

Studiul compușilor volatili și activitatea antimicrobiană a uleiurilor esențiale de Thuia

Study of volatile compounds and antimicrobial activity of Thuja essential oils

Dumitrescu E., Kraunovic M.C., Orășan-Alic A.S., Moruzi R.F., Mohamed E.,
Doma A.O., Muselin F., Cristina R.T.
FMV Timișoara

eugeniadumitrescu@usab-tm.ro

Cuvinte cheie: Thuia, compuși volatili, activitate antimicrobiană.

Key words: Thuia, volatile compounds, antimicrobial activity.

Rezumat

Timp de peste 5.000 de ani, diferite culturi au folosit aceste uleiuri din plante pentru o multitudine de probleme de sănătate. Istoria folosirii uleiurilor esențiale are rădăcini în antichitate în țări precum Persia, India, Egipt, China. Uleiurile esențiale se formează în general în perioada de înflorire a plantelor și se acumulează în flori, fructe, frunze, rădăcini sau scoarță. Compoziția chimică a unui ulei esențial obținut dintr-o plantă diferă în funcție de părțile plantei din care a fost extras. În prezenta lucrare sunt enumerate informații despre arbuștii Thuia unde sunt încadrate 5 specii de arbori, dintre care doi sunt originari din America de Nord (*Thuja occidentalis*, *T. plicata*) și trei din Asia de Vest (*Thuja koraiensis*, *T. standishii*, *T. sutchuenensis*). Este prezentată taxonomia, compoziția chimică, proprietățile farmacologice precum și noțiuni despre uleiurile esențiale de Thuia. În partea de cercetări este prezentată identificarea compușilor volatili din uleiul esențial de Thuia prin metoda GC-MS și testarea efectului antimicrobian al uleiului esențial de Thuia.

Abstract

For over 5,000 years, various crops have used these herbal oils for a variety of health problems. The history of the use of essential oils has its roots in antiquity in countries such as Persia, India, Egypt, China. Essential oils are generally formed during the flowering period of plants and accumulate in flowers, fruits, leaves, roots or bark. The chemical composition of an essential oil obtained from a plant differs depending on the parts of the plant from which it was extracted. This paper lists information about Thuja shrubs which includes 5 species of trees, two of which are native to North America (*Thuja occidentalis*, *Thuja plicata*) and three from Western Asia (*Thuja koraiensis*, *Thuja standishii*, *Thuja sutchuenensis*). It presents taxonomy, chemical composition, pharmacological properties and notions about Thuja essential oils. The research part presents the identification of volatile compounds in thuja essential oil by GC-MS method and testing the antimicrobial effect of thuja essential oil.

Introducere

Uleiurile esențiale conțin un amestec foarte complex de molecule volatile care pot fi clasificate în două grupe principale, în funcție de structura lor moleculară:

1. Terpene și terpenoide

Terpenele și terpenoidele sunt hidrocarburi formate prin combinarea a mai multor unități de izopren. În timp ce majoritatea terpenelor nu posedă activitate antimicrobiană

semnificativă, multe terpenoide sunt antimicrobiene puternice.

2. Fenilpropanoide

Fenilpropanoidele sunt o familie diversă de molecule care sunt sintetizate din aminoacizii fenilalanină și tirozină.

Activitatea lor antimicrobiană variază de la compus la compus.

Există mai multe mecanisme prin care uleiurile esențiale acționează asupra bacteriilor:

1. Toxicitate asupra peretelui celular

Datorită naturii hidrofobe a uleiurilor esențiale, acestea sunt capabile să se lege de peretele bacterian și să acționeze în moduri diferite pentru a le perturba, pentru a crește permeabilitatea și a cauza pierderea componentelor celulare. În cele din urmă, acest lucru duce la moartea bacteriilor.

2. Acțiune asupra sinteza proteinelor

Diferitele componente ale uleiurilor esențiale modifică anumite căi de sinteză a proteinelor.

3. Reducerea nivelului ATP intracelular

Adenozin trifosfatul (ATP) este "unitatea moleculară de schimb" a transferului de energie în celule și este vital pentru metabolismul celular.

4. Reducerea pH-ului intracelular

5. Modificări ale citoplasmei

Unele uleiuri esențiale (scorțișoară, oregano) determină coagularea materialului proteic în citoplasmă.

Obiectiv:

Pornind de la considerentul că, proprietățile farmacologice și cele terapeutice ale unui ulei esențial sunt date de componentele lor chimice, componente care diferă în funcție de proveniență, sol, temperatură, umiditate etc., ne-am propus să determinăm conținutul în compuși volatili a uleiului esențial de Thuia procurat din comerț și să testăm efectul antimicrobian al acestuia.

1. Noțiuni generale despre arbuștii din genul Thuia

În Genul *Thuja* sunt încadrate cinci specii de arbori, dintre care două sunt originare din America de Nord

În Europa aceștia se folosesc mai mult în scopuri ornamentale [1, 6].

Părțile medicinale sunt reprezentate de frunze, conuri și tulpină, din care se obțin tincturi, extracte, uleiuri esențiale.

Lemnul este ușor, moale și aromatic. Se poate tăia ușor și rezistă timp de zeci de ani.

Lemnul se poate folosi la obținerea unor cufere pentru haine, care sunt repelente împotriva moliiilor. De asemenea lemnul se mai

poate folosi la fabricarea gardurilor sau parilor [7].

Lemnul speciei *Thuja plicata* este folosit pentru fabricarea coardelor folosite la chitare. În secolul XIX arborii din acest gen se foloseau sub formă de tinctură sau unguent pentru tratarea verucilor, negilor, dermatofitozelor și a candidozei orale.

Indigenii din Canada, foloseau frunzele de *Thuja occidentalis* pentru a face ceai pe care îl consumau pentru prevenția scorbutului.

S-a demonstrat că acesta conține 50 mg vitamina C în 100 g produs.

Amerindienii creșteau *Thuja spp* pentru lemn și în scopuri medicinale.

