efectul asupra integrității membranei celulare și a permeabilității a fost analizat prin cuantificarea eliberării de LDH în mediu. Rezultatele au arătat scăpări semnificative înregistrate la concentrațiile de 75, 100 și 150 $\mu\text{g/mL}$ comparativ cu martorul. Prin urmare, se pare că extractul apos de ienupăr are o acțiune dependentă de concentrație, atingând procente de citotoxicitate de aproximativ 60%. Nucleele celulelor A375, în special la concentrațiile de 75, 100 și 150 $\mu\text{g/mL}$, au prezentat o reducere a dimensiunii lor, o fragmentare cu formarea de corpuri apoptotice, precum și condensare, comparativ cu martorul. Aceste aspecte vizibile au indicat prezența semnelor apoptotice după expunerea la extractul apos timp de 24 de ore.

Prin urmare, se poate afirma că a fost evidențiată activitatea anticancerigenă a fracțiunii hidrosolubile din pseudo-fructele de ienupăr împotriva celulelor melanomului uman A375. Cu toate acestea, investigațiile suplimentare privind izolarea și elucidarea structurii compusului (compuşilor) activ(i) ar trebui să fie de interes în identificarea candidaților pentru obținerea unor noi medicamente din acest produs vegetal.

4.4. EXTRACTUL ETANOLIC DE *JUNIPERUS COMMUNIS*: ACTIVITATE ANTIMICROBIANĂ ȘI CITOTOXICITATE SELECTIVĂ PE CELULE TUMORALE DE PANCREAS (PANC-1) COMPARATIV CU HEPATOCITELE (HEPARG)

În **Capitolul 5** ne-am propus să explorăm extractul etanolic de *Juniperus communis*, în ceea ce privește analiza sa fitochimică și efectele sale citotoxice asupra unei linii celulare de cancer pancreatic (PANC-1), testând în același timp biosecuritatea sa asupra unei linii celulare sănătoase (HepaRG). Obiectivul a fost de a corela în continuare profilul său chimic cu efectele farmacologice observate și de a oferi o perspectivă mai profundă asupra potențialelor sale aplicații farmaceutice. În plus față de evaluările *in vitro*, au fost efectuate bioteste *in ovo* pentru a investiga potențialul iritant al extractului etanolic de *Juniperus communis* la nivel vascular pentru a completa profilul de siguranță al plantei testate.

Rezultatele au arătat unele diferențe față de studiile raportate, în ceea ce privește cuantificarea și identificarea compușilor prin analiza LC-MS. Se poate afirma că aceste diferențe sunt legate de zona geografică din care a fost recoltată planta, de tehnica de extracție și de solventul utilizat în procesul de extracție.

Extractul etanolic de *Juniperus* a evidențiat un potențial antimicrobian semnificativ față de *Streptococcus pyogenes* Gram-pozitiv, în timp ce față de celelalte tulpini testate, acesta nu a fost determinat. Controalele negative (EtOH/H₂O, DMSO) nu au arătat nici o inhibiție, confirmând activitatea antimicrobiană a extractului.

Testul MTT a fost utilizat pentru a determina dacă extractul etanolic de ienupăr exercită activitate citotoxică împotriva liniilor celulare maligne și sănătoase. Au fost evaluate diferite concentrații (150 µg/mL, 175 µg/mL și 200 µg/mL) în tratamentul cancerului pancreatic pe linia celulară PANC-1, precum și pe o linie celulară necanceroasă, HepaRG (hepatocite umane), pentru a evalua selectivitatea extractului. În celulele PANC-1, extractul a prezentat un efect stimulat ușor la cea mai mică concentrație testată (150 µg/mL), dar apoi viabilitatea celulară a fost redusă treptat într-o manieră dependentă de doză. La concentrația intermediară (175 µg/mL), viabilitatea celulară a scăzut ușor, reducându-se la cea mai mare concentrație (200 µg/mL) la aproximativ

80%. În ceea ce privește tratamentul liniei de celule hepatice sănătoase HepaRG, extractul etanolic a stimulat semnificativ celulele la 150 µg/mL, cu o ușoară creștere observată la 175 µg/mL. Cu toate acestea, la 200 µg/mL, viabilitatea celulară a început să scadă, deși a rămas la aproximativ 130%.

