

REZUMAT

al tezei de doctorat intitulată:

EXPLORAREA POTENȚIALULUI DE VALORIFICARE A UNUI SOI NOU DE LAVANDĂ

Doctorand: **MARCHIDAN Ionuț Georgică**

Conducător științific: **Prof. Univ. Dr. BĂBEANU Narcisa**

CUVINTE-CHEIE: George 90; specii de lavandă; compoziție chimică; potențial biologic

Genul *Lavandula*, cunoscut pentru sinteza de compuși bioactivi, a fost martor la o creștere notabilă a producției în ultimii 15 ani. Această escaladare subliniază relevanța industrială a genului *Lavandula* în sectoarele farmaceutice, parfumerie și alimentare. Constituenții bioactivi ai genului *Lavandula* își găsesc aplicații în formulări medicinale, produse de parfumerie și creații culinare, afirmând semnificația sa ca resursă botanică versatilă, cu implicații științifice și comerciale largi.

România se mândrește cu o specie endemică de lavandă, numită *George 90*, indexată în aprilie 2017 în Catalogul Oficial al Soiurilor. Analizat de Institutul de Stat pentru Testarea și Înregistrarea Soiurilor, *George 90* prezintă proprietăți morfostructurale distincte, care îl deosebesc de alte specii *Lavandula*. Caracterizat prin creștere extinsă, dimensiuni mari și caracteristici unice, acest soi de lavandă are frunziș verde cu tonuri subtile de gri și nu are incizii pe marginea frunzelor. Tulpina înflorită este lungă și flexibilă, nepubescentă, cu numeroase ramuri laterale. Inflorescența este lată și lungă, având o formă cilindrică cu vârfuri distanțate și numeroase flori, fiecare împodobită cu un caliciu verzui, pubescent și o corolă violetă. Recunoașterea lui *George 90* în Catalogul Oficial al Soiurilor îi evidențiază unicitatea în cadrul genului *Lavandula*.

Teza de doctorat este structurată în nouă capitole. **Capitolele I și II** oferă o prezentare detaliată a tehnicilor de cultură ale speciilor de lavandă, în timp ce se abordează și stadiul actual al cunoașterii, incluzând informații extrase din literatura de specialitate cu privire la compoziția chimică, utilizările și proprietățile biologice active ale speciilor de lavandă cunoscute. Ulterior, **capitolele III – IX** următoare aduc o contribuție originală prin expunerea comparativă detaliată a compoziției chimice a speciilor de lavandă *L. angustifolia*, *L. latifolia* și respectiv, speciei *George 90*. De asemenea, aceste capitole prezintă pentru prima dată informații relevante despre proprietățile biologice ale compușilor identificați în cadrul studiului.

Scopul tezei de doctorat a fost acela de a analiza potențialul de valorificare a unui soi nou de lavandă - *George 90*, comparativ cu speciile cunoscute - *L. angustifolia* și *L. latifolia*. Pentru atingerea scopului propus au fost înființate culturi comparative și au fost realizate extracții ale principiilor active din speciile de lavandă. Au fost analizate atât extractele din materialul biologic cât și uleiurile obținute și au fost evidențiate proprietățile biologice ale compușilor biologic activi identificați în speciile de lavandă studiate. De asemenea, au fost efectuate testări pentru a se evalua potențialul antitumoral al compușilor activi din lavandă.

Obiectivele specifice propuse au fost următoarele:

- ✚ Înființarea culturilor comparative, evaluarea fenologică a speciilor studiate și demonstrarea diversității genetice a culturii de lavandă: *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*.

