

# Calitatea extractelor gemoterapice prin prisma metodelor analitice

## THE QUALITY OF GEMMOTHERAPIC EXTRACTS THROUGH ANALYTICAL METHODS

Conf. Dr. Olah Neli-Kinga<sup>1,2</sup>, Dr. chimist Ramona Câmpean<sup>1</sup>, Kurucz Réka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SC PlantExtrakt SRL, jud. Cluj

<sup>2</sup>Facultatea de Medicină, Farmacie și Medicină Dentară, Catedra de Chimie Farmaceutică, Universitatea de Vest „Vasile Goldiș”, Arad

### Rezumat

**Obiective.** Gemoterapia a deschis o nouă ramură în fitoterapie, cea a terapiei cu extracte din țesuturi meristemice proaspete, cu un potențial terapeutic care a determinat inițierea mai multor studii în ultimii ani. Cunoașterea compoziției chimice, menținerea în limitele constanței permise de natură, a extractelor gemoterapice este premisa unor produse eficiente și sigure. Asigurarea eficienței și siguranței se poate realiza numai printr-un control riguros al calității extractelor folosind metode analitice moderne – cromatografice și spectrale. Lucrarea prezintă studiul comparativ al compoziției unor extracte gemoterapice din plante aparținând familiei Ericaceae – extractele din mlădițe de Iarbă neagră – *Calluna vulgaris* L., de Afin – *Vaccinium myrtillus* L. și de Merișor – *Vaccinium vitis-idaea* L.

**Materiale și metode.** Extractele gemoterapice s-au obținut conform prevederilor Farmacopeei franceze și europene, din mlădițe tinere, recoltate din zona Cluj. Polifenolii, flavonoidele și arbutozida s-au evaluat prin cromatografie pe strat subțire, cromatografie de lichide de înaltă performanță și spectrofotometrie UV-Vis.

**Rezultate.** Metodele cromatografice au identificat în extracte arbutozida și hiperozida, respectiv cvercetina în extractul din mlădițele de Merișor și acidul clorogenic în extractul din mlădițe de Iarbă neagră. Concentrație mai mare de flavonoide totale și polifenoli totali s-a găsit în extractul din mlădițe de Iarbă neagră, iar arbutozida are concentrație mai mare în extractul din mlădițe de Merișor.

**Concluzii.** S-au observat asemănări și diferențe compoziționale. Metodele cromatografice pot realiza net diferențierea dintre specii înrudite cum sunt Afinul și Merișorul. Identificarea și determinarea cantitativă a compușilor activi din aceste extracte pot da explicații asupra efectelor terapeutice ale acestora, observate clinic. Prin aceste studii se poate propune o metodă de verificare a calității acestor extracte pentru asigurarea eficienței și siguranței.

**Cuvinte cheie:** gemoterapie, extracte din țesuturi meristemice, controlul calității, cromatografie, spectrofotometrie UV-Vis

### Abstract

**Objectives.** The gemmotherapy opened a new phytotherapy branch, those that use fresh, meristematic tissues extracts, having such a therapeutic power that determined the beginning of more studies in this field. The

Adresa de corespondență:

Conf. Dr. Olah Neli-Kinga, Facultatea de Medicină, Farmacie și Medicină Dentară, Str. L. Rebreanu Nr. 86, Arad  
e-mail: olahnr@aol.com

knowledge regarding the chemical composition of the gemmotherapeutic extracts, its constant maintenance in the nature allowed limits, is the premise of the efficient and safe products. The efficacy and safety can be assured just by a rigorous quality control of these extracts using modern chromatographic and spectral methods. This work present a comparative study of the chemical composition of some gemmotherapeutic extracts obtained from plants belonging to Ericaceae family – the young shoots extracts of Common heather - *Calluna vulgaris* L., Bilberry – *Vaccinium myrtillus* L. and Cowberry– *Vaccinium vitis-idaea* L.

**Materials and methods.** The gemmotherapeutic extracts were obtained according to French and European Pharmacopoeia from young shoots, harvested near Cluj. The polyphenols, flavonoids and arbutoside were evaluated by thin-layer chromatography (TLC), liquid chromatography (HPLC) and UV-Vis spectrophotometry.