Acestia foloseau preparatele din Thuja pentru tratarea tusei, febrei, cefaleei, tulburărilor menstruale, dar și a durerilor musculare [16].

De-a lungul timpului s-au demonstrat efectele antivirale, antioxidante, antimicrobiene și antidiareice ale extractelor de *Thuja occidentalis*. Acestea au fost folosite pentru tratarea catarului bronhial, cistitei, psoriazisului, carcinoamelor uterine, amenoreei și reumatismului.

Uleiul esențial obținut din acești arbori conține thujonă, substanță care a fost studiată pentru efectul antagonist asupra receptorilor GABA [17].

În prezent se folosesc uleiurile esențiale sau tincturile, ambele cu efect antibacterian.

S-a demonstrat că extractul de *Thuja* are efect antibacterian, acționând atât asupra bacteriilor Gram pozitive cât și pe cele Gram negative [5].

Se folosește mai des în tratarea infecțiilor acute sau cronice ale tractului respirator superior, ca antibiotic adjuvant în infecțiile bacteriene severe, cum ar fi:

- bronșita,
- angina,
- faringita,
- otita medie și
- sinuzita.

Proprietățile imunostimulatoare și antivirale se bazează pe creșterea proliferării limfocitelor T și producerea interleukinei-2.

1.1. Încadrarea taxonomică a arbuștilor din genul *Thuja*

Thuja spp este un conifer hermafrodit, încadrat în:

Genul *Thuja*,
Subfamilia *Thujoideae*,
Familia *Cupressaceae*, care face parte din
Ordinul *Pinales*,
Clasa *Pinopsida*,
Subîncregătura *Pinophyta*,
Încregătura *Spermatophyta* [20].

Denumirea populară a acestui arbore este „arborele vieții”. Din genul *Thuja* fac parte două specii originare din America de Nord:

- *Thuja occidentalis*,
 - *Thuja plicata* și
- trei specii originare din Asia:
- *Thuja koraiensis*,
 - *Thuja standishii*,
 - *Thuja sutchuenensis*) [7].



Figura 1. *Thuja occidentalis*

Sursa: <https://www.gardenia.net/plant/thuja-occidentalis-smaragd> [35]



Figura 2. *Thuja plicata*

Sursa: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thuja_plicata_%27Zebrina%27_leaves_01_by_Line1.jpg [33]



Figura 3. *Thuja koraiensis*

Sursa: <https://treesandshrubsonline.org/articles/thuja/thuja-koraiensis/> [37]

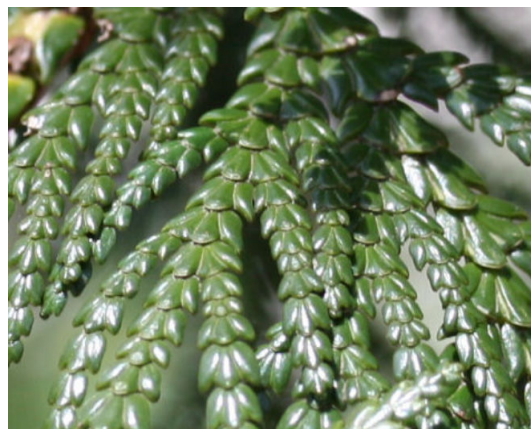


Figura 4. *Thuja standishii*

Sursa: <https://conifersociety.org/conifers/thuja-standishii/> [34]



Figura 5. *Thuja sutchuenensis*

Sursa: <http://www.pinetum.org/sp/THsutchuenensis.html> [36]

În Europa cea mai răspândită specie este *Thuja occidentalis*, care se folosește în scopuri ornamentale. Această specie se întâlnește sub patru varietăți majore:

- *T. occidentalis* var. *aureospica*,
- *T. occidentalis* var. *lutea*,
- *T. occidentalis* var. *vervaeneana*,
- *T. occidentalis* var. *wareana* [12].

1.1.1. Descrierea arbuștilor

Thuja spp este un conifer hermafrodit, originar din America de Nord, regiune în care formează păduri întinse dacă terenul este umed. Acesta se adaptează la condiții diverse de climat și temperatură și este rezistentă la ger [4].

Thuja occidentalis, denumită în popor „*Thuia obișnuită*” are tulpina dreaptă, cu ramurile scurte și dese cu o coroană piramidală.

Scoarța este subțire, netedă, de culoare brun-roșcată care se exfoliază în fâșii. Lujerii sunt turtiți și ramificați alternativ în planuri orizontale sau oblice [25].

Frunzele sunt de culoare verde, solziforme, opuse și îmbracă complet lujerul, iar *frunzele laterale* au formă de luntre, iar cele de pe fața superioară și inferioară au câte o glandă reziniferă, glandă care dă un miros caracteristic, intens și un gust puternic, camforic.

Frunzele de pe fața superioară și fața inferioară nu au glanda reziniferă convexă, ci câte o gropiță care arată ca o zgârietură. Iarna, frunzișul capătă o culoare ruginie.

Florile sunt unisexuat monoice, dispuse în conuri ovoid-alungite, cu lungimea de 1 cm, de culoare galben-verzuie și prezintă 3-5 perechi de solzi pieloși, uscați, cei localizați la bază sunt lungi, aproape cât conul și mucronați la vârf.

Semințele sunt mici, plate, de culoare galben-marou și prezintă 2 aripioare emarginate, dispuse câte două sub fiecare solz. Fructele seamănă cu castanele.

Thuja orientalis (denumire populară: „*arborele vieții*”) este originară din Extremul Orient. Specia are o distribuție ecologică largă,

este rezistentă la secetă și fum, dar nu este foarte rezistentă la ger.

T. orientalis se deosebește de *T. occidentalis* prin tulpina care se ramifică neregulat de la bază, iar ramurile sunt ascendente. O altă deosebire sunt lujerii, care sunt mai subțiri și mai puțin turtiți, dispuși în planuri verticale.