Efectul extractului etanolic la aceleași concentrații a fost evaluat la nivel morfologic după 24 h de tratament. În cazul liniei celulare pancreatice (PANC-1), extractul din plantă a evidențiat o ușoară scădere a confluentei, care a fost observată într-o manieră dependentă de doză, iar la cea mai mare concentrație (200 µg/mL), celulele păreau să sufere alterări morfologice, cum ar fi micșorarea celulelor și urme de resturi celulare. În cazul liniei celulare hepatice sănătoase (HepaRG), extractul de ienupăr a stimulat vizibil creșterea celulară, cu o creștere aparentă a numărului de celule atât la 150 µg/mL, cât și la 175 µg/mL. Cu toate acestea, extractul etanolic nu a prezentat nici un semn de dismorfologie în intervalul testat.

Am examinat în continuare aspectul nucleelor din celulele PANC-1 prin metoda Hoechst, utilizată în mod obișnuit în diverse domenii pentru a observa modificări ale structurii nucleare. Rezultatele obținute după 24 h de tratament indică faptul că extractul etanolic de ienupăr induce dismorfologii nesemnificative la 150 µg/mL comparativ cu martorul. La concentrațiile de 175 µg/mL și 200 µg/mL, nucleele par mai mici și sunt prezente și unele modificări nucleare ușoare, cum ar fi condensarea cromatinei, care marchează apoptoza.

Modificările în mitocondrii au fost efectuate prin colorare cu imunofluorescență. Cea mai mică concentrație (150 µg/mL) nu a indus nici o modificare vizibilă a mitocondriilor comparativ cu martorul. La concentrația intermediară (175 µg/mL), au putut fi observate unele modificări ușoare la nivel mitocondrial, cum ar fi condensarea mitocondrială. Cu toate acestea, la cea mai mare doză (200 µg/mL), extractul etanolic a produs o condensare masivă a mitocondriilor și a redus confluentele acestora.

Testul HET-CAM efectuat a demonstrat că extractul etanolic de *Juniperus communis* prezintă un profil de biosecuritate favorabil la o concentrație de 200 µg/mL în cadrul modelului *in ovo*, după cum reiese din absența iritației vasculaturii membranei corioalantoice (IS=0,07).

Teza de doctorat se bazează pe rezultatele originale obținute din trei articole de cercetare, în care subsemnata este autor principal (prim autor pe două publicații și autor de corespondență pe o publicație), după cum urmează:

- Datele prezentate în partea teoretică a tezei de doctorat, fac obiectul unui articol ISI, publicat în Jurnalul Plants (MDPI), Journal Rank Q1 (I.F.= 4).

Cele mai importante descoperiri din acest studiu, se bazează pe metaboliți secundari valoroși ai ienupărului, cum ar fi diterpenele, lignanii și biflavonoidele, care au dezvăluit o multitudine de efecte biologice. Prin urmare, această specie ar putea fi o sursă fiabilă de compuși activi și extracte standardizate care pot oferi alternative terapeutice pentru o serie de patologii. Substanțele fitochimice din ienupăr pot prezenta profiluri farmacocinetice slabe, ceea ce le face candidați pentru manipularea tehnologică, capabile să optimizeze potențialul lor ca instrumente terapeutice. Din cunoștințele noastre, nanoformulări pe bază de extracte de ienupăr nu a fost încă realizate.

- Datele prezentate în Capitolul 4, de la partea specială a tezei, fac obiectul unui alt articol ISI, publicat în Jurnalul Farmacia, Journal Rank Q3, (I.F. = 1.4).

În ceea ce privește acest studiu, am arătat că extractul apos prezintă o inhibiție notabilă numai asupra bacteriei *Streptococcus pyogenes*, având o activitate slabă asupra celorlalte organisme testate. Mai mult, extractul apos din pseudo-fructe de ienupăr a prezentat un efect toxic asupra celulelor de melanom uman A375, într-o manieră dependentă de concentrație, subliniind activitatea antitumorală a fracțiunii hidrosolubile împotriva melanomului uman.

- Datele prezentate în Capitolul 5, fac obiectul celui de-al treilea articol ISI, publicat în Jurnalul Farmacia, Journal Rank Q3, (I.F. = 1.4).

În ceea ce privește acest studiu, rezultatele prezentate arată că *Juniperus communis* poate fi utilizat ca o alternativă promițătoare pentru tratamentul cancerului pancreatic. Extractul de ienupăr a redus selectiv viabilitatea celulelor canceroase pancreatice (PANC-1), stimulând în același timp celulele hepatice sănătoase (HepaRG). Aceste rezultate oferă o bază pentru investigații suplimentare privind potențialul terapeutic al ienupărului, subliniind necesitatea unor studii mecaniciste suplimentare, a unor teste de eficacitate *in vivo* și a unor evaluări farmacodinamice pentru a valida pe deplin aplicabilitatea sa clinică.