**Results.** By the used chromatographic methods were identified in all extracts the arbutoside and the hyperoside, the quercetine was identified in the Cowberry young shoots extract and the chlorogenic acid in Common heather young shoots extract. The higher concentration of total flavonoids and polyphenols was determined in the Common heather young shoots extract. The arbutoside concentration was the highest in the Cowberry young shoots extract.

**Conclusions.** There were observed compositional similarities and differences. By chromatographic methods it was made a difference between very similar species, like the Bilberry and Cowberry. The identification and quantitative determination of the active compounds from these extracts can explain the therapeutic effects of them, clinically already observed. Using the mentioned methods could be proposed a quality control method of these extracts to assure them efficiency and safety.

**Key words:** gemmotherapy, meristematic tissues extracts, quality control, chromatography, UV-Vis spectrophotometry

## INTRODUCERE

Gemoterapia este o ramură mai nouă a fitoterapiei, numită de mulți chiar „noua fitoterapie”, dezvoltată începând din prima jumătate a secolului XX și fundamentată în anii '60. Gemoterapia se bazează pe efectul stimulator și reglator pe care celulele „stem vegetale” sau celulele meristemice îl pot avea asupra organismului uman. Celulele meristemice sunt celule vegetale nediferențiate, cu potențial mare de diviziune și care prin procesul de diferențiere vor putea deveni diferite tipuri de celule cu funcții specifice pentru plante (1-4).

Astfel, încă din anii '60 a apărut în Farmacopeea Franceză între monografiile de preparare a sușelor homeopate, metoda de preparare a maceratelor glicerinice din țesuturi meristemice proaspete (5). Aceste macerate glicerinice sunt extractele gemoterapice pe care se bazează azi toată experiența clinică în domeniul gemoterapiei.

Extractele gemoterapice sunt prin urmare extracte în alcool etilic, glicerină și apă ale unor țesuturi de plante tinere, proaspete, care se găsesc în muguri, mlădițe, radicele, semințe etc. Prin modul lor de preparare ele plasează gemoterapia la granița dintre fitoterapie și homeopatie.

Compoziția chimică a mugurilor, mlădițelor și altor țesuturi aflate în curs de diferențiere nu sunt bine cunoscute, ele conținând atât precursori ai compușilor de acumulare, cât și compuși de acumulare deja formați. Compoziția chimică este unul dintre factorii care determină efectul terapeutic și, ca urmare, calitatea, eficiența și siguranța acestor extracte. Ca urmare, studiul acestora și identificarea compușilor de bază au o importanță deosebită pentru stabilirea unor metode de control al calității.

Farmacopeele moderne, printre care și Farmacopeea Europeană, prevăd pentru plante și extracte din plante o serie de metode analitice care pot fi folosite pentru verificarea calității acestora. Dintre acestea, metodele cromatografice sunt importante deoarece sunt capabile de a separa și identifica componentele unor amestecuri atât de complexe cum sunt plantele și extractele acestora (6).

Dintre metodele cromatografice, cromatografia pe strat subțire este tehnica folosită pentru identificarea speciilor de plante, oferind o amprentă specifică fiecărei specii datorită compoziției lor chimice unice. Alte metode cromatografice cum sunt cromatografia de lichide sau de gaze sunt folosite pentru identificarea și determinarea cantitativă a unor compuși individuali din

plante. Metodele spectrale, în special spectrofotometria UV-Vis, este folosită pentru determinări de clase de compuși activi din plante sau pentru evaluarea efectului antioxidant (6,7).

Având în vedere necesitatea de a cunoaște compoziția chimică a extractelor gemoterapice și de a dezvolta metode de control al calității care să asigure o compoziție și concentrație constantă a compușilor activi din aceste extracte, pentru o eficiență terapeutică constantă, am ales să studiem extractele gemoterapice obținute din plante aparținând familiei Ericaceae. Extractele din mlădițele de Iarbă neagră – *Calluna vulgaris* L., de Afin – *Vaccinium myrtillus* L. și de Merișor – *Vaccinium vitis-idaea* L. au fost studiate prin metode cromatografice și spectrale. S-a urmărit conținutul de flavonoide, polifenoli și de arbutozidă, compus caracteristic familiei Ericaceae, observând asemănări și deosebiri între plante, care, macroscopic, pot avea caracteristici morfologice similare.