Conurile sunt mai mari, 10-25 mm, cărnoase, verzi la început, apoi brune, brumate, cu 6 solzi cu vârful răstrânt ca un corn, care la maturitate se desfac mai mult în lateral. Semințele sunt de culoare brună și nearipate [14].

Thuja plicata (denumire populară: *Thuia gigantică*) este originară din America de Nord și ajunge până în Alaska. Este o specie exotica ce poate să ajungă până la 60 m înălțime.

Tulpina este dreaptă, cilindrică, coroana conică, ascuțită, la exemplarele izolate fiind dezvoltată până la sol.

Scoarța este netedă, de culoare brun-roșcată, cu un ritidom timpuriu, exfoliabil. Lujerii principali nu sunt turtiți ca la *T. occidentalis*, ci sunt aproape rotunzi, cei terminali turtiți, cu ramificații distice și dese. Frunzele sunt solziforme, opuse, verzi și peste iarnă, fără glande rezinifere convexe, pe dos cu 2 dungi de stomate albastrui.

1.2. Compoziția chimică

Din punct de vedere chimic, arborele conține o serie de compuși: saponine, fenoli, taninuri, amine, mucilagii, principii amari, componenți lactonici, carotene, uleiuri esențiale, triterpene, steroizi, glucide reducătoare, cumarine, acid tanic, polizaharide, proteine și minerale.

Dintre toate aceste componente, flavonoidele și lignanii sunt reprezentativi pentru acest grup de arbori.

Din grupul flavonoidelor s-au descris:

- catechina,
- gallocatechina,
- mearusitrina,
- myricetina,
- procyanidina B-3,
- prodelphinidina,

- querectina,
- quercitrinul și
- camferolul [2].

Dintre bioflavonoide au fost evidențiate: bilobetina și amentoflavona.

Amentoflavona este prezentă într-o cantitate considerabilă în *T. occidentalis* și prezintă activitate mare antifungică împotriva unor fungi cu patogenitate înaltă și proprietăți antivirale împotriva virusului respirator sincițial.

În grupa *carbohidraților* intră:

- polizaharidele celulozice și
- non-celulozice (ex. xylan și manoză).

Glucidele hidrosolubile sunt reprezentate de:

- arabinogalactoză și
- pectine.

Lignanii sunt polifenoli și de-a lungul timpului au fost asociați cu activitatea antioxidantă, antivirală, antibacteriană, insecticidă, nematodicidă pe care o are *Thuja spp.* Lignanii izolați din *T. occidentalis* sunt reprezentați de:

- matairesinol,
- thujaplicatin metal eter,
- wikstromol,
- 8-hidroxi-thujaplicatin metal eter,
- 4-O-demetilatină,
- epi-pinoresinol,
- pinoresinol și
- secoisolariciresinol,

toate acestea fiind izolate din xilemul ramurilor [22].

Thujalignanii și lignanii sunt produșii metabolici reprezentativi ai extractului hidrofilic obținut din *T. occidentalis* remarcați pentru activitatea antioxidantă [2].

1.3. Proprietățile farmacologice

Thuja occidentalis are diverse proprietăți farmacologice. Acestea sunt exercitate de substanțe active ca:

- α -pinina,
- d- α -tujona,
- 1-frencona,
- 1-broneolul acetic,
- acidul andisovaleric,

- terpineolul,
- sabiena,
- camfenul,
- acidul camfor valerianic,
- occidol- β -sitosserolul,
- quercetin rhodoxantina,
- taninuri,
- mucilagii și
- vitamina C [3, 11].

Se consideră ca *Thuja spp* are activitate antivirală și imunostimulantă.

Astfel, s-a demonstrat că polizaharidele din compoziția preparatelor obținute din *T. occidentalis* inhibă activitatea virusului:

- imunodeficienței umane și a
- virusului gripal influenza tip A.

Acestea acționează prin inducerea limfocitelor T, mai ales a limfocitelor T CD4+ [10].

De asemenea, activitatea hepato-protectoare a fost demonstrată prin protecția pe care o asigură ficatului în insuficiență hepatică acută sau cronică, prin intermediul:

- flavonoidelor,
- taninurilor și
- polizaharidelor [9].

Compușii fenolici acționează protector asupra mucoasei gastrice în leziunile provocate de aspirină, stres, alcool sau acid clorhidric [10].

Proprietățile antidiabetice au fost demonstrate prin administrarea șoarecilor Wistar albinoși o doză de 200mg/kgc, extract de *T. occidentalis* care a dus la o creștere semnificativă a glutationului, care are efect antioxidant. S-au mai observat îmbunătățiri și în ceea ce privește greutatea corporală și profilul lipidic al șoarecilor.

Se consideră că, această acțiune este datorată prezența flavonoidelor, acidului tanic, a polizaharidelor și a proteinelor din această fracțiune [8].

Într-un studiu efectuat *in vitro*, s-a demonstrat activitatea antifungică a diluției homeopate obținută din *T. occidentalis* împotriva unor specii de fungi: *Aspergillus flavus* și *Aspergillus niger*. Acesta a acționat asupra fungilor prin inhibarea sporulării și exudației.

Într-un alt studiu *in vitro*, s-a pus în evidență activitatea puternică antimicrobiană a extractului metanolic de *T. occidentalis* împotriva unor bacterii Gram-negative și Gram-pozitive (ex. *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Shigella flexenari*, *Yersinia aldovae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) și fungi (*Saccharomyces cereviciae*, *Aspergillus parasiticus*, *Trichophyton rubrum*, *Yersinia aldovae and Candida albicans*) [19, 29].

Constituenți ai uleiului esențial de *T. occidentalis* ca:

- sabinyl acetatul,
- fenconă,
- sabienă,
- β -tujona,
- α -pinena și
- terpinen-4-ol,

au demonstrat că acesta are activitate antimicrobiană împotriva *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, iar α -tujona și β -tujona sunt foarte active împotriva bacteriilor Gram negative (*Pseudomonas aeruginosa* și *Klebsiella pneumoniae*).