- ✚ Realizarea extracției uleiurilor esențiale din speciile de lavandă: *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*, prin intermediul metodei de extracție asistată de microunde;

- ✚ Realizarea extracției compușilor polifenolici din speciile de lavandă *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*, prin utilizarea metodei de extracție asistată de microunde;

- ✚ Separarea și identificarea compușilor biologic activi din speciile de lavandă *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*, prin utilizarea unor tehnici avansate de analiză;

- ✚ Evaluarea activității antioxidante a compușilor biologic activi din speciile de lavandă *L. angustifolia*, *L. latifolia* și respectiv, specia românească *George 90*, prin intermediul diferitelor metode microspectrofotometrice, cum ar fi metodele DPPH, ABTS^{•+} și FRAP;

- ✚ Evaluarea activității antimicrobiene a compușilor biologic activi din speciile de lavandă *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*, utilizând metode *in vitro* de inhibare, inclusiv metoda difuzimetrică, determinarea concentrației minime inhibitorii și determinarea concentrației minime bactericide/fungicide;

- ✚ Evaluarea activității antitumorale a compușilor biologic activi din speciile de lavandă *L. angustifolia*, *L. latifolia* și respectiv, specia românească *George 90*, utilizând metode *in vitro* de evaluare a viabilității celulare, precum testul MTT.

Originalitatea tezei de doctorat este evidențiată prin cercetarea detaliată a speciei de lavandă românești *George 90* și prin analiza exhaustivă efectuată asupra celorlalte două specii de lavandă, *L. angustifolia* și *L. latifolia*. Această originalitate este susținută de investigația aprofundată a compoziției chimice a acestor trei specii de lavandă, precum și de analiza potențialului biologic al compușilor identificați în cadrul studiului.

Capitolul III intitulat „*Lavandula sp. Înființarea culturilor comparative, analiza fenologică și diversitatea genetică*”, prezintă datele obținute în ceea ce privește culturile demonstrative, dar și un studiu privind diversitatea genetică a culturii de lavandă. În ceea ce privește talia plantelor de lavandă se observă faptul că după 5 ani de la plantare, specia *George 90* a ajuns la o înălțime de 129 cm, valoare nesemnificativ mai mică față de specia *L. latifolia* (131 cm), dar la o diferență mare față de specia *L. angustifolia* (75 cm). Comparativ cu valoarea medie, specia *L. angustifolia* are o talie cu 37 cm mai redusă. Lungimea inflorescențelor în primul an de cultură (2017) este cuprins între 10 cm (*L. angustifolia*) și 13 cm (*L. latifolia*). În următorii ani, diferențele sunt nesemnificative.

Specia *George 90* are o lungime medie a inflorescențelor de 12 cm. Tija florală a avut în medie o lungime de 70,6 cm la specia *George 90*, o lungime de 70 cm la specia *L. latifolia* și o lungime de 43 cm la specia *L. angustifolia*. Numărul verticilor pe spicul floral variază în funcție de an și varietate. Pentru specia *George 90* acesta variază între 86 (2020) și 92 (2018), pentru specia *L. angustifolia* variază între 70 (2018, 2020, 2021) și 72 (2017 și 2019), iar pentru specia *L. latifolia* între 78 (2017) și 84 (2019 și 2021). Specia *George 90*, ca valoare medie a numărului de verticile pe spic, depășește celelalte varietăți cu 4,4 specia *L. latifolia* și cu 12,4 specia *L. angustifolia*.

Producția de inflorescențe diferă în funcție de an și varietate. Cele mai scăzute producții de inflorescențe au fost înregistrate în anul 1 (2017). Acestea au variat între 1716 kg/ha (*L. angustifolia*) și 3218 kg/ha (*George 90*). Cele mai ridicate producții au fost înregistrate în anul 5 (2021), ordinea varietăților fiind aceeași (6435 kg/ha – *L. angustifolia* și 18590 kg/ha - *George 90*). Media producțiilor ordonează variantele experimentale astfel: *George 90* – 11283 kg/ha, *L. latifolia* – 7004 kg/ha și *L. angustifolia* - 4403 kg/ha. Diferențele față de

media variantelor (13583 kg/ha) sunt foarte semnificative pozitive pentru speciile *George 90* și *L. latifolia* și semnificativ negative pentru specia *L. angustifolia* (DL5% = 465,14 kg/ha; DL 1% = 618,68 kg/ha, DL 0,01% = 801,71 kg/ha). Aceași tendință o putem observa și în cazul cantității de ulei esențial obținută la unitatea de suprafață.