## MATERIALE ȘI METODE

### Prepararea extractelor

Mlădițele de Iarbă neagră, Afin și Merișor s-au recoltat în perioada mai-iunie, din zone nepoluate, aflate la cel puțin 3 km depărtare de orice zonă intens circulată, din județul Cluj. Prelucrarea plantei proaspete s-a realizat în maximum 6 ore de la recoltare, după o verificare amănunțită sub aspect botanic (macroscopic).

Extractele gemoterapice s-au preparat conform metodei din Farmacopeea Franceză, respectiv Europeană (5,6), folosind ca și solvent apă purificată, alcool etilic 96% vol. și glicerină vegetală 100%, toate de calitate farmaceutică. Extracția s-a realizat la rece, prin macerare. Toate extractele au fost obținute la SC PlantExtrakt SRL.

### Condițiile analizei cromatografice pe strat subțire

Analiza cromatografică pe strat subțire s-a realizat pe placă de silicagel, având încorporat indicator de fluorescență la 254 nm, provenit de la firma Merck, Germania. Extractele s-au supus extracției pe fază solidă, pe coloane silicagel-C18, înainte de a fi aplicate pe placă (8). Ca și etaloane s-au folosit soluții metanolice de 1 mg/ml de acid clorogenic, hiperozidă și cvercetină. Pe placă s-au aplicat câte 40 μl din extractele gemoterapice prelucrate și câte 10 μl din etaloane. Eluarea s-a realizat cu un amestec de acetat de etil – metanol – apă purificată (64:20:16, v/v). După eluare placa s-a uscat în aer, apoi s-a pulverizat cu reactiv Neu-PEG și s-a vizualizat în fluorescență la 365 nm (7,9).

### Condițiile analizei cromatografice de lichide (HPLC)

Analiza cromatografică de lichide de înaltă performanță s-a realizat cu un aparat HPLC Varian ProStar prevăzut cu pompă terțiară și detector spectrofotometric cu arie de diode. Separarea s-a realizat pe coloană Phenomenex C-18, 150 x 4,6 mm, 5 μm, prevăzut cu o precoloană de aceeași tip, de 5 mm lungime. Faza mobilă izocratică a fost formată din 90% metanol și 10% apă purificată și s-a introdus în coloană cu un debit de 1 ml/minut. S-au injectat câte 10 μl din soluții metanolice 10% obținute din cele 3 extracte gemoterapice, respectiv din soluții standard de arbutozidă de 0,1; 0,2; 0,3 respectiv 0,4 mg/ml. Detecția spectrofotometrică s-a realizat la 280 nm. Pe baza ariilor determinate la soluțiile standard de arbutozidă s-a construit o curbă de calibrare pentru evaluarea conținutului de arbutozidă în cele 3 extracte gemoterapice.

### Condițiile analizelor spectrofotometrice UV-Vis

#### Determinarea flavonoidelor totale

Determinarea s-a realizat adaptând metoda din Farmacopeea Română (10).

Câte 2 ml din extractele gemoterapice s-au amestecat cu 3 ml clorură de aluminiu 2,5% și 5 ml acetat de sodiu 10% și totul s-a adus la 25 ml cu metanol. După 30 de minute s-au citit absorbanțele la un aparat GBC-Cintra 101, Australia, la 430 nm. Ca și soluție de comparație s-a folosit un amestec format din 2 ml extract gemoterapic adus la 25 ml cu metanol.

Ca și standard s-a folosit o soluție de rutozidă de 0,1 mg/ml din care s-au luat câte 1, 2, 3 respectiv 4 ml și s-au amestecat cu 3 ml clorură de aluminiu 2,5% și 5 ml acetat de sodiu 10% și apoi toate soluțiile s-au adus la 25 ml cu metanol. După 30 de minute s-au citit absorbanțele la un aparat GBC-Cintra 101, Australia, la 430 nm. Ca și soluție de comparație s-a folosit un amestec format din 8 ml apă adus la 25 ml cu metanol. Pe baza absorbanțelor citite pentru soluțiile standard s-a construit o curbă de calibrare pentru determinarea concentrației de flavonoide totale exprimate în rutozidă în extractele gemoterapice studiate.