În studiile făcute pentru determinarea efectului inhibitor al *T. occidentalis* asupra *Pseudomonas aeruginosa* folosind tehnica densității optice, s-a demonstrat că extractele apoase și alcoolice de *T. occidentalis* au fost eficiente împotriva *P. aeruginosa* la o concentrație de 50%, în timp ce la o concentrație de 10% aceste extracte au fost mai puțin eficiente. Activitatea antibacteriană și antimicrobiană a uleiurilor esențiale obținute din frunze și conuri de *T. occidentalis* a fost testată asupra a șapte microorganisme:

- *Staphylococcus aureus*,
- *Aeromonas hydrophila*,
- *Escherichia coli*,
- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Salmonella thyphimurium*,
- *Aspergillus flavus* și
- *Aspergillus niger*.

Ambele uleiuri au fost eficiente, dar o activitatea microbiană mai crescută s-a observat la uleiul esențial obținut din frunze. Efectul antifungic a fost cel mai puternic. Se consideră că această proprietate a uleiurilor se

datorează pinenei, care este componentul major al ambelor uleiuri [15, 23, 25].

1.4. Noțiuni despre uleiurile esențiale de Thuia

Uleiurile esențiale, sunt definite ca lichide parfumate extrase din diferite părți ale unei plante: flori, frunze, semințe, tulpină, iar din punct de vedere chimic, uleiurile esențiale conțin numeroși compuși organici și grupări funcționale.

Uleiul esențial de *T. occidentalis* este obținut din frunze sau conuri și se folosește în industria farmaceutică și la parfumuri.

Acesta se obține prin hidrodistilare și se folosește în produsele farmaceutice datorită proprietăților farmaceutice.

De asemenea se folosește și la cosmetice, săpunuri, deodorante, spray-uri de cameră, detergenți, dezinfectante și insecticide [14].

Din cauza prezenței tujonei, care este toxică și poate provoca amețeli și convulsii, dozarea uleiului trebuie controlată atent.

Tujona pură este folosită ca ingredient activ în decongestionantele nazale și antitusive, iar datorită proprietăților anticancerigene se poate aplica în chimoterapie [27].

Există 3 metode de obținere a uleiurilor esențiale:

1. *Distilarea aburului* – metoda uzuală și cea mai des folosită.
2. *Extracția solventului* – metodă care se aplică atunci când se dorește obținerea unui component termosensibil sau care conține un constituent major non-volatil.
3. *Extracția din flori* - metodă folosită pentru petalele florilor delicate.

În general, constituenții majori ai uleiurilor esențiale obținute din frunzele de *Thuja spp.*, sunt:

- tujona,
- α -pinena,
- D-3-carena,
- sabienă și
- cedrolul [31].

Constituentul major la uleiului esențial este monoterpena tujona, component cu activitate farmacologică, component al decongestionantelor nazale, antitusivelor, parfumurilor.

Uleiul esențial obținut din *T. plicata* a fost pentru prima dată studiat de către Brandel, care a raportat prezența următoarelor componente: tujonă, fenconă și esterii ai borneolului. În uleiurile esențiale obținute din *T. occidentalis* s-a observat prezența următorilor compuși:

- borneol,
- camfenă,
- limonenă,
- miricenă,
- alfa terpină,
- terpinolenă,
- alcool thujyl,
- carvotanacetona,
- origanol,
- origane,
- mircenă și camfenă,
- sesquiterpenă occidenol.

Analiza uleiului esențial obținut din *Thuja occidentalis* a evidențiat prezența a 22 de compuși, inclusiv: α -tujonă (49,64%), fenconă (14,06%), β -tujonă (8,98%).

Au fost observate diferențe în ceea ce privește componența uleiurilor esențiale obținute din aceste specii. Acestea pot fi date de originea arborilor, de momentul recoltării, de metoda uscării, de intensitatea și durata iulminării, de temperatură, altitudine, anotimp, sol, nutriție și de procesul de extracție.

Într-un studiu s-a comparat conținutul în principii activi al uleiului esențial obținut din frunze și al celui obținut din conuri.

S-a observat faptul că uleiul esențial obținut din frunze are o structură mult mai complexă decât cel obținut din conuri [23].

Componentele majore ale uleiului esențial obținut din frunze sunt: pinena (34,4%), cedrolul (13,17%) și fellandrenul (8,04%), în timp ce în cel obținut din conuri predomină pinena (58,55%) și 3-carena (24,08%).

S-a pus în evidență faptul că uleiul esențial obținut din frunze are activitatea antioxidantă foarte mare [13].

Diferențe majore în conținutul de principii activi ai uleiurilor esențiale obținute din frunze de *T. orientalis* s-au observat la arborii proveniți din regiuni diferite.

De exemplu, componentele majore din uleiul esențial de *T. orientalis* provenit din Iran sunt: pinenă (21,9%), cedrol (20,3%), D-3-carena (10,5%), și limonenă (7,2%), în timp ce la cel provenit din Himalaya constituenții majori sunt: pinenă (29,2%), D-3-carena (20,1%), cedrol (9,8%), cariofilen (7,5%) și limonenă (5,4%).

Aceste diferențe se datorează variabilității genetice, condițiilor de climat, sezonului de recoltare, compoziției solului și procesului de uscare [18, 26].

Uleiul esențial obținut din *Thuja occidentalis* în combinație cu pudra de caolin este folosit pentru fumigații împotriva insectelor.

Uleiul esențial de *Thuja spp.* intră în componența analgezicelor, a dezinfectantelor, spray-urilor, decongestionantelor nazale.

Datorită mirosului caracteristic pe care îl au aceste uleiuri ele sunt utilizate în fabricația parfumurilor.

De asemenea sunt utilizate și în industria alimentară, ca și corectori de gust. Indiferent de ramura industrială în care sunt folosite aceste uleiuri, tujona nu trebuie să se regăsească în produsul finit.

În scopuri medicinale, uleiurile se administrează extern și trebuie folosite cu atenție, deoarece tujona este neurotoxică. Simptomele intoxicației cu tujonă constau în: convulsii, gastroenterită, flatulență și hipotensiune.