Analiza dendrogramei evidențiază faptul că probele sunt divizate în două subgrupe distincte, speciile *L. latifolia*, *George 90* și lavandă market – un grup și *L. angustifolia* și *L. angustifolia* Blue scent LV-BS – al doilea grup. Markerii RAPD au contribuit la evidențierea relațiilor genetice dintre probele testate. De asemenea, s-au dovedit a fi utili în stabilirea unor markeri specifici pentru speciile de lavandă. Rezultatele au arătat 86,75% polimorfism între cele cinci probe testate, gradul înalt de variabilitate fiind datorat și faptului că speciile de lavandă sunt culturi preponderent exterioare.

Capitolul IV intitulat „**Extracția compușilor biologic activi prezenți în speciile de lavandă studiate**” prezintă prelevarea și pregătirea materialului vegetal, extracția uleiului esențial și extracția compușilor polifenolici. Materialul vegetal de *L. angustifolia*, *L. latifolia* și respectiv, *George 90* s-a prelevat din pepiniera din orașul Buftea, județul Ilfov. Prelevarea fiind o etapă importantă în realizarea obiectivelor propuse, a fost efectuată în luna iunie, atunci când speciile de lavandă au ajuns la maturitate și compușii biologic activi au ajuns la concentrația maximă. Etapa de prelevare a fost urmată de etapa de pregătire a materialului vegetal și respectiv, analiza acestuia.

Extracția avansată MAE a fost utilizată pentru a obține ulei esențial de lavandă, bogat în compuși biologic activi, iar extracția convențională HD a fost efectuată ca metodă comparativă. Uleiul esențial de lavandă s-a obținut din inflorescențele a trei specii diferite, precum *L. angustifolia*, *L. latifolia* și respectiv, *George 90*. În total s-au obținut șase uleiuri esențiale: ulei esențial MAE de *L. angustifolia* (LA-MAE), ulei esențial MAE de *L. latifolia* (LL-MAE), ulei esențial MAE de *George 90* (G90-MAE), ulei esențial HD de *L. angustifolia* (LA-HD), ulei esențial HD de *L. latifolia* (LL-HD) și respectiv, ulei esențial HD de *George 90* (G90-HD). S-a observat faptul că o cantitate considerabil mai mare de ulei esențial a fost obținută prin metoda de extracție MAE, comparativ cu metoda de extracție HD. Cel mai mare randament de extracție a fost obținut pentru uleiul esențial extras din specia de lavandă *George 90*, atât prin metoda de extracție MAE, cât și prin metoda de extracție HD.

Metoda de extracția asistată de microunde (MAE) a fost utilizată pentru a obține extractele bogate în compuși polifenolici din părți aeriene de lavandă (*L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*), folosind solvenți polari, etanol (EtOH) și metanol (MeOH), cu scopul de a obține un randament mai mare de extracție. Intervalul de temperatură (70 °C) a fost ales luând în considerare punctele de fierbere ale celor doi solvenți (etanol și metanol). Prezența apei împreună cu solventul (EtOH sau MeOH) ajută la eficientizarea încălzirii din interiorul vasului și facilitează extracția. Cu cât solventul utilizat este mai polar, cu atât încălzirea este mai eficientă. Astfel, s-au utilizat următorii solvenți de extracție: EtOH 50%, EtOH 70% și MeOH 50%.