#### Determinarea polifenolilor totali

Determinarea s-a realizat adaptând metoda din Farmacopeea Română (11).

Câte 10 ml de extracte gemoterapice s-au amestecat cu 0,5 ml reactiv fosfowolframic și totul s-a adus la 25 ml cu soluție de carbonat de sodiu 15%. După 2 minute s-au citit absorbanțele la un aparat GBC-Cintra 101, Australia, la 715 nm. Ca și soluție de comparație s-a folosit un amestec format din 10 ml extract

gemoterapic adus la 25 ml cu soluție de carbonat de sodiu 15%.

Ca standard s-a folosit o soluție de acid cafeic de 1 mg/ml din care s-au luat câte 0,01; 0,5 respectiv 1 ml și s-au amestecat cu 0,5 ml reactiv fosfowolframic și apoi toate soluțiile s-au adus la 25 ml cu soluție de carbonat de sodiu 15%. După 2 minute s-au citit absorbanțele la un aparat GBC-Cintra 101, Australia, la 715 nm. Ca și soluție de comparație s-a folosit un amestec format din 1,5 ml apă adus la 25 ml cu soluție de carbonat de sodiu 15%. Pe baza absorbanțelor citite pentru soluțiile standard s-a construit o curbă de calibrare pentru determinarea concentrației de polifenoli totali exprimați în acid cafeic în extractele gemoterapice studiate.

## REZULTATE

În Fig. 1 se observă cromatograma pe strat subțire obținută pentru cele 3 extracte gemoterapice studiate.