Beneficiile uleiurilor esențiale sunt variate.

Astfel, aplicate pe piele au efect:

- antireumatic,
- tonic,
- diuretic și astringent,
- stimulează nervii periferici și
- reduce iritațiile.

Inhalat, acționează ca decongestionant al căilor nazale, antitusiv și expectorant.

Datorită proprietăților antivirale a componentelor uleiurilor, acționează ca adjuvant în virozele respiratorii, reducând severitatea și durata lor.

2. Studiul uleiurilor esențiale de Thuia

2.1. Materiale și Metode

2.1.1. Descrierea uleiului esențial de thuia folosit în studiu

În studiu a fost folosit uleiul esențial de thuia, ulei procurat din comerț (fig.3.1).



Figura 5. Uleiul esențial Thuia

Producătorul specifică că, uleiurile esențiale sunt 100% pure și naturale, botanic și biochimic definite, nerectificate, nedenaturate și nu conțin ingrediente sintetice sau solvenți. Uleiul a fost obținut prin distilarea ramurilor și a scoarței de Thuia cu vapori de apă.

Uleiul esențial de Thuia are o aromă lemnoasă, caldă, cu miros de pământ. Oferă o protecție puternică împotriva factorilor nocivi sezonieri și de mediu.

Are proprietăți puternice depurative și contribuie la buna funcționare a celulelor.

Thuia este cunoscut și sub denumirea de "Arborele vieții" sau "Arbor vitae".

Este un agent puternic de curățare și purificare a organismului. Uleiul esențial de Thuia are o acțiune antiinflamatoare, antiseptică, antivirală, antidepresivă, tonică.

2.1.2. Identificarea compușilor volatili din uleiul esențial de thuia prin metoda GC-MS

Analiza probei luată în studiu s-a realizat cu ajutorul gaz cromatografului model Agilent Technology 7820A (AGILENT Scientific, Santa Clara, CA, SUA), cuplat cu spectrometrul de masă MSD 5975 și dotat cu o coloană capilară DB WAX (30 m x 250 pm x 0,25 pm).

Gazul folosit a fost heliu cu un debit de masă de 1 ml/min.

Pentru separarea compușilor, s-a folosit programul de cuptor: 40 °C timp de 1 min, 5°C min⁻¹ până la 210°C timp de 5 min.

Temperaturile injectorului și ale sursei de ioni au fost de 250 și respectiv 150 °C.

Volumul de injectare a fost de 1 μl din fiecare ulei sau amestec pur, fără solvent, cu un raport de divizare 1:20.

Pentru identificarea compușilor volatili a fost utilizată biblioteca de spectre NIST.

Identificarea a fost făcută prin compararea spectrelor de masă cu cele stocate în bibliotecile NIST 02, Wiley 275.

Valoarea procentuală a componentelor individuale a fost calculată pe baza zonelor de vârf ale GC fără a utiliza factori de corecție.



Figura 6. Gaz cromatograful Agilent Technology, model 7820A (AGILENT Scientific, CA, SUA)

2.1.3. Testarea efectului antimicrobian a uleiului esențial de Thuia

Testarea efectului antimicrobian a uleiului esențial de Thuia s-a realizat prin metoda discurilor, conform Normelor Standard pentru Testarea Sensibilității Antimicrobiene a Discurilor Impregnate.

Pentru testarea efectului antimicrobian s-au folosit tulpini de catalog din două specii bacteriene Gram negative:

- *Proteus vulgaris* și
 - *Salmonella typhimurium*)
- și două specii Gram pozitive:
- *Staphylococcus aureus* și
 - *Bacillus subtilis*.

Din speciile bacteriene testate s-au preparat inițial culturi tinere de 24 de ore după cum urmează: pe o placă Petri cu geloză nutritivă s-au făcut însămânțări cu ansa

bacteriologică pentru obținerea de colonii izolate. După incubarea la termostat timp de 24 ore la 37°C din fiecare cultură corespunzătoare speciilor bacteriene folosite s-a preluat o colonie cu o ansă bacteriologică care s-a trecut în 10 ml bulion nutritiv.

Tuburile cu bulion s-au incubat apoi la termostat timp de 24 ore la 37 °C.

Acestea au fost considerate culturi proaspete și pure.

Din fiecare specie bacteriană aleasă pentru testare s-au făcut apoi diluții pentru obținerea unei densități celulare de 10^7 /ml. Verificarea densității s-a realizat cu scara McFarland.

În vederea testării mediul de cultură, geloza nutritivă s-a turnat în plăci Petri sterile. S-a folosit câte o placă pentru fiecare cultură bacteriană. După solidificarea mediului, plăcile s-au menținut la termostat aproximativ 15 minute pentru eliminarea condensului care se formează pe capacul plăcilor datorită diferenței de temperatură dintre placă și mediul de cultură. Apoi, pe suprafața mediului de cultură repartizat în plăci s-a însămânțat câte 1 ml, din fiecare cultură pregătită.

Prin mișcări de rotire s-a realizat repartizarea uniformă a culturii pe suprafața mediului. Excesul de lichid s-a aspirat.

Plăcile s-au lăsat apoi în repaus timp de 15 minute pentru ca, corpii bacterieni să facă contactul cu mediul de cultură.

Au fost folosite discuri sterile Whatman (6mm) care au fost încărcate cu 20 μl ulei esențial de Thuia și depuse pe mediul de cultură inoculat.

Plăcile au fost incubate la 37°C pentru 24 h. Activitatea antimicrobiană a uleiului esențial de Thuia a fost studiată pe trei concentrații: 25%, 50%, 75% de ulei esențial.

Plăcile au fost incubate timp de 24 de ore la 37 °C, după care a fost măsurat diametrul zonei de inhibiție și exprimat în mm.

Controlul negativ a fost pregătit folosind DMSO ca și solvent, și amoxicilină ca și control pozitiv.