Pentru a cunoaște impactul raportului material vegetal/solvent asupra extracției compușilor polifenolici, a fost stabilit raportului material vegetal/solvent la 1:20 (m/v) și respectiv, la 1:40 (m/v). S-au utilizat două dimensiuni ale materialului vegetal, material vegetal de dimensiune grosieră, notată cu G1 și material vegetal de dimensiune foarte fină, notată cu G2. În total s-au obținut prin extracția MAE, 12 extracte pentru fiecare specie de lavandă (*L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*). S-a observat faptul că o cantitate considerabil mai mare de compuși polifenolici a fost obținută cu MeOH 50% comparativ cu EtOH 50%. Similar extracției MAE și extracției HD a uleiurilor esențiale, cea mai mare cantitate de compuși polifenolici a fost extrasă din specia de lavandă *George 90*.

Capitolul V intitulat „**Analiza uleiurilor esențiale obținute din inflorescențele speciilor de lavandă studiate**” prezintă analiza GC-MS/MS a uleiurilor esențiale extrase din inflorescențele speciilor de lavandă studiate (*L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*), obținute prin două metode de extracție diferite: metoda de extracție MAE și metoda de extracție HD.

În total s-au identificat 41 de compuși biologic activi, compuși care fac parte din clasa hidrocarburilor și derivați ai hidrocarburilor. În uleiurile esențiale de *George 90* s-au identificat compușii biologic activi majoritari (eucaliptol, α -linalool, camfor, terpinen-4-ol, acetat de linil, acetat de bornil, acetat de geranil,

cariofilenă și oxid de cariofilenă) cu cea mai mare abundență (%). Din nou, metoda de extracție MAE s-a dovedit a fi mai eficientă decât metoda de extracție HD, deoarece uleiurile esențiale de *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*, obținute prin extracția MAE, s-au dovedit a fi mai bogate în compuși biologici activi din punct de vedere al concentrației.

Terpenoida camfor, care prezintă proprietăți antiinflamatoare, a fost identificată în uleiurile esențiale de *George 90*, obținute prin cele două metode de extracție: extracția MAE și extracția HD, similar uleiurilor esențiale de *L. angustifolia*. Asemenea uleiurilor esențiale de *L. latifolia*, sesquiterpenoida cariofileană, s-a identificat în procente mai mari în uleiul esențial G90-HD, decât în uleiul esențial G90-MAE, în schimb derivatul său, oxidul de cariofileană, s-a identificat în procente mai mari în uleiul esențial G90-MAE, decât în uleiul esențial G90-HD.

Capitolul VI intitulat „*Analiza compușilor polifenolici prezenți în speciile de lavandă studiate*” prezintă separarea, identificarea și cuantificarea compușilor polifenolici din extractele hidroalcoolice de *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*, în care s-a separat, identificat și cuantificat un procent de 95% din compușii de referință în extractele hidroalcoolice de *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*. Cei mai eficienți parametrii de extracție utilizați la extracția MAE a compușilor biologic activi din clasa polifenolilor din speciile de lavandă studiate (*L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*) au fost: EtOH 70%, dimensiune particule material vegetal G2 și raport material solvent 1:40 > MeOH 50%, dimensiune particule material vegetal G1 și raport material solvent 1:40 > EtOH 50%, dimensiune particule material vegetal G2 și raport material solvent 1:40.

Toți compușii de referință (acidul tanic, acidul galic, acidul protocatehic, catehina, acidul cafeic, acidul clorogenic, acidul siringic, acidul p-coumaric, acidul ferulic, acidul o-coumaric, acidul elagic, isoquercetina, rutina, acidul rozmarinic, hiperozida, naringina, quercetina, luteolina, naringenina și kaemferol) utilizați la analiza HPLC-DAD a extractelor de lavandă (*L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*) s-au regăsit în cantitatea cea mai mare în extractele hidroalcoolice de *George 90*. În schimb, acizii hidroxibenzoici (acidul tanic, acidul galic, acidul protocatehic), dar și derivați ai acizilor hidroxibenzoici (acidul siringic) au fost identificați în cantitate mai mare în extractele hidroalcoolice de *L. angustifolia*. Totodată, acizi hidroxicinamici (acidul cafeic, acidul p-coumaric, acidul o-coumaric, acidul ferulic), dar și derivați ai acizilor hidroxicinamici (acidul clorogenic, acidul rozmarinic) au fost identificați în cantitate mai mare în extractele hidroalcoolice de *L. latifolia*. Acidul elagic și flavonoidele naringină și naringenină au fost identificate în cantitate mai mare în extractele hidroalcoolice de *L. latifolia*, iar flavonoidele isoquercetină, rutină, hiperozidă, quercetină și luteolina naringenină au fost identificate în cantitate mai mare în extractele hidroalcoolice de *L. angustifolia*.