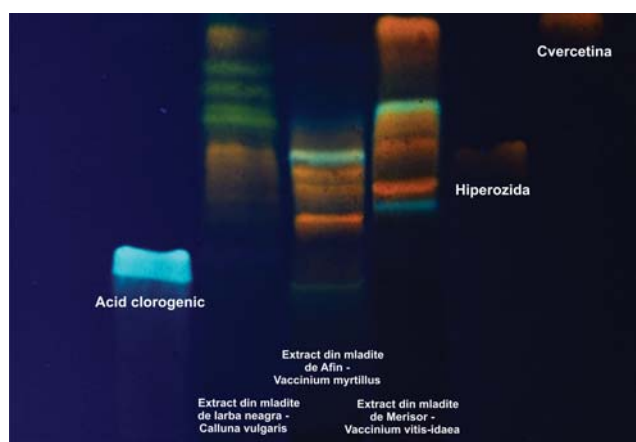


FIGURA 1. Cromatograma extractelor gemoterapice de Ericaceae în fluorescență

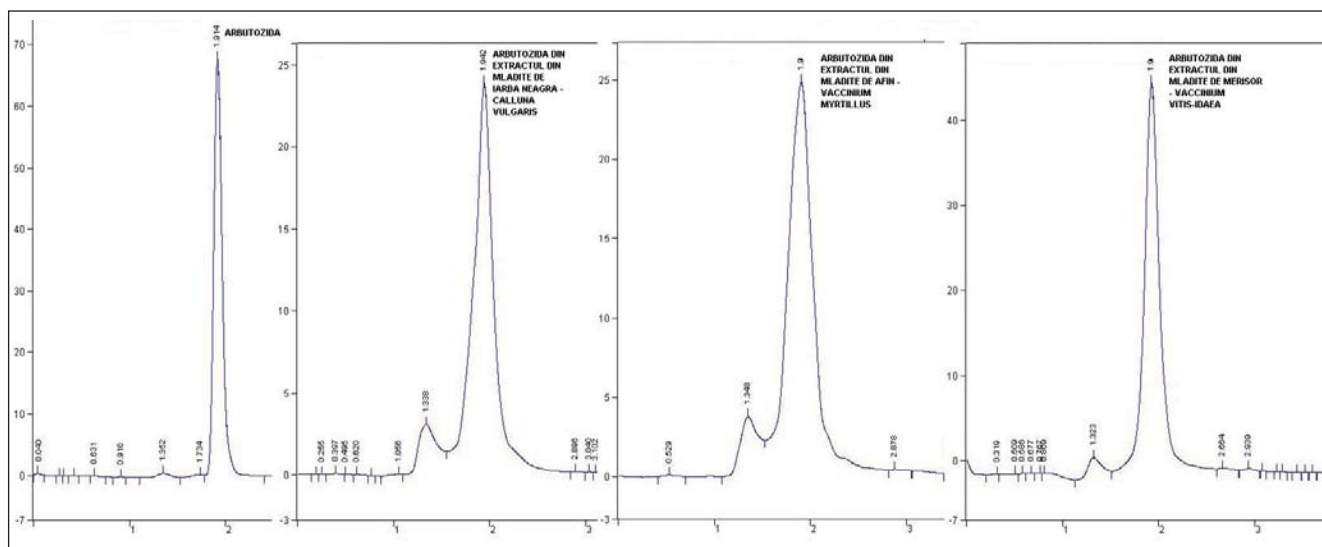


FIGURA 2. Cromatogramele HPLC ale arbutozidei standard și ale arbutozidelor separate din extractele gemoterapice

În Fig. 2 sunt prezentate cromatogramele HPLC obținute pentru extractele gemoterapice și al arbutozidei standard, iar în Tabelul 1 sunt prezentate maximele de absorbție din spectrul UV-Vis al arbutozidei standard, respectiv ale arbutozidelor separate din extractele gemoterapice. Timpul de retenție al arbutozidei este de 1,9 min atât la standard, cât și în cazul compușilor separați din extractele gemoterapice.

TABELUL 1. Maximele de absorbție ale arbutozidei și al arbutozidelor separate din cele 3 extracte gemoterapice

Arbutozida	Maxim de absorbție, nm
Standard	285,76
Din extract din mlădițe de Iarbă neagră – <i>Calluna vulgaris</i>	289,44
Din extract din mlădițe de Afin – <i>Vaccinium myrtillus</i>	289,23
Din extract din mlădițe de Merisor – <i>Vaccinium vitis idaea</i>	284,43

În Fig. 3 se observă curbele de calibrare pentru rutozidă, respectiv acid cafeic obținute prin metodele spectrofotometrice menționate și pentru arbutozida obținută prin HPLC. În Tabelul 2 sunt prezentate ecuațiile curbelor și coeficienții de corelație.

TABELUL 2. Ecuațiile curbelor de calibrare și coeficienții lor de corelație

Ecuția pentru	Ecuția	Coeficientul de corelație
Rutozidă	Abs = 31,185 x C + 0,0017	0,9999
Acid cafeic	Abs = 13,967 x C + 0,1637	0,9984
Arbutozidă	Aria = 4x10 <sup>7</sup> x C + 450779	0,9990