Toate determinările au fost realizate în triplicat iar pentru analiza statistică a fost folosit soft-ul pentru evaluarea unei analize unilaterale a varianței (ANOVA) la $p \leq 0.05$.

2.2. Rezultate și Discuții

2.2.1. Identificarea compușilor volatili din uleiul esențial de Thuia prin metoda GC-MS

În urma analizei gaz cromatografice cuplată cu spectrometrie de masă, pentru uleiul esențial de Thuia au fost identificați următorii compuși prezentați în cromatogramă (fig. 7.), tabelul 1 și figura 8.

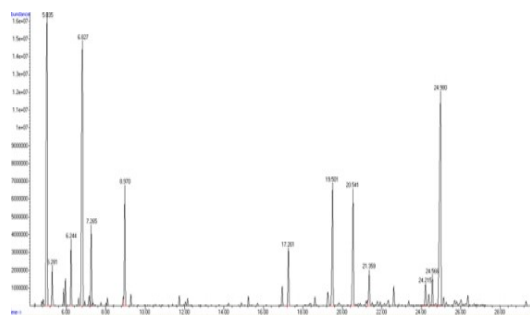


Figura 7 Cromatograma uleiului esențial de Thuia

Tabelul 1.
Compușii volatili identificați în uleiul esențial de Thuia

Compus	R. I	Conc. %
<i>Hydrocarburi monoterpene</i>		
1 α -Pinene	935	22,25
Camphene	947	1,32
Sabinene	970	0,54
β -Pinene	974	0,88
β -Myrcene	992	2,16
3-Carene	1012	20,47
p-Cymene	1020	0,49
Limonene	1024	3,38
Terpinolene	1092	4,58
<i>Monoterpene oxigenate</i>		
Terpinen-4-ol	1172	0,58
α-Terpinyl acetate	1280	2,72
<i>Hydrocarburi sesquiterpene</i>		
β -Elemen	1386	0,36
α-Cedrene	1412	0,81
β -Caryophyllene	1416	6,12
α-Humulene	1452	5,57
γ -Cadinene	1476	0,40
δ -Cadinene	1479	0,81
<i>Sesquiterpene oxigenate</i>		
Spathulenol	1511	1,12
α-Cadinol	1541	0,67
Caryophyllene oxide	1581	0,62
Cedrol	1654	19,21

În urma analizei gaz cromatografice în uleiul esențial de Thuia au fost identificate 21 componente, acestea însumând 95,06% din compoziția totală de ulei esențial și reprezintă

patru grupe diferite de hidrocarburi, și anume; *hidrocarburi monoterpenice*, *monoterpene oxigenate*, *hidrocarburi sesquiterpenice* și *sesquiterpene oxigenate*.

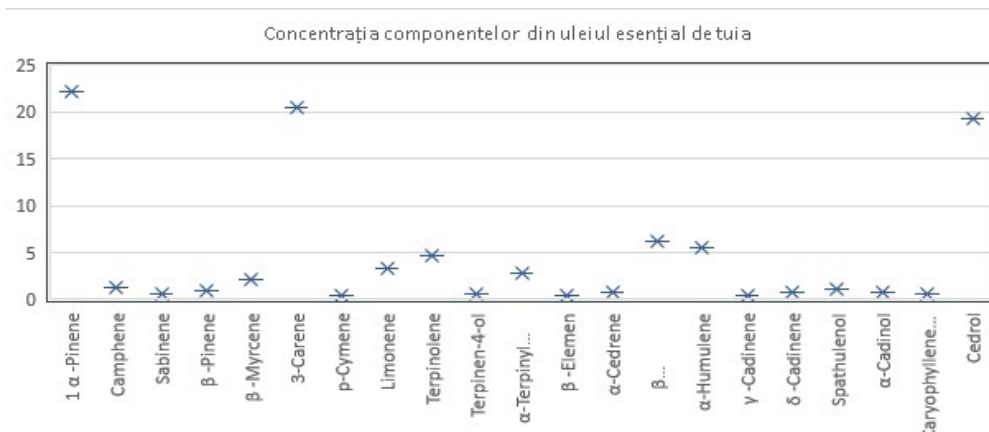


Figura 8. Reprezentarea grafică procentuală a componentelor din uleiul esențial de Thuia

Hidrocarburile monoterpenice au constituit grupul chimic cel mai dominant (56,07%) și dintre componente:

- α-pinenul (22,25%), urmat de
- 3-carene (20,47%),
- terpinolene (4,58%),
- limonen (3,38%),
- β-myrcene (2,16%) și
- camphene (1,32%).

Monoterpenele oxigenate însumează 3,3% din componentele uleiului esențial de Thuia, iar cea mai mare proporție a fost a acetatului de α-terpinil (2,72%).

Hidrocarburile sesquiterpene au fost în proporție de 14,07%, acestea incluzând ca și compuși predominanți:

- B-cariofilenul (6,12%) și
- α-humulenu (5,57%).

Sesquiterpenele oxigenate reprezintă 21,62% din compoziția uleiului esențial de Thuia și au avut ca și componente majore:

- cedrol (19,21) și
- spathulenol (1,12).

Compoziția uleiului esențial a arătat unele asemănări cu studii anterioare realizate de alți cercetători, dar cu diferențe în ceea ce privește regiunea în care planta a fost cultivată.

De exemplu, componentele majore din uleiul esențial de *T. orientalis* provenit din Iran sunt:

- pinen (21,9%),
 - cedrol (20,3%),
 - D-3-carenă (10,5%), și
 - limonen (7,2%),
- în timp ce la cel provenit din Himalaya constituenții majori sunt:
- pinen (29,2%),
 - D-3-carenă (20,1%),
 - cedrol (9,8%),
 - cariofilen (7,5%) și
 - limonen (5,4%).

Aceste diferențe se datorează variabilității genetice, condițiilor de climat, sezonului de recoltare, compoziției solului și procesului de uscare [32].

Un alt studiu realizat în Pakistan a arătat că, uleiul esențial de Thuia are 22 de componente principale reprezentate de:

- α-pinen (40,6 %),
- beta-caryophyllen (6.8%),
- cedrol (10.7 %),
- alloaromadendren (7.8%),
- β -mircen (3,7 %) și
- R-+-limonen (3.2%),

iar un alt studiu realizat în Egipt pune în evidență 23 componente principale, cele mai predominante fiind:

- α pinenul (21,83%),
- β-pinenul (6,71%),
- β-cariofilina (12,07),
- α-cedrolul (6,86%),

- β -selinenul (6,15%), și
- limonina (5,49%) [18, 28].

2.2.2. Testarea efectului antimicrobian a uleiului esențial de Thuia

Activitatea antimicrobiană *in vitro* a uleiului esențial de Thuia împotriva unor

microorganismelor a fost evaluată calitativ și cantitativ prin metoda de microdiluție.

Zonele de inhibiție împotriva microorganismelor testate sunt prezentate în tabelul 2 și fig. 9.

Tabelul 2.

Rezultatele efectului antimicrobian pentru uleiul esențial de thuia

Concentrație	Diametrul haloului zonei de inhibiție (mm)			
	25%	50%	75%	Amoxicilina
Gram pozitivi				
<i>Bacillus subtilis</i>	12,6±0,14	14,8±0,11	30,12±0,16	39,4±0,11
<i>Staphylococcus aureus</i>	21,8±0,12	24,18±0,12	35,42±1,08	NA
Gram negativi				
<i>Proteus vulgaris</i>	NA	NA	18,05±0,7	42,2±0,32
<i>Salmonella typhimurium</i>	NA	NA	NA	15,4±0,18

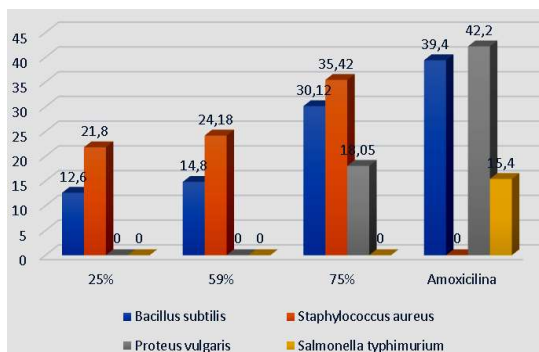


Figura 9. Reprezentarea grafică a zonei de inhibiție (mm) la cele trei concentrații de ulei esențial de Thuia

Rezultatele obținute pentru uleiul esențial de Thuia au arătat că, acesta are cea mai mare activitate împotriva gram pozitivilor, genurile:

- *Staphylococcus aureus* (35,42±1,08) și
- *Bacillus subtilis* (30,12 ±0,16),

în timp ce, aceasta nu a arătat nici o activitate împotriva *Salmonella typhimurium* (gram negativ), iar în cazul patogenului gram negativ *Proteus vulgaris*, activitatea antimicrobiană a fost obținută numai la concentrația maximă aplicată (18,05 ±0,7 comparativ cu 42,2 ±0,32 la amoxicilină).

Rezultatele obținute în acest studiu sunt asemănătoare și cu ale altor cercetători care, susțin activitatea antimicrobiană a uleiului esențial de Thuia, în special împotriva patogenilor gram pozitivi [24, 31].

2.3. Concluzii

În urma studiului efectuat pe uleiul esențial de Thuia privind analiza cromatografică și testarea eficacității antimicrobiene, putem concluziona că:

- uleiul esențial de Thuia are efecte inhibitoare semnificative împotriva unor bacterii gram-pozitive și gram-negative, care sunt asociate cu boli clinice;
- este mai eficient împotriva gram pozitivilor decât a gram negativilor;
- ineficient împotriva *Salmonella typhimurium*;
- componentele majore identificate au fost:
 - α -pinenul,
 - 3-carene,
 - terpinolenul,
 - limonenul,
 - β -myrcenul și
 - camphenul iar,
- prezența acestor compuși arată că, uleiul esențial de Thuia posedă un mare potențial de utilizare în multe aplicații medicale.