Capitolul VII intitulat „*Potențialul antioxidant al compușilor biologic activi prezenți în speciile de lavandă studiate*” prezintă evaluarea potențialului antioxidant al compușilor biologic activi prezenți în speciile de lavandă *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*.

Activitatea antioxidantă a extractelor de lavandă *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90* este legată de principalii compuși polifenolici, cum ar fi acidul protocatehic, acidul siringic, acidul elagic, acidul rozmarinic, izoquercetina, rutina, hiperozida și naringina. În ceea ce privește extracția cu solvenți, în cazul evaluării potențialului antioxidant prin metodele DPPH, ABTS^{•+} și FRAP, extractele hidroalcoolice de lavandă extrase cu EtOH 70%, raport 1:40 (m/v) au prezentat un potențial antioxidant mai mare, urmate de extractele hidroalcoolice de lavandă extrase cu MeOH 50%, raport 1:40 (m /v) și extractele hidroalcoolice de lavandă extrase cu EtOH 50%, raport 1:40 (m/v).

Rezultatele obținute pentru evaluarea potențialului antioxidant al probelor de lavandă *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90* (uleiurile esențiale și extractele hidroalcoolice), cu ajutorul metodelor DPPH, ABTS^{•+} și FRAP, sunt comparabile cu datele din literatura de specialitate, dar cu toate acestea, potențialul lor antioxidant este relativ mai slab în comparație cu standardele de referință, precum trolox și acid ascorbic. S-a dovedit faptul că prin toate metodele utilizate, de evaluare a potențialului antioxidant (DPPH, ABTS^{•+} și FRAP), atât pentru uleiurile esențiale, cât și pentru extractele hidroalcoolice, activitatea antioxidantă cea mai mare o deține specia românească de lavandă *George 90*, urmată de specia de lavandă *L. angustifolia* și respectiv, specia *L. latifolia*.

Capitolul VIII intitulat „**Potențialul antimicrobian al compușilor biologic activi prezenți în speciile de lavandă studiate**” prezintă evaluarea potențialului antibacterian și antifungic al compușilor biologic activi prezenți în speciile de lavandă *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*. Uleiurile esențiale de lavandă *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*, obținute atât prin metoda de extracție MAE, cât și prin metoda de extracție HD, au prezentat activitate antibacteriană notabilă asupra bacteriilor *Gram-pozitive* testate, *B. cereus* și *B. subtilis*, cu valori CMI variind de la 2,5 la 10.0%.

Uleiurile esențiale G90-MAE și G90-HD au prezentat potențiale antimicrobiene puternice asupra tulpinii *B. subtilis* și potențiale antimicrobiene moderate asupra tulpinii *B. cereus*. Uleiul esențial de lavandă LL-MAE a prezentat cel mai puternic potențial antibacterian asupra tulpinii *B. subtilis*, urmat de uleiul esențial G90-MAE. Totodată, uleiul esențial LA-MAE a prezentat cel mai puternic potențial antibacterian asupra tulpinii *B. cereus*, urmat de uleiul esențial LL-MAE. Toate uleiurile esențiale de lavandă *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90* au prezentat activitate antibacteriană semnificativă împotriva tulpinilor bacteriene *Gram-pozitive* testate.