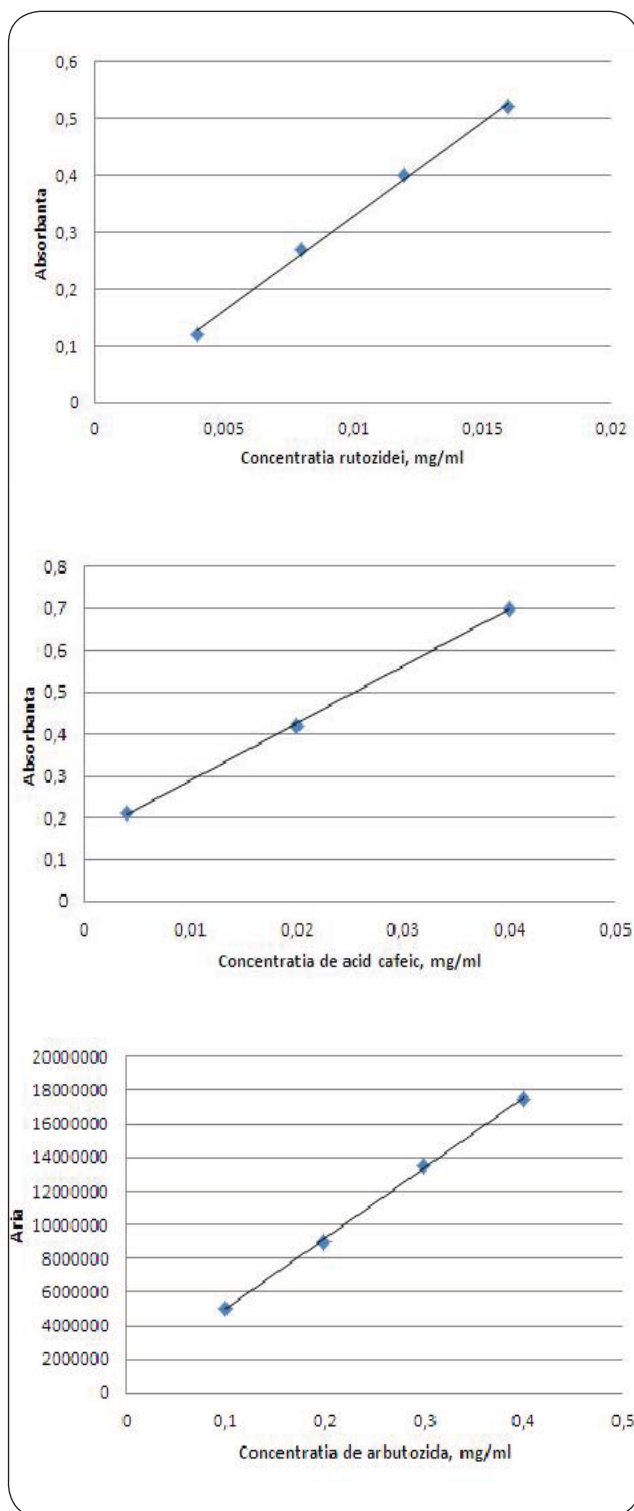


FIGURA 3. Curbele de calibrare în rutozidă, acid cafeic și arbutozidă

În Tabelul 3 și Figura 4 sunt prezentate rezultatele determinărilor spectrofotometrice pentru cele 3 extracte gemoterapice în ceea ce privește conținutul lor în flavonoide totale exprimate în rutozidă, polifenoli totali exprimați în acid cafeic și arbutozidă.

TABELUL 3. Conținutul de flavonoide totale exprimate în rutozidă, de polifenoli totali exprimați în acid cafeic și de arbutozidă a celor 3 extracte gemoterapice

Extractul gemoterapic din mlădițe de	Conținut de flavonoide totale exprimate în rutozidă, mg/ml	Conținut de polifenoli totali exprimate în acid cafeic, mg/ml	Conținut de arbutozidă, mg/ml
larbă neagră – <i>Calluna vulgaris</i>	0,102	0,131	0,430
Afin – <i>Vaccinium myrtillus</i>	0,071	0,072	1,030
Merișor – <i>Vaccinium vitis-idaea</i>	0,074	0,075	1,330

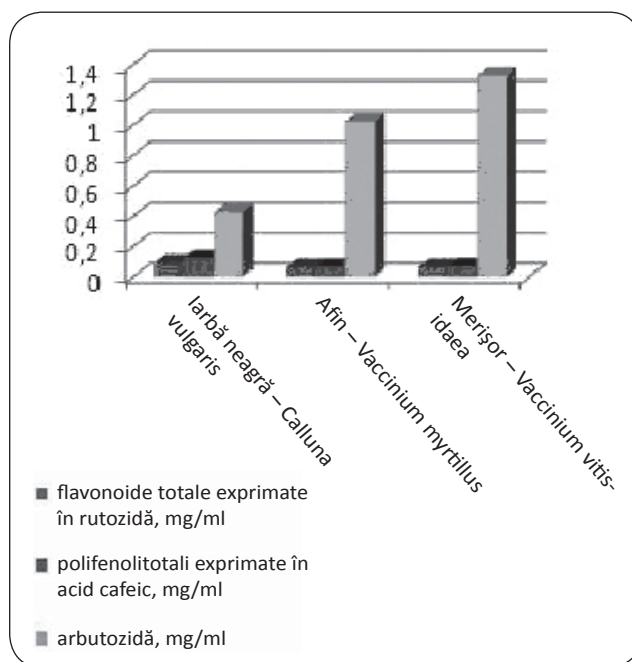


FIGURA 4. Conținutul de flavonoide totale exprimate în rutozidă, de polifenoli totali exprimați în acid cafeic și de arbutozidă a celor 3 extracte gemoterapice