Bibliografie

1. Alves, L.D.S., Figueirêdo, C.B.M., Silva, C.C.A.R., Marques, G.S., Ferreira, P.A.,

- Soares, M.F.R., Silva, R.M.F., Rolim-Neto, P.J., 2014**, *Thuja Occidentalis* L. (Cupressaceae), Review of Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Aspects, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 5(4):1163-1177.
2. **Aragón, Z., 2005**, Lignanols (I): estructura y funciones en las plantas, *Revista de fitoterapia*, 5 (1): 55-68.
 3. **Bellili, S., Aouadhi, C., Dhifi, W., Ghazghazi, H., Jlassi, C., Sadaka, C., El Beyrouthy, M., Maaroufi, A., Cherif, A., Mnif, W., 2018**, The Influence of Organs on Biochemical Properties of Tunisian *Thuja occidentalis* Essential Oils, *Symmetry*, 10(11):649
 4. **Bucur, V., 2005**, *Acoustics of Wood*, Springer Berlin Heidelberg
 5. **Bushra, M., 2017**, Study of the inhibitory effect of *Thuja occidentalis* against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from surgical wounds in vitro and in vivo, *International Journal of Science and Nature*, 8(2):352-357
 6. **Ciocârlan, V., 2000**, *Flora ilustrată a României*, Editura Ceres, București.
 7. **Clinovschi, F., 2005**, *Dendrologie*, Editura Universității Suceava
 8. **Dubey, S.K., Batra, A., 2008**, Anti diabetic activity of *Thuja occidentalis* Linn, *Research Journal of Pharmacy and Technology* 1(4): 362-365.
 9. **Dubey, S.K., Batra, A., 2008**, Hepatoprotective activity from ethanol fraction of *Thuja occidentalis* Linn., *Asian Journal of Research in Chemistry*, 1(1): 32-35.
 10. **Dubey, S.K., Batra, A., 2009**, Role of phenolic compound rich ethanol fraction of *Thuja occidentalis* Linn. in protective mechanism, *Journal of Pharmacy Research* 2(2): 217-225.
 11. **Dut Jasuja, N., Sharma, S., Choudhary, J., Joshi, S.C., 2013**, Essential Oil and Important Activities of *Thuja orientalis* and *Thuja occidentalis*, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(4):931-949.
 12. **Farmacopeia Homeopática Brasileira, 2011**, *Thuja occidentalis*. Fundação Oswaldo Cruz, third edition.
 13. **Gohla, S.H., Zeman, R.A., Bogel, M., Jurkiewicz, E., Schrum, S., Haubeck, H.D., Schmitz, H., Hunsmann, G., Neth, R.D., 1992**, Modification of the vitro replication of the Human Immunodeficiency Virus HIV-1 by TPSg, a Polysaccharide Fraction Isolated from the Cupressaceae *Thuja occidentalis* L. (Arborvitae), *Haematology Blood Transfusion*, 35: 140-149.
 14. **Guleria, S., Kumar, A., Tiku, A.K., 2008**, Chemical composition and fungitoxic activity of essential oil of *Thuja orientalis* L. grown in the north-western Himalaya. *Z. Naturforsch*, 63:211–214.
 15. **Gupta, G., Srivastava, A.K., 2002**, In vitro activity of *Thuja occidentalis* Linn. against human pathogenic *Aspergilla*, *The Homeopathic Heritage*, 27(1): 5-12.
 16. **Hoffmann, D., 2003**, *Medical Herbalism: Principles and Practices*, Healing Arts Press p.588.
 17. **Hold, K.M., Sirisoma, N.S., Ikeda, T., Narashashi, T., Casida, J.E., 2000**, Alpha-thujone (the active component of absint): gamma-aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97(8):3826-31.
 18. **Ibrahim, Magda T., Nevein, M., Abdel-Hady., Lamiaa, N., Hammad., 2004**, GC/MS Analysis and biochemical studies of the essential oil of *Thuja Orientalis* L. growing in Egypt. *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.*, Vol. 42, No. 1.
 19. **Jahan, N., Ahmad, M., Zia-Ul-Haq M., Alam, S., Qureshi, M., 2010**, Antimicrobial screening of some medicinal plants of Pakistan, *Pakistan Journal of Botany* 42(6): 4281-4284.
 20. **Johnston, W.,F., 2008**, *Thuja occidentalis*, *Conifers. Silvics of North America*, Washington, D.C.
 21. **Jung, H.J., Sung, W.S., Yeo, S., Kim, H.S., Lee, I., Woo, E., Lee, D.G., 2009**, Antifungal effect of amentoflavone derived from *Selaginella tamariscina*, *Archives of Pharmacal Research*, 29 (9): 746-751.
 22. **Kéïta, S.M., Vincent, C., Schmidt, J.P., Arnason, J.T., 2001**, Insecticidal effects of *Thuja occidentalis* (Cupressaceae) essential oil on *Callosobruchus maculatus*

- [Coleoptera:Bruchidae], Canadian Journal of Plant Science, 81(1):173-177.
23. **Lis, A., Liszkiwicz, R., Krajewska, A., 2016**, Comparison of chemical composition of the essential oils from different parts of *Thuja occidentalis* L. 'Brabant' and *T. occidentalis* L. 'Smaragd', *Herba Polonica*, 62(3):20-27.
 24. **Mohamad, J. K., Ghaytha, M., Bahira, Z., 2016**, Antibacterial and Phytochemical Investigation of *Thuja orientalis* (L.) Leaves Essential Oil from Syria, *IJCPR*, Volume 7(5).
 25. **Naser, B., Bodinet, C., Tegtmeier, M., Lindequist, U., 2005**, *Thuja occidentalis* (Arbor vitae): A Review of its pharmaceutical, pharmacological and clinical properties, Evidence-based complementary and alternative medicine, (1): 69-78.
 26. **Nickavar B., Amin, G., Parhami, S., 2003**, Volatile constituents of the fruit and leaf oils of *Thuja orientalis* L. grown in Iran. *Zeitschrift für Naturforschung Teil C Biochemie Biophysik Biologie Virologie* 58:171-172.
 27. **Pietarinen, S.P., Willför, S.M., Ahotupa, M.O., Hemming, J.E., Holmbom, B.R., 2006**, Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials, *Journal of Wood Science*, 52: 436–444.
 28. **Riaz, M., Rashid, M. K., Chaudary, F. M., 2005**, Volatile Constituents of the Leaves Pakistani *Cupressus sempervirens* and *Thuja orientalis*, *Pakistan Journal of Science and Industrial Research*, Vol. 42, No. 2, pp.98-101
 29. **Shiv Nandan, S., Sunil, R., Man Kumar, T., 2017**, Antibacterial Effects of *Thuja* Leaves Extract, *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 5(2):256-260
 30. **Sulea, D., Leca, M., 2009**, Collagen-*Thuja* tincture biomaterials for wound treatment, *Revue Roumaine de Chimie*, 54(11-12):1097-1101.
 31. **Tsiri, D., Graiku, K, Poblock-Olech, L., Krauze-Baranows, M., Spyropoulos, C., Chinou, I., 2009**, Chemosystematic Value of the Essential Oil Composition of *Thuja* species Cultivated in Poland – Antimicrobial Activity, *Molecules* 14(11):4707-4715.
 32. **Wajaht, A.S., Mahpara, Q., 2014**, Chemical composition, Antioxidant and Antibacterial activity of *Thuja Orientalis* essential oil. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(1): 56-61.
- Web sites**
33. ***https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thuja_plicata_%27Zebrina%27_leaves_01_by_Line1.jpg
 34. ***<https://conifersociety.org/conifers/thuja-standishii/>
 35. ***<https://www.gardenia.net/plant/thuja-occidentalis-smaragd>
 36. ***<http://www.pinetum.org/sp/THsutchuenensis.html>
 37. ***<https://treesandshrubsonline.org/articles/thuja/thuja-koraiensis>