Uleiurile esențiale de lavandă *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*, obținute atât prin extracția MAE, cât și prin extracția HD, au prezentat potențial antifungic. Cel mai puternic potențial antifungic a fost obținut asupra tulpinii *A. brasiliensis*, urmat de potențial antifungic moderat tulpinilor *F. oxysporum* și respectiv, *P. expansum*. Atunci când s-a utilizat cantitatea de 20 μ L de ulei esențial de lavandă *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90* s-a observat o activitate puternică de inhibare a tulpinii *F. oxysporum*, în schimb uleiurile esențiale de lavandă obținute prin extracția MAE prezintă activitate antifungică mai puternică în comparație cu uleiurile esențiale de lavandă obținute prin extracția HD.

Uleiurile esențiale de lavandă *L. angustifolia* și *George 90* au prezentat potențial antifungic puternic asupra tulpinii *A. brasiliensis*, cu un grad de inhibare de $100 \pm 0.0\%$ pentru toate cantitățile de ulei esențial testate (20 - 45 μ L). Atunci când cantitățile folosite au fost de 20 μ L și 25 μ L, gradul de inhibare a variat între 76.7 ± 12.0 - $97.24 \pm 2.8\%$, în timp ce la utilizarea cantităților mai mari, gradul de inhibare este de $100 \pm 0.0\%$.

În cazul tulpinii *P. expansum*, se observă faptul că gradul de inhibare este de $100 \pm 0.0\%$ atunci când a fost testată cantitatea de 45 μ L pentru toate uleiurile esențiale de lavandă (*L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*), obținute atât prin extracția MAE, cât și prin extracția HD, ceea ce denotă o rezistență naturală mai mare a tulpinii *P. expansum*. În schimb, uleiul esențial G90-MAE, a prezentat un grad de inhibare de $100 \pm 0.0\%$ și atunci când s-au utilizat cantitățile mai mici de ulei esențial (25 - 40 μ L). Atunci când s-au testat cantitățile în intervalul 25 μ L și 40 μ L, uleiurile esențiale de lavandă *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90* (G90-HD) au prezentat valori comparabile, gradul de inhibare variind între 76.5 ± 0.0 - $97.7 \pm 2.4\%$.

Capitolul IX intitulat „**Potențialul antitumoral al compușilor biologic activi prezenți în speciile de lavandă**” prezintă potențialul antitumoral al uleiurilor esențiale de *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*, evaluat asupra liniei celulare tumorale HeLa, folosind testul MTT. Acest studiu a indicat un potențial antitumoral puternic, la concentrații scăzute (1 %), ceea ce înseamnă că uleiurile esențiale *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90* conțin diferiți compuși biologic activi și fiecare compus îmbunătățește sau modifică potențialul antitumoral.

Pe baza literaturii de specialitate și a rezultatelor obținute în cadrul studiului, putem deduce că potențialul antitumoral al uleiurilor esențiale *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90* este strâns legat de metabolizarea compușilor biologic activi prezenți și de efectul sinergic al acestora. Uleiurile esențiale de lavandă au fost raportate ca având potențial antitumoral asupra mai multor linii celulare tumorale (Calu-3, U-373, PC3, MCF-7).

Elementele de noutate ale tezei de doctorat au fost:

(1) Analiza comparativă a speciilor de lavandă *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90* din punct de vedere al productivității biologice și demonstrarea diversității genetice a speciei *George 90*;

(2) Caracterizarea compoziției chimice ale speciilor de lavandă *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*, prin tehnici avansate de analiză, cum ar fi cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS/MS) și cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu detector cu șir de diode (HPLC-DAD);

(3) Evaluarea potențialelor biologice ale speciilor de lavandă *L. angustifolia*, *L. latifolia* și *George 90*, cum ar fi potențialul antioxidant, potențialul antibacterian, potențialul antifungic și potențialul antitumoral, prin metode de inhibare *in vitro*.