## DISCUȚII

Analiza cromatografică pe strat subțire indică clar diferențele între cele 3 specii, fiecare având o amprentă cromatografică specifică cu o gamă de compuși specifici, chiar dacă fac parte din aceeași familie. Se observă însă și o serie de asemănări, compuși care sunt prezenți în toate cele 3 specii, aceștia fiind compuși specifici familiei. S-a putut identifica hiperozida în toate cele 3 extracte gemoterapice, cvercetina doar în extractul din mlădițe de Merișor, iar acidul clorogenic mai ales în extractul din mlădițe de larbă neagră. Se observă diferențe de intensitate a benzilor separate care indică concentrații diferite ale componentelor în diferitele extracte gemoterapice studiate. Astfel, se poate observa o bandă corespunzătoare hiperozidei

mai intensă în extractele din mlădițele de Afin, respectiv Merișor.

Prezența arbutozidei, identificată și determinată cantitativ prin cromatografie de lichide pe coloană în toate cele 3 extracte gemoterapeutice, fiind compus specific familiei de plante, poate explica indicația acestor extracte gemoterapice, pe baza experienței clinice, în infecții urinare de tipul cistitelor, colibacilozei etc. Picul mai înalt, indicând o concentrație mai mare, corespunzătoare arbutozidei în extractul din mlădițe de Merișor, poate explica indicația preponderent în sfera aparatului urinar și digestiv, mai ales în colibaciloze, a acestui extract.

Dozarea de flavonoide totale și polifenoli totali a relevat o concentrație mai mare a acestora în Extractul din mlădițe de lărbă neagră, dar toate cele 3 extracte gemoterapice studiate au o concentrație semnificativă de flavonoide și polifenoli. Aceste date sunt în concordanță și cu rezultatele cromatografiei pe strat subțire, unde benzile galben-portocalii sau galben-verzui indică flavonoidele, iar cele albastre sau verzui-albastre derivații de acid cafeic. Concentrația mare de polifenoli și flavonoide poate să fie corelată cu o activitate antioxidantă semnificativă care poate contribui la efectele benefice ale acestor extracte gemoterapice, observate clinic.

În cazul Extractului gemoterapic din mlădițe de Afin – *Vaccinium myrtillus* concentrația semnificativă de polifenoli poate explica efectul benefic asupra ochilor, inclusiv în caz de complicații retiniene din diabetul zaharat, deoarece prin conținutul ridicat de polifenoli poate reduce stresul oxidativ de la nivelul ochilor.

Concentrația semnificativă de flavonoide din Extractul din mlădițe de lărbă neagră – *Calluna vulgaris* poate explica efectul diuretic al acestuia, constatat clinic, cunoscut fiind că flavonoidele contribuie la diureză. Raportul de concentrație polifenoli, flavonoide și arbutozidă în extractul din mlădițe de lărbă neagră poate explica și indicația preponderentă a acestui extract ca diuretic, de eliminare a unor tipuri specifice de calculi renali și mai puțin în infecții urinare.

Ca urmare, metodele analitice folosite – cromatografia pe strat subțire, HPLC și spectrofotometria UV-Vis – pot fi propuse ca metode de control al calității acestor extracte gemoterapice, determinând identitatea speciei, identificând potențialii compuși activi și determinând cantitativ clase de compuși sau compușii importanți. Folosind aceste teste ca metode de control

al calității se va putea verifica constanța, în limitele permise de natură, a compușilor importanți din punct de vedere terapeutic și se va putea asigura eficiența constantă a extractelor gemoterapeutice.

Folosind metode analitice de controlul calității se garantează calitatea, eficiența și siguranța constantă a extractelor gemoterapice PlantExtrakt, folosirea speciei corespunzătoare și obținerea de extracte cu gama de compuși activi corespunzători, atât sub aspect calitativ, cât și cantitativ.

## CONCLUZII

Lucrarea a evidențiat similaritățile și diferențele compoziționale existente între 3 extracte gemoterapice obținute din plante aparținând aceleiași familii, Ericaceae. S-au putut identifica prin cromatografie compușii specifici familiei, prezenți în toate cele 3 extracte, arbutozida, dar și compușii specifici ficărei specii, mai ales din clasa polifenolilor. S-a observat, pe baza mărimii picului corespunzător arbutozidei, că cel mai mare conținut se găsește în extractul din mlădițe de Merișor – *Vaccinium vitis-idaea*. S-au determinat cantitativ flavonoidele totale, polifenolii totali și arbutozida, observându-se că extractul din mlădițe de lărbă neagră conține o concentrație mai mare de polifenoli și flavonoide (0,131 mg/ml, respectiv 0,102 mg/ml), iar extractele de Afin și Merișor conțin mai multă arbutozidă (1,03, respectiv 1,33 mg/ml). Pe baza acestor date se pot explica o serie de indicații terapeutice sau efecte benefice ale acestor extracte gemoterapice, observate clinic. Astfel s-a putut explica folosirea preponderentă în sfera urinară a Extractului din mlădițe de lărbă neagră – *Calluna vulgaris*, care are un conținut mai mare de flavonoide cu posibil efect diuretic. Pe baza concentrației semnificative de polifenoli și flavonoide cu rol antioxidant se poate explica efectul benefic asupra ochilor al Extractului din mlădițe de Afin – *Vaccinium myrtillus*. Prezența arbutozidei în toate cele 3 extracte gemoterapice explică indicația lor în infecții urinare – cistite și colibaciloze, mai ales al Extractului din mlădițe de Merișor, care prezintă concentrația cea mai mare de arbutozidă.

Lucrarea demonstrează importanța controlului calității extractelor gemoterapice folosind metode analitice moderne, cromatografice și spectrale, metode ce satisfac cerințele pentru a fi folosite în acest sens. Controlul riguros al calității acestor extracte gemoterapice asigură eficiența și siguranța constantă a acestora.

## BIBLIOGRAFIE

1. Piterà F. – Compendiu de gemoterapie clinică (Meristemoterapia) cu index clinic, Ediția a III-a, Traducere din limba italiană – dr. Sorina Soescu, Constanța: Fundația Creștină de Homeopatie „Simile”, 2003.
2. Tetau M. – Gemotherapy – A clinical guide, St. Bruno, Quebec: Ed. Du Detail Inc, 1998.
3. Rozencwajg J. – Dynamic Gemmotherapy – Integrative Embryonic Phytotherapy, Second Edition, Natura Medica Ltd., 2008.
4. Halfon R. – Gemmotherapy – The Science of Healing with Plant Stem Cells, Rochester, Vermont, Toronto, Canada: Healing Arts Press, 2010.
5. \*\*\* Pharmacopée Française, ed. VIII, Paris: Gouvernement Français, 1965.
6. \*\*\* European Pharmacopoeia, Monografia 2371: Metode de preparare a sușelor homeopatice și potențarea, Ed. 7, Brussel: Council of Europe - EDQM, 2012.
7. \*\*\* Homeöpathisches Arzneibuch, Stuttgart, Eschborn: Deutscher Apotheker Verlag, 2012.
8. Cobzac S., Cimpan G., Olah N., Gocan S. – The quantitative determination of rutin in different glycerinic plant extracts by solid-phase extraction and thin layer chromatography with densiometry. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 1999; 12: 26-30.
9. \*\*\* European Pharmacopoeia, Monografia 2029: Tincturi mamă pentru preparate homeopatice, Ed. 7, Brussel: Council of Europe - EDQM, 2012.
10. \*\*\* Farmacopeea Română, Ed. X, București: Ed. Medicală, 1993.
11. \*\*\* Farmacopeea Română, Ed. IX, București: Ed. Medicală, 1